

---

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie  
Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Einfluss von biodegradierbaren PLLA(Poly-L-Lactid)-  
Nanofasern auf die Knochenheilung am standardisierten  
Critical-Size-Defektmodell der Ratte**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Jan Thomas Schaefer**

aus Schlüchtern

Schlüchtern 2012

---

---

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 05.12.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Markus Schofer

1.Koreferent: Prof. Dr. Steiniger

<b>1.: EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1: ÜBERSICHT VERSCHIEDENER KNOCHENERSATZMATERIALIEN .....	3
1.2: ELEKTROSPINNEN VON NANOFASERN AUS POLY-L-LACTID (PLLA).....	10
1.3: DER TUTOPLAST-PROZESS .....	11
1.4: TISSUE ENGINEERING IN DER MODERNEN ORTHOPÄDISCHEN FORSCHUNG.....	12
1.5: IN VITRO FORSCHUNG AN NANOFASERN AUS PLLA.....	13
1.6: KLINISCHE RELEVANZ VON PSEUDARTHROSEN UND WEITEREN HEILUNGSSTÖRUNGEN .....	15
1.7: PHYSIOLOGIE DER FRAKTURHEILUNG .....	18
1.8: DIE FAMILIE DER BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs) UND SMADS .....	24
<b>2.: FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN .....</b>	<b>27</b>
<b>3.: MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
3.1: GRUNDAUFBAU DER VERSUCHSREIHE.....	28
3.2: PARAMETER DER NANOFASERSYNTHESE .....	29
3.3: ANÄSTHESIE UND OPERATIONSVERFAHREN .....	29
3.3.1: <i>Anästhesie</i> .....	29
3.3.2: <i>Operationsverfahren</i> .....	30
3.4: POSTOPERATIVE NACHBETREUUNG UND PFLEGE DER TIERE.....	33
3.5: GEWINNUNG DER KNOCHEN- UND BLUTPROBEN .....	34
3.6: VORBEREITUNG DER GEWEBEBEPROBEN ZUR HISTOLOGISCHEN AUSWERTUNG.....	34
3.7: HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG UND FÄRBESCHEMATA.....	36
3.8: TECHNISCHE PROGRAMME ZUR HISTOMORPHOMETRIE UND ZELLZÄHLUNG.....	39
3.8.1: <i>Ausmessung der neu gebildeten Knochenmenge durch Leica QWin</i> .....	40
3.8.2: <i>Zellauszählung durch ImageJ</i> .....	40
3.8.3: <i>Ausmessung der Osteocalcin-positiven Zellen durch ImageJ</i> .....	41
3.8.4: <i>Auszählung BMP-2- und SMAD5-positiver Zellen durch ImageJ</i> .....	41
3.9: STATISTISCHE DATENANALYSE .....	42
<b>4.: ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
4.1: GEWICHTSVERLAUF DER TIERE .....	43
4.2: ZELLZÄHLUNGEN IM HE-PRÄPARAT .....	43
4.3: AUSMESSUNG DER KNOCHENNEUBILDUNG IM MASSON-GOLDNER PRÄPARAT .....	44
4.4: ANZAHL OSTEOCALCIN-POSITIVER ZELLEN.....	45
4.5: ANZAHL BMP-2-POSITIVER ZELLEN.....	45
4.6: ANZAHL SMAD5-POSITIVER ZELLEN.....	47
4.7: LABORCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	47
4.8: HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER PRÄPARATE.....	49
4.8.1: <i>Allgemeine Morphologie der Präparate in der HE und Masson-Goldner Färbung</i> .....	49
4.8.2: <i>Antikörperfärbung gegen BMP-2 und SMAD5</i> .....	56
4.8.3: <i>Antikörperfärbung gegen Osteocalcin</i> .....	58
4.8.4: <i>Antikörperfärbungen gegen Kollagen 1A1</i> .....	59
<b>5: DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
5.1: ÜBERPRÜFUNG DER AUSGANGSHYPOTHESEN .....	61

---

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>72</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>77</b>

# **1.: Einleitung**

Knochenheilungsstörungen sowie Knochendefekte stellen ein Problem in der orthopädischen Praxis dar. Oft sind alte Menschen betroffen, welche unter der zunehmenden Immobilisierung leiden. Therapeutische Optionen wie Auto- oder Allografts sind mit verschiedenen Komplikationen verbunden und stehen daher nur in einem begrenzten Umfang zur Verfügung. Um diese Engpässe zu lösen, wird an Knochenersatzmaterialien geforscht. Neben aufgearbeiteter boviner Spongiosa kommen unterschiedliche Keramiken zum Einsatz. Ein neuer Erfolg versprechender Werkstoff ist PLLA, ein Polymer aus Milchsäuren. Dieses kann durch die Art der Verarbeitung in verschiedenste Festkörperformen überführt werden, z.B. als solides Material oder feines, dreidimensionales Netz.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Biokompatibilitätsprüfung dieses neuen Werkstoffes im Lebewesen. Aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse wurde ein dreidimensionales poröses Netz aus PLLA Fasern dafür verwendet. Es wurde dazu das Heilungsverhalten von 5mm messenden kreisrunden Defekten in der Schädelkalotte von Ratten untersucht. Dabei wurde der Defekt entweder leer belassen, mit Tutobone© oder PLLA aufgefüllt und nach vier, acht und zwölf Wochen evaluiert.

Die folgenden theoretischen Grundlagen dienen dem tieferen Verständnis der Arbeit. Dazu wird eine Einleitung über die aktuellen Knochenersatzmaterialien, im Speziellen PLLA, gegeben, im Anschluss die klinische Relevanz dieses Themas beleuchtet. Abschließend werden elementare Prozesse der Frakturheilung sowie wichtige Marker der Knochenheilung und Wachstumsfaktoren vorgestellt.

## **1.1: Übersicht verschiedener Knochenersatzmaterialien**

Zur Deckung von knöchernen Defekten sind verschiedene Arten von Knochenersatzmaterialien im Einsatz. Diese lassen sich entweder nach biologischem Effekt auf die Knochenheilung oder nach Art des verwendeten Materials unterscheiden. Nach Art des Materials werden diese unterteilt in (modifiziert nach (Nandi et al., 2010)):

- A) Am Menschen oder Tier durch Biopsie oder Operation erhaltene Materialien
- B) Keramiken
- C) Zemente
- D) Polymere

Eine Unterteilung nach dem Einfluss des Ersatzmaterials auf die Heilung wird nach K.H. Kraus (Kraus & Kirker-Head, 2006) gegliedert nach:

*a) Osteogene Ersatzmaterialien*

Materialien, welche knochenbildende Zellen und ein Arbeitsgerüst für diese Zellen bereitstellen, werden osteogene Materialien genannt. Autologe Implantate aus dem Beckenkamm sind als ideales Beispiel zu nennen und stellen auch gleichzeitig den Goldstandard bei der Auffüllung von Knochendefekten dar. Sowohl osteogene Zellen wie MSC und Osteoprogenitorzellen als auch das Gerüst mit den vielen unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren werden in suffizienter Weise durch autologe Implantate bereitgestellt.

*a) Osteoinduktive Ersatzmaterialien*

Materialien, welche die Fähigkeit besitzen, Knochen in anderen Lokalisationen als im Knochen wie im Muskel Knochen neu zu bilden, werden osteoinduktive Materialien genannt. Zur Bildung des Knochens ist die Rekrutierung von MSC und anderer osteogenen Zellen durch Chemotaxis aus dem Empfängerorganismus nötig. Das bekannteste Beispiel für ein osteoinduktives Material ist demineralisierte Knochenmatrix (DBM) wie Tutobone©, in welcher diese Chemokine wie BMPs, TGFs u.a. enthalten sind. Durch die Demineralisation werden diese Chemokine, welche in der Knochenmatrix normalerweise durch Calciumkristalle maskiert sind, wie bei einer Fraktur freigelassen und können ihre Wirkung entfalten.

*b) Osteokonduktive Ersatzmaterialien*

Materialien, welche lediglich das Gerüst für eine Knochenbildung liefern, werden osteokonduktiv genannt. Anders als die beiden erstgenannten, werden weder Wachstumsfaktoren noch Zellen bereitgestellt. Dennoch werden biologisch hohe Ansprüche an solch ein Material gestellt. Vor allem darf das Material keine Abstoßungsreaktion hervorrufen. Zum einen muss eine adäquate Adhärenz der Zellen an das Material gegeben sein. Dies kann nur durch optimale Interaktion der Zellen mit dem Material erreicht werden. Zum anderen ist es von essentieller Bedeutung für die Zellinvasion und den späteren Umbau zu Knochen, dass Gefäße die Möglichkeit haben, in das Zielgebiet einzudringen. Entsprechende Porosität, mit nicht zu kleinen oder zu großen Poren, bei gegebener Bioresorbierbarkeit sind solche Ansprüche an das Material.

Für diese Klasse von Materialien lassen sich mehrere Beispiele finden: Hydroxylapatit, Kollagen, Tricalcium-Phosphat, bioaktiviertes Glas sowie auch Polylactide und Polyglycolide.

### c) *Osteopromotive Ersatzmaterialien*

Materialien oder physikalische Stimuli, welche zu einer gesteigerten und/oder schnelleren Knochenheilung führen, werden osteopromotiv genannt. Allein sind diese Stimuli/Materialien aber nicht in der Lage, die Knochenbildung einzuleiten. Als derzeit bekanntestes Beispiel kann das so genannte platelet-rich plasma (PRP) gelten. Durch den hohen Gehalt an Thrombozyten, welche in ihren  $\alpha$ -Granula unter anderem TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF und IGF gespeichert haben, werden MSC und andere Zellen ins Zielgebiet angezogen. VEGF fördert die Angiogenese, PDGF und IGF-I stimulieren die osteogene Differenzierung und Mitose der Zellen (Kraus & Kirker-Head, 2006; Mizuno et al., 1990). Der physikalische Stress beeinflusst ebenso die Knochenheilung: Zu starke Kompression führt zu chondrogener Differenzierung, große Bewegungen zu Pseudarthrosen infolge Gefäß- und Gewebszerreißungen. Minimale bis moderate Bewegungen hingegen haben einen fördernden Effekt auf die Knochenbruchheilung. Dies scheint mit der Elongation und Deformierung der Zellen im Zusammenhang zu stehen, welches über intrazelluläre Signale zu vermehrter Mitoserate bei gleichzeitiger osteogener Differenzierung führt (McKibbin, 1978).

Im Bereich der Orthopädie stellen sich einige Grundvoraussetzungen an die eingesetzten Implantate (Bernstein, Bornhauser, Gunther, & Stiehler, 2009; Dr. Dr. Smeets & Dr. Dr. Kolk, 2010; Schmidt-Rohlfing, Tzioupis, Menzel, & Pape, 2009): Zuerst ist dabei die Biokompatibilität des Implantats zu nennen. Es darf weder eine Abstoßungsreaktion mit Entzündungsantwort entstehen, noch darf das Implantat selbst toxisch sein oder sich im Blut oder den peripheren Geweben anreichern. Der zweite wichtige Punkt ist die primäre Belastungsstabilität des Materials. Vor allem bei mechanisch stark beanspruchten Lokalisationen sollte das Material die Heilung durch genügende mechanische Belastbarkeit bei gleichzeitig vorhandener Elastizität unterstützen. Als ebenfalls wichtigen Punkt ist die Resorbierbarkeit des Stoffes zu nennen. Beim Umbau zum reifen Knochen sollte dabei die Stützfunktion nicht verloren gehen, was in dieser Phase zu Defekten und weiteren Brüchen führen kann. Daher sollte die Geschwindigkeit des Transplantatabbaus in etwa mit derjenigen der Knochenneubildung durch körpereigene Zellen übereinstimmen. Weder toxische, noch teratogene oder kanzerogene Stoffe sollten dabei in den Körper gelangen. Falls es jedoch

nicht vom Körper resorbiert werden kann, sollte eine gute Integration in den vorhandenen Knochen gegeben sein. Idealerweise hat ein derartiges Implantat neben diesen osteokonduktiven auch noch osteoinduktive bzw. osteogenetische Eigenschaften, welche zur erfolgreichen Überbauung des Defektes führen. Um die Besiedlung des Implantates zu gewährleisten, muss dieses Porosität aufweisen, ohne dabei die Stabilität im Frakturbereich nennenswert zu beeinflussen. Je höher die Porosität, desto größer ist die zu besiedelnde Oberfläche bei gleichzeitig abnehmender Stabilität. Aus ökonomischer Sicht spielt ebenso die Finanzierbarkeit eine wichtige Rolle. Neben diesen dem Material zuzuordnenden Eigenschaften sollte der Werkstoff zudem ausreichend und schnell verfügbar sein. Zurzeit werden diese Voraussetzungen noch von keinem bekannten Implantat in ausreichender Weise erfüllt.

Knochenelemente, welche durch eine Operation oder Biopsie gewonnen wurden, haben alle gewünschten Eigenschaften, die an das Transplantat an sich gestellt werden können, die Verfügbarkeit hingegen ist eingeschränkt: Autografts erzeugen keine Abstoßungsreaktion. Gleichfalls ist eine Unterstützung durch die mechanischen Eigenschaften des Implantates gegeben, wenngleich bei Verwendung von Spongiosa keine primäre Stabilität erreicht wird. Zudem werden durch die Knochenimplantate sowohl osteoinduktive, als auch osteokonduktive und osteogenetische Eigenschaften ausgeübt. Daher gilt der Autograft als Goldstandard in der Auffüllung knöcherner Defekte (De Long et al., 2007). Dabei wird autologes Knochenmaterial meistens aus dem Beckenkamm gewonnen (Sen & Miclau, 2007), die Tibia, der distale Radius oder Calcaneus eignen sich ebenfalls als Donorstelle (Brydone, Meek, & Maclaine, 2010). Es wird dabei die gut vaskularisierte Spongiosa zur Auffüllung der Defekte genommen. Spongiosa hat den Vorteil, dass bereits viele mesenchymale Stammzellen an den Ort der Fraktur bzw. Pseudarthrose implantiert werden. Gleichzeitig ist im Gegensatz zur Kortikalis eine wesentlich größere Oberfläche durch das Mark gegeben (Sen & Miclau, 2007). Die Kortikalis beinhaltet nur wenige Stammzellen und Osteozyten sowie Osteoblasten, aber eine bessere primäre Stabilität. Somit wirkt Kortikalis eher als osteokonduktives Material. Daher sind bei kleineren Defekten durch Spongiosa in der Regel bessere Ergebnisse zu erreichen (Nandi et al., 2010). Zur Defektdeckung werden neben autologen Knochenimplantaten *xenogene* Implantate wie Tutobone© verwendet, welche aus Rinderspongiosa mit anschließender Antigenelimination gewonnen werden. Daneben werden xenogene Transplantate z.B. auch aus den Kalkgerüsten von Meeresalgen (Algipor©)

gewonnen und sind vor allem im orofacialen Fachgebiet im Einsatz (Haers, Suuronen, Lindqvist, & Sailer, 1998; Schopper et al., 2003).

Auch allogene Implantate, welche z.B. bei einem Endoprothesenersatz der Hüfte gewonnen werden, werden im klinischen Alltag verwendet. Diese besitzen aber genau so wie xenogene Implantate keine osteogenetischen Eigenschaften, da sie durch verschiedene Verfahren frei von Zellen sind. Trotz zum Teil guter Resultate, kann es auch hierbei zur Persistenz des Defektes kommen. Besonders die Morbidität des Patienten als auch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Entnahmestellen grenzen die Anwendung autologen Materials ein. Schwierigkeiten wie Schmerzen an der Entnahmestelle, oberflächliche Infektionen, Serome und kleinere Hämatome traten in zehn Prozent der Patienten in einer Studie von Arrington et al. auf, welche zwischen 1983 bis 1993 am Brooke Army Medical Center durchgeführt wurde (Arrington, Smith, Chambers, Bucknell, & Davino, 1996). Bei etwa sechs Prozent fanden sich schwerwiegende Komplikationen wie Herniation abdomineller Organe durch große Donorstellen, Gefäßverletzungen, tief sitzende Infektionen, neurologische Symptome oder ausgedehnte Hämatome mit chirurgischem Behandlungsbedarf sowie Frakturen des Os Ilium. Die Entnahmestellen sind durch diese Komplikationen daher stark begrenzt.

Des Weiteren kann auch Knochenmark als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden, da dieses ebenfalls osteogenetische Eigenschaften ausüben kann (De Long et al., 2007). Knochenmark hat den Vorteil, dass es durch eine perkutane Aspiration gewonnen werden kann und somit mit geringerer Donormorbidität einhergeht (Nandi et al., 2010). Um die Zellzahl zu erhöhen und das Injektionsvolumen zu verkleinern, wird das Aspirat vorher zentrifugiert. Teilweise können diese Zellkonzentrate auch mit demineralisierter Knochenmatrix kombiniert werden, um den Defektbereich zu stabilisieren. Da es derzeit aber noch keine Level I Studie zur Wirksamkeit von Knochenmark zur Intervention von Knochendefekten gebe, könne nach De Long et al. aber noch keine definitive Aussage zur Wirksamkeit getroffen werden (De Long et al., 2007).

Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) kann in den Fällen, in denen weder Auto- noch andere Allografts zur Verfügung stehen, eine Behandlungsalternative darstellen. Per definitionem handelt es sich hierbei um ein Allograft, sie wird aber im klinischen Gebrauch oft davon abgegrenzt. Es bietet, da es demineralisiert wurde, keine Stabilität im Frakturspalt. Gleichzeitig ist es immunologisch neutral, da die antigenen Determinanten durch den Demineralisationsprozess eliminiert wurden (Tuli & Singh, 1978). Da bei diesen Prozessen aber die für die Knochenheilung wichtigen Faktoren wie BMPs und andere Wachstumsfaktoren nicht zerstört werden, kann DBM osteoinduktive Eigenschaften ausüben.

Diese seien aber von Präparat zu Präparat unterschiedlich. Gleichzeitig gebe es aber, so De Long (De Long et al., 2007), keine Level I Studien am Menschen, welche eine Wirksamkeit der DBM belegen würden, wenngleich durch die Demineralisierung die Wachstumsfaktoren im Knochen leichter zur Verfügung stünden (Rueger, 1998). Gleichzeitig besteht aber auch hierbei, wie bei anderen Allografts, die Gefahr der Übertragung von Krankheiten, auch wenn diese durch die Aufbereitungsmethoden und vorherige Selektion der Spender gering einzuschätzen ist.

Keramiken bieten eine weitere Option zur Behandlung von knöchernen Defekten. Zu diesen Keramiken zählen Produkte aus Kalzium-Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tricalcium Phosphat (TCP wie Cerasorb©) sowie bioaktive Gläser (z.B. Biogran©). Keramiken mit einem Verhältnis Calcium zu Phosphat Verhältnis von 3:1, wie es in TCP vorliegt, erwiesen sich dabei als besonders geeignet für die rekonstruktive Chirurgie (Klawitter & Hulbert, 1971). Hydroxyapatit, welches im Knochen den größten Anteil an anorganischer Substanz darstellt, zeigt somit eine sehr gute Biokompatibilität, welche aber durch Zink und Magnesium modifiziert werden kann (Nandi et al., 2010). Durch verschiedene Herstellungsverfahren werden aus diesen Grundsubstanzen Keramiken mit verschiedenen Eigenschaften hinsichtlich Porosität und Belastbarkeit erzeugt. Dennoch unterscheidet sich die synthetisch hergestellte Form z.B. in der Resorbierbarkeit. Synthetisch hergestelltes Hydroxyapatit wird wesentlich langsamer resorbiert und verbleibt teilweise Jahre lang im Körper. Es ist dabei weder osteogenetisch, noch osteoinduktiv, sondern lediglich osteokonduktiv. Dies kann aber durch die Inkorporation von Wachstumsfaktoren erreicht werden. Tricalcium Phosphat ist eine weitere Keramik, welche in verschiedenen Formen einsetzbar ist. Sowohl Blöcke, Granulate als auch Puder sind erhältlich. Die Porengröße scheint dabei von entscheidender Wichtigkeit der Osseointegration zu sein. Untersuchungen von Kuhne et al. deuten darauf hin, dass Porengrößen zwischen 300 und 500 $\mu\text{m}$  ideal sind (Kuhne et al., 1994). Zu große und zu kleine Poren vermindern die Fähigkeiten für Zellen, in das Implantat einzuwandern, was zu verminderter Zellzahl und geringerer knöcherner Überwachung führt. Da Tricalcium Phosphat schneller als Hydroxyapatit resorbiert wird, werden diese Materialien auch als biphasische Calciumphosphate kombiniert, um die Kinetik von Hydroxyapatit zu verbessern. Daneben gibt es viele weitere Keramiken wie „Bioglass“, ein resorbierbares Gemisch aus Silizium, Natriumoxid, Calciumoxid sowie Phosphat. Es stellt eine poröse Fläche für die Einwanderung von Zellen da, ohne dabei eine inflammatorische Reaktion zu provozieren (Nandi et al., 2010). Gleichzeitig werden aber wie bei den anderen Keramiken osteoinduktive Eigenschaften nicht gesehen. In all diese Keramiken können

Wachstumsfaktoren integriert werden, was möglicherweise zu einem besseren Heilungsverhalten führen kann und daher in wissenschaftlichen Arbeiten untersucht wird.

Zemente (oder Calciumphosphatzemente, CPCs) werden häufig bei orthopädischen Operationen eingesetzt. Vor allem in der Endoprothesenchirurgie haben sie einen festen Platz zur Integration und Stabilisierung der Prothesen im Hüftbereich erlangt. Es gibt sowohl in der Zusammensetzung, als auch in der Anwendung, Aushärtungszeit sowie Belastbarkeit und Resorptionskinetik starke Unterschiede zwischen den Materialien. In der Regel werden die Produkte in Pulverform mit einem flüssigen Aktivator ausgeliefert. Diese Komponenten werden dann während der Operation vermischt und z.B. in den Endoprothesenkanal gespritzt, wo sie nach fünf bis sieben Minuten ausgehärtet sind. Einige Produkte erhitzen sich dabei durch eine chemische Reaktion, andere wiederum erreichen lediglich Raumtemperatur. Nach etwa 4-24 Stunden haben die meisten Präparate Ihre Endfestigkeit und damit Belastungsstabilität erreicht (Dr. Dr. Smeets & Dr. Dr. Kolk, 2010). Die Belastbarkeit des Materials hängt wiederum z.B. von der Porosität und der Kristallzusammensetzung des Endproduktes ab. Auch hierbei gilt, dass zunehmende Porosität die Einwanderung von Zellen begünstigt, sich aber auf die Stabilität negativ auswirkt. Einfache Calciumphosphate sind dabei im Allgemeinen weniger stark belastbar als Dhallit (Noriam CRS©) (Dr. Dr. Smeets & Dr. Dr. Kolk, 2010). Die Abbaukinetik, wie schnell der Zement durch neuen Knochen ersetzt wird, ist unterschiedlich je nach Produkt. Dhallite entsprechen in etwa dem im Knochen vorkommenden Hydroxyapatit, weshalb es schneller durch osteoklastische Aktivitäten abgebaut wird als andere Zemente.

*Polymere* können aus verschiedenen Grundsubstanzen hergestellt werden und sind aktuell Schwerpunkt wissenschaftlicher Forschung. Je nachdem, ob diese im Körper verbleiben oder abgebaut werden, werden sie unterschieden in bioresorbierbare und nicht resorbierbare Polymere. Nach der Zusammensetzung der Polymere werden diese unterschieden in: Polyester (Homopolymere oder Kopolymere), Polyaminosäuren, Polyanhydride, Polyorthoester sowie Polyphosphazene (Rueger, 1998). Neben soliden Polymeren, welche schon seit längerem in odontologischen Bereichen als Schrauben und Platten eingesetzt werden (Haers et al., 1998; Pihlajamaki, Bostman, Tynninen, & Laitinen, 2006), werden in letzter Zeit dreidimensionale Netze aus Polymerfasern im Nanometerbereich untersucht, die durch Ihre Porosität und Ähnlichkeit zur extrazellulären Matrix eventuell soliden Materialien überlegen sind (Woo et al., 2009). Der Vorteil von soliden Polymeren liegt darin, dass durch ihre Biegsamkeit intraoperativ den Bedürfnissen angepasst werden können und in der Regel keine Entzündungsreaktion hervorrufen sowie gleichzeitig mechanische Belastbarkeit

gewährleisten können. Die Grundstoffe für Polymere stehen in nahezu unbegrenztem Umfang zur Verfügung, sie können an unterschiedliche Frakturen angepasst werden und können durch Sterilisationsverfahren problemlos keimfrei erzeugt werden. Auch wenn sie in Ihrer Grundform nur als Gerüst für Zellen dienen und keine osteoinduktiven Eigenschaften ausüben, so lassen sie sich mit Wachstumsfaktoren beladen, sodass sie zur Knochenbildung führen (Porter, Ruckh, & Popat, 2009; Schofer et al., 2008; M.D. Schofer et al., 2011; M. D. Schofer et al., 2011; Su et al., 2012). Aus diesen Gründen wird in letzter Zeit an bioresorbierbaren Nanofaserkonstrukten im Rahmen des so genannten Tissue engineering geforscht, welches in den folgenden Abschnitten dargestellt wird.

## 1.2: Elektrosponnen von Nanofasern aus Poly-L-Lactid (PLLA)

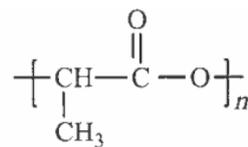


Abbildung 01: PLLA- chemische Strukturformel.

Nanofasern sind Konstrukte von so geringer Größe, dass sie mit dem menschlichen Auge nicht mehr erfasst werden können. Selbst die besten optischen Mikroskope sind nicht in der Lage, diese darzustellen. Ein Nanometer entspricht einer Größe von 1/100.000 Metern. Ein normaler Erythrozyt misst hingegen etwa 7,5 Mikrometer, also 7500 Nanometer (Greiner & Wendorff, 2007).

Es gibt eine Vielfalt an Stoffen, welche als Grundsubstanz für Fasern in dieser Größenordnung dienen können, wie zum Beispiel Poly-L-Lactid (PLLA), Polyvinylalkohol (PVA), Polystyrol, Poly-ε-caprolacton (PCL), Polyglycole (PGA) und viele weitere. In diese Fasern können gleichzeitig weitere Partikel wie Metalle, Keramiken, aber auch Enzyme, Viren oder Ähnliches eingearbeitet werden (Greiner & Wendorff, 2007).

Bei dem in dieser Dissertation verwendeten Polymer wurde als Grundsubstanz PLLA eingesetzt, welches zu feinen Matten von etwa 2mm Dicke gewoben wurde. PLLA bietet im Gegensatz zu anderen α-Hydroxy-Estern den Vorteil, dass es im Vergleich mit diesen zu einer höheren Zellproliferationsrate mit größerer Zelldichte führt (Li, Cooper, Mauck, & Tuan, 2006). Da vor der Durchführung dieses Tierversuches *in vitro* Versuche zum Wachstumsverhalten mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten auf dieser Matrix

erarbeitet wurden, wird ein einleitender Überblick über den Prozess des Elektrosplennens beleuchtet.

Der Prozess des so genannten Elektrosplennens, welcher zur Produktion der PLLA-Fasern angewandt wird, ist nicht neu, sondern wurde bereits 1934 durch Anton Formhals als Patent angemeldet. Das medizinische Interesse an den Fasern stellte sich aber erst in den letzten Jahren ein. Nanofasern können durch Elektrosplennen in einem Größenbereich von etwa einem Mikrometer bis hinunter zu wenigen Nanometern produziert werden (Boudriot et al., 2004).

Der Fertigungsprozess basiert im Wesentlichen auf den folgenden Schritten (Boudriot et al., 2004; Greiner & Wendorff, 2007): Zuerst wird ein Gemisch aus einem synthetischen Werkstoff mit verschiedenen Zusatzstoffen hergestellt, sodass eine in sich homogene Lösung entsteht. Im Fall von PLLA gesplennenen Fasern kann dies zum Beispiel eine Lösung aus 4 % Dichlormethan sein. Dieses Polymer wird nun in ein Gefäß mit aufgesetzter Düse überführt, welche in den meisten Fällen einen Durchmesser von einigen hundert Mikrometern hat. Dieses Gefäß ist vertikal angeordnet, mit der Düse nach unten auf Richtung Gegenelektrode zeigend. Nun wird zwischen der Düse, welche als Elektrode dient und der Gegenelektrode eine Spannung von 100-500 kV/m angelegt, sodass Ströme von circa 100 nA fließen. Durch die angelegte Spannung wird eine konusförmige Verformung des Polymertropfens, welcher an der Spitze der Düse hängt, von etwa 30° bewirkt. Unter der verwendeten Hochspannung tritt ein dünner Flüssigkeitsstrahl aus dem Tropfen aus und wird in Richtung Gegenelektrode beschleunigt. Auf dem Weg dorthin verdunstet das Lösungsmittel und es entstehen die fertigen Nanofasern, welche sich nun ungeordnet als eine Art Matte auf der Gegenelektrode beziehungsweise einem vorgeschalteten Auffangbehälter abscheiden. Die durch Nanofasern erzeugte Oberfläche ist derart groß, dass zum Beispiel aus einem Gramm Polyethylen eine Fläche von 40 m<sup>2</sup> erzeugt werden kann. Die resultierenden Fasern sind in einem dreidimensionalen Netz angeordnet, welches eventuell geeignet ist, die extrazelluläre Matrix nachzuahmen (Woo et al., 2009).

### **1.3: Der Tutoplast-Prozess**

Tutobone© gehört zur Gruppe der natürlichen Knochenersatzmaterialien. Es wird aus boviner Spongiosa durch den Tutoplast Prozesses gewonnen. In Deutschland wird Tutobone© in verschiedenen Ausführungen und auch individuell angepasst durch die Tutogen Medical GmbH, 91077 Neunkirchen vertrieben. Tutobone© wird im Allgemeinen zum Auffüllen

knöcherner Defekte bei Spondylodesen, Tumorresektionen, Hüft- und Kniegelenksrevisionen, Korrekturen von Fehlstellungen oder Trümmerfrakturen eingesetzt.

Der Tutoplast Prozess dient zum einen dem Ziel, eine möglichst geringe Antigenität des Implantats zu erzeugen, zum anderen dazu, die Implantate von pathogenen Keimen zu reinigen und letztlich die Wachstumsstoffe im Knochen zu konservieren. Gleichzeitig wird die hohe mechanische Belastbarkeit des Knochens erhalten (durchschnittlich 18mPa in den Implantaten laut Herstellerangaben). Dies wird durch verschiedene Schritte im so genannten Tutoplast Prozess erreicht, welcher im Folgenden kurz skizziert werden soll (Schoepf, 2006).

Der erste wichtige Schritt stellt die Delipidisierung dar. Hierbei werden die Lipide durch Ultraschall in einem Acetonbad entfernt. Dies ist wichtig, da die Lipide in den Heilungsprozess eingreifen und eine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Die Delipidisierung wirkt gleichzeitig auch viruzid auf HIV und HCV bei menschlichen Allografts. Anschließend werden Viren, Sporen und Bakterien durch eine Behandlung mittels Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eliminiert und gleichzeitig lösliche Proteine aus dem Implantat zerstört. Eine letzte Dehydratation durch Aceton mit nachgeschalteter Vakuumextraktion inaktiviert ebenso Prionen wie auch weitere Viren. Nach Abschluss dieses Prozesses werden die abgepackten Implantate nochmals mit einer niedrigen Dosis von 17-28kGy bestrahlt, um Kontaminationen während des Verpackungsprozesses auszuschließen. Die Knochenchips sind somit nach dem Tutoplastprozess frei von lebenden Zellen, aber dennoch nicht entkalkt. Die leeren osteozytären Lakunen stellen somit im histologischen Bild eine Hilfe dar, wodurch leicht zwischen neu gebildetem Knochen und präformiertem Knochen durch die Tutobone©-Chips unterschieden werden kann.

Die bisherigen subjektiven positiven Erfahrungen mit Tutobone© in der klinischen Praxis lassen sich mittlerweile durch Studien belegen. *In vivo* Studien von Schieker et al. konnten belegen, dass Tutobone© eine adäquate Leitschiene für mesenchymale Stammzellen darstellt und diese nach Implantation in Mäuse auch nicht in andere Gewebe abwandern (Schieker et al., 2004). Dennoch konnten keine Knochenneubildungen im beobachteten Zeitraum von zwölf Wochen festgestellt werden, was möglicherweise daran lag, dass die Implantate nicht in eine Frakturlinie, sondern neben der Wirbelsäule in eine Weichteiltasche implantiert wurden.

#### **1.4: Tissue engineering in der modernen orthopädischen Forschung**

Wie bereits erwähnt, heilen manche Knochenbrüche nur langsam oder gar nicht und bilden in 1-3% eine Pseudarthrose aus. Eines der Forschungsgebiete innerhalb der rekonstruktiven

Orthopädie stellt das Gebiet des so genannten Tissue engineering dar. Mit dem Begriff Tissue engineering wird der Versuch umschrieben, mittels (halb)synthetischer Leitschienen ein adäquates Gerüst für den Nachbau von menschlichem Gewebe zu erreichen. Der Vorteil dieser Leitschienen gegenüber *in vitro* Kulturen von Zellen auf Nährböden besteht unter anderem darin, dass hierdurch eine dreidimensionale Struktur erreicht werden kann. Teilweise werden diese Leitschienen, auch Scaffolds genannt, vorher mit Zellen, wie z.B. mesenchymalen Stammzellen, besiedelt und mit Wachstumsfaktoren angereichert (*in vitro* Besiedlung) oder die Gebilde werden erst im Körper durch autologe Zellen infiltriert (in situ Regeneration) (Schmidt-Rohlfing et al., 2009). Bei Nährböden bleibt eine solche Zellbildung durch Kontaktinhibition der Zellen aus. Der Vorteil von *in vitro* Besiedlung der Scaffolds liegt darin, dass ein bereits mit Zellen besiedeltes Implantat günstigere Grundvoraussetzungen für den Gewebersatz liefert, da die Zellen nicht erst in das Zielgebiet einwandern müssen. Die Zellen können z.B. mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden, sodass sie expandieren und dadurch bereits extrazelluläre Matrix auf den Materialien ablagern können (Porter et al., 2009). Dennoch ist aber nicht davon auszugehen, dass die Zellen, welche unter Laborbedingungen z.B. Knochen synthetisiert haben, diesen auch noch nach der Implantation produzieren (Porter et al., 2009). Ein anderer Nachteil der *ex vivo* Besiedlung von Scaffolds ist der, dass es durch die notwendige Inkubationsdauer zu einer zweiten Operation des Patienten kommt, während dieser auf das Implantat warten muss. Zudem besteht durch die Besiedlung an sich das Risiko von Verunreinigungen mit Bakterien und anderen Stoffen, welche im Organismus eine Entzündungsreaktion hervorrufen könnten. Azelluläre Scaffolds hingegen besitzen ein geringeres Risiko der Verunreinigung, sind wesentlich einfacher zu sterilisieren und besitzen im Gegensatz zu mit Zellen besiedelten Implantaten ein wesentlich geringeres Immunogenitätspotential. Nachteilig hingegen ist, dass in die Implantate selbst Zellen einwandern müssen, was durch Inkorporation von Wachstumsfaktoren wie BMPs erreicht werden kann. Hierbei muss sichergestellt sein, dass diese Faktoren nicht auf einmal, sondern kontinuierlich in adäquater Dosierung freigesetzt werden. Diese Implantate sollen in Zukunft zur Produktion von Geweben wie Leber, Muskel, Haut oder auch Knochen genutzt werden.

### **1.5: In vitro Forschung an Nanofasern aus PLLA**

Die Forschungsgruppe Tissue engineering an der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie in Marburg arbeitet an Stoffen, welche als Lösungsansatz für die bereits erwähnten

Knochenheilungsstörungen und Ersatzmaterialien dienen können. Zu diesem Zweck wird seit einigen Jahren mit dem Fachbereich Chemie an der Philipps-Universität Marburg in enger integrativer Kooperation an Nanofaserkonstrukten gearbeitet. Für den experimentellen Teil dieser Dissertation wurden PLLA (Poly-L-Lactid Acid = Poly-L-Lactid Säure)- Nanofasern verwendet, die schon in vorigen Experimenten untersucht wurden. Bisher wurde erfolgreich gezeigt, dass sich die Nanofasern *in vitro* als potentes Gerüst für das Wachstum mesenchymaler Stammzellen eignen (Schofer et al., 2008). Schofer et al. untersuchten in diesem Zusammenhang 2008, ob das Wachstum mesenchymaler Stammzellen auf PLLA Fasern erfolgen kann und in wiefern dabei gleichzeitig eine osteoinduktive Potenz ausgeübt wird. Dabei wurde unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten auf PLLA Fasern und mit BMP-2 beladenen PLLA Fasern anhand der Expression von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und Kollagen I untersucht. Es wurde festgestellt, dass durch die PLLA Fasern initial eine Downregulation der Expression osteoinduktiver Gene bewirkt wird, die sich nach 22 Tagen der Versuchskontrolle (cover slips) anpasste. Eine verminderte Zellzahl insgesamt sei dabei aber nicht messbar gewesen. Da dies auch bei anderen Polymeren aufgetreten sei, könne dies aber auch auf die physikalische Struktur zurückführbar sein. Im gleichen Versuch wurde ebenfalls gezeigt, dass BMP-2 die initiale Downregulation verhindern kann und gleichzeitig osteoinduktiv wirkt. Dies konnte in anderen Versuchen von Su et al. mit modifizierten Implantaten aus PLLA-Kollagen kürzlich bestätigt werden (Su et al., 2012). Diese wiesen ebenfalls nach, dass es zu einer kontinuierlichen Abgabe von BMP-2 innerhalb der Zellkultur kommt. Durch nachfolgende Versuche konnte belegt werden, dass im Vergleich zu Kollagen Typ I kein Unterschied der Zelldichte im PLLA Präparat nach 28 Tagen unter Wachstumsbedingungen besteht, wenn dieses mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt wird. Erneut wurden aber geringere Aktivitäten der osteoblastären Marker erkennbar. Vor allem in der Frühphase der Knochenheilung zeigte sich ein vermehrtes Wachstum von Zellen auf Kollagen im Vergleich zu PLLA sowie eine Hochregulation der Expression von Genen der Osteogenese. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine Matrix aus PLLA-COL1 einem Implantat, das nur aus PLLA gewoben wurde, in der osteoinduktiven Potenz überlegen ist und somit ein geeignetes Konstrukt für den *in vivo* Einsatz darstellen könnte (Schofer, Boudriot, Leifeld et al., 2009). Das Verhältnis von PLLA zu Kollagen ist dabei entscheidend für das Wachstumsverhalten der Zellen. Die besten Ergebnisse wurden bei einem Verhältnis von 4:1 erzielt. Ähnliche Ergebnisse wurden von Salasznyk et al. (Salasznyk, Williams, Boskey, Batorsky, & Plopper, 2004) erzielt. Sie konnten in Ihren

Untersuchungen nachweisen, dass die Bindung von mesenchymalen Stammzellen via  $\alpha 2\beta 1$  Integrin des Kollagens eine osteogene Differenzierung bewirken kann. In einem weiterführenden Versuch von Schofer et al. konnte gezeigt werden, dass Nanofasern aus PLLA-Kollagen, in welche zusätzlich BMP-2 eingearbeitet wurde, Fasern aus PLLA allein sowie PLLA-Kollagen in der osteoinduktiven Potenz sowie Fähigkeit der Zellen zur Adhärenz an den Fasern überlegen ist (M. D. Schofer et al., 2011). Gleichzeitig wurde aber eine verminderte Poliferationsrate anhand von Messung von Ki67 sowie Cyclin 1D im Vergleich zur PLLA-Kollagen Gruppe festgestellt. Dies könnte möglicherweise die Folge der zunehmenden Differenzierung der Zellen widerspiegeln.

Um das Problem des uniformen Zellwachstums auf in vitro Kulturen zu lösen, können Zellen direkt durch Elektrosponnen gleichmäßig in das Implantat inkorporiert werden (J. R. Paletta et al., 2011). Dazu wurden Osteoblasten ähnliche Zellen der Linie MG63 in einem Medium suspendiert und per Elektrospraying auf die durch Elektrosponnen entstehenden Nanofasern aus PLLA oder PLLA-Kollagen Typ I überführt und damit in Fasermatten eingearbeitet. Anschließend wurden diese Scaffolds auf osteoblastäre Marker (Osteocalcin und Kollagen Typ I) sowie Überleben und Proliferation (Fluoreszein Diazetat) untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Entfernung der Elektroden die Überlebensrate der Zellen negativ beeinflusst, ähnliches wurde für die Dauer des Herstellungsprozesses vermutet. Bezüglich der strukturellen Veränderungen der Faserkonstrukte durch die verschiedenen Suspensionen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Lösungsmittel, welches zur Herstellung der Nanofasern verwendet wird, als auch die zusätzlichen Copolymere und Wachstumsfaktoren, welche in das Nanofasernetz eingewoben werden, die physikalischen Eigenschaften der Scaffolds beeinflussen. Mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) hergestellte Fasern erwiesen sich als belastbarer als mit Dichlormethan produzierte Fasern bei geringerer Dehnbarkeit. Zudem wurde die Porosität der Fasern durch Einbettung von BMP-2 vermindert (J. Paletta et al., 2009; M. D. Schofer et al., 2011). Inwiefern diese strukturellen Veränderungen aber für zelluläre Prozesse von Relevanz sind, muss in weiteren Studien untersucht werden.

### **1.6: Klinische Relevanz von Pseudarthrosen und weiteren Heilungsstörungen**

Im klinischen Alltag einer orthopädischen Klinik findet sich ein breites Spektrum an zu behandelnden Krankheiten. Neben Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Bechterew sowie einigen pädiatrischen Fragestellungen werden sehr häufig auch Arthroskopien durchgeführt und mechanische

Gelenkersatzprothesen eingesetzt. Ein weiteres Problemfeld stellen Frakturen, insbesondere des älteren Menschen mit osteoporotischem Vorleiden, dar. Eine Schätzung anhand der Krankenhausdiagnosestatistik aus dem Jahr 2004 geht davon aus, dass die Inzidenz der Schenkelhalsfraktur in Deutschland bei 140,9 pro 100.000 Einwohner liegt, was einer Gesamtzahl von etwa 116.000 entspricht (Icks, Haastert, Wildner, Becker, & Meyer, 2008). Dabei ist eine eindeutige Korrelation mit dem Alter der Patienten zu erkennen. Eine weitere große Gruppe an Frakturen stellen diejenigen des distalen Radius dar. Die Inzidenzen werden in Deutschland auf 200.000/Jahr geschätzt. Mit einem Anteil von 10-25% stellt dieser Frakturtyp den häufigsten Knochenbruch überhaupt dar (Siebert & Klonz, 2005).

Bei dem Großteil der behandelten Patienten heilt die Fraktur komplikationslos aus, ein kleineres Kollektiv durchläuft einen komplizierten Heilungsprozess. Neben bakteriellen Wundinfektionen führen Instabilitäten im Frakturspalt und mangelnder Kontakt der Fraktur dazu, dass die Knochenenden nicht adäquat aufeinander zuwachsen und sich letztlich nicht vereinigen- es resultiert eine Pseudarthrose. Per definitionem entspricht einer Pseudarthrose eine Fraktur, die nach 6 Monaten nicht zur knöchernen Verheilung des Defektes geführt hat (J. Meiners, Gerlach, S., Jürgens, & Faschingbauer, 2000). Die Pseudarthrosen werden hinsichtlich ihrer Ätiopathogenese in zwei Gruppen unterteilt: septische und aseptische hypertrophe oder atrophe Pseudarthrosen, wobei die atropen Pseudarthrosen den hypertropen zahlenmäßig überlegen sind.

Die aseptischen hypertropen Pseudarthrosen entstehen nach Meiners et al. hauptsächlich aus mechanisch instabilen Frakturen (J. Meiners et al., 2000). Über die Bildung eines so genannten „Unruhecallus“ würde dies zu einer hypertropen oder reaktiven Pseudarthrose führen. Letztlich würden diese Prozesse einer überbrückenden Frakturheilung entgegenwirken. Atrophe Pseudarthrosen zeigen ein anderes Bild. Meiners beschreibt atrophe oder areaktive Pseudarthrosen als eine verminderte peri- und endostale Reaktion, im Zuge derer es zu gestörter Blutversorgung kommt und sich kein „Reizcallus“ ausbilden kann. Er spricht in diesem Zusammenhang von einer Devitalisierung der Frakturen. Hierbei stünden nicht, wie bei hypertropen Pseudarthrosen, mechanische Instabilitäten im Vordergrund. Vielmehr entstünden solche Reaktionsmuster bei ausgedehnten Trümmerfrakturen. Eine knöcherne Heilung sei in diesen Fällen auch nicht mit einer Fixierung durch Plattenosteosynthese zu erreichen.

Septische Pseudarthrosen manifestieren sich, so Meiners, hauptsächlich in dem Bild der avitalen Pseudarthrose. Offene Frakturen, Weichteilschäden oder zusätzliche prädisponierende Faktoren würden über eine Infektion der Wunde zu einer gestörten

Knochenheilung führen. Als häufigste Erreger werden dabei *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* genannt.

Hinsichtlich der Lokalisation der Pseudarthrosen lässt sich feststellen, dass es ein typisches Verteilungsmuster gibt. In einer groß angelegten Studie der Medizinischen Hochschule Hannover wurden alle Patienten mit einer diaphysären Pseudarthrose im Zeitraum von 1971 bis 1993 systematisch hinsichtlich Parameter wie Behandlungsmodus (konservativ versus operativ), Alter und Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnose, Verteilungsmuster etc. untersucht (Kasperczyk, Mahlke, & Tscherne, 1996). Sie stellten dabei fest, dass sich 51 % der Pseudarthrosen am Unterschenkel ausbildeten, gefolgt vom Oberarm und Unterarm (20 % und 17 %). Gleichzeitig habe sich im Zeitraum von 1981 bis 1993 die Zahl der Pseudarthrosen halbiert, ebenso verhalte es sich beim Verhältnis der aseptischen zu den septischen Pseudarthrosen (von 1:1 auf 1:0,5). Bei allen Pseudarthrosen überwiege zudem das männliche Geschlecht. Leider wird dabei aber nicht das Verhältnis von behandelten Patienten mit Ausbildung einer Pseudarthrose zu behandelten Patienten ohne Ausbildung einer Pseudarthrose angegeben.

Allgemeine Angaben über die Inzidenzen von Pseudarthrosen sind nicht leicht zu finden, zumal das Risiko eine Pseudarthrose mit der Schwere sowie der Lokalisation der Fraktur korreliert (Tzioupis & Giannoudis, 2007). Mutschler gibt für epimetaphysäre Pseudarthrosen allgemein eine Inzidenz von 1,3% der behandelten Fälle an (Mutschler, 1996). Sen et al. gibt eine Prävalenz von 2,5% an (Sen & Miclau, 2007).

Die Überbrückung von Knochendefekten muss bei vielen weiteren Indikationen bewerkstelligt werden. Häufiger noch als bei Pseudarthrosen ergeben sich Knochendefekte z.B. bei Hüft- und Kniegelenksrevisionen, Ausräumung von Knochenzysten, Korrektur von Achsfehlstellungen und Tumorresektionen. Spondylodesen können ebenfalls Hohlräume hinterlassen. Bisher werden zur Defektdeckung entweder autologe Knochenimplantate, also vom Patienten selbst stammend, oder xenogene Implantate wie Tutobone verwendet, die aus Rinderspongiosa mit anschließender Antigenelimination gewonnen werden. Auch allogene Implantate, welche bei einem Endoprothesenersatz der Hüfte gewonnen werden, werden im klinischen Alltag eingesetzt. Trotz zum Teil guter Resultate, kann es auch hierbei zur Persistenz des Defektes kommen. Besonders die Morbidität des Patienten als auch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Entnahmestellen grenzen die Anwendung autologen Materials ein (Kneser, Schaefer, Polykandriotis, & Horch, 2006). Mäßiggradige Schwierigkeiten wie oberflächliche Infektionen, oberflächliche Serome und kleinere Hämatome traten bei zehn Prozent der Patienten einer Studie auf, die zwischen 1983 bis 1993

am Brooke Army Medical Center durchgeführt wurde. Bei etwa sechs Prozent fanden sich schwerwiegende Komplikationen wie Herniation abdomineller Organe durch große Donorstellen, Gefäßverletzungen, tief sitzende Infektionen, neurologische Symptome oder ausgedehnte Hämatome mit chirurgischem Behandlungsbedarf sowie Frakturen des Os Ilium (Arrington et al., 1996). Es ist daher von großer Relevanz, ein leicht verfügbares, effizientes und kostengünstiges Knochenersatzmaterial zur Behandlung dieser Knochendefekte bereit zu stellen.

### **1.7: Physiologie der Frakturheilung**

Die Frakturheilung ist ein komplexer, sowohl zeitlich als auch räumlich koordinierter Prozess, der durch eine Vielzahl an Hormonen und Zytokinen, lokalen wie systemischen und physikalischen Faktoren der Bruchstelle selbst bestimmt wird. Wenngleich es einige Details gibt, die noch immer unklar sind, haben die letzten Jahrzehnte ein breites wissenschaftliches Verständnis dessen, was sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch abspielt, gebracht. Zum Thema der Frakturheilung finden sich daher von einigen Autoren ausführliche Übersichtsarbeiten, welche die molekularen Prozesse beleuchten (Ai-Aql, Alagl, Graves, Gerstenfeld, & Einhorn, 2008; Dimitriou, Tsiridis, & Giannoudis, 2005; Einhorn, 1998; Gerstenfeld, 2003; Ohishi et al., 1998; Schindeler, McDonald, Bokko, & Little, 2008). Bereits durch mehrere Untersuchungen wurde festgestellt, dass es dabei eine starke Überlappung mit den Vorgängen der in der embryonalen Entwicklungsphase stattfindenden Osteogenese gibt (Gerstenfeld, 2003).

Prinzipiell unterscheidet man die primäre von der sekundären, über Osteoid abheilende Knochenheilung.

#### A) Die primäre Knochenheilung

Diese Art der Frakturheilung wurde histologisch zuerst von Schenk und Willenegger 1963 und 64 untersucht (Schenk & Willenegger, 1963, 1964). Per definitionem lässt sich bei dieser Art der Frakturheilung kein äußerer Kallus nachweisen. Die Frakturheilung setzt eine genaue Adaptation und direkten Kontakt der beiden Bruchenden zueinander voraus. Solche Bedingungen finden sich erst, seitdem es möglich ist, durch operative Verfahren eine Stabilisierung der Knochenstücke zu erreichen. Entgegen der sekundären Knochenbruchheilung, wird die primäre demnach durch Bewegung gehemmt. Als weitere Voraussetzung muss gegeben sein, dass die Bruchenden kaum oder keine nekrotischen

Anteile aufweisen. Eine adäquate Blutversorgung ist demnach ebenso eine Grundvoraussetzung. Auf diese Weise können dann, den physiologischen Umbauprozessen im Knochen entsprechend, Zellen durch Resorptionskanäle auf die andere Seite einwandern und neuen Lamellenknochen bilden. Mit Ihnen sprossen neue Gefäße sowie Osteoprogenitorzellen ein, die sich später in Osteoblasten differenzieren. Diese Umbaueinheiten werden auch als so genannte „cutting cones“ bezeichnet (Einhorn, 1998). Da diese Resorptionsvorgänge fast ausschließlich in der Kortikalis ablaufen, wird diese Art der Knochenheilung auch als kortikale Frakturheilung bezeichnet. Eine perfekte Überlappung der Bruchstücke auf mikroskopischer Ebene ist aber nicht möglich, sodass immer wieder kleinere Spalten entstehen. Dennoch müssen diese Löcher gefüllt werden. Dies geschieht zum einen durch Kollagen, welches mit dem Frakturhämatom in diese Löcher gelangt ist (Wiltfang, Merten, Rieger, & Luhr, 1997), zum anderen durch Kallus, welcher durch Zellen aus Haversschen Kanäle produziert worden ist (McKibbin, 1978). Bei der beschriebenen Art der primären Knochenheilung wird von Kontaktheilung gesprochen. Wenn größere Spaltlinien zwischen den Frakturrenden verbleiben, sprossen bereits nach wenigen Tagen dünnwandige Gefäße vom Markraum, Periost oder aus den Haversschen Kanälen aus ein, die zellreiches Bindegewebe mit sich führen (Schenk & Willenegger, 1964). Willenegger et al. postulieren initial resorptive Prozesse an den offenen Knochenstellen, die er als eine Art der „Anfrischung“ beschreibt (Schenk & Willenegger, 1963). Schon bald belegen Osteoblasten die Bruchflächen in einer Art epithelialen Verband, wie sie aus den Haversschen Kanälen bekannt sind und bilden auf diese Weise ein Regenerat aus Faserknochen. Der Umbau zum Lamellenknochen erfolgt analog den beschriebenen Verhältnissen des physiologischen Knochenanpassungsprozesses.

### B) Die sekundäre Knochenheilung

Die meisten Brüche heilen durch den (radiologisch nachweisbaren) Schritt der Kallusbildung, wobei sich in der Regel ein gemischtes Bild aus enchondraler und intermembranöser Knochenheilung ergibt (Ai-Aql et al., 2008; Einhorn, 1998). Im Gegensatz zur primären Frakturheilung wird diese Form durch Bewegung stimuliert und durch rigide Fixierung gehemmt (McKibbin, 1978). Die sekundäre Knochenheilung wird klassischerweise in drei zeitlich unterschiedliche Stadien aufgeteilt, welche aber auch parallel nebeneinander verlaufen können (Graumann, 2004):

*Erstens:* Hämatom und Inflammation

*Zweitens:* Ausbildung des weichen (fibrokartilaginösen) Kallus

*Drittens:* Ausbildung des harten Kallus und Umbau zum lamellären Knochen

*Erstens: Phase der Hämatombildung und Inflammation*

Durch den Bruch selbst werden Gefäße sowohl im Knochen und den Knochenhäuten als auch im umliegenden Gewebe zerstört. Die Integrität der Zellen wird dadurch empfindlich gestört, was schon durch Brighton et al. beschrieben wurde. Es kommt zu einer Extravasation von Blut ins umliegende Gewebe mit entsprechender Aktivierung und Degranulation von Thrombozyten, Makrophagen sowie anderer Entzündungszellen (Graumann, 2004). Diese Zellen breiten sich in dem entzündlich aufgelockerten Gewebe aus und sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Phagozyten resorbieren den abgestorbenen Knochen, Fibroblasten wandern ein und sezernieren Bindegewebe, welches als erster Stabilisator angesehen werden kann (Barnes, Kostenuik, Gerstenfeld, & Einhorn, 1999; Brighton & Hunt, 1991; Schindeler et al., 2008). Durch Aktivierung des koagulatorischen Systems bildet sich so binnen kurzer Zeit ein fibrinreicher Thrombus an den Bruchenden, welcher ein weiteres Bluten der Läsion verhindert (Gerstenfeld, 2003). Obwohl man sich bereits lange mit der Rolle des Frakturhämatoms beschäftigt, ist die funktionelle Relevanz noch nicht ganz klar. Es wird mittlerweile aber davon ausgegangen, dass das Hämatom in der initialen inflammatorischen Phase eine wichtige Rolle spielt. So wurde gezeigt, dass das Hämatom selbst ein potenter Modulator der Aktivität von neutrophilen Granulozyten darstellt (Einhorn, 1998; Schindeler et al., 2008; Timlin et al., 2005).

Mizuno et al. konnten zeigen, dass das Frakturhämatom selbst eine osteoinduktive Potenz besitzt. Bei Implantation eines zwei Tage alten Hämatoms in eine subperiostale Schicht wurde eine Ossifikation vorwiegend enchodralen Modus gefunden. Diese Art der Ossifikation spricht vom Muster her mehr gegen das Periost als Ursprung der Knochenbildung, da dieses normalerweise mit primärer Knochenbildung einhergeht, sodass die Autoren vom Hämatom als Ursache der Knochenbildung ausgehen. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei einem vier Tage alten Hämatom gefunden. Wenn das Hämatom jedoch intramuskulär injiziert wurde, fand sich eine entsprechende Knochenbildung aber nur beim vier Tage alten Hämatom. Diesen Aspekt deuteten die Autoren als eine Art von Reifung des Hämatoms mit konsekutiver Knochenbildung (Mizuno et al., 1990).

Die Inflammation lässt sich nicht nur histomorphologisch, sondern auch durch den Nachweis spezifischer Zellprodukte darlegen. Zu den ersten Substanzen, die im Hämatom nachgewiesen

werden, zählen der transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und plateled derived growth factor (PDGF). Diese werden zuerst von aktivierten Thrombozyten im Blutpfropf freigesetzt. Auf jene Stimuli hin wird das Gewebe schon bald von anderen Entzündungszellen wie Makrophagen oder Granulozyten infiltriert, welche die Entzündungsantwort durch Sezernierung weiterer Faktoren verstärken. Diese sind unter anderem Fibroblast growth factor (FGF), PDGF, TGF- $\beta$  sowie Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) sowie VEGF (Barnes et al., 1999).

In einer quantitativen Analyse von Cho et al. wurde zudem in den ersten fünf Tagen nach der Fraktur ein signifikanter Anstieg von mRNA für BMP-2 und GDF-8 festgestellt (Cho, Gerstenfeld, & Einhorn, 2002). Da sie diese zwei Faktoren vornehmlich in der frühen Phase vorfanden, formulieren sie die Hypothese, dass sie mit der Rekrutierung von Zellen sowie der Induktion der Knochenbildung im Zusammenhang stehen. In vielen weiteren Studien, in denen BMP-2 zum Beispiel in Muskelgewebe injiziert wurde, konnte dieser Verdacht erhärtet werden (Pekkarinen, Lindholm, Hietala, & Jalovaara, 2003).

Eine knorpelige Stabilisierung des Frakturspaltes findet je nach Ausmaß der Fraktur zwischen dem siebten bis zehnten Tag statt, womit auch die inflammatorische Reaktion abklingt (Einhorn, 1998, 2005).

#### *Zweitens: Ausbildung des weichen (fibrocartilaginösen) Kallus*

Die Ausbildung des weichen Kallus ist wie die erste Phase ein sehr komplexes Zusammenspiel vieler lokaler und humoraler Faktoren und Zellen inklusive sezernierter Mediatoren wie BMPs, TGF und VEGF. Physikalisch-mechanische Faktoren wirken sich gerade zu diesem Zeitpunkt besonders stark auf die Morphogenese des Kallus aus.

Für das Verständnis der Knochenregeneration ist es wichtig zu wissen, dass die hauptsächliche zelluläre Aktivität nicht von den Frakturrenden, sondern von weiter weg entfernten Orten ausgeht. McKibbin et al. nennt dies die fundamentale Voraussetzung, um die folgenden Prozesse verstehen zu können (McKibbin, 1978). Die Knochenenden selbst würden nicht an der proliferativen Aktivität teilnehmen, da sie avital sind, was durch die leeren osteozytären Lakunen nachzuvollziehen sei.

Die periostale Reaktion lässt sich schon innerhalb der ersten drei Tage nachweisen und dauert bis etwa zwei Wochen nach dem frakturierenden Ereignis an (Dimitriou et al., 2005). Diese wird von Einhorn und Kollegen als die wahrscheinlich wichtigste Reaktion im ganzen Knochenheilungsprozess benannt (Einhorn, 1998). Die Reaktion wird generell durch (Mikro)Bewegungen stimuliert und durch rigide Fixierung gehemmt. Je weiter entfernt von

der Fraktur gelegen, desto geringer ist aber die periostale Verdickung ausgeprägt (McKibbin, 1978).

Die Infiltration des bis dato fibrösen Clots innerhalb des Frakturspaltes durch mesenchymale Zellen ist bereits drei Tage nach dem traumatischen Ereignis histologisch feststellbar (Barnes et al., 1999). Der weiche Kallus, welcher neben dem Periost auch durch das umliegende Weichteilgewebe produziert wird (Einhorn, 1998), erfährt ab Anfang der zweiten Woche bis zur dritten Woche einen Umbauprozess. Die Zellen beginnen sich zu Chondrozyten zu differenzieren und sezernieren entsprechende Matrixkomponenten, bestehend vor allem aus Kollagen Typ II (und X) sowie Proteoglykanen (Schindeler et al., 2008). Dieser kartilaginöse Kallus wird als weicher Kallus bezeichnet (Barnes et al., 1999; Dimitriou et al., 2005; Einhorn, 1998, 2005; Gerstenfeld, 2003; McKibbin, 1978; Schindeler et al., 2008) und stellt in den Fällen, in denen keine direkte Brückenbildung durch intermembranösen Knochen geschieht, eine stabile Leitschiene für die weitere Knochenheilung dar.

Im weiteren Verlauf des Heilungsprozesses teilen sich die nun differenzierten Chondrozyten und werden zum dominanten Zelltyp im Regenerat. Nach etwa zwei Wochen stellen die relativ gleichförmigen Chondrozyten ihre mitotischen Aktivitäten ein und nehmen zunächst eine ovale Form an, um dann zu hypertrophieren (Barnes et al., 1999). In elektronenmikroskopisch beobachteten Zellen finden sich so genannte „budding membranes“ (Einhorn, 1998), welche sich zu Vesikeln zusammenfinden. In diesen Vesikeln finden sich (alkalische) Phosphatasen und Proteasen, welche zur Einlagerung von Calciumphosphat in den Knorpel führt (Barnes et al., 1999). Gleichzeitig lässt sich der mineralisierte knorpelige Kallus nun röntgenologisch darstellen. Der Prozess der Knorpelkalzifizierung ist im Menschen nach etwa vier bis fünf Wochen abgeschlossen, sodass der Kallus nun Angriffspunkt für den Umbau durch Osteoblasten wird.

Die zeitlich koordinierte Expression der wichtigsten Vertreter der TGF- $\beta$  Superfamilie wurden von Cho, Gerstenfeld und Einhorn durch den Nachweis von mRNA untersucht (Cho et al., 2002). Neben der Beobachtung, dass BMP-2 und GDF-8 in der initialen Phase nach der Frakturierung im Gewebe zwischen den Fraktarenden zu finden ist, wurden in der Phase der Chondrogenese um den zehnten Tag herum GDF-5 (auch cartilage derived morphogenetic Protein 1, CDMP-1, bezeichnet) und TGF- $\beta$ 2 und -3 gefunden. BMP-5, -6 und GDF-10 sowie TGF- $\beta$ 1 wurden über den gesamten beobachteten Zeitraum von 21 Tagen mit erhöhten Levels gemessen. In dem Knochen bildenden Zeitraum von 14-21 Tagen fallen die Spiegel von BMP-3a, -4, -7 und -8 ab, wohingegen ein zweiter Anstieg von BMP-2 zu diesem Zeitpunkt zu verzeichnen ist (Dimitriou et al., 2005).

Andere Arbeitsgruppen haben sich neben der zeitlich-quantitativen Messung der Wachstumsfaktoren damit beschäftigt, welche Zellen diese synthetisieren. Bostrom et al. haben dazu das Verteilungsmuster von BMP-2 und -4 in einem Femurfrakturmodell durch immunhistochemische Färbungen untersucht (Iwaki et al., 1997). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass in allen Phasen der Knochenheilung, sowohl im enchondral als auch im intermembranös entstehenden Knochen, ein Signal nachweisbar war. Beim Remodeling des lamellären Knochens war allenfalls ein geringes Signal sichtbar, sodass dieser Prozess weniger durch BMP-2 oder -4 gesteuert wird. Hauptsächlich konnten Signale in Osteoblasten und primitiven mesenchymal-chondrogenen Zellen gezeigt werden. Weiter differenzierte Zellen, vor allem hypertrophierte Chondrozyten, wiesen nur eine geringe Signalintensität auf, Osteoblasten, welche neuen Knochen anbauen, waren wiederum stärker gefärbt.

#### *Drittens: Bildung des harten Kallus und Umbau zum lamellären Knochen*

Als harter Kallus wird der neu entstandene Geflechtknochen durch die Aktivität der einwandernden Osteoblasten bezeichnet. Dieser wird in der Regel im Anschluss an den weichen Kallus nach dem Muster der enchondralen Ossifikation gebildet. Wie bereits beschrieben, kann bei stabiler Fixierung der Knochenenden auch eine intermembranöse Verknöcherung erreicht werden. Spector et al. haben 2001 in diesem Zusammenhang die Expression von BMP-2 und -4 sowie Osteoprotegerin-1, auch als BMP-7 bekannt, an einem Frakturmodell der Ratte untersucht (Spector et al., 2001). Dazu wurde ein neues Frakturmodell vorgestellt, welches primär durch intermembranöse Verknöcherung heilen soll. Durch eine partielle Durchtrennung der Mandibula wurde eine stabile Fraktur geschaffen, welche durch keine Fixierungsmethoden mehr unterstützt werden musste. Die Autoren konnten dabei ein ähnliches räumlich-zeitliches Muster der Expression von BMP-2, -4 und -7 feststellen, wie es bei der enchondralen Ossifikation beobachtet wird. Vor allem mesenchymale Vorläuferzellen und heranreifende Osteoblasten sowie Osteoklasten wurden positiv angefärbt, Osteozyten jedoch nicht.

Häufiger als durch direkte Verknöcherung heilen aber die meisten Defekte durch enchondrale Ossifikation. Nachdem die Knorpelmatrix durch Calciumphosphatkristalle genügend gefestigt wurde und die Chondrozyten hypertrophiert sind, eröffnet sich nun der Weg für penetrierende Gefäße, welche Osteoblasten sowie deren Vorläufer mit sich bringen. Zwischen den voranschreitenden Zelleinheiten, welche die kalzifizierte Matrix vor allem durch MMPs degradieren (Behonick et al., 2007; Colnot, Thompson, Miclau, Werb, & Helms, 2003; Vu et al., 1998), bleiben kleinere Bälkchen mit mineralisierter Knorpelmatrix übrig. An diese lagern

sich Osteoblasten an, welche Osteoid produzieren und so mehr und mehr von der Knochenmatrix umgeben werden (Mark, Penington, Nannmark, Morrison, & Messina, 2004). Osteocalcin spielt während der Mineralisation des Knochens eine wichtige Rolle. Somit ist OC zum einen in dem Aufbau neuen Knochens involviert, andererseits wird es aber auch bei der Resorption durch Osteoklasten aus dem Kristallverband gelöst und in das Blut freigelassen (Hauschka & Wians, 1989). Da Osteocalcin nur in Dentin und im Knochen gefunden wird (Price, 1988), kann es daher als ein spezifischer Knochenumsatzmarker angesehen werden. Dabei ist die Verteilung innerhalb des Knochens unterschiedlich: Kortikaler Knochen enthält etwa 30 mal mehr OC als trabekulärer Knochen (Roach, 1994). Osteocalcin besitzt Gla-Reste, welche Vitamin-K abhängig carboxyliert werden. Diese Reste können, wie bei anderen Gla-Proteinen, in Interaktion mit freiem oder an Mineralisationen teilnehmenden Kalziumionen treten, wie dies zum Beispiel in Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) oder Brushit ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) der Fall ist, nicht jedoch mit Phosphat (Hauschka & Wians, 1989).

Osteocalcin scheint direkt chemoattraktiv auf periphere Blutmonozyten zu wirken. Von OC gereinigte Knochenpräparate werden somit in tierexperimentellen Modellen schlechter resorbiert als Knochenproben, welche nicht frei von Osteocalcin sind (Hauschka & Wians, 1989). Zum anderen greift OC in die Mineralisierungsmechanismen der Hydroxylapatitkristalle des Knochens ein. Roach führte Untersuchungen durch, welche sich mit der zeitlich-räumlichen Sekretion der Proteine OC, Osteonectin, Osteopontin und Bone Sialoprotein beschäftigten (Roach, 1994). Roach postulierte, dass Bone Sialoprotein und Osteopontin möglicherweise als Initiator der Kristallbildung dienen, da diese noch vor der Mineralisationsfront immunhistochemisch nachgewiesen wurden. Osteocalcin könne als Inhibitor einer weiteren Kristallvergrößerung dienen. Dies wird durch *in vitro* Beobachtungen von Doi et al. bestätigt, in denen Osteocalcin sowohl Kristalle am appositionellen Wachstum hindert als auch deren Umwandlung zu Apatit stört (Doi et al., 1992). Der so neu gebildete Knochen zeigt noch nicht den lamellären Aufbau des reifen Knochens und ist auch noch nicht so stark mechanisch belastbar wie dieser (Einhorn, 1998; McKibbin, 1978).

Der Umbau zum lamellären Knochen unterscheidet sich bei der Knochenbruchheilung nicht von den „normalen“ Umbauprozessen, welche das ganze Leben über stattfinden und dem Ziel einer möglichst optimalen, so genannten trajektorialen Bauweise dient.

## **1.8: Die Familie der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und SMADs**

Es waren die Entdeckungen vor allem von Urist und Kollegen aus dem Jahr 1965, welche zu der Vermutung führten, dass es in der Knochenmatrix Faktoren geben muss, welche die Induktion der Knochenbildung einleiten (Urist, 1965). In seinen Versuchen stellte er fest, dass eine demineralisierte Knochenmatrix, wenn sie an anderer Stelle als Knochen implantiert wurde (M. rectus abdominis, M. erector spinae oder M. quadriceps femoris), zur Bildung von ektopen Knocheninseln führt. Dieser Effekt konnte nur durch Faktoren zu erklären sein, welche in der Knochenmatrix gespeichert waren und durch die Entzündungsreaktion nachfolgend frei gesetzt wurden. Später benannte er diesen Faktor als „Bone morphogenetic Protein“ (Urist & Strates, 1971).

Die BMPs gehören mit Ausnahme von BMP-1 zur TGF- $\beta$  Superfamilie. Die übrigen BMPs 2-9 wurden aus genetischen Analysen wegen ihrer ähnlichen Aminosäuresequenz der TGF- $\beta$  Superfamilie zugeordnet (Schmitt, Hwang, Winn, & Hollinger, 1999).

Die BMP Rezeptoren wiederum sind einer Gruppe heterogener Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren zuzuordnen (Miyazono, Kamiya, & Morikawa, 2010). Wie bei vielen anderen Ligand-Rezeptor Interaktionen, bestehen auch hierbei verschiedene Affinitätsniveaus der Liganden zu den unterschiedlichen Rezeptoren, sodass z.B. BMP-2 und-4 mit hoher Affinität an BRIa und BRIb Rezeptoren binden, aber eine nur geringe Bindungsfähigkeit an Typ II Rezeptoren besteht (Sieber, Kopf, Hiepen, & Knaus, 2009).

Die Signaltransduktion ist erst dann möglich, wenn jeweils ein Typ I Rezeptor mit einem Typ II Rezeptor zu einem Heterodimer oligomerisiert. Durch die Ligandenbindung an die Rezeptoren kann die (konstitutiv aktive) Serin/Threonin-Kinase des Typ II Rezeptors eine am Typ I Rezeptor nahe dem N-Terminus gelegene Glycin und Serin reiche Region (so genannte GS-Region) phosphorylieren (Miyazono et al., 2010). Durch die Phosphorylierung der GS-Domäne wird die Kinasefunktion der Typ I Rezeptoren frei gelegt, sodass diese nun aktiv ist.

Die Signaltransduktion durch SMADs (der Name ergibt sich als Kombination aus dem Protein SMA und *mothers against decapentaplegic* MAD, zu denen eine nahe Homologie besteht) wird beobachtet, wenn eine Bindung von BMPs an BISC (BMP-induced signaling complex) geschieht.

Die Gruppe der SMADs stellt eine intrazelluläre Fraktion an Proteinen dar, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die SMADs werden unterteilt in regulatorische R-SMADs (1, 5 und 8 sind BMP-spezifisch, 2 und 3 werden durch TGF- $\beta$  und den Activin Weg phosphoryliert), die anschließend einen Komplex mit co-SMADs (in Säugetieren nur SMAD-4) sowie inhibitorische I-SMADs (SMAD-6 und 7) eingehen, und die R- und co-SMADs negativ regulieren (Miyazono et al., 2010; Sieber et al., 2009). Der Komplex aus zwei R-

SMADs und SMAD-4 kann jetzt in die Kernregion eindringen, wo die Interaktion mit SMAD-binding elements (SBEs) in der Promotorregion der DNA geschehen kann (Miyazono et al., 2010). Der SMAD-unabhängige Signaltransduktionsweg ist durch eine Caveola-vermittelte Endozytose nach PFC-Bindung charakterisiert.

Ebenso vielschichtig wie die Signalwege und deren Modulationsmöglichkeiten der BMPs sind auch die unterschiedlichen Wirkungsweisen und Wirkorte. Anders als es der Name eigentlich vermuten lässt, handelt es sich bei den BMPs nämlich nicht nur wie bereits beschrieben um rein am Knochen angreifenden Wachstumsfaktoren, sondern vielmehr um Signal vermittelnde Proteine, welche an nahezu allen Stellen des Körpers zu verschiedensten Zeitpunkten (Organogenese, Tumoren, Haut und Knochenmark) angreifen (Blank et al., 2008; Botchkarev, 2003; Kessler, Fichard, Chanut-Delalande, Brusel, & Ruggiero, 2001; Kumamoto & Ooya, 2006; Langenfeld & Langenfeld, 2004; Sieber et al., 2009). In der Zusammenschau der bisher dargelegten Forschungsergebnisse kann somit wie von Reddi et al. vorgeschlagen von Body morphogenetic proteins gesprochen werden (Reddi, 2005).

## **2.: Fragestellung und Hypothesen**

Ziel dieser Arbeit war es, die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf eine *in vivo* Studie an Ratten zu überprüfen. Von besonderem Interesse war die Untersuchung der Biokompatibilität der PLLA-Implantate. Im zweiten Schritt sollte getestet werden, ob die Implantate eine osteoinduktive Eigenschaft ausüben können.

Bei der Aufarbeitung der Gewebeproben galt es demnach, folgende Hypothesen zu beweisen oder zu widerlegen:

- 1. Durch das PLLA-Gerüst wird keine lokale oder systemische Entzündungs- oder Abstoßungsreaktion hervorgerufen*
- 2. Ein Gerüst aus PLLA-Nanofasern eignet sich *in vivo* als adäquate Leitschiene für eine gezielte Einwanderung von Zellen in einen Knochendefekt*
- 3. Es besteht eine signifikant höhere Zelldichte in dem PLLA-Implantat als in der Negativkontrolle*
- 4. Ein Implantat aus PLLA-Nanofasern übt keine osteoinduktive Potenz aus*

Die gewonnenen Gewebeproben wurden dazu entkalkt und in Paraffin eingebettet. Eine anschließende histomorphologische und -metrische Auswertung wurde mittels der Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner sowie durch immunhistochemische Verfahren gegen Kollagen 1A1, Osteocalcin, BMP-2 und SMAD5 durchgeführt.

### 3.: Material und Methoden

#### 3.1: Grundaufbau der Versuchsreihe

Im vorliegenden Versuch wurden 120 fünf Monate alte Ratten des Stammes Sprague-Dawley (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) vor einer operativen Intervention in vier Versuchsgruppen unterteilt: Gruppe eins waren diejenigen Tiere, welche ohne Defektauffüllung als so genannte „Negativkontrolle“ dienten. Die zweite Gruppe wurde durch die Implantation von Tutobone©-Chips definiert, die dritte Gruppe enthielt im Defekt das PLLA-Implantat. Im vorliegenden Versuch wurden runde Tutobone©-Chips verwendet. Die letzte Gruppe wurde durch Ratten mit einem PLLA-BMP-2-Implantat gebildet. Während der Operation wurden bilateral auf jeder Schädelhälfte auf Höhe der Schädelmitte ein 5 mm messender, kreisrunder Kalottendefekt platziert, welcher bereits in Tierversuchen vorher durch andere Arbeitsgruppen evaluiert wurde (Bosch, Melsen, & Vargervik, 1998; Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Jones, Thomsen, Mosekilde, Bosch, & Melsen, 2007; Schmitz & Hollinger, 1986). Anschließend erfolgte zu den Zeitpunkten null, vier, acht und 12 Wochen eine radiologische Auswertung. Zu den gleichen Zeitpunkten (Ausnahme Zeitpunkt null Wochen) wurden jeweils zehn Tiere aus einer Gruppe getötet, um eine histologische Aufarbeitung zu ermöglichen. Die PLLA-BMP-2 Gruppe ist Teil einer anderen Doktorarbeit und wurde daher hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Die Durchführung des Versuches wurde durch die lokale Ethikkommission des Regierungspräsidiums Gießen (Referenznummer V54-19c 20-15 (1) MR 20/21-Nr 18/2008) bewilligt.

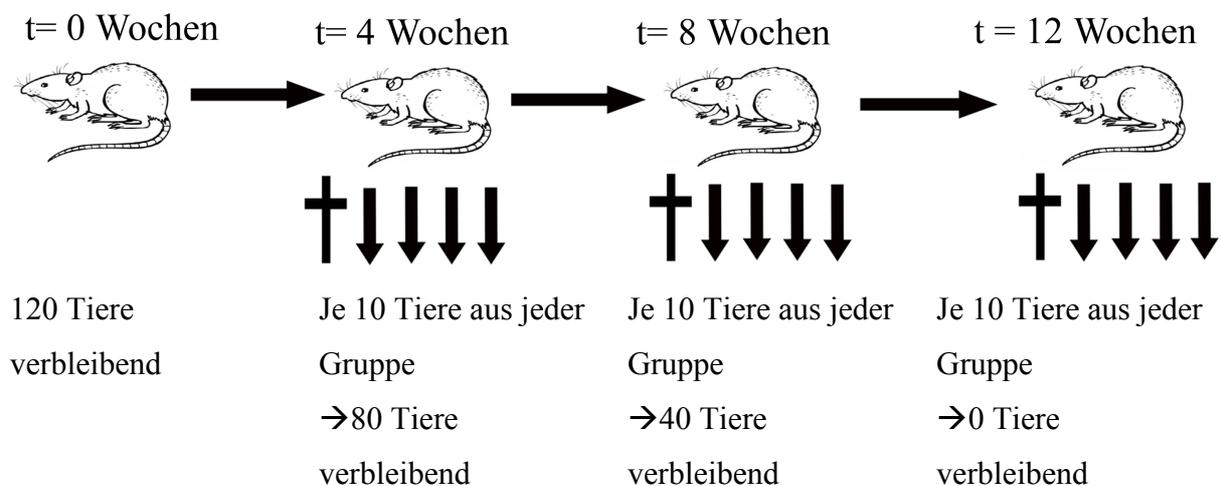


Abbildung 02: Versuchsaufbau des Experiments. Jeweils zum Zeitpunkt vier, acht und zwölf Wochen wurden zehn Tiere aus einer Gruppe entnommen, um das Wachstumsverhalten in Defektbereich zu studieren.

### 3.2: Parameter der Nanofasersynthese

Die im vorliegenden Versuch verwendeten Parameter zur Herstellung der Nanofasern waren: 4% (w/w) PLLA (Resomer L210, Boehringer, Ingelheim, Deutschland), aufgelöst in Dichlormethan unter Raumtemperatur bei ständigem Rühren über Nacht. Fluss-Rate 14µl/min bei 20-30kV Elektrodenspannung. Elektrodenabstand 15cm.

### 3.3: Anästhesie und Operationsverfahren

#### 3.3.1: Anästhesie

Einen allgemeinen Überblick über die verwendeten Medikamente und sonstige Hilfsmittel geben Tabelle 01 und Abbildung 03.

Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland PZN: 1320422
Ketamin 10 % (Ketaminhydrochlorid)	Bela-Pharm GmbH, Vechta, Deutschland ISBN: 7030996029460
Isofluran 100%, 250 ml	Baxter Deutschland GmbH, Deutschland Unterschleißheim PZN 7311944
Ampicillin 1,0g (Ampicillin-Natrium)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland PZN: 2036628
Ringer-Infusionslösung B.Braun, 500 ml (Natrium-, Kalium-, Calciumchlorid)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland PZN: 1471405

Tabelle 01: Medikamente für die Anästhesie.



Abbildung 03: Links Anästhesietisch mit benötigter Medikation und Bedarfsmaterialien, rechts Anästhesiergefäß.

Um die Tiere in einen operationsfähigen Zustand zu überführen und ihnen gleichzeitig unnötige Belastungen zu ersparen, wurden sie vor der eigentlichen intraperitonealen Injektion des Narkosemittel durch Inhalation eines Isofluran-haltigen Luftgemisches in einem geschlossenen Glasgefäß betäubt ( Abb. 03).

Eine suffiziente Anästhesie und Analgesie für die Operation wurde durch Anwendung eines Gemisches aus Ketamin und Xylazin erreicht, welches intraperitoneal appliziert wurde. Es wurden 100mg/kg KG Ketamin (10%ig) und 10mg/kg KG Xylazin (2%ig) verwandt. Im Anschluss wurde den Tieren prophylaktisch Ampicillin (0,125ml/kg KG 200.000 I.U./ml) subkutan injiziert, um intra- und postoperative Infektionen zu verhindern. Nach den Injektionen wurden die Tiere in ihre Käfige überführt und etwa zwölf Minuten gewartet, bis die Ratten ihre Bewegungen einstellten.

### 3.3.2: Operationsverfahren

Im Folgenden werden die Operationsschritte beschrieben, welche alle durch den gleichen Operateur (Prof. Dr. M. Schofer) durchgeführt wurden.

In Tabelle 07 (siehe Anhang) werden das von uns verwendete Operationsbesteck und weitere benötigte Utensilien im Detail aufgelistet, siehe auch Abbildung 04. Weiterführende Erklärungen zur genauen Verwendung der Materialien finden sich im nachstehenden Text.

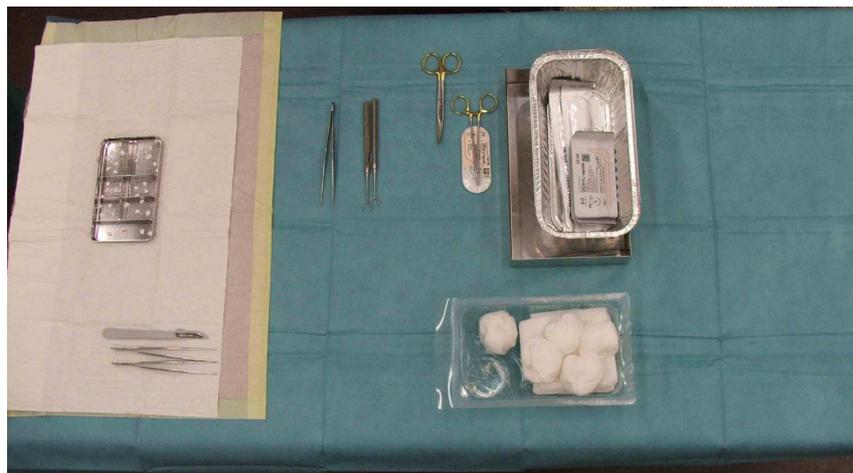
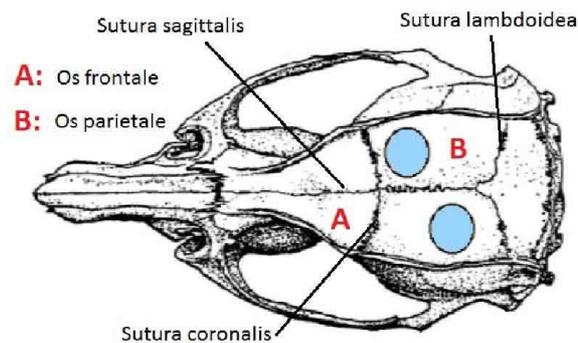


Abbildung 04: Operationstisch mit OP-Bestek und Utensilien.

Nach erfolgreicher Anästhesie wurden die Tiere auf dem vorbereiteten Operationstisch fixiert. Zur Vorbereitung auf eine sterile chirurgische Arbeitsweise wurden zuerst die Kopfhaare sauber entfernt. Zu diesem Zweck entfernten wir die längeren Haare in einem ersten Schritt mit einem elektrischen Haarschneidegerät. Anschließend wurde das Operationsfeld von den

kurzen Haaren durch einen Einmalrasierer gesäubert. Die darauf folgende Desinfektion mit Phenoxyethanol (Octenisept®, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) schloss die präoperativen Vorbereitungen ab. Der erste Schnitt wurde von tief occipital nach tief frontal in medianer Schnittführung entlang der Sutura sagittalis auf einer Länge von ca. 20 mm platziert (vgl. Abb. 05).



*Abbildung 05: Schematische Darstellung der Defektlöcher. Jeweils ein Defekt wurde rechts und links (etwas versetzt voneinander) der Sutura Sagittalis platziert.*

Die beiden dabei entstandenen Wundränder wurden durch den Assistenten mit Hilfe der Lidhaken zur Seite gehalten. Als nächstes eröffnete der Operateur das Periost durch einen Schnitt von medio-occipital nach medio-frontal. Da es als eine wichtige Quelle zur Regeneration des späteren Defektes dient, wurde es so wenig wie möglich beschädigt und nach der Durchtrennung sorgsam zur rechten und linken Seite geklappt. Das so geschaffene Operationsfenster erstreckte sich vom Os parietale bis zum hinteren Viertel des Os frontale. Zum Zwecke der eindeutigen topographischen Orientierung wurden die Sutura sagittalis, Sutura coronalis und die Sutura lambdoidea dargestellt

Die folgenden Schritte wurden unter kontinuierlicher Spülung mittels steriler Kochsalzlösung durchgeführt. Dies diente zum einen der besseren Einsicht auf das Operationsfeld aufgrund kleiner blutender Gefäße, zum anderen sollte es die bei der Bohrung entstehende Wärmeenergie absorbieren, sodass der knöcherne Defektrand nicht zu sehr beschädigt wird. Da direkt unter der Sutura sagittalis ein großes venöses Sammelgefäß verläuft, wurde in den anstehenden Schritten darauf geachtet, dass die beiden Defektlöcher leicht zur Seite versetzt wurden.

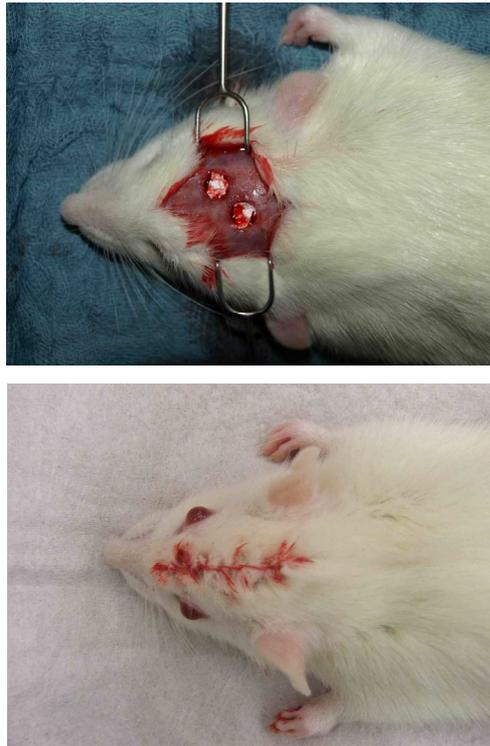
Um dem Operateur ein sensibles Arbeiten mit dem Rotationsbohrer zu ermöglichen, wurde eine flexible Welle eingesetzt. Als Bohrkopf diente ein Aufsatz, wie er üblicherweise im zahnärztlichen Fachgebiet verwendet wird (siehe Abb. 06)



*Abbildung 06: Trepanationsbohrer mit Aufsatz von 5mm Durchmesser, Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Deutschland; Artikelbezeichnung BTRRI; No. 229.040.*

Der resultierende Defektdurchmesser von 5mm konnte somit in standardisierter Weise reproduziert werden. Der erste Defekt wurde unter stetiger NaCl-Spülung im hinteren rechten Quadranten des Operationsfeldes gesetzt. Nachdem dieser erfolgreich platziert wurde, bohrte der Operateur den zweiten Defekt leicht nach ventral versetzt auf der Gegenseite zum ersten Loch. Erst nachdem beide Schritte ausgeführt waren, wurde die jeweiligen Implantate (Tutobone©-Spongiosa, PLLA oder PLLA-BMP-2-Implantat) eingesetzt (Vgl. Abb. 07-10).





*Abbildungen 07-10: In situ Ansicht der Implantate nach der Platzierung im Defektbereich. Von oben nach unten ist eine Ratte ohne Implantat (Negativkontrolle), eine mit Tutobone®-Chip (Positivkontrolle) und eine mit PLLA-Implantat gezeigt. Das letzte Bild zeigt eine bereits wieder zugenähte Ratte.*

Es wurde dabei darauf geachtet, die Nachblutung so gering wie möglich zu halten. Die meist minimalen persistierenden Blutungen konnten einfach durch lokale Kompression und Wundverschluss ausreichend reguliert werden.

Der anschließende Wundverschluss wurde in umgekehrter Reihenfolge wie die Wundöffnung durchgeführt. Zuerst wurden die Periostlappen erneut nach medial in ihre Ursprungsposition geklappt. Letztlich wurde die Kopfhaut durch einen geflochtenen resorbierbaren Faden der Stärke 4-0 (Vicryl rapide) mit Einzelknopfnähten vernäht und das Versuchstier der postoperativen Überwachung übergeben.

### **3.4: Postoperative Nachbetreuung und Pflege der Tiere**

Besonders nach einer Operation befinden sich die Tiere noch in einer vulnerablen Phase, welche die Wundheilung beeinflussen kann.

Wie bereits erwähnt, wurden die Ratten sofort nach der Naht zur postoperativen Nachsorge übergeben. Dazu gehörte in den ersten Minuten die genaue Beobachtung der Atmung sowie die suffiziente Verhinderung des Auskühlens. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurden die Ratten direkt in ihren Einzelkäfig (Macrolon Typ III) überführt, in dem bereits frische Pellets (LASQdiet® Rod 16 Rad, LASVendie, Soest, Deutschland) ausgelegt waren. Zudem waren in

diesem Beobachtungsraum mehrere Rotlichtlampen aufgestellt, um eine durchgehende Raumtemperatur von etwa 22°C zu erzielen. Ebenso wie Nahrung und Wasser ad libitum war eine konsequente Reizabschirmung durch den separaten Raum mit ausgeschaltetem Licht bereitgestellt.

In der Tierpflegeeinrichtung erhielten die Ratten frische Nahrung und Wasser ad libitum, die Käfige wurden regelmäßig gesäubert und es wurde auf artgerechte Haltung geachtet, welche gemäß § 16 Abs. 2 Tierversuchsgesetz, BGBl. Nr. 501/1989 vorgeschrieben ist.

### **3.5: Gewinnung der Knochen- und Blutproben**

Die Blutproben wurden am lebenden Tier gewonnen. Dazu wurden die Ratten per kontinuierlicher Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach initialer Betäubung durch Isofluran in einem großen Gefäß wurde den Ratten ein kleiner Erlenmeierkolben, in dem ein mit Isofluran getränkter Wattebausch platziert war, über die Nase gestülpt. Anschließend wurde mit einer Spritze (Serum Gel Monovetten) unter Aspiration Blut aus dem Herzen gewonnen. Diese Proben wurden im Anschluss im Labor auf C-reaktives Protein [mg/l], Haptoglobin [g/l], alkalische Phosphatase [U/l] sowie Calcium im Serum (ionisiert) [mmol/l] und Phosphat [mmol/l] untersucht. Die Tiere wurden durch anschließende CO<sub>2</sub>-Asphyxie getötet und nach sorgfältiger Präparation die Knochenproben mit Bindegewebe sowie Haut und Anhangsgebilden erhalten.



*Abbildung 11: Entnommene Schädelkalotte mit Gewebe zur weiteren histologischen Bearbeitung.*

### **3.6: Vorbereitung der Gewebeproben zur histologischen Auswertung**

Eine tabellarische Zusammenfassung der einzelnen Schritte zur Vorbereitung des Gewebes für die histologische Aufarbeitung gibt Tabelle 08 (siehe Anhang), weitere erläuternde Ausführungen zu der Technik und Wirkprinzipien finden sich im anschließenden Absatz.

Um die Gewebeproben mit histologischen Methoden untersuchen zu können, ist es zwingend notwendig, den Zerfall des Gewebes durch systematische Blockade aller autolytischer Prozesse aufzuhalten. Dies wurde durch eine Fixierung des Gewebes in 4%iger Formalinlösung erreicht. Nachdem die Proben drei Tage in einem Formalinbad eingelegt waren, wurden sie am Abend des dritten Tages unter stetigem, aber leichtem Wasserzu- und -abfluss im Labor gewässert. Zu diesem Zweck wurden die Proben einzeln in kleine Säckchen mit großen Maschen verpackt und ins Wasserbad gelegt.

Nachfolgend wurden die Gewebe für jeweils eine Woche in drei Gefäßen mit Osteosoft® (Firma Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) entkalkt. Da sowohl die Größe des Gewebestückes als auch das Gewebe selbst die Entkalkungszeit beeinflussen, ist die definitive Aussage, wann und ob das Gewebe ausreichend entkalkt ist, manchmal nur anhand einer manuellen Testung des „Weichheitsgrades“ fest zu machen. Das fertig entkalkte Material ist von Knorpel- oder Gummiartiger Konsistenz. Osteosoft enthält den Chelatbinder EDTA (Konzentration  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ : 177g/l, pH: 7,0-7,3), welcher Kalziumionen aus dem Gewebe entfernt, ohne dabei die Antigenstruktur zu beeinflussen (Merck, 2009). Aus diesem Grund eignen sich die mit Osteosoft/EDTA entkalkten Medien noch für eine immunhistochemische Untersuchung. Osteosoft ist gelb eingefärbt, um den Arbeitsprozess des „Entkalkens“ deutlich zu machen. Eine Abschwächung der Farbtintensität beeinflusst die Entkalkungsmöglichkeiten der Lösung nicht.

Die anschließenden Schritte dienen der Entwässerung des Materials. Um dies zu erreichen, wurden die Proben in eine aufsteigende Ethanolreihe von 50% für zwei Stunden, zweimal 70% für jeweils zwei Stunden, vier Stunden 80%, drei Stunden 90% und wieder vier Stunden 96% überführt. Isopropanol wurde im letzten Schritt als 100%iger Ethanolersatz eingesetzt (3x für jeweils fünf Stunden). Zur vollkommenen Entfernung des restlichen Wasserreste wurden die Schnitte nun für jeweils dreimal 14 Stunden in auf 50°C vorgewärmtes Zedernholzöl (Firma Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland;) im Wärmeofen (Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) inkubiert. Das Zedernholzöl dient als effektives Intermedium zwischen Isopropanol und Paraffin. Zum Schluss wurde das Zedernholzöl schrittweise durch Paraffin ersetzt.

Letztlich erfolgte die Einbettung in Paraffinblöcke. Das auf 62°C im Waxdispenser (Firma Barnstead Elektrothermal, Dubuque, Iowa, USA) erwärmte Paraffin wurde in die Einbettungsförmchen gegossen, in welche ein zurechtgeschnittener Gewebeblock gelegt

wurde. Die frisch eingegossenen Paraffinblöcke wurden nun auf einer Kühlplatte zur Aushärtung gebracht und anschließend in einem Kühlschrank bei etwa 6°C zur weiteren histologischen Verarbeitung gelagert.

### **3.7: Histologische Aufarbeitung und Färbeschemata**

Im Rahmen der Dissertation wurden mehrere histologische Färbungen durchgeführt. Dabei wurden zum einen zwei klassische histologische Färbungen bearbeitet, Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner, um einen allgemeinen Überblick über die Heilungssituation im Implantat zu erlangen. Andererseits wurden auch mehrere immunhistochemische Färbungen angewandt, um detaillierter Informationen über die zellulären Prozesse zu bekommen. Im Folgenden werden die Färbungsschemata im Detail dargestellt. Zum Anfertigen der 5µm dicken Schnitte der Gewebeproben diente ein Mikrotom aus dem Hause Leica (Leica Microsystems GmbH; Rm2125RT; Wetzlar, Deutschland).

#### A) Hämatoxylin-Eosin

Diese Färbung gehört zu den klassischen histologischen Standardfärbungen. Die Färbung wurde mit Hilfe von Färbekits der Firma Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland, durchgeführt. Die folgenden Informationen entstammen Datenblättern des Herstellers ("<http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/?brochures/clinical/W287021.pdf>; Zugriff 24.11.2009; 21:37 Uhr"). Mit den verwendeten Färbungskits stellen sich Kerne dunkelblau, Zytoplasma rot-orange und Kollagen, Elastin sowie Erythrozyten gelb orange dar. Eine selektive Färbung des Kerns durch Hämalaun wird durch die Azidität im Kernmilieu und dem Überschuss an Alaun erreicht. Eosin G hingegen ist ein saurer Farbstoff, welcher hauptsächlich an Proteine bindet. Dadurch bietet es sich als Zytoplasmafärbung an.

Details zu den einzelnen Produkten:

- Hämalaun nach Mayer, Bestellnummer: 1.09249
- Eosin G 0,5%, Bestellnummer: 1.09844

*Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin siehe Tabelle 09 (Anhang)*

#### B) Färbung nach Masson und Goldner

Die Masson-Goldner Färbung gehört zu den klassischen Bindegewebsfärbungen mittels Trichromtechnik. Es ist eine Färbung mit höherem technischen Aufwand und verlangt etwas mehr Erfahrung als zum Beispiel die relativ einfache HE-Färbung. Viele Abwandlungen dieses Färbeverfahrens existieren, was die Auswahl schwierig gestaltet. Wir haben uns daher für ein standardisiertes Kit aus dem Hause Merck (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) entschieden. Zur Kernfärbung wird dazu eine Gegenfärbung durch Weigerts Hämatoxylin empfohlen, da herkömmliche Hämatoxylinlösungen durch die sauren Farbstoffe in der Masson-Goldner Färbung entfärbt würden. Diese drei Färbemittel sind Lichtgrün SF, Phosphorwolframsäure, Orange G und Azophloxin. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die vom Hersteller veröffentlichten Angaben ("[http://www.merck-chemicals.de/chemdat/de\\_DE/Merck-DE-Site/EUR/ShowDocument-Protected?ProductAttachmentUUID=L6yb.s1Oh50AAAEkpSAXq\\_Ny&ProductUUID=.wmb.s1OjdkAAAEWF9FwbT2\\_&DocType=Bro&SKU=MDA\\_CHEM-100485&DocName=Masson-Goldner+Trichromf%26%23228%3Brbekit+-+zur+selektiven+Bindegewebsdarstellung+in+der+Histologie&DocLocale=de\\_DE&DocFormat=PDF](http://www.merck-chemicals.de/chemdat/de_DE/Merck-DE-Site/EUR/ShowDocument-Protected?ProductAttachmentUUID=L6yb.s1Oh50AAAEkpSAXq_Ny&ProductUUID=.wmb.s1OjdkAAAEWF9FwbT2_&DocType=Bro&SKU=MDA_CHEM-100485&DocName=Masson-Goldner+Trichromf%26%23228%3Brbekit+-+zur+selektiven+Bindegewebsdarstellung+in+der+Histologie&DocLocale=de_DE&DocFormat=PDF)"; Zugriff 23.11.2009; 18:04 Uhr"). Zellkerne werden dunkelbraun bis schwarz angefärbt, Zytoplasma und Muskulatur ziegelrot, Bindegewebe und saure Mucopolysaccharide stellen sich grün dar, Erythrozyten hingegen leuchtend orange.

*Details zu den einzelnen Produkten:*

- Masson-Goldner Kit; Bestellnummer: 1.00485.0001
- Weigerts Eisenhämatoxylin, Bestellnummer: 1.15973.0001

*Färbeprotokoll Masson-Goldner siehe Tabelle 10 (Anhang)*

### C) Histologische Färbung mittels Antikörper

Die im vorliegenden Versuch verwendeten Antikörper und Antikörper-Detektionskits wurden von Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland, erworben. Im Detail handelt es sich dabei um die Antikörper für Osteocalcin (Kit sc-30044, Haase), Kollagen 1A1 (Kit sc-25974, Ziege), BMP-2 (Kit sc-6895, Ziege) und SMAD5 (Kit sc-7443, Ziege) sowie die Detektionskits sc-2051 gegen Hasen-Antikörper und sc-2053 gegen Ziegenantikörper. Eine Demaskierung der Antigene musste nicht vorgenommen werden.

Wie bei den anderen Färbungen auch, wurden die 5µm dicken Gewebsschnitte zuerst in verschiedenen Xylolbädern entparaffiniert. Dazu wurde eine Serie von Schnitten in drei Behältern mit Xylol für jeweils 10 Minuten gebadet. Anschließend durchliefen die Schnitte, analog den Standardfärbungen, eine absteigende Alkoholreihe von 100% Ethanol (2x je

3min), 96% (3min), 90% (3min), 80% (3min) und 70% (3min). Daraufhin wurden die Schnitte in deionisiertem Wasser auf einer Schüttelplatte für eine weitere Minute gewaschen und das überschüssige Wasser von den Objektträgern durch Tuchaspiration entfernt. Die folgenden Schritte wurden alle in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die endogene Peroxidaseaktivität der Enzyme auf dem Schnitt zu unterdrücken und somit störende Signale bei der Detektion zu minimieren, wurden die Schnitte mit ein bis drei Tropfen eines vom Hersteller vorgefertigten Peroxidaseblocks für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS (Phosphat buffered Saline, pH=7,5-7,6) abgewaschen, für zwei Minuten in PBS auf einer Schüttelplatte gesäubert und danach die überflüssige Flüssigkeit aspiriert. Darauf folgend wurden die Schnitte mit einem vom Hersteller bereitgestellten Serum-Block für 20 Minuten inkubiert. Dabei handelt es sich beim Kit sc-2051 um normales Ziegenserum und beim Kit sc-2053 um normales Affenserum.

Im nun folgenden Schritt wurden die verdünnten Primärantikörper in ausreichender Menge auf den Objektträger aufgetragen, sodass die Gewebsschnitte bedeckt wurden. Die Antikörper wurden zu diesem Zweck im Serumblock des jeweiligen Detektionskits verdünnt. Vorherige Serien an Probeschnitten dienten dazu, die ideale Verdünnung herauszufinden. Die Präparate inkubierten nun über Nacht. Nach der abgeschlossenen Inkubation wurden die Schnitte mit PBS abgewaschen und anschließend zweimal für je zwei Minuten auf einer Schüttelplatte in PBS gesäubert und daraufhin die überschüssige Flüssigkeit aspiriert.

Die nun folgenden Schritte dienen der eigentlichen Detektion der gebundenen Primärantikörper. Um dies zu ermöglichen, wurden die Objektträger für 30 Minuten mit ein bis drei Tropfen eines 1:50 verdünnten biotinylierten sekundären Antikörpers inkubiert. Die verwendeten Antikörper des Kits sc-2051 entstammen der Ziege und sind gegen den Fc-Teil von Antikörpern des Hasen gerichtet, die Antikörper des Kits sc-2053 wurden aus Affen gewonnen und reagieren gegen den Fc-Teil von Ziegenantikörpern. Nach erneuter Abspülung und Waschung in PBS auf der Schüttelplatte (zweimal zwei Minuten) wurden die Objektträger nun mit ein bis drei Tropfen HRP-Streptavidin-Komplex (horse radish peroxidase), welches ebenfalls im Kit enthalten war, für 30 Minuten bedeckt. Während dieser Inkubationszeit wurde das so genannte HRP-Substrat frisch angesetzt. Dazu wurden in einem speziellen Mischgefäß 1,6ml deionisiertes Wasser, fünf Tropfen zehnfacher Substratpuffer, ein Tropfen DAB-Chromogen (3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) sowie ein Tropfen 50-faches Peroxidase-Substrat (Wasserstoffperoxid) zusammengegeben und zur weiteren Verarbeitung bereitgestellt. Da DAB bei Licht zerfällt, musste dieses Gemisch unter Ausschluss von Licht aufbewahrt werden. Nach der Inkubationszeit des HRP-Streptavidin

Komplexes wurden die Schnitte mit PBS abgewaschen und erneut zweimal zwei Minuten lang auf der Schüttelplatte gesäubert sowie überschüssige Flüssigkeit von den Schnitten entfernt. Im Anschluss wurde das bereits erwähnte HRP-Substrat auf die Schnitte aufgetragen und gewartet, bis eine leichte Braunfärbung der Schnitte zu erkennen war (etwa zehn Minuten). Auch dieser Schritt erfolgte unter minimalen Lichtverhältnissen, um die Stabilität des DAB zu gewährleisten. Damit stellt sich ein gebundener Antikörper im histologischen Schnitt als Braunfärbung dar, sodass daran indirekt auf die Präsenz des entsprechenden Antigens geschlossen werden kann. Nach erfolgreicher Färbung wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser abgewaschen und für jeweils zweimal zwei Minuten auf der Schüttelplatte gereinigt.

Nach dieser Antikörperfärbung wurde eine Gegenfärbung mit Gills Hämatoxylin für 20 Sekunden durchgeführt, um die Zellkerne besser zur Darstellung zu bringen. Nach fünfminütiger Bläuung unter kontinuierlichem Leitungswasserzufluss wurden die Präparate mit bekannter Alkoholreihe, welche auch bereits bei den übrigen Färbungen angewandt wurde, entwässert. Bei jeder Färbereihe wurde eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper angefertigt, um den korrekten Färberefolg zu überprüfen. Für Details wie angewandte Verdünnung der Antikörper wird auf Tabelle 11 (siehe Anhang) verwiesen.

*Details zu den einzelnen Produkten:*

Detektionskits:

- Sc-2051
- Sc-2053

Antikörper:

- Osteocalcin, Sc-3004
- BMP-2, Sc-6895
- SMAD5, Sc-7443
- COL1A1, Sc-25974

### **3.8: Technische Programme zur Histomorphometrie und Zellzählung**

Nach der Fertigung der Präparate wurden diese digital erfasst. Als Mikroskop wurde dazu ein Gerät der Firma Leica verwendet (Leica Microsystems GmbH, DM 5000B, Wetzlar,

Deutschland). Die Aufnahme der digitalen Bilder wurde durch eine Kamera ebenfalls von Leica bewerkstelligt (Typenbezeichnung DFC 320).

Die weitere digitale Bearbeitung und Auswertung der Bilder am Computer geschah entweder mit Hilfe des Programms Leica QWin Pro (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland Version 3.3.1; Seriennummer 9993) oder mit ImageJ (Version 1.6.0.10; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

### **3.8.1: Ausmessung der neu gebildeten Knochenmenge durch Leica QWin**

Um die Neubildung von Knochen zwischen den verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurden die Gewebeproben unter makroskopischer Kontrolle bis etwa in die Mitte des Defektes am Mikrotom geschnitten, da eine standardisierte Schnittbildebene erreicht werden sollte. Anschließend wurden diese Schnitte durch die bereits erwähnte Masson-Goldner Färbung aufgearbeitet. Durch diese Färbung ist es möglich, Knochen sehr gut zu erkennen. Anhand des histologischen Bildes kann neuer von altem Knochen unterschieden werden. Gleichzeitig dienen die Ränder des chirurgischen Eingriffes als Beurteilungshilfe, wo alter Knochen aufhört und neuer Knochen anfängt.

Da die kompletten Gewebeschnitte nicht auf einen Bildausschnitt abbildbar waren, wurde mittels der Quips-Mosaicfunktion ein Mosaicbild aus sechs einzelnen Bildern erstellt. Die gemessene Fläche wurde anschließend zur vorher gemessenen Defektfläche in Beziehung gesetzt. Die Auswertung der Tutobone©-Gruppe musste in besonderer Weise vorgenommen werden, da bereits ein größerer Teil der Defektfläche durch den Chip ausgefüllt war. In diesem Fall wurde die alte bovine Implantatspongiosa von der separat gemessenen neu gebildeten Knochenmenge, welche sich an den Spongiosabälkchen gruppierte, subtrahiert.

### **3.8.2: Zellauszählung durch ImageJ**

Die Schnitte für die Zellzählung wurden ebenfalls aus der Präparatmitte erstellt. Da eine Auszählung des gesamten Präparates keinen wesentlichen Informationszugewinn erbringt, wurden fünf repräsentative Abschnitte der Bilder bei 40-facher Vergrößerung ausgewählt (je ein Gesichtsfeld rechts und links sowie drei in der Mitte) und anschließend ausgewertet. Eine graphische Veranschaulichung der idealen Gebiete innerhalb eines Präparates zeigt Abbildung 13, ImageJ als Arbeitsoberfläche zeigt Abbildung 14.

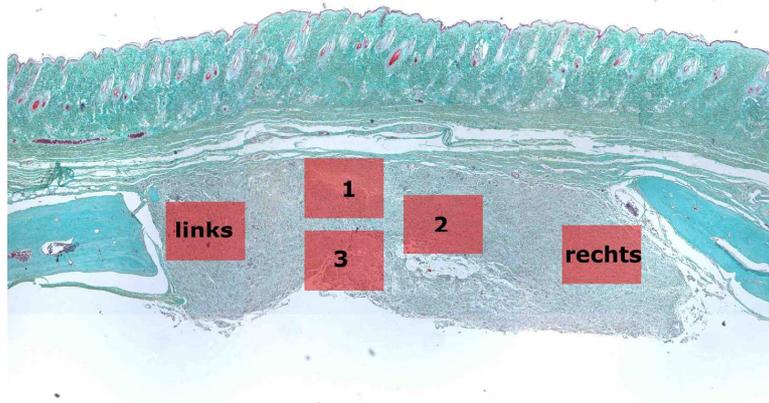


Abbildung 12: Exemplarisches Verteilungsmuster der Referenzstellen.



Abbildung 13: Zellzählung mit Image J.

### 3.8.3: Ausmessung der Osteocalcin-positiven Zellen durch ImageJ

Bei der Auswertung der Osteocalcin-positiven Zellen wurden vier repräsentative Stellen (je eine rechts und links, zwei in der Mitte des Präparates) bei 20-facher Vergrößerung untersucht. Es wurden dabei die Zellen als positiv angesehen, welche sich durch DAB deutlich braun anfärbten. Die Zellzählung erfolgte mit ImageJ.

### 3.8.4: Auszählung BMP-2- und SMAD5-positiver Zellen durch ImageJ

Die Auszählung oben genannte Zellen erfolgte analog Punkt 3.7.3.

---

### **3.9: Statistische Datenanalyse**

Die Datenanalyse erfolgte durch ANOVA via SPSS Version 17. Dabei wurden statistische Tests zum Nachweis von Unterschieden innerhalb einer Gruppe zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten sowie zwischen den Gruppen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p \leq 0,05$  festgesetzt.

## 4.: Ergebnisse

### 4.1: Gewichtsverlauf der Tiere

Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag anfangs bei  $236,77 \pm 19,34\text{g}$ , stieg auf  $417,13 \pm 46,58\text{g}$  während der dreimonatigen Beobachtungszeit an und zeigte damit deutliche statistische Zusammenhänge ( $p < 0,001$ ). Zwischen den verschiedenen Gruppen war kein Unterschied festzustellen.

### 4.2: Zellzählungen im HE-Präparat

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, wurden die Zellen zu quantitativen Vergleichen im HE-Präparat an definierten Stellen ausgezählt. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse in graphischer Form präsentiert. Diese Darstellungen zeigen die Mittelwerte aus den unterschiedlichen Messbereichen sowie Standardabweichung. Es wurden über 200.000 Zellen zu diesem Zweck ausgezählt.

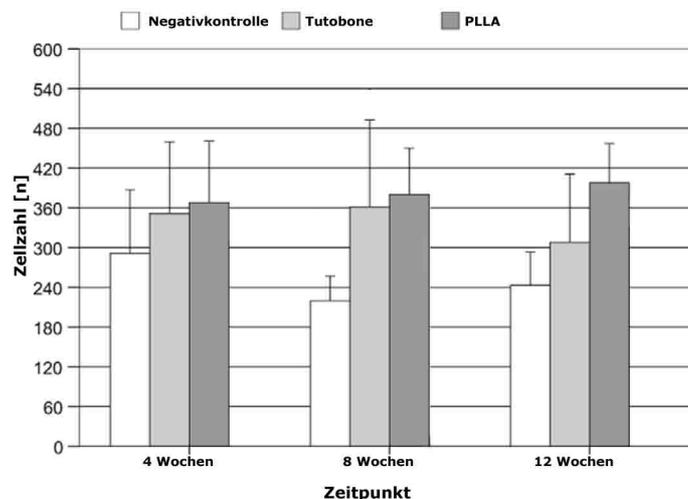


Diagramm 01: Verteilung der Zellzahlen der Versuchsgruppen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Statistisch signifikant mehr Zellen zwischen Negativkontrolle und PLLA nach acht und zwölf Wochen. Kein Unterschied zwischen PLLA und Tutobone©.

Insgesamt ist festzustellen, dass bei keiner der Gruppen eine nachweisbare Veränderung der Zelldichte zu den verschiedenen Zeitpunkten nachweisbar war.

Ähnliches zeigte sich beim Vergleich zwischen den Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten: nach vier Wochen war keine Unterschied, nach acht und zwölf Wochen aber zwischen PLLA und der Negativkontrolle auszumachen ( $p=0,08$  bzw.  $0,01$ ).

Gleichzeitig wurden auch die Verhältnisse der Zellanzahl in der Mitte des Präparates zum Rand des Präparates untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte kein Unterschied in der Zellverteilung nachgewiesen werden.

### 4.3: Ausmessung der Knochenneubildung im Masson-Goldner Präparat

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Ausmessung der Knochenneubildung im Masson-Goldner Präparat präsentiert. Hierbei wurde die Knochenneubildung als Anteil des Knochendefektes ausgemessen und in Prozent wiedergegeben

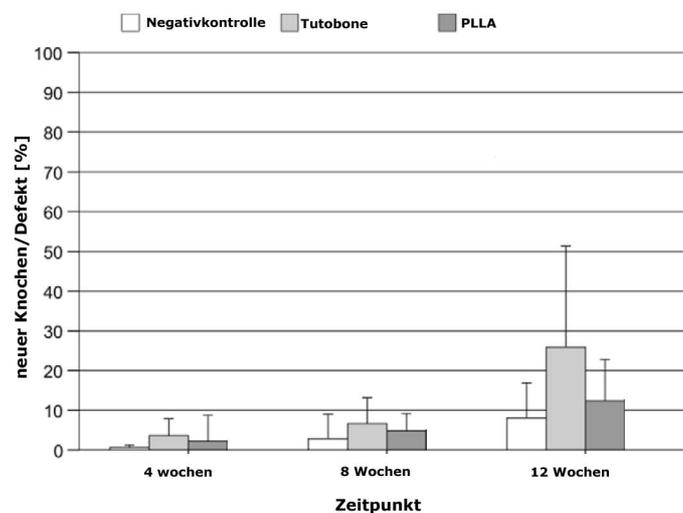


Diagramm 02: Teilweise signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

Alle Gruppen zeigten mit Fortschreiten der Heilungszeit eine Zunahme der Knochenneubildung. In der Negativkontrolle steigt der Anteil neu gebildeten Knochens von 0,64% auf etwa 8,09%, in der Tutobone©-Gruppe sogar von 3,64% auf fast 25,91% und in der PLLA-Gruppe von 2,26% auf 12,41%. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und PLLA nach zwölf Wochen zeigte aber keine Signifikanz.

Ein Vergleich innerhalb der Negativkontrollen offenbart aber, dass es in dieser Gruppe zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Anstieg der neu gebildeten Knochenmasse gibt, auch nicht im Vergleich zwischen vier und zwölf Wochen. In der Kontrollgruppe ergab sich ein nachweisbarer Unterschied zwischen vier und zwölf sowie acht und zwölf Wochen ( $p \leq 0,03$ ), nicht jedoch zwischen vier und acht Wochen. Anders hingegen in der PLLA-Gruppe: Dort war lediglich ein Unterschied zwischen vier und zwölf Wochen auszumachen ( $p \leq 0,032$ ).

Zwischen den Gruppen konnte weder zu vier, noch zu acht oder zwölf Wochen ein statistisch nachweisbarer Unterschied festgestellt werden, wenngleich die Unterschiede nach zwölf Wochen bei 17,82% (zwischen Tutobone© und Negativkontrolle) im Maximum lagen.

#### 4.4: Anzahl Osteocalcin-positiver Zellen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Auszählung Osteocalcin-positiver Zellen im Gewebsschnitt gezeigt. Eine grafische Übersicht bietet Diagramm 03.

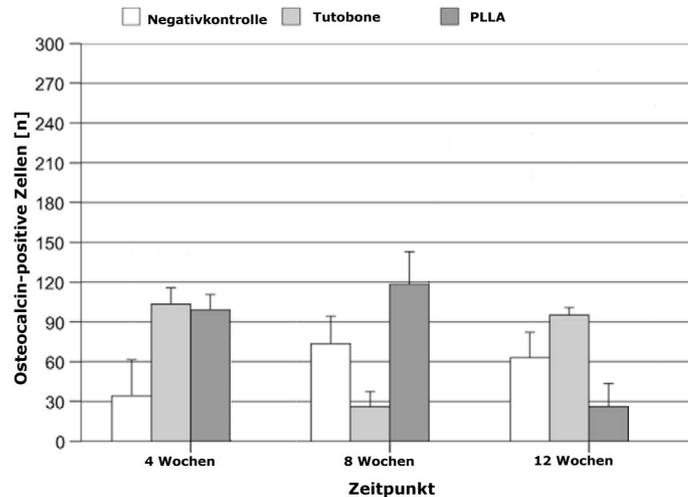


Diagramm 03: Signifikanter Abfall der OC-positiven Zellen nach zwölf Wochen in der PLLA-Gruppe unter den Wert der Negativkontrolle, die Tutobone©-Gruppe verhält sich invers.

Sowohl in der Negativkontrolle als auch in der PLLA-Gruppe kam es nach acht Wochen zum Anstieg der Osteocalcin-positiven Zellen, um danach wieder auf einen niedrigeren Wert nach zwölf Wochen zu fallen. Dieser Verlauf war in der Negativkontrolle zwischen vier und acht Wochen signifikant, in der PLLA-Gruppe zwischen vier und zwölf sowie acht und zwölf Wochen ( $p \leq 0,001$ ). Dabei fiel die Anzahl positiver Zellen im PLLA-Präparat nach zwölf Wochen sogar unter denen in der Negativkontrolle ( $p = 0,007$ ) und Tutobone© ( $p \leq 0,001$ ).

Anders hingegen in der Tutobone©-Gruppe. Nach einem kurzem Abfall der Osteocalcin-produzierenden Zellen nach acht Wochen ( $p \leq 0,001$ ) stiegen diese zum letzten Beobachtungszeitpunkt auf die Höhe des Anfangswertes ( $p \leq 0,001$  zwischen acht und zwölf Wochen) an.

Im Vergleich zwischen den Gruppen konnte ein statistisch relevanter Unterschied zwischen Osteocalcin-produzierenden Zellen im Leerpräparat und Tutobone© sowie PLLA nach vier Wochen gezeigt werden ( $p \leq 0,001$ ). Nach acht Wochen waren mit Ausnahme von Negativkontrolle zu PLLA alle Unterschiede signifikant, nach zwölf Wochen lediglich der Unterschied zwischen Tutobone© und PLLA.

#### 4.5: Anzahl BMP-2-positiver Zellen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Auszählung BMP-2-positiver Zellen im Gewebsschnitt gezeigt. Eine grafische Übersicht bietet Diagramm 04.

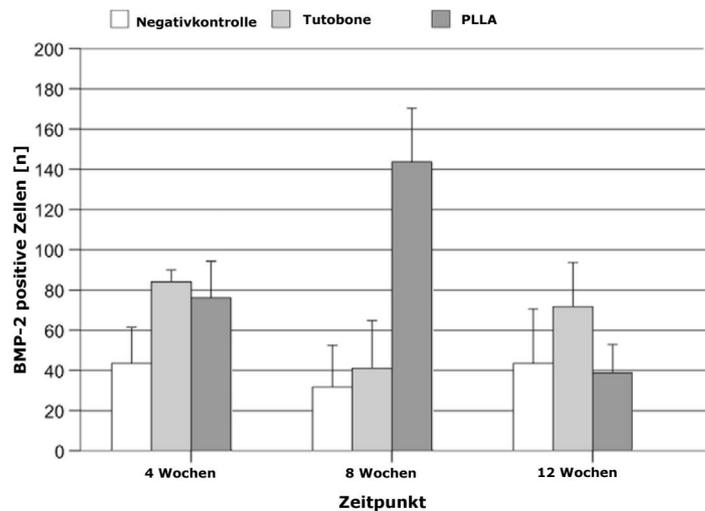


Diagramm 04: Ähnlicher Verlauf bei den BMP-2-positiven Zellen wie bei den OC-positiven Zellen (siehe dort).

Die Gruppenverläufe zeigten dabei insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie die Osteocalcin-positiven Zellen. Während sowohl in der Gruppe ohne Implantat als auch in der Referenzgruppe mit Tutobone® ein Abfall der BMP-2-positiven Zellen nach acht Wochen mit nachfolgendem Anstieg in etwa auf Höhe des Wertes nach vier Wochen zu verzeichnen war, ist dies in der PLLA- Versuchsgruppe umgekehrt. Dennoch erwiesen sich die Unterschiede im Verlauf innerhalb der Negativkontrolle als nicht signifikant, innerhalb der Positivkontrolle jedoch zwischen vier und acht sowie zwischen acht und zwölf Wochen ( $p=0,004$  bzw.  $p=0,039$ ). Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede innerhalb der PLLA-Gruppe zu allen Zeitpunkten signifikant ( $p \leq 0,001$ , Ausnahme zwischen vier und zwölf Wochen:  $p \leq 0,019$ ). In dieser Gruppe steigt die Anzahl an BMP-2-positiven Zellen nach acht Wochen im Vergleich zu vier Wochen signifikant an, um danach wieder auf einen Wert kleiner als nach vier Wochen zu fallen. Dieser Anstieg der BMP-2-positiven Zellen innerhalb der PLLA-Gruppe nach acht Wochen war gleichfalls signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen Gruppen zu diesem Zeitpunkt ( $p \leq 0,001$ ).

Weiterhin bestanden zum Zeitpunkt vier Wochen zwischen Negativkontrolle und Tutobone® ( $p \leq 0,001$ ) sowie Negativkontrolle und PLLA ( $p \leq 0,005$ ) signifikante Unterschiede. Keine Signifikanz hingegen wurde zu diesem Zeitpunkt zwischen Tutobone und PLLA nachgewiesen.

Nach zwölf Wochen stellten sich signifikant hohe Werte innerhalb der Tutobone® Versuchsreihe im Vergleich zu acht Wochen ein, zwischen den Gruppen konnte aber kein statistisch nachweisbarer Unterschied festgestellt werden.

#### 4.6: Anzahl SMAD5-positiver Zellen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Auszählung SMAD5-positiver Zellen im Gewebsschnitt gezeigt. Eine grafische Übersicht bietet Diagramm 05.

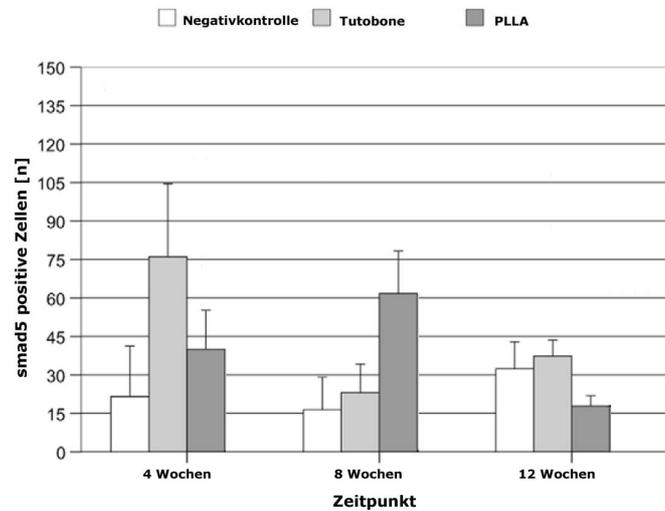


Diagramm 05: ähnlicher Verlauf bei den SMAD5-positiven Zellen wie bei den BMP-2 und OC-positiven Zellen (siehe dort).

Während innerhalb der Negativkontrollen keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, präsentierte sich in der Tutobone©-Gruppe ein nachweislicher Unterschied zwischen vier und acht (Verminderung der SMAD5-positiven Zellen nach einem Gesamtmaximum nach vier Wochen,  $p \leq 0,001$ ) sowie vier und zwölf Wochen (erneuter Anstieg,  $p = 0,006$ ). Die Veränderungen im Verlauf der PLLA-Gruppe mit einem Anstieg der SMAD5-positiven Zellen von vier auf acht Wochen mit folgendem Abfall nach zwölf Wochen waren zu jedem Zeitpunkt signifikant.

Nachdem nach vier Wochen ein relevanter Anstieg in der Tutobone©-Gruppe im Vergleich zu den restlichen Untersuchungsgruppen festzustellen war ( $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,025$ ), zeigte sich dies für PLLA nach acht Wochen ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,012$ ). Zum letzten Beobachtungszeitpunkt konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr ausgemacht werden.

#### 4.7: Laborchemische Untersuchungen

Im Folgenden sind die laborchemischen Ergebnisse für Alkalische Phosphatase, C-reaktives Protein, Calcium im Serum, Phosphat sowie Haptoglobin aufgelistet.

Alkalische Phosphatase [U/l]				
Negativkokontrolle	Tutobone©	PLLA		
206,78(161-248)	189,9(158-227)	157,14(129-197)		Woche 4
143,22(105-177)	150,8(124-177)	159,9(131-277)		Woche 8
468,5(290-573)	520,11(267-1600)	469,8(311-563)		Woche 12

Tabelle 02: Alkalische Phosphatase der Gruppen zu vier, acht und zwölf Wochen.

Haptoglobin [g/L]				
Negativkokontrolle	Tutobone©	PLLA		
0,88(0,6-1,12)	0,99(0,58-1,58)	1,04(0,6-1,42)		Woche 4
0,88(0,51-1,07)	0,75(0,44-1,07)	0,99(0,76-1,03)		Woche 8
1,15(0,94-1,39)	1,14(0,59-1,46)	1,37(0,78-1,55)		Woche 12

Tabelle 03: Haptoglobinwerte der Gruppen zu vier, acht und zwölf Wochen.

Phosphat [mmol/L]				
Negativkokontrolle	Tutobone©	PLLA		
2,82(2,25-3,68)	3,11(2,64-3,66)	4,13(2,24-13,52)		Woche 4
2,28(1,87-2,92)	2,65(2,13-3,21)	2,58(1,98-3,0)		Woche 8
2,12(1,88-2,76)	2,00(1,8-2,24)	2,09(1,49-2,42)		Woche 12

Tabelle 04: Phosphatwerte der Gruppen zu vier, acht und zwölf Wochen.

CRP [mg/L]				
Negativkokontrolle	Tutobone©	PLLA		
44,56(41,2-47,2)	39,52(37,3-44,5)	43,21(38,4-62,6)		Woche 4
22,24(14,3-69,1)	15,9(13,8-23)	16,56(12,3-22,1)		Woche 8
19,85(17,6-23,5)	18,94(17,1-24,4)	21,09(16,6-26,9)		Woche 12

Tabelle 05: CRP-Werte der Gruppen zu vier, acht und zwölf Wochen.

Calcium i.S. ionisiert [mmol/L]				
Negativkokontrolle	Tutobone©	PLLA		
1,13(0,96-1,32)	1,15(0,95-1,25)	1,06(0,5-1,2)		Woche 4
1,42(1,26-1,67)	1,48(1,31-1,67)	1,38(1,3-1,45)		Woche 8
1,37(1,32-1,43)	1,29(1,25-1,33)	1,26(1,23-1,3)		Woche 12

Tabelle 06: Calciumwerte der Gruppen zu vier, acht und zwölf Wochen.

Bei der statistischen Auswertung der Laborergebnisse zeigte sich insgesamt keine deutliche Erhöhung des C-reaktiven Proteins im Sinne eines entzündlichen Geschehens. Nach einem initialen Anstieg des CRPs kommt es zügig zu einem Abfall um etwa 50%. Zwischen den

verschiedenen Gruppen ist lediglich ein signifikant höherer Anstieg des CRP im Vergleich zu Tutobone© und PLLA nach vier Wochen ( $p=0,00022$ ) gegeben, welcher aber nur sehr gering ist und sich im Verlauf verliert. Die Reduktion des CRP zwischen vier und acht Wochen sowie vier und zwölf Wochen ist in allen Gruppen signifikant, zwischen den Zeitpunkten acht und zwölf Wochen besteht keine signifikante Veränderung der Werte mehr.

Als weiterer Marker im Rahmen einer Entzündungsreaktion sowie Hämolyse wurde *Haptoglobin* untersucht. Hierbei war ebenfalls kein Anstieg über den Normbereich zu erkennen. Zwischen den Gruppen kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden.

Hingegen kam es bei allen Gruppen nach zwölf Wochen zu einem Anstieg der *alkalischen Phosphatase* über den Normbereich. Zudem stiegen die Werte für die AP zum letzten Zeitpunkt hin signifikant auf ihren jeweils höchsten Wert an ( $p\leq 0,028$ ), innerhalb der Tutobone©-Gruppe maximal bis auf 520 U/l. Zwischen den Gruppen selbst kam es zu keinen relevanten Unterschieden.

Bei Betrachtung der Calciumwerte im Serum fällt bei allen Gruppen ein Anstieg des Serumkalziums nach acht Wochen auf. Dieser Anstieg ist bei allen Gruppen signifikant. Sowohl davor als auch danach normalisieren sich diese Werte aber wieder. Zwischen den Gruppen konnte insgesamt auch kein relevanter Unterschied aufgezeigt werden.

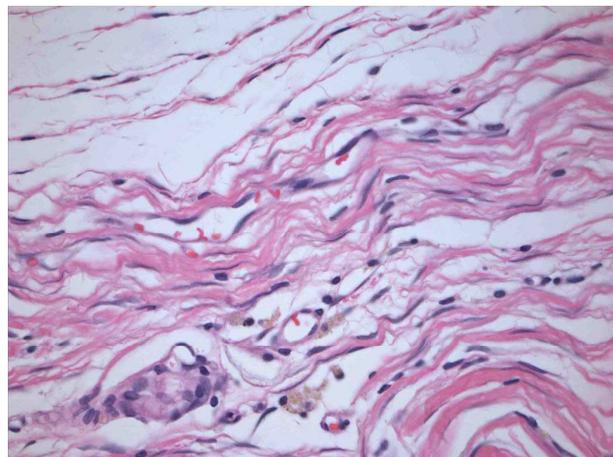
## **4.8: Histologische Aufarbeitung der Präparate**

### **4.8.1: Allgemeine Morphologie der Präparate in der HE und Masson-Goldner Färbung**

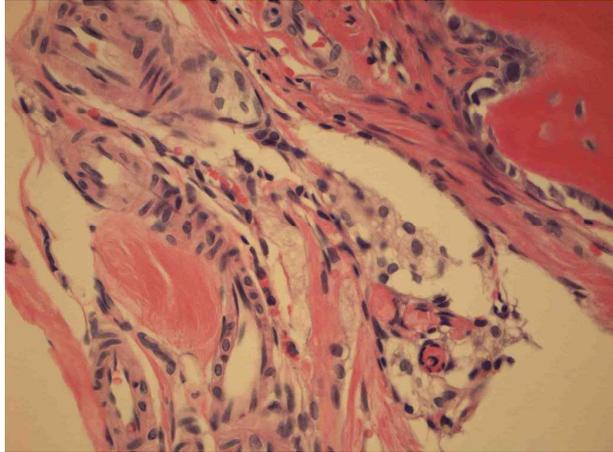
Die allgemeine Histologie lässt sich am zuverlässigsten in den Standardfärbungen der mikroskopischen Anatomie erfassen. Die Negativkontrollen (siehe Abbildung 14) zeigen alle eine Auffüllung des Defektes mit Zellen, die lediglich eine Art Schutzkappe über den Defekt bilden. Diese Schutzkappe ist sehr dünn und nur wenige Millimeter dick. Innerhalb dieser Schicht an Zellen erkennt man einige Zellen mit teilweise sehr lang gestrecktem Kern. Die Zellen sind einkernig, der Kern selbst ist basophil und ist in der Mehrzahl der Fälle etwa parallel zu den die Zellen umgebenden kollagenen Fasern, welche sich im histologischen Schnitt eosinophil anfärben, angeordnet. Gelappte Zellkerne lassen sich nicht feststellen. Ebenso zeigen sich nur in seltenen Fällen mehrkernige Zellen. Die Zellgrenzen sind nicht immer eindeutig feststellbar. Es ist reichlich Stroma vorhanden, welches im HE-Bild vor allem eosinophil erscheint. Ebenfalls erkennbar sind Gefäßneubildungen. Teilweise bilden sich auch Zellen ab, welche um stark eosinophile Knochensplitter angeordnet sind, die sich

mitten im Defekt zeigen. Diese Knochensplitter scheinen von den sie umgebenden Zellen resorbiert zu werden, da die Oberfläche dieses avitalen Knochens zerklüftet und zerfranst aussieht. Die sie umgebenden Zellen sind fixierungsbedingt nicht mehr diesen Knochenstrukturen anliegend.

Osteoblasten finden sich nur sehr spärlich. Wenn, dann sind diese direkt an den Defekträndern am Knochen lokalisiert und sind dort als dem Knochen eng anliegende Zellen mit einem großen runden Kern und definierbaren Zellgrenzen auszumachen. Ihre Zelleiber sind basophil, ein paar wenige sind bereits in neu gebildetem Knochen als Osteozyten eingeschlossen. Diese sind in den Antikörperfärbungen besser auszumachen. Insgesamt stellen diese Zellen aber in den Negativkontrollen die Minderheit dar. Besonders zu betonen ist die periostale Reaktion, welche aufgrund der sonst geringen Knochenneubildung in den Negativkontrollen besonders sichtbar wird (siehe Abb. 18). Eine Knochenneubildung im Defektbereich zeigte sich wenig, wenn aber, dann als eine Auftreibung der Frakturrenden. Eine neu gebildete Knochenschicht ist dann an der Innen- sowie Außenseite des Schädelknochens auszumachen, welche in manchen Fällen zusammen etwa so breit ist wie der ursprüngliche Schädelknochen. Der Knochen verdickt sich somit zusehends an den Frakturrenden. Eine Überbrückung des Spaltes ist bei zentraler Schnittführung, wie wir sie in unseren Schnitten durchgeführt haben, in der Negativkontrolle aber zu keinem Zeitpunkt sichtbar.

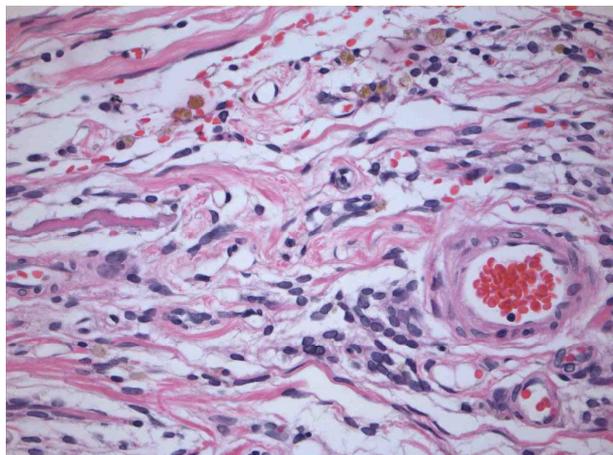


*Abbildung 14 aus Präparat 47 (Negativkontrolle Woche 8): Zellen mit länglichen Kernen und nicht definierbaren Zellgrenzen. Um ein zentral liegendes Gefäß finden sich Siderophagen.*



*Abbildung 15 aus Präparat 8 (Negativkontrolle Woche 4): Rechts oben im Bild sind dem Knochen eng anliegende Osteoblasten mit leicht basophilem Zytoplasma und großem, aktivierten Kern zu erkennen. Zu erkennen sind auch die Zellkerne von fünf Osteozyten, die bereits von neuem Knochen ummauert sind.*

Eine Zelleinheit, welche in allen Präparaten immer wieder auftaucht, sind etwas größere, meist einkernige Zellen mit granulären, bräunlichen intrazellulären Ablagerungen. Diese Ablagerungen erscheinen wie kleine rundliche Speicherhaufen. Die Zellkerne dieser Zellen sind recht groß und rund, was auf einen aktivierten Zustand dieser Zellen hindeutet. Meistens finden sich diese Zellen im bindegewebigen Anteil der Präparate (nicht z.B. im PLLA) etwas dezentral des eigentlichen Defektes, teilweise auch in der Nähe von Gefäßen (siehe folgende Abbildungen 16 und 17). Bei diesen Zellen könnte es sich möglicherweise um Siderophagen handeln. Eine Übersicht zeigt Abb. 18.



*Abbildung 16 aus Präparat 48(Negativkontrolle Woche 8): Links im Bild sind resorbierende Zellen um ein Knochenfragment angeordnet. Rechts ein großes, neu gebildetes Gefäß mit Erythrozyten. Oben sind Siderophagen mit braunem Zellinhalt in der Nähe mehrerer kleinerer Gefäße.*

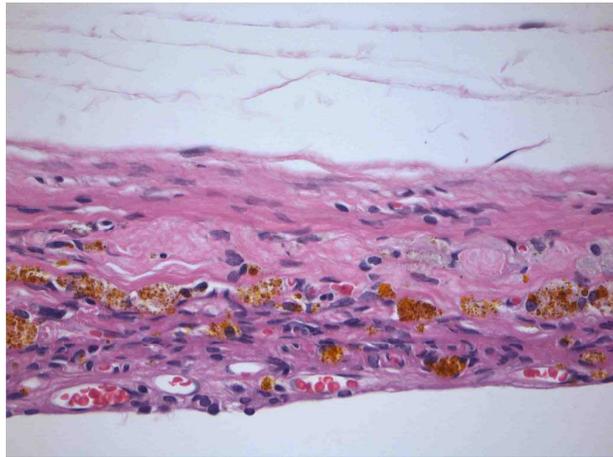


Abbildung 17 aus Präparat 86(Negativkontrolle Woche 12): deutlich erkennbare Siderophagen.

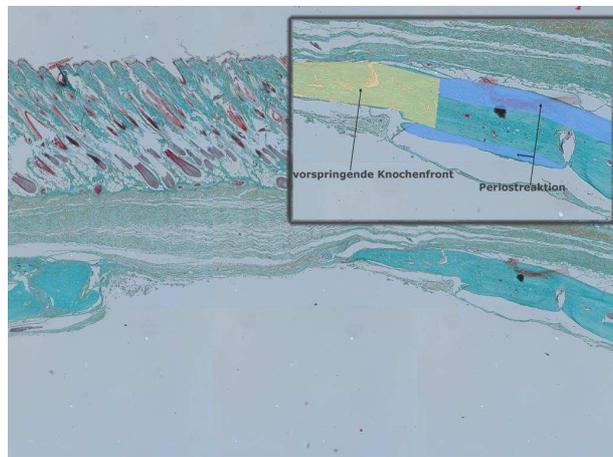
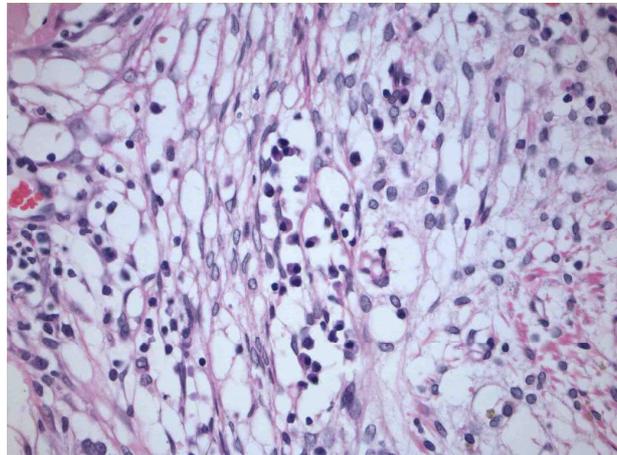


Abbildung 18: Übersicht Präparat 7(Negativkontrolle Woche 4): deutlich erkennbare periostale Reaktion mit Verdickung der Frakturenden sowie einsproßender Knochenfront rechts im Bild. Bild-in-Bild zeigt eingefärbt die Periostreaktion und Knochenfront. Ebenfalls erkennbar ist eine dem Knochen von außen anliegende derbe Bindegewebsschicht, welche über den Defekt reicht.

Die Defekte, welche mit Tutobone©-Chips aufgefüllt wurden, zeigten im Vergleich zu den Leerkontrollen einige Besonderheiten. Bereits in der vierten Woche waren sämtliche Räume zwischen den Knochenbälkchen mit Zellen und Bindegewebe durchsetzt. Auch hier dominierten, ähnlich wie bei den Leerkontrollen, zum Zeitpunkt vier Wochen nach Intervention Bindegewebe bildende Zellen mit basophilen, länglichen Kernen in eosinophilem Stroma, welches lamellenartig angeordnetes kollagenes Bindegewebe erkennen lies. Auch hierbei waren die Defekte gut zugeheilt und ein intakter regulärer Aufbau der Kutis und Subkutis war zu erkennen. Der vorherrschende Zelltyp ist einkernig. Neben den Zellen mit länglichen Kernen, welche auch in den Leerkontrollen zu erkennen waren, zeigten sich in diesen Präparaten zusätzlich viele einkernige Zellen mit einem basophilem, runden Zellkern.

Riesenzellen oder mehrkernige Zellen waren nicht vertreten. Siderophagen konnten ebenfalls dargestellt werden, zwischen den Knochenersatzmaterialien waren sie aber nur ausnahmsweise anzutreffen. Die Distanz zwischen den Knochenbälkchen und den Zellen ist als Fixierungsartefakt zu werten.



*Abbildung 19 aus Präparat 57: Repräsentativer Ausschnitt des Zellbildes zwischen den Knochenbälkchen des Tutobone®-Chips; neben vielen Zellen mit länglichen Kernen sind einige Zellen mit rundem Kern zu erkennen, deren Somata besser abgrenzbar sind.*

Besonderheiten ergeben sich bei Betrachtung der Ossifikationsbereiche. Während bei den Leerdefekten eine Verknöcherung von den Randbereichen her zu beobachten war, ist dies bei der Gruppe mit Tutobone® nicht der Fall. Zwar ist ebenfalls eine ausgeprägte periostale Reaktion zu verzeichnen. Die Verknöcherung stoppt jedoch an der Grenze zum Implantat. Gleichzeitig zeichnet sich eine ubiquitäre Ossifikation an den Knochtrabekeln innerhalb des Tutobone®-Chips ab. Diese Verknöcherungszonen sind an den basophilen Osteoblasten, welche wie in einer Reihe Seite an Seite den Knochenbälkchen aufgelagert sind, ebenso wie durch die farblich leicht abgehobene neue Knochenmatrix zu erkennen. Alter Knochen des Implantates kann durch die leeren Räume ohne Osteozyten, welche während des Tutoplast-Prozesses eliminiert wurden, differenziert werden. Auch durch die Fixierung und Färbung konnte dabei keine Spaltbildung zwischen neu gebildeter Knochenmatrix und alter Knochenstruktur des Implantates provoziert werden. Abbildung 20 zeigt dazu ein Präparat mit deutlich erkennbaren Osteoblasten und Knochenneuauflagerungen.

Eine Abstoßungsreaktion mit Entzündungszellen war nicht zu verzeichnen. Mehrkernige Zellen sind die Ausnahme, ebenso sind keine Zellen mit gelappten Kernen sichtbar.

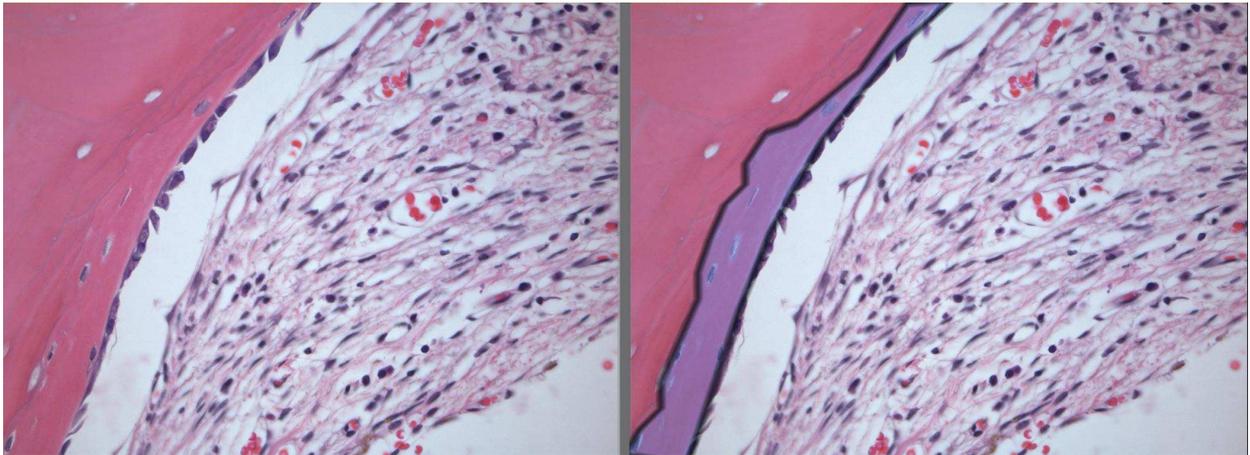


Abbildung 20 aus Präparat 96: Links sind deutlich erkennbare basophile Osteoblasten, die dem Knochen eng angelagert sind. Darunter befindet sich eine bereits synthetisierte Schicht mit neuem Knochen, welche rechts violett markiert ist. Leere Osteozytenlakunen befinden sich daran im Anschluss, welche den avitalen Knochen der Tutobone©-Chips markieren. Das bindegewebige Stroma ist fixierungsbedingt von den Osteoblasten gelöst.

Ein eigenes Muster zeigte sich bei der Begutachtung der histologischen Schnitte derjenigen Versuchstiere, welchen **PLLA-Fasern** implantiert wurden. Während auch hierbei eine reguläre Heilung der Kopfhaut zu verzeichnen war, bot sich direkt innerhalb des Implantats ein anderes Bild. Schon bereits in der Aufsicht ist zu erkennen, dass die Implantate stark von Zellen durchsetzt sind. Es finden sich dabei weniger Zellen mit länglichen Kernen in gestrecktem Zustand, sondern eher viele Zellen mit runden Kernen. Die Kerne sind ebenfalls basophil, das Zytoplasma nicht auffällig basophil oder eosinophil, sondern intermediär. Auffällig sind große Kerne mit deutlich darstellbaren Neukleoli, welche eine hohe Aktivität der Zellen widerspiegeln. Der Anteil an Osteoblasten ist im Gegensatz dazu geringer.

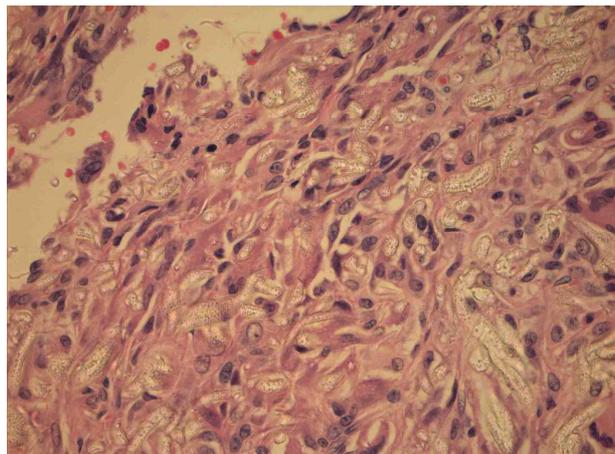
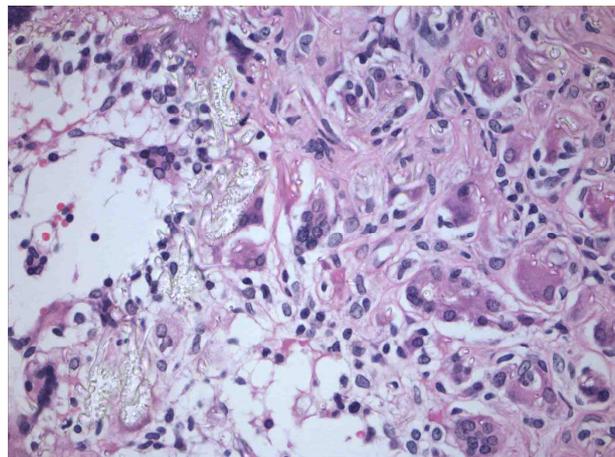


Abbildung 21 aus Präparat 21: Viele groß wirkende Zellen mit deutlich basophilen Zellkernen und gut darstellbaren Nukleoli als Zeichen der Aktivierung. PLLA-Fasern als helle, nicht angefärbte Konstrukte zwischen den Zellen.

Granulozyten mit gelappten Zellkernen sind nicht auffindbar. Als besondere Eigenheit der PLLA-Präparate stellen sich mehrkernige Riesenzellen heraus, welche teilweise über 30

Kerne besitzen, die meistens an einer Seite konzentriert zum Liegen kommen. Auch diese Zellen zeigen Nukleoli in ihren Zellkernen. Das Zytoplasma hebt sich dabei von den anderen Zellen etwas hervor, da es kräftiger als der durchschnittliche Zelltyp angefärbt ist. Die Zellen zeigten sich selten positiv für die getesteten Antikörperfärbungen (siehe dort). Eine direkte Verbindung zu neuem Knochen kann dabei bestehen, ist aber nicht immer der Fall. Einschlusskörperchen kommen in den Zelleibern der Riesenzellen nicht zur Darstellung. Ebenso wenig ist ein Verbund von Riesenzellen um eine zentrale Stelle im Sinne einer Granulombildung erkennbar. Die Riesenzellen sind dabei im Präparat diffus angeordnet, eine fokale Anreicherung der Zellen ist nicht augenscheinlich. Außerhalb des PLLA-Implantats waren sie nicht anzutreffen. Die Riesenzellen sind durch den kompletten Beobachtungszeitraum von 12 Wochen zu sehen. Eine Veränderung des Typus konnte nicht dargestellt werden.



*Abbildung 22 aus Präparat 64 (PLLA Woche 8): Rechts sowie zentral im Bild sind mehrere Riesenzellen mit kräftig angefärbtem Zytoplasma sowie basophilen Kernen mit Nukleoli zu erkennen.*

Die PLLA-Fasern konnten ebenfalls an sämtlichen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Dabei fiel auf, dass die Fasern (evtl. durch Resorptionsvorgänge) weniger wurden, je später der Untersuchungszeitraum war. Während nach vier Wochen noch sehr viele Fasern erfassbar waren, waren nach 12 Wochen nur noch wenige zu erkennen (vgl. Abb. 23).

Die Verknöcherung des Präparates stellt sich gleichermaßen als eine Besonderheit dar. Während die Verknöcherung bei den Negativkontrollen von außen nach innen verläuft, bei den Tutobone®-Chips anhand der Knochenbälkchen, ist dies innerhalb der PLLA-Implantate ohne ein offensichtliches Muster. Zwar bildet sich wie bei den Negativkontrollen eine deutliche periostale Reaktion heraus. Es können sich aber auch an unterschiedlichen Stellen direkt im Präparat kleine Ossifikationszentren bilden. Insgesamt präsentieren sich mehrere Stellen im Präparat bei Färbung nach Masson-Goldner in rotem Farbton, was als Hinweis auf

Osteoid verwertbar sein kann. Dennoch ist die letztliche Knochenneubildungsrate im Präparat gering und geht ähnlich der Negativkontrolle hauptsächlich von den Frakturrenden aus. Eine Ossifikation direkt auf den PLLA-Fasern scheint nicht immer sofort statt zu finden. Wenn eine Verknöcherungszone zu sehen ist, dann oft dort, wo bereits ein größerer Teil der Fasern resorbiert worden ist. Dennoch werden auch direkt um die noch bestehenden PLLA-Fasern Knochenstrukturen angebaut (siehe Abb. 24).

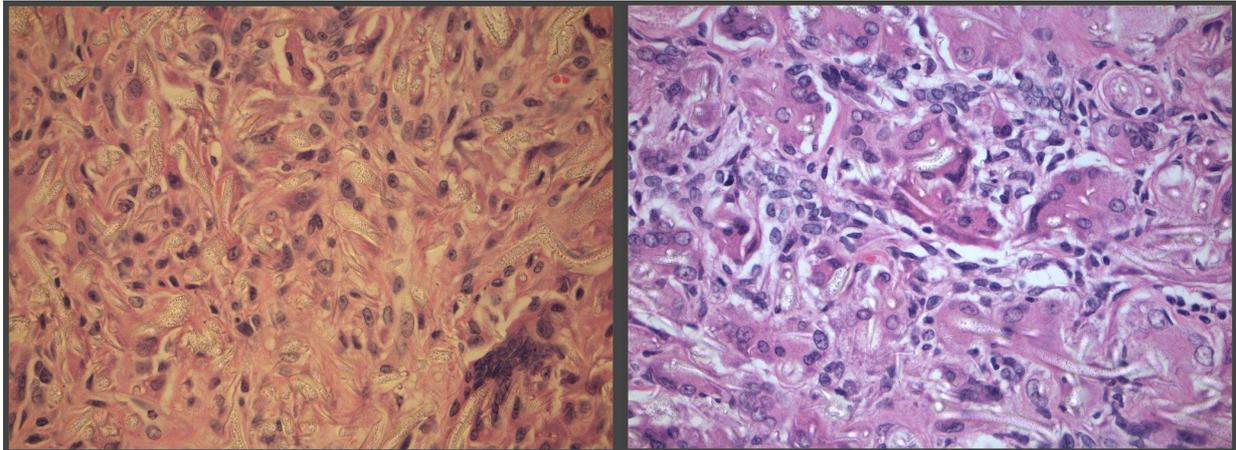


Abbildung 23 aus Präparat 21(links) und 108(rechts): Erkennbar ist die Abnahme der Faserdichte, zudem in beiden sichtbare Riesenzellen mit besonders vielen Kernen im Bild links unten.

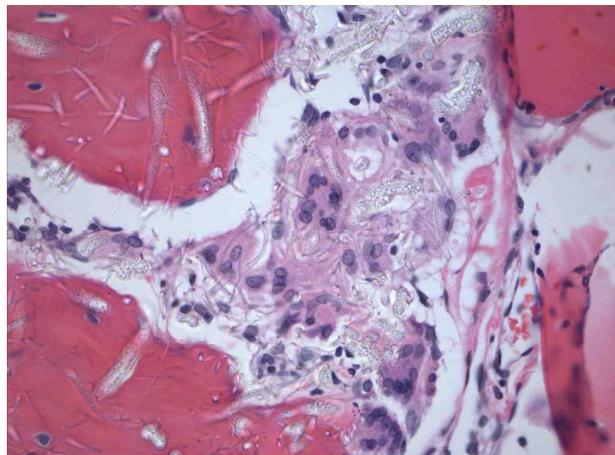
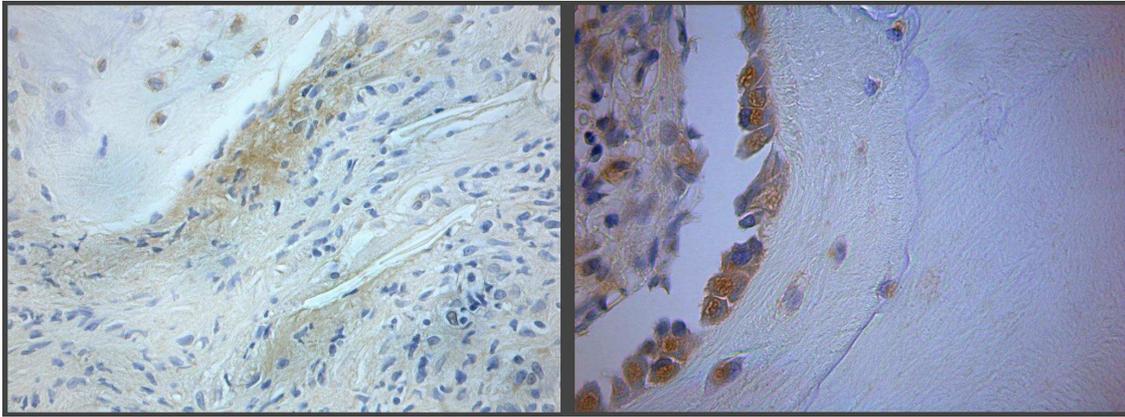


Abbildung 24 aus Präparat 65: Knochenneubildung in einem Präparat mit PLLA-Fasern.

#### 4.8.2: Antikörperfärbung gegen BMP-2 und SMAD5

Da BMP-2 durch SMAD5 intrazellulär vermittelt wird, kann eine Koinzidenz der beiden Signale innerhalb einer Zelle erwartet werden. Dies kann durch die in diesem Versuch zur Verfügung stehenden histologischen Techniken nicht direkt dargestellt werden. Indirekt weist aber die Positivität von Osteoblasten sowohl für BMP-2 als auch für SMAD5 darauf hin. Dieser Zusammenhang zeigte sich in den von uns angefertigten Schnitten.

Da BMP-2 vor allem in Osteoblasten produziert wird, ist dort eine besonders starke Färbung zu erwarten. Der extrazelluläre Anteil von BMP-2 ist relativ gering, weshalb hierbei nur eine schwache Anfärbung zur Ausprägung kommen sollte. In mehreren Bildern wurde eine fokale Mehranreicherung von BMP-2 nahe dem neu gebildeten Knochen deutlich (siehe Abb. 25).



*Abbildung 25 aus Präparat 36 (links) und 16 (rechts): Deutlich erkennbare Anfärbung der Osteoblasten gegen BMP-2 (rechts Bild). Das dem neu gebildeten Knochen anliegende Stroma ist gleichfalls BMP-2 positiv (links).*

Im Vergleich zu den Negativkontrollen fallen sowohl bei der Tutobone© als auch bei der PLLA-Gruppe je nach Untersuchungszeitpunkt deutlich mehr Antikörper-positive Zellen ins Auge. Diese sind wie zu erwarten vor allem in der Nähe neu gebildeten Knochens zu finden. Besonders intrazellulär konnte ein starkes Signal bei Osteoblasten nachgewiesen werden. Die extrazellulären Signale waren insgesamt schwach. Abbildung 25 zeigt sowohl intra- als auch extrazelluläre Signale.

Ebenso wie das teilweise diffuse Muster der Verknöcherung im Implantat, erschienen die Antikörper-positiven Zellen im PLLA-Präparat, insofern sie sich nicht um einen Verknöcherungsherd als Osteoblasten ansammelten, unregelmäßig verteilt. In den Präparaten mit Tutobone©-Chip konzentrierten sich die Zellen an den Knochenbälkchen, um dort neuen Knochen zu synthetisieren. In den PLLA-Präparaten erwiesen sich einige Zellen als positiv für die BMP-2 und SMAD5, ohne jedoch effektiv neuen Knochen zu bilden. In der Zusammenschau bildeten sich die BMP-2-positiven Zellen deutlicher ab als SMAD5-positive Zellen, was an einer insgesamt schwächeren Färbung zu erkennen war. Die bereits angesprochenen Riesenzellen färbten sich teilweise für BMP-2 oder SMAD5 an, teilweise waren sie aber auch für beide Antikörper negativ.

Neben den Osteoblasten wurden weitere Zellen innerhalb der Transplantate gegen BMP-2 und SMAD5 angefärbt. Besonders markant waren in einigen Präparaten Gefäßendothelien für BMP-2 und SMAD5 angefärbt. Dies trat besonders bei Gefäßen auf, welche mehr als nur eine

Zellreihe aufwiesen und eher mittelgroßen Gefäßen zuzuordnen sind. Ebenfalls positiv für beide Marker zeigten sich Megakaryozyten und Zellen des Haarfollikels.

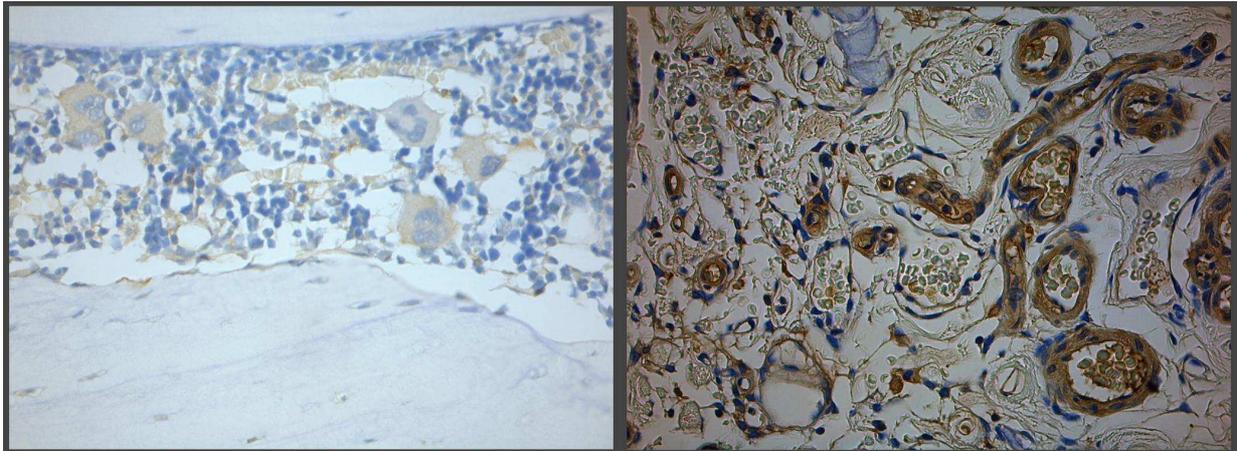


Abbildung 26: Links SMAD5-positiver Megakaryozyt, rechts BMP-2-positive Gefäßendothelien.

In zwei Präparaten (Präparate 36 und 79) zeigte sich neben der primären Ossifikation auch eine sekundäre Ossifikation über eine knorpelige Vorstufe. Eine derartige Form der Verknöcherung wurde nur in diesen Präparaten beobachtet. Es soll daher nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

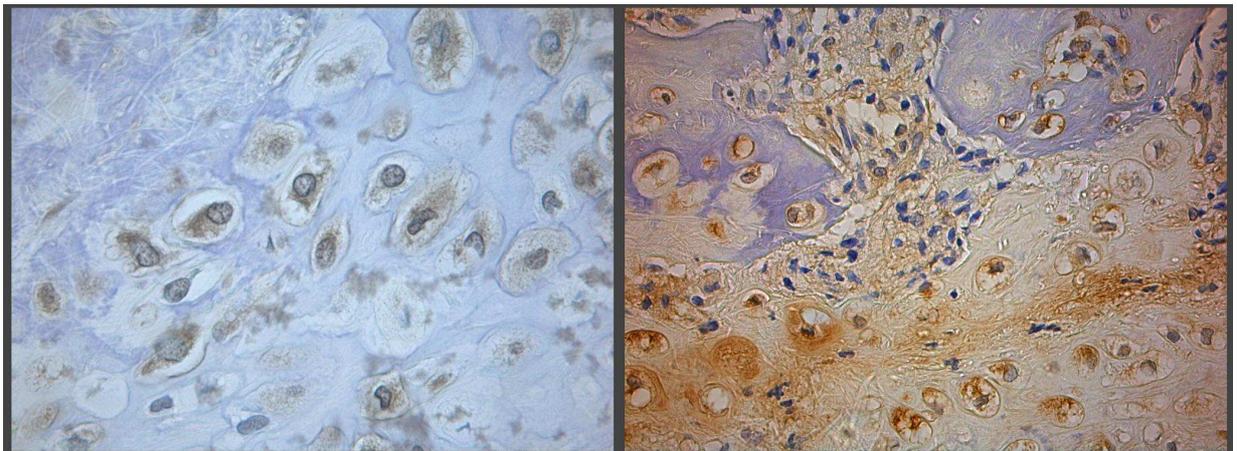


Abbildung 27 aus Präparat 36 (rechts, Antikörper gegen BMP-2) und 79 (Antikörper gegen Osteocalcin, links): Sekundäre Ossifikation durch knorpeligen Umbau.

#### 4.8.3: Antikörperfärbung gegen Osteocalcin

Osteocalcin wird primär von Osteoblasten synthetisiert, weshalb es sowohl in Osteoblasten als auch in der extrazellulären Matrix zu vermuten ist. Bereits kristallisierter Knochen lässt sich entgegen dem entstehenden Knochen nicht für Osteocalcin anfärben, sodass durch Osteocalcin potentielle Felder zukünftiger Knochenneubildung erkennbar werden.

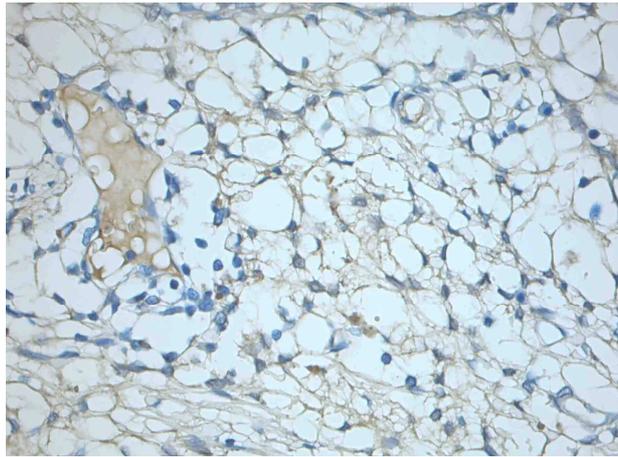


Abbildung 28 aus Präparat 57 (Tutobone© Woche 8): Bild aus dem Bereich zwischen den Knochenbälkchen. Osteocalcin-positiver Bereich links oben. Sonstige Zellen nur schwach positiv bzw. negativ.

Besonders markant ist die Expression von Osteocalcin in und um neue Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten. Dabei wurde Osteocalcin teilweise diffus in der kollagenen Matrix abgelagert, wobei dann ein körniges Muster entstand (siehe Abb. 29). Andererseits bildeten sich auch fokale Anreicherungen mit homogener Osteocalcindeposition und scharfen Grenzen zur Umgebung heraus (siehe Abb. 28). Besonders deutlich ist die Produktion von Osteocalcin an Bereichen nahe neuer Knochenbildung zu sehen.

In Gefäßendothelien konnte kein Nachweis von Osteocalcin erbracht werden. In den für PLLA typischen Riesenzellen war keine konstante Anfärbung für Osteocalcin erkennbar.

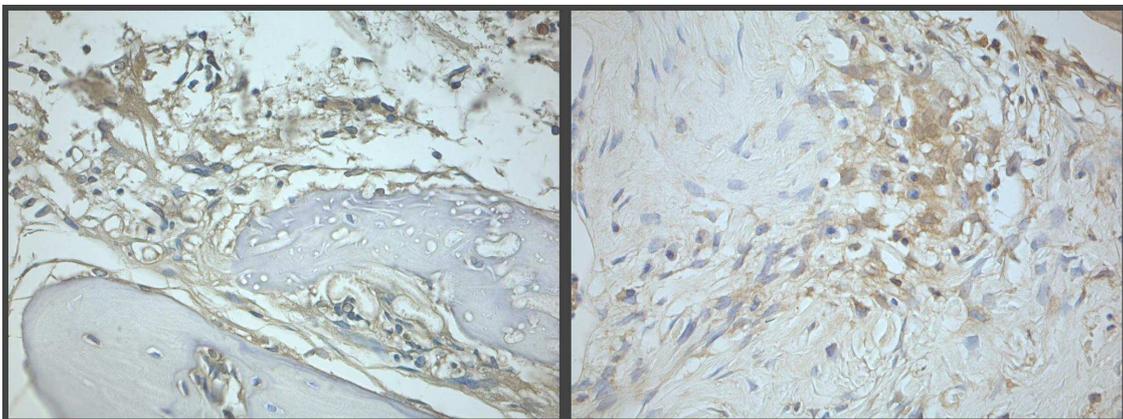
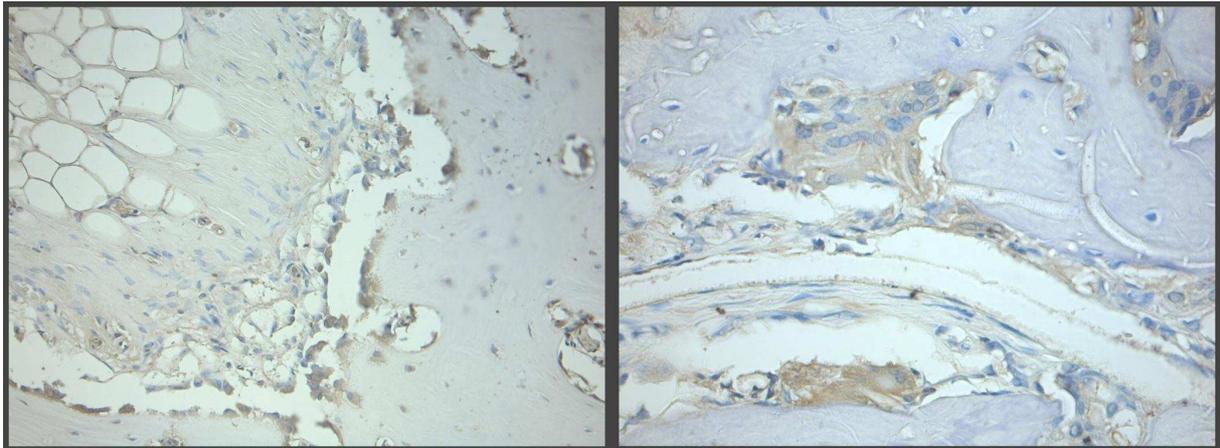


Abbildung 29 aus Präparat 67 (links, PLLA Woche 8) sowie 99(rechts, Tutobone© Woche 12): Links sind deutlich positive Zellen nahe neu gebildetem Knochen zu sehen; Rechts: intra- und extrazelluläre Ablagerung von Osteocalcin in einem fein- granulären Muster. Oben rechts im Bild ist neu gebildeter Knochen angeschnitten. Das restliche Bindegewebe ist nicht oder nur schwach angefärbt.

#### 4.8.4: Antikörperfärbungen gegen Kollagen 1A1

Nur das nicht mit Kristallisationsprodukten beladene Kollagen kann in der Antikörperfärbung dargestellt werden. Daher zeigten die dem neuen Knochen angelagerten Osteoblasten eine deutliche Färbung. Osteozyten, welche bereits in einer Lakune eingemauert waren,

produzierten kein Kollagen 1A1 mehr und sind somit negativ. Wie bei den anderen Färbungen auch, waren kaum Signale in den Leerdefekten zu erkennen. Dort, wo viel Knochen produziert wurde, entstanden deutliche Signale. Innerhalb des bindegewebigen Stromas zwischen den Zentren, wo neuer Knochen gebildet wurde, konnte kein Nachweis von Kollagen 1A1 erbracht werden. Ein Beispiel von COL1A1-positiven Zellen gibt Abb. 30. Riesenzellen waren, wie Abbildung 30 wiedergibt, vor allem in der Nähe des Knochens positiv für COL1A1. Ansonsten war das Färbungsverhalten unterschiedlich, aber insgesamt schwach.



*Abbildung 30 aus Präparat 86 (links; Negativkontrolle Woche 12) und 106 (rechts; PLLA Woche 12): Links sind besonders die dem Knochen aufgelagerten Osteoblasten positiv für COL1A1, rechts teilweise mehrkernige Riesenzellen (beachte unten im Bild) positiv. Bindegewebiges Stroma dazwischen bleibt weitestgehend negativ.*

## **5: Diskussion**

Die hier vorgestellte Studie wurde im Rahmen der Biokompatibilitätsprüfung eines neuen, bioresorbierbaren Implantates, des PLLA-Implantats, durchgeführt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde nun ein kleiner Teil des Forschungsprojektes bearbeitet. Einige Elemente, wie zum Beispiel mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 beladene PLLA-Fasern sowie die radiologische Erfassung der Knochenheilung, wurden von anderen Versuchsteilnehmern bearbeitet und vervollständigen die Versuchsreihe. Die Ergebnisse der Forschung mit BMP-2 beladenen Polymeren stellt die konsequente Fortführung dieses Versuches dar (M.D. Schofer et al., 2011). Nachdem überprüft werden sollte, ob es zu einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion durch Nanofasern kommt, wurde getestet, ob PLLA *in vivo* als eine Leitschiene für Zellen dienen kann. Im letzten Schritt wurden mögliche osteoinduktive Eigenschaften des Implantates beleuchtet. Dazu galt es die genannten Ausgangshypothesen zu belegen oder widerrufen.

### **5.1: Überprüfung der Ausgangshypothesen**

*„Durch das PLLA-Gerüst wird keine lokale oder systemische Entzündungs- oder Abstoßungsreaktion hervorgerufen.“*

Weder in der allgemeinen histologischen Begutachtung, noch bei der Auswertung der Laborergebnisse konnte eine lokale oder systemische Entzündungsreaktion in einem der Präparate erkannt werden. Ziel der allgemeinen histologischen Betrachtung war es, eine lokale Abstoßungsreaktion auszuschließen. Dabei wurde darauf geachtet, ob Granulozyten, Lymphozyten oder andere Zellen im Präparat vorhanden waren, ob es zu einer allgemeinen Gewebsauflockerung kam oder sonstige Zeichen einer Abstoßungsreaktion deutlich wurden. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eines der oben genannten Punkte in einem Präparat aufgezeigt werden, im Besonderen auch nicht in der PLLA- oder Tutobone©-Gruppe. Als markante Auffälligkeit waren in den PLLA-Präparaten große mehrkernige Zellen zu beobachten. Diese schienen metabolisch stark aktiv zu sein, da sie deutliche Nukeloli aufwiesen. Einschlusskörper waren zwar nicht innerhalb der Zellleiber zu sehen, dennoch muss davon ausgegangen werden, dass diese Zellen die bestehenden PLLA-Fasern abbauen. Ob diese Zellen die Nanofasern komplett abbauen können oder ob sie in kleinen Fragmenten z.B. zur Leber transportiert werden, bleibt unklar, da dies nicht untersucht wurde. Diese mehrkernigen

Riesenzellen sind am ehesten als Fremdkörper-induzierte Riesenzellen zu interpretieren. Die Bildung von Riesenzellen, teilweise mit Granulombildung, ist ein bekanntes Problem in der Orthopädie beim Einsatz von PLLA-Schrauben, z.B. bei Sehnenfixationen (Nusselt, Freche, Klinger, & Baums, 2010). Diese Riesenzellen scheinen nicht nur bei PLLA-Fasern aufzutreten, sondern sind eine Erscheinung bei anderen Polymeren, z.B. PLGA (Khang, 2012). Insgesamt ist letztlich nur durch eine hochauflösende elektronenmikroskopische Beurteilung zu klären, ob diese Zellen nun doch Fremdkörper in sich tragen, die lichtmikroskopischen Möglichkeiten sind dabei limitierend. Die Bildung von Riesenzellen kann aufgrund einer überschießenden Immunreaktion begrenzend auf das mögliche Einsatzgebiet der Nanofasern wirken und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden. Eine lokale Reaktion im Sinne einer Fremdkörperreaktion, jedoch ohne Granulom- oder Abszessbildung sowie Einwanderung von Granulozyten, muss somit postuliert werden.

Diese histologischen Beobachtungen sind konsistent mit den durch Blutentnahme erhaltenen Laborwerten. Bei Versuchstieren kann der Normwert aber erheblich schwanken, je nach Gattung und teilweise auch z.B. bei der alkalischen Phosphatase nach Geschlecht (Zur, 2005). Für die Interpretation der Laborergebnisse wurden daher die Ergebnisse von Sauer sowie Lillie et al. verwendet (Lillie, Temple, & Florence, 1996; Sauer et al., 2006).

Die Auswertung der Laborergebnisse zeigt ein in sich homogenes Bild. Insgesamt zeichnet sich nach einem anfänglichen Anstieg des CRP [mg/l] sowie des Phosphats eine schrittweise Reduktion der Parameter ab. Gleichzeitig lässt sich am Verlauf des CRP erkennen, dass in allen Gruppen keine systemische Entzündungsreaktion im Sinne einer Abstoßungsreaktion zu verzeichnen ist, dies mit besonderem Augenmerk auf die Gruppen mit Tutobone© und PLLA Implantaten. In der PLLA-Gruppe sinkt das CRP von  $43,21 \pm 8,67$  mg/l nach vier Wochen auf  $21,09 \pm 3,53$  mg/l nach zwölf Wochen. Ähnlich verhält es sich mit den anderen Gruppen. Gruppenunterschiede bestehen nicht. Jenes bestärkt die Annahme, dass es weder durch Tutobone©, noch durch PLLA zu einer Abstoßungsreaktion mit systemischer Beteiligung kommt. Bei einer Abstoßungsreaktion müssten die Werte für CRP über denen des Leerdefektes liegen. Eine nicht systemwirksame Abstoßungsreaktion kann hierdurch natürlich nicht ausgeschlossen werden. Vollkommen in Normbereich befindet der CRP-Wert bei allen Gruppen aber zum letzten Messzeitpunkt noch nicht. Diese leichte Erhöhung des CRP-Wertes kann aber auch von der Abnahmetechnik und Abnahmesituation mit Stress für die Tiere beeinflusst sein. Mangels valider Normwerte des CRPs für Sprague Dawley Ratten kann leider auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese minimale Erhöhung über den für Menschen normalen Werten noch im Normalbereich der Ratten liegt. Haptoglobin als

Parameter für intravasale Hämolyse sowie Entzündung lag im Normbereich, wodurch eine systemische Entzündungsreaktion ebenfalls unwahrscheinlich erscheint. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht. Die Käfige wurden zur Minderung optischer Reize mit Tüchern verdeckt. Trotzdem kann es durch die Inhalationsnarkose zu einer Stressreaktion der Tiere kommen, wodurch es zu leicht erhöhten CRP-Werten kommen kann. Auch wenn es zwischen den verschiedenen Gruppen ausgeglichen sein mag, so besteht die Möglichkeit, dass durch den Faktor Stress insgesamt ein etwas zu hoher CRP-Wert gemessen wurde. Die verwendeten Anästhetika üben keinen Einfluss auf die gewonnenen Blutproben aus. Eine dazu durchgeführte Literaturrecherche in der Datenbank pubmed konnte keinen Nachweis dafür erbringen, dass Isofluran oder CO<sub>2</sub> die gemessenen Blutwerte verändert.

Die von uns erzielten Ergebnisse stimmen somit mit den Erkenntnissen anderer Forschergruppen überein (Salaszyk et al., 2004; Sung, Meredith, Johnson, & Galis, 2004; Walton & Cotton, 2007; Woo et al., 2009), welche die Reaktionen auf solide PLLA Implantate sowie Nanofasern untersuchten. Durch den Abbau von Polylactiden komme es jedoch zu einer pH Verschiebung im Gewebe. Je nachdem, wie schnell dieser sich ändert, könne sich dies negativ auf das Zellwachstum auswirken (Sung et al., 2004). Im Vergleich zwischen L-Lactid-Glycolsäure Co-Polymer (PLGA) und Poly ε-Caprolacton (PCL) komme es bei PLGA zu einer späteren in vivo Zellinvasion, wenn solche Implantate in Mäuse implantiert würden. Dies könne nach Aussage der Autoren mit dem schnelleren Abbau von PLGA und damit Absinken des pHs im Zusammenhang stehen. Daher ist es wichtig, eine Balance zwischen guter Bioresorbierbarkeit und pH Absenkung zu erreichen, um ideale Bedingungen für die Zellinvasion herzustellen. Die Degradation eines soliden PLLA Implantates könnte aufgrund der Masse zu einer stärkeren pH Absenkung führen als PLLA Nanofasern. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung für die Überlegenheit von Nanofasern im Vergleich zu soliden PLLA Implantaten sein, was vor kurzem bereits durch Woo et al. aufgezeigt wurde (Woo et al., 2009).

*„Ein Gerüst aus PLLA-Nanofasern eignet sich in vivo als adäquate Leitschiene für eine gezielte Einwanderung von Zellen in einen Knochendefekt.“ sowie „Es besteht eine signifikant höhere Zelldichte in dem PLLA-Implantat als in der Negativkontrolle.“*

Nachdem eine lokale oder systemische Entzündungsantwort ausgeschlossen werden konnte, wurde nun untersucht, ob PLLA-Nanofasern eine adäquate Leitschiene für einwandernde

Zellen darstellen kann. Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl der Zellen im Defektbereich ausgewertet. Dabei stellte sich in Übereinstimmung mit den Bereits *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen (J. Paletta et al., 2009; J. R. Paletta et al., 2011; Schofer, Boudriot, Leifeld et al., 2009; Schofer, Boudriot, Wack et al., 2009; Schofer et al., 2008; M.D. Schofer et al., 2011; M. D. Schofer et al., 2011) heraus, dass PLLA als Oberfläche von Zellen genutzt werden kann, aber hemmend auf die Differenzierung in Richtung osteoblastärer Zelllinie wirkt. Schon bereits bei der histologischen Begutachtung der Bilder fiel auf, dass ein Unterschied in der Anzahl der Zellen zwischen Negativprobe und PLLA (welcher in der statistischen Auswertung zum Zeitpunkt zwölf Wochen Signifikanz erreichte) besteht. Im Vergleich zwischen Tutobone© und PLLA bestand jedoch zu keinem der Zeitpunkte ein Unterschied. Die Zellen nutzen die Fasern als Leitstruktur, um in das Defektgebiet einzudringen. Sie bleiben nicht am Randgebiet des Defektes vor den Nanofasern stehen, sondern haften an diesen und bewegen sich darauf vorwärts in Richtung Defektmitte.

Anhand der Daten kann demnach die Aussage gemacht werden, dass PLLA im Vergleich zu Negativkontrolle eine vermehrte Einwanderung von Zellen in das Defektgebiet gewährleistet, welche mindestens so gut ausfällt wie in der Tutobone©-Gruppe. Auch wenn diese Zellen wenig Knochenmatrix synthetisieren, scheint PLLA ein adäquates Gerüst für die Adhäsion von Zellen zu sein, welches nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* von Zellen akzeptiert wird. Eine Blockierung der Zellinvasion scheint nicht statt zu finden.

Da PLLA durch die Nanofaserstruktur eine große Oberfläche bietet, größer als z.B. Tutobone©, kann eine Adhäsion von vielen Zellen erreicht werden. Dies trägt wahrscheinlich zur guten Einwanderung der Zellen bei. Woo et al. zeigte in diesem Zusammenhang auf, dass dreidimensionale, poröse Implantaten bei der Knochenregeneration soliden PLLA-Implantaten überlegen sind. PLLA scheint besonders im dreidimensionalen Muster eine ansprechende Leitschiene für einwandernde Zellen darzustellen, da dreidimensionales PLLA in seiner porösen Form möglicherweise Kollagen Typ I als Bestandteil der extrazellulären Matrix nachahmen kann (Woo et al., 2009). Wichtig scheint demnach die Größe der Poren zu sein. Zu kleine Poren verhindern eventuell die Einwanderung von Zellen, wenn diese zu groß gewählt werden vermindert sich die nutzbare Oberfläche für die Zellen.

Als Kritikpunkt sei angemerkt, dass in den PLLA-Implantaten die Zellzählung aufgrund der mehrkernigen Riesenzellen schwierig war. Während die meisten Zellen einkernig sind und die Zellanzahl dadurch anhand der Zellkerne wiedergegeben werden kann, ist dies bei mehrkernigen Zellen und verwaschenen Zellgrenzen wesentlich schwieriger.

„Ein Scaffold aus PLLA-Nanofasern übt keine osteoinduktive Potenz aus.“

Als letzter Punkt sollte untersucht werden, inwiefern es durch die mit Zellen besiedelten Nanofasern zu einer Knochenneubildung kommt. Zur Evaluation dieses Punktes wurden die Präparate auf neu gebildeten Knochen, Anzahl BMP-2, Osteocalcin und SMAD5 positiver Zellen sowie radiologisch untersucht. Wie Schofer et al. bereits *in vitro* zeigen konnte, kommt es unter *in vitro* Bedingungen zu einer initialen Downregulation osteoblastärer Gene, wenn Zellen auf PLLA kultiviert werden (Schofer, Boudriot, Leifeld et al., 2009; Schofer, Boudriot, Wack et al., 2009; Schofer et al., 2008; M. D. Schofer et al., 2011). Da dieser Effekt auch auf anderen Keramiken beobachtet worden sei, sei dies kein besonderer Effekt der PLLA Fasern. In der vorliegenden Studie hatte PLLA alleine keinen Einfluss auf die Knochenneubildungsrate, es war in diesem Punkt der Referenzgruppe mit Tutobone© aber statistisch auch nicht unterlegen. Dennoch zeigte sich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied nach zwölf Wochen. Ein Unterschied zur Leerkontrolle bestand nicht. Maximal acht bzw. zwölf Prozent der Defektfläche konnte nach zwölf Wochen knöchern ersetzt werden. Insgesamt bestätigt dies die bereits von Schofer et al. veröffentlichten Ergebnisse, dass PLLA nicht osteoinduktiv wirkt.

Die Anzahl der BMP-2-positiven Zellen stellt einen Marker für die Zugehörigkeit der Zellen zur osteoblastären Zellreihe dar. SMAD5 zeigt dabei den intrazellulären Signaltransduktionsweg an, sodass hierfür ähnliche Ergebnisse zu erwarten waren. Ähnliches gilt für Kollagen IAI und Osteocalcin, da dieses durch reife Osteoblasten synthetisiert wird.

Die Auszählung der BMP-2-positiven Zellen diente im Rahmen dieser Arbeit dazu, nachzuweisen, ob die eingewanderten Zellen osteoblastäre Differenzierungsmuster am Ort des Implantates aktivieren. Generell gibt es viele unterschiedliche Funktionen, welche durch BMP-2 reguliert werden - nur eine davon ist die Osteogenese. Wie bereits in vorigen Kapiteln angesprochen, hat BMP-2 u.a. einen stimulierenden Effekt auf die Angiogenese in manchen Tumoren, bei anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom wirkt die BMP-2 Ausschüttung aber antiproliferativ (Kumamoto & Ooya, 2006; Langenfeld & Langenfeld, 2004; Reddi, 2005; Yoshikawa, Nakase, Myoui, & Ueda, 2004). Es sind weitere Arbeiten notwendig, um die unterschiedlichen Reaktionsmechanismen durch eine BMP-2 Erhöhung oder Erniedrigung zu erforschen.

Bereits durch die Ergebnisse der ausgemessenen Knochenneubildung im Defekt war zu sehen, dass kaum neuer Knochen in der PLLA-Gruppe gebildet wurde. Dennoch zeigte sich nach

acht Wochen ein Maximum an BMP-2 und SMAD5-positiven Zellen in dieser Gruppe. Dies verliert sich aber wieder nach zwölf Wochen, während in der Tutobone©-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt ein höheres Niveau erreicht wird (wenngleich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung der Osteocalcin positiven Zellen. Auch in dieser Untersuchungsreihe, analog der Detektion BMP-2- und SMAD5-positiver Zellen, kam es nach acht Wochen zu einem Maximum in der PLLA-Gruppe, um danach wieder abzufallen. Nach zwölf Wochen war aber auch hierbei ein signifikanter Abfall der positiven Zellen zu vermerken. Es waren in der PLLA Reihe sogar signifikant weniger Zellen Osteocalcin positiv als in der Negativ- und Tutobone©-Gruppe.

Kollagen IAI wurde qualitativ ausgewertet, um reife Osteoblasten deutlich zu machen. Die Ergebnisse der Zellfärbung stimmen mit dem bereits genannten überein, da lediglich nahe dem Knochen aufliegende Zellen positiv für Kollagen IAI angefärbt wurden. Da in den Negativkontrollen nur sehr wenige Zellen positiv für Kollagen IAI angefärbt wurden, verdeutlicht dies zusätzlich, dass dort nur wenig Knochenneubildung stattgefunden hat. Gleiches gilt für Zellen in den PLLA Scaffolds.

Dies könnte in der Zusammenschau mit dem bereits Gesagten auch auf die fehlende osteoinduktive und -konduktive Eigenschaft der PLLA-Implantate hindeuten, was die weiter oben angesprochenen *in vitro* Ergebnisse bestätigt. Mehr noch unterstreicht dies die Downregulation osteoinduktiver Gene durch PLLA, da mehr Osteocalcin-produzierende Zellen in der Negativkontrolle nach zwölf Wochen zu finden waren. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass mit BMP-2 beladene PLLA-Netze zu allen Zeitpunkten nicht nur zu signifikant erhöhten Knochenneubildung führte, sondern auch mehr Osteocalcin, BMP-2 und SMAD5-positive Zellen in Präparat zu sehen waren (M.D. Schofer et al., 2011). Es zeigte sich dabei eine signifikante Neubildung von Knochen schon bereits nach vier Wochen, welche auch nach zwölf Wochen im Vergleich zur Leerkontrolle sowie PLLA alleine überlegen war. Zu den Zeitpunkten vier und acht Wochen war es allen Gruppen überlegen (M.D. Schofer et al., 2011). Dennoch bleibt auch hierbei das Problem, dass initial mit einem dreidimensionalem PLLA-Implantat keine Stabilität bei komplexen Frakturen hergestellt werden kann - es wird eine Stütze benötigt. Zu klären ist hierbei, inwiefern dieses rasche Einwachsverhalten die Instabilität kompensieren kann. Dazu sind Studien an Frakturmodellen nötig, welche mehr Bewegung im Frakturbereich zulassen. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang die erhöhte Anzahl an Osteocalcin, BMP-2 sowie SMAD5 positiven Zellen im PLLA-Implantat im Vergleich zu allen anderen Zellen nach acht Wochen. Diese

Unterschiede waren statistisch signifikant. Es ist zu vermuten, dass trotz der Expression der Gene für Osteocalcin, BMP-2 sowie SMAD5 die letztliche osteogene Differenzierung ausbleibt.

Die radiologische Auswertung, welche in Kooperation mit der Klinik für Radiologie Marburg bearbeitet wurde (Daten nicht aufgeführt), zeigte wie unsere Daten, dass insgesamt eine leichte Zunahme des neu gebildeten Knochens in allen Gruppen zu verzeichnen ist. Wichtig dabei ist aber, dass zu keinem Zeitpunkt in der PLLA-Gruppe ein Dichtewert über der Tutobone©-Gruppe erreicht wird und nach zwölf Wochen das Defektgebiet röntgenologisch weniger dicht ist als bei den Negativkontrollen, wenngleich diese Unterschiede nicht signifikant sind. Insgesamt zeigt sich auch zu keinem Zeitpunkt davor, dass innerhalb der PLLA-Gruppe eine höhere Dichte als in der Negativkontrolle messbar war (M. D. Schofer et al., 2011).

Auch dies bestätigt, dass durch PLLA keine osteoinduktiven Eigenschaften ausgeübt werden. Die mehrfach angesprochene Downregulation osteoinduktiver Gene durch PLLA zeigt sich auch hierbei eventuell in der verminderten Dichte nach zwölf Wochen im Vergleich zur Negativkontrolle. Wenn mit BMP-2 gekoppelt, können diese Nachteile zwischen PLLA und Tutobone© ausgeglichen werden, was dann auch radiologisch nachweisbar ist. Nach zwölf Wochen besteht kein signifikanter Unterschied mehr zu den Dichtewerten der Tutobone©-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Das von uns verwendete Tiermodell wurde bereits mehrfach im Rahmen der klinischen Forschung eingesetzt und validiert (Bosch et al., 1998; Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Jones et al., 2007; Schmitz & Hollinger, 1986). Dennoch muss diskutiert werden, ob dieses Tiermodell ideal für Untersuchung einer Fraktur *in vivo* ist. Bei den meisten Frakturen muss davon ausgegangen werden, dass zwischen den Frakturrenden Reibung, Druck oder Zug herrscht. Wie bereits in der Einleitung dargelegt, ist der Druck und der Zug auf zwei Frakturrenden ein nicht unwesentlicher Faktor, welcher das Heilungsverhalten einer Fraktur beeinflusst (McKibbin, 1978). Es kommt durch die lokal wirkenden Kräfte zu einer Stimulation des Knochenwachstums, was bis zu einer gewissen Ausprägung somit fördernd für die Knochenheilung ist. Im Tiermodell nach Jones (Jones et al., 2007) dagegen wirken diese Einflüsse nicht, da es sich um einen ausgestanzten, stabilen Defekt handelt. Damit bleibt die Frage offen, inwiefern Druck und Zug sowie Instabilität sich auf die Implantate ausgewirkt hätte. Es ist daher schwierig, den Effekt des PLLA-Materials bei einer Fraktur einzuschätzen, welche unter dem Einfluss der oben genannten Kräfte steht.

Zur Analyse wurden die Zeitpunkte vier, acht und zwölf Wochen bestimmt. Innerhalb dieser Intervalle lassen sich die meisten Prozesse in einem guten zeitlichen Zusammenhang erfassen. Kritisch muss man zu diesen Zeitpunkten anmerken, dass nach vier Wochen die frühe Phase, welche für die Einwanderung der Zellen wichtig ist, bereits vorbei ist. Nach diesem Zeitpunkt scheint kein starkes Einwandern von neuen Zellen mehr zu geschehen. Um diese anfängliche Phase der Zellinvasion beurteilen zu können, hätte ein wesentlich früherer Zeitpunkt als vier Wochen ausgewählt werden müssen. Gleichfalls sind nach zwölf Wochen die Defekte nicht oder nur wenig zugeheilt. Wie bereits andere Veröffentlichungen gezeigt haben (Hollinger & Kleinschmidt, 1990; Jones et al., 2007; Schmitz & Hollinger, 1986), hat es keinen Vorteil, den letzten Beobachtungszeitraum länger als zwölf Wochen zu wählen, insofern ein Critical size defect (CSD) *ohne* Intervention betrachtet wird. Bisher wurde aber noch nicht validiert, wann der optimale Zeitpunkt für mit Implantaten wie Tutobone© befüllte Defekte ist, um zu beurteilen, ob noch weiteres Knochenwachstum zu erwarten ist oder nicht. Mangels bestehender Daten wurde daher als letzten Zeitpunkt 12 Wochen gewählt. Es erscheint aber aufgrund der progredienten Zuheilung des Defektes möglich, dass ein späterer Zeitpunkt noch besser gewesen wäre, um die maximale Heilungstendenz des Knochens nach Implantation von Tutobone© oder PLLA zu erkennen. Diese Überlegung wird gestützt durch die Werte der alkalischen Phosphatase (AP). Bei sämtlichen Tieren ist die AP nach zwölf Wochen über die Norm erhöht. Zudem zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein Anstieg der AP zwischen acht und zwölf Wochen, welcher in den Gruppen signifikant ausfiel. Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigten sich signifikante Unterschiede der AP nach 4 Wochen zwischen der Negativkontrolle und PLLA sowie zwischen Tutobone© und PLLA. Tiere in der PLLA-Gruppe hatten dabei immer niedrigere Werte. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der zu Beginn einsetzenden Hemmung der Zelldifferenzierung. Eine verminderte Aktivität der Osteoblasten könnte sich indirekt durch einen niedrigeren Wert der AP manifestieren. Um diese Theorie zu untermauern, sollte eine größere Fallzahl untersucht werden. Insgesamt könnte dies darauf hindeuten, dass nach zwölf Wochen eine aktive Neubildung des Knochens im Defektbereich noch immer stattfinden kann. Dies gilt sowohl für die Negativkontrollen als auch für Tutobone© und PLLA Implantatgruppen. Die Erkenntnisse durch die laborchemischen Untersuchungen stützen daher die Hypothese, dass ein späterer Zeitpunkt als zwölf Wochen wohlmöglich ein Voranschreiten der Bruchheilung gezeigt hätte und daher in der klinischen Beobachtung auch sinnvoll gewesen wäre. Eventuell wäre es nach Resorption der PLLA Fasern noch zum weiteren Knochenwachstum gekommen. Für nachfolgende Versuche wäre demnach eine Untersuchung nach wenigen

---

Tagen sowie eine weitere, später als zwölf Wochen nach der Implantation, eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Zeitpunkten.

## **Zusammenfassung**

Pseudarthrosen und andere Knochendefekte stellen in der orthopädischen Praxis ein therapeutisches Problem dar. Zudem besteht bei der Entnahme von autologem Knochen aus dem Beckenkamm und anderen Gebieten das Problem, dass dieses Verfahren mit einer hohen Donormorbidität belastet ist. Postoperative Schmerzen, geringe Menge an zur Verfügung stehendem Material, Infektionen und Instabilitäten an der Entnahmestelle sind dabei zu nennen. Allogene Implantate sind ebenfalls limitiert und bergen trotz aller Vorsichtsmaßnahmen noch immer die Gefahr der Übertragung von Krankheiten.

Um diese Probleme zu lösen, wird im Bereich des Tissue engineering an neuen Ersatzmaterialien geforscht. Dreidimensionale, poröse Nanofasern aus Poly-L-Lactid (PLLA) sind dabei von großem wissenschaftlichem Interesse. Es fehlten bisher jedoch Daten aus *in vivo* Studien, welche die Biokompatibilität von PLLA Fasern bestätigen.

Ziel dieser Studie war es, die Biokompatibilität und mögliche osteoinduktive Eigenschaften von Poly-L-Lactid Nanofasern am standardisierten Kalottendefektmodell der Ratte zu testen. Dazu wurden 90 Ratten der Gattung Sprague Dawley in drei Versuchsgruppen unterteilt: Leerkontrollen, Kontrollgruppe (Tutobone©-Chips) und PLLA-Fasern. Den Ratten wurden zwei 5mm messende kreisrunde Kalottendefekte mit einem Trepanationsbohrer gesetzt und anschließend entweder leer belassen oder mit Tutobone© bzw. PLLA-Implantaten befüllt. Nach vier, acht und zwölf Wochen wurden je 10 Tiere aus den Gruppen entnommen und sowohl radiologisch als auch laborchemisch und (immun)histologisch untersucht.

In der laborchemischen Untersuchung zeigten sich keine Hinweise auf eine anhaltende Entzündungsreaktion. Anhand der alkalischen Phosphatase wurde ein bestehender Knochenanbau nachgewiesen, durch Messung des CRPs eine systemwirksame Abstoßungsreaktion ausgeschlossen. Es zeigten sich keine relevanten statistisch signifikanten Unterschiede der Laborwerte zwischen den Gruppen, zudem war keine Erhöhung der Entzündungsparameter zu verzeichnen. Eine systemisch wirksame Abstoßungsreaktion konnte somit nicht nachgewiesen werden. In den Standardfärbungen durch HE und Masson-Goldner Färbung konnte ebenfalls kein Nachweis einer lokalen Entzündungsreaktion mit Invasion Granulozyten, Lymphozyten oder Auflockerung des Gewebes aufgezeigt werden. Die PLLA Präparate waren jedoch insgesamt von vielen Zellen durchsetzt. Als Eigenheit stellten sich mehrkernige Riesenzellen ohne Granulombildung dar, welche am ehesten als Fremdkörperriesenzellen zu interpretieren sind. Eine lokale Entzündungsantwort im Defektbereich konnte somit nicht sicher ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurden die Zellzahlen im Defektbereich gemessen, um die Eignung der Präparate als Leitstruktur für die Zellinvasion zu überprüfen. Hierbei stellten sich nach vier Wochen keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen heraus, nach acht und zwölf Wochen wurde aber ein Unterschied zwischen den Negativkontrollen und PLLA deutlich. In der PLLA-Gruppe waren zu diesem Zeitpunkt signifikant mehr Zellen vorhanden als in der Negativgruppe. Gleiches galt im Vergleich zur Tutobone©-Gruppe. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. PLLA scheint demnach *in vivo* eine adäquate Leitstruktur für die Invasion von Zellen zu sein und ist einer Negativkontrolle wohlmöglich überlegen.

Um die Knochenneubildung zu quantifizieren, wurden histologische Schnitte in der Mitte der Defekte angefertigt und der neu gebildete Knochen in das Verhältnis zur Defektfläche gesetzt. Dabei war bei der Tutobone- und PLLA-Gruppen eine signifikante Zunahme der Knochenneubildung zwischen vier und zwölf Wochen zu sehen, nicht jedoch in der Leerdefektgruppe. Es war dennoch zum Zeitpunkt zwölf Wochen zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen, wenn auch der Unterschied zwischen Tutobone© und Negativkontrolle 20% betrug. In der PLLA-Gruppe wurde mehr Knochen als in der Leerkontrolle gebildet, hingegen jedoch weniger als in der Tutobone© Gruppe. Bei fehlender statistischer Signifikanz konnte somit kein Vorteil für PLLA im Vergleich zur Negativkontrolle oder Tutobone© aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung wurden durch gleichzeitig durchgeführte radiologische Evaluation der Defektstellen unterstützt. Damit konnte die Hypothese, dass PLLA nicht osteoinduktiv wirkt, durch einen *in vivo* Versuch unterstützt werden.

Immunhistologische Färbungen wurden sowohl für Kollagen1A1 als auch für Osteocalcin, BMP-2 und SMAD5 angefertigt und die Zellen ausgezählt, welche sich auf den jeweiligen Antikörper hin positiv darstellten. Während in der Negativkontrolle insgesamt konstant niedrige Werte erzielt wurden, kam es in der Tutobone©-Gruppe, nach einem Abfall der positiven Zellen von vier auf acht Wochen, nach zwölf Wochen zu hohen Werten. In der PLLA-Gruppe kam es nach acht Wochen zu Höchstwerten, welche im Anschluss nach zwölf Wochen auf Werte unter derjenigen der Negativkontrolle fielen. Dies könnte mit der bereits *in vitro* nachgewiesenen Downregulation osteoblastärer Gene durch PLLA im Zusammenhang stehen. Zusammenfassend konnte eine gute Biokompatibilität von PLLA-Nanofasern ohne Zeichen einer lokalen oder systemisch wirksamen Entzündungsreaktion festgestellt werden. Es wurde eine erhöhte Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen, es fand jedoch keine signifikant erhöhte Knochenneubildung statt. Diese fehlende Osteoinduktivität bestätigte sich zudem in den immunhistochemischen Färbungen.

## Anhang

Skalpell	Eröffnung des OP-Gebietes, Periostdurchtrennung Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka Feather disposable scalpel No. 10
Lidhaken	Halten der Wundränder
Nadelhalter, Chirurgische Pinzette, Schere	
NaCl 0,9% (250ml)	Spülung, um Hitze bei der Bohrung zu vermindern B.Braun Ag, Melsungen Braun Ecoflac Plus Artikelnummer: 347873
Spritze 5ml	OP-Feld Säuberung, Kühlung
Trepanationsbohrer	Trepanation/Defektsetzung King Craft KBM-40F Art. Nr.: 826458
Aufsatz „flexible Welle“	KBM-40 F
Bohrkopf (5mm Durchmesser)	Trepanation/Defektsetzung Hager & Meisinger GmbH, Neuss Set „Transfer-Ring-Control“, Artikelbezeichnung BTRRI; No. 229.040
Resorbierbarer Faden (Vicryl Rapid, 4-0, geflochten)	Wundrandadaption Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt Art.Nr.: V2150H
Tupferset (je 6 Gazetupfer und Longuetten)	Blutstillung, Säuberung des OP-Bereiches Paul Hartmann AG, Heidenheim MediSet® Verbandwechsel-Set 4 EAN-Code: 7611600970742
OP-Decke, Foliodrape (100*150mm)	Steriles Abdecken des OP-Tisches Paul Hartmann AG, Heidenheim Foliodrape, Artikelnummer: 2512204

Tabelle 07: Operationsmaterialien

Zeitraumen (t1=0h)	Reagenz
0-3d	Formalin (4%)
3d-4d	Wässern über Nacht
4d-11d	Osteosoft Lösung Nr.1 (Firma Merck, Artikelnummer: 1017281000)

11d-18d	Osteosoft Lösung Nr.2
18d-25d	Osteosoft Lösung Nr.3
d25	Wässern über Nacht
d26; 2h (z.B. 8:00 - 10:00)	50% Ethanol 2h (Firma Fischar, Deutschland; aus Ethanol absol.; Chargennummer : 200-578-6)
d26; 2x2h (z.B. 10:00 - 12:00 - 14:00)	70% Ethanol 2x2h
d26; 4h (z.B. 14:00 - 18:00)	80% Ethanol 4h
d26; 3h (z.B. 18:00 - 21:00)	90% Ethanol 3h
d26-d27; 4h (z.B. 21:00 – 1:00)	96% Ethanol 4h
d27; 5h (z.B. 1:00 - 7:00)	Isopropanol (100%) (Firma Fischar, Deutschland; Chargennummer: 200-661-7)
d27; 5h (z.B. 7:00 - 12:00)	Isopropanol (100%)
d27; 5h (z.B. 12:00 - 18:00)	Isopropanol (100%)
d27-29; 3x14h (z.B. 18:00 - 8:00- 22:00 - 12:00)	Zedernholzöl (Firma Merck, Artikelnummer: Nr. 1.06965)
d29-32	Paraffin 62°C (3x24h)
d32	Paraffineinbettung

Tabelle 08: Protokoll von Fixierung bis Paraffineinbettung

Stoff/Vorgang	Dauer
Xylol	15 min
Xylol	15 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 90%	3 min
Ethanol 80%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Hämalaun nach Mayer	3 min
HCl 0,1%	2 sec
Leitungswasser fließend	5 min
Eosin G 0,5%	3 min

Leitungswasser fließend	30 sec
Ethanol 70%	1 min
Ethanol 80%	1 min
Ethanol 90%	1 min
Ethanol 96%	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	2 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min

Tabelle 09: Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin

Stoff/Vorgang	Dauer
Xylol	15 min
Xylol	15 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 90%	3 min
Ethanol 80%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Hämatoxylin nach Weigert	5 min
Leitungswasser fließend	5 min
Essigsäure 1%	30 sec
Azophloxin	10min
Essigsäure 1%	30 sec
Phosphorwolframsäure Orange G	1 min
Essigsäure 1%	30 sec
Lichtgrüns SF	2min
Essigsäure 1%	30 sec
Ethanol 70%	1 min
Ethanol 80%	1 min

Ethanol 90%	1 min
Ethanol 96%	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	2 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min

Tabelle 10: Färbeprotokoll Masson-Goldner

Stoff/Vorgang	Dauer
Xylol	15 min
Xylol	15 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol absolut	3 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 90%	3 min
Ethanol 80%	3 min
Ethanol 70%	3 min
Peroxidase-Block 1-3 Tropfen	5 Minuten
PBS	Abwaschen plus 2x2 min
Serum-Block 1-3 Tropfen	20 min
Antikörper (1:50)	Über Nacht (Kühlschrank)
PBS	Abwaschen plus 2x2 min
Biotinyliertes Sekundärantikörper, 1-3 Tropfen (1:50)	30 min
PBS	Abwaschen plus 2x2 min
HRP-Streptavidin-Komplex, 1-3 Tropfen	
PBS	Abwaschen plus 2x2 min
HRP-Substrat, 1-3Tropfen	5-15 Minuten
Deionisiertes Wasser	Abwaschen plus 2x2 min
Gills Hämatoxylin	20 Sekunden
Leitungswasser	5 min
Ethanol 70%	1 min

Ethanol 80%	1 min
Ethanol 90%	1 min
Ethanol 96%	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	1 min
Ethanol absolut	2 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min

Tabelle 11: Färbeschema Osteocalcin

## Literaturverzeichnis

- Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, 87(2), 107-118.
- Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., & Davino, M. A. (1996). Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 329, 300-309.
- Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (1999). Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, 14(11), 1805-1815.
- Behonick, D. J., Xing, Z., Lieu, S., Buckley, J. M., Lotz, J. C., Marcucio, R. S., et al. (2007). Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One*, 2(11), e1150.
- Bernstein, P., Bornhauser, M., Gunther, K. P., & Stiehler, M. (2009). [Bone tissue engineering in clinical application : assessment of the current situation]. *Orthopade*, 38(11), 1029-1037.
- Blank, U., Seto, M. L., Adams, D. C., Wojchowski, D. M., Karolak, M. J., & Oxburgh, L. (2008). An in vivo reporter of BMP signaling in organogenesis reveals targets in the developing kidney. *BMC Dev Biol*, 8, 86.
- Bosch, C., Melsen, B., & Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9(4), 310-316.
- Botchkarev, V. A. (2003). Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol*, 120(1), 36-47.
- Boudriot, R., Dersch, B., Goetz, P., Griss, A., Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2004). Elektrogenessponnene Poly-L-Laktid-Nanofasern als resorbierbare Matrix für Tissue-Engineering. *Biomedizinische Technik, Walter de Gruyter*, 49(9), 242-247.
- Brighton, C. T., & Hunt, R. M. (1991). Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*, 73(6), 832-847.
- Brydone, A. S., Meek, D., & Maclaine, S. (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*, 224(12), 1329-1343.
- Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*, 17(3), 513-520.
- Colnot, C., Thompson, Z., Miclau, T., Werb, Z., & Helms, J. A. (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*, 130(17), 4123-4133.
- De Long, W. G., Jr., Einhorn, T. A., Koval, K., McKee, M., Smith, W., Sanders, R., et al. (2007). Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*, 89(3), 649-658.
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., & Giannoudis, P. V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36(12), 1392-1404.
- Doi, Y., Horiguchi, T., Kim, S. H., Moriwaki, Y., Wakamatsu, N., Adachi, M., et al. (1992). Effects of non-collagenous proteins on the formation of apatite in calcium beta-glycerophosphate solutions. *Arch Oral Biol*, 37(1), 15-21.
- Dr. Dr. Smeets, R., & Dr. Dr. Kolk, A. (2010). <http://www.zmk-aktuell.de/zahnheilkunde/implantologie/story/osteokonduktive-und-induktive-knochenersatzmaterialien-teil-1/print.html>; Zugriff 29.01.2011 19:30 Uhr. ZMK-aktuell.
- Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl), S7-21.

- Einhorn, T. A. (2005). The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*, 19(10 Suppl), S4-6.
- Gerstenfeld, L. C. (2003). Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 873-884.
- Graumann, S. (2004). Compact Lehrbuch Anatomie. *Schattauer Verlag, Stuttgart New York, 1. Auflage*.
- Greiner, A., & Wendorff, J. H. (2007). Elektros핀nen: eine faszinierende Methode zur Präparation ultradünner Fasern. *Angewandte Chemie* 119(30), 5770-5805.
- Haers, P. E., Suuronen, R., Lindqvist, C., & Sailer, H. (1998). Biodegradable polylactide plates and screws in orthognathic surgery: technical note. *J Craniomaxillofac Surg*, 26(2), 87-91.
- Hauschka, P. V., & Wians, F. H., Jr. (1989). Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat Rec*, 224(2), 180-188.
- Hollinger, J. O., & Kleinschmidt, J. C. (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*, 1(1), 60-68. <http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/?brochures/clinical/W287021.pdf>; Zugriff 24.11.2009; 21:37 Uhr. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
- [http://www.merck-chemicals.de/chemdat/de\\_DE/Merck-DE-Site/EUR/ShowDocument-Protected?ProductAttachmentUUID=L6yb.s1Oh50AAAEkpSAXq\\_Ny&ProductUID=.wmb.s1OjdkAAAEWF9FwbT2\\_&DocType=Bro&SKU=MDA\\_CHEM-100485&DocName=Masson-Goldner+Trichromf%26%23228%3Brbekt+-+zur+selektiven+Bindegewebsdarstellung+in+der+Histologie&DocLocale=de\\_DE&DocFormat=PDF>](http://www.merck-chemicals.de/chemdat/de_DE/Merck-DE-Site/EUR/ShowDocument-Protected?ProductAttachmentUUID=L6yb.s1Oh50AAAEkpSAXq_Ny&ProductUID=.wmb.s1OjdkAAAEWF9FwbT2_&DocType=Bro&SKU=MDA_CHEM-100485&DocName=Masson-Goldner+Trichromf%26%23228%3Brbekt+-+zur+selektiven+Bindegewebsdarstellung+in+der+Histologie&DocLocale=de_DE&DocFormat=PDF>); Zugriff 23.11.2009; 18:04 Uhr. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
- Icks, A., Haastert, B., Wildner, M., Becker, C., & Meyer, G. (2008). Inzidenz von Hüftfrakturen in Deutschland - Auswertung der Krankenhausdiagnosestatistik 2004. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 133, 125-128.
- Iwaki, A., Jingushi, S., Oda, Y., Izumi, T., Shida, J. I., Tsuneyoshi, M., et al. (1997). Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res*, 12(1), 96-102.
- J. Meiners, J., Gerlach, U., S., M., Jürgens, C., & Faschingbauer, M. (2000). Pseudarthrosen. *Der Chirurg*, 80(10), 979-986.
- Jones, L., Thomsen, J. S., Mosekilde, L., Bosch, C., & Melsen, B. (2007). Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1, 3, and 6 months after implantation with osteopromotive substances. *J Craniomaxillofac Surg*, 35(8), 350-357.
- Kasperczyk, W. J., Mahlke, L., & Tscherne, H. (1996). [Diaphyseal pseudarthroses. Epidemiology and outcome]. *Orthopade*, 25(5), 416-428.
- Kessler, E., Fichard, A., Chanut-Delalande, H., Brusel, M., & Ruggiero, F. (2001). Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. *J Biol Chem*, 276(29), 27051-27057.
- Khang, G. (2012). Handbook of Intelligent Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative. *Stanford Publishing Pte Ltd.*, 313 ff.
- Klawitter, J. J., & Hulbert, S. F. (1971). Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5(6), 161-229.
- Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., & Horch, R. E. (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med*, 10(1), 7-19.
- Kraus, K. H., & Kirker-Head, C. (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*, 35(3), 232-242.

- Kuhne, J. H., Bartl, R., Frisch, B., Hammer, C., Jansson, V., & Zimmer, M. (1994). Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 65(3), 246-252.
- Kumamoto, H., & Ooya, K. (2006). Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis*, 12(2), 163-170.
- Langenfeld, E. M., & Langenfeld, J. (2004). Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res*, 2(3), 141-149.
- Li, W. J., Cooper, J. A., Jr., Mauck, R. L., & Tuan, R. S. (2006). Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater*, 2(4), 377-385.
- Lillie, L. E., Temple, N. J., & Florence, L. Z. (1996). Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum Exp Toxicol*, 15(8), 612-616.
- Mark, H., Penington, A., Nannmark, U., Morrison, W., & Messina, A. (2004). Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats. *Bone*, 35(2), 535-542.
- McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*, 60-B(2), 150-162.
- Merck. (2009). Anwendungsbeschreibung Osteosoft, "Knochenentkalkerlösung für sensitive, kalziumhaltiges Material in der Histologie". Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147(1), 35-51.
- Mizuno, K., Mineo, K., Tachibana, T., Sumi, M., Matsubara, T., & Hirohata, K. (1990). The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br*, 72(5), 822-829.
- Mutschler, W. (1996). [Epimetaphyseal pseudarthroses]. *Orthopade*, 25(5), 429-434.
- Nandi, S. K., Roy, S., Mukherjee, P., Kundu, B., De, D. K., & Basu, D. (2010). Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*, 132, 15-30.
- Nusselt, T., Freche, S., Klinger, H. M., & Baums, M. H. (2010). Intraosseous foreign body granuloma in rotator cuff repair with bioabsorbable suture anchor. *Arch Orthop Trauma Surg*, 130(8), 1037-1040.
- Ohishi, T., Takahashi, M., Kushida, K., Hoshino, H., Tsuchikawa, T., Naitoh, K., et al. (1998). Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*, 118(3), 126-130.
- Paletta, J., Erffmeier, K., Theisen, C., Hussain, D., Wendorff, J. H., Greiner, A., et al. (2009). Influence of poly-(L-lactic acid) nanofiber functionalization on maximum load, Young's modulus, and strain of nanofiber scaffolds before and after cultivation of osteoblasts: an in vitro study. *ScientificWorldJournal*, 9, 1382-1393.
- Paletta, J. R., Mack, F., Schenderlein, H., Theisen, C., Schmitt, J., Wendorff, J. H., et al. (2011). Incorporation of osteoblasts (MG63) into 3D nanofibre matrices by simultaneous electrospinning and spraying in bone tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 21, 384-395.
- Pekkarinen, T., Lindholm, T. S., Hietala, O., & Jalovaara, P. (2003). New bone formation induced by injection of native reindeer bone morphogenetic protein extract. *Scand J Surg*, 92(3), 227-230.
- Pihlajamäki, H., Bostman, O., Tynnenen, O., & Laitinen, O. (2006). Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: an experimental study. *Bone*, 39(4), 932-937.
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Papat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*, 25(6), 1539-1560.

- Price, P. A. (1988). Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr*, 8, 565-583.
- Reddi, A. H. (2005). BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(3), 249-250.
- Roach, H. I. (1994). Why does bone matrix contain non-collagenous proteins- The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*, 18(6), 617-628.
- Rueger, J. M. (1998). Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick. *Der Orthopäde*, Axel Springer Verlag Heidelberg, 27(02), 72-79.
- Salasznyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A., & Plopper, G. E. (2004). Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*, 2004(1), 24-34.
- Sauer, M. B., Dulac, H., Clark, S., Moffitt, K. M., Price, J., Dambach, D., et al. (2006). Clinical pathology laboratory values of rats housed in wire-bottom cages compared with those of rats housed in solid-bottom cages. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 45(1), 30-35.
- Schenk, R., & Willenegger, H. (1963). Zum histologischen Bild der sogenannten Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Birkhäuser Verlag Basel, 19(11).
- Schenk, R., & Willenegger, H. (1964). Zur Histologie der primären Knochenheilung. *Langenbeck's archives of surgery, Springer Online Journal Archives 1860-2000*, 308(1), 440-452.
- Schieker, M., Seitz, S., Gülkan, H., Nentwich, M., Horvath, G., Regauer, M., et al. (2004). Tissue Engineering von Knochen: Integration und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell. *Der Orthopäde*, Axel Springer Verlag Heidelberg, 33(12), 1354-1360.
- Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 19(5), 459-466.
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C. L., & Pape, H. C. (2009). [Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications]. *Unfallchirurg*, 112(9), 785-794; quiz 795.
- Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R., & Hollinger, J. O. (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*, 17(2), 269-278.
- Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 4(205), 299-308.
- Schoepf, C. (2006). Allograft safety: efficacy of the Tutoplast® process. *International Magazine of Oral Implantology*(1), 10-15.
- Schofer, M. D., Boudriot, U., Leifeld, I., Sutterlin, R. I., Rudisile, M., Wendorff, J. H., et al. (2009). Characterization of a PLLA-collagen I blend nanofiber scaffold with respect to growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 9, 118-129.
- Schofer, M. D., Boudriot, U., Wack, C., Leifeld, I., Grabedunkel, C., Dersch, R., et al. (2009). Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers. *J Mater Sci Mater Med*, 20(3), 767-774.
- Schofer, M. D., Fuchs-Winkelmann, S., Grabedunkel, C., Wack, C., Dersch, R., Rudisile, M., et al. (2008). Influence of poly(L-lactic acid) nanofibers and BMP-2-containing poly(L-lactic acid) nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 8, 1269-1279.

- Schofer, M. D., Roessler, P. R., Schaefer, J., Theisen, C., Schlimme, S., Heverhagen, J. T., et al. (2011). Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *Public Library of Science*, 6(9), e25462.
- Schofer, M. D., Veltum, A., Theisen, C., Chen, F., Agarwal, S., Fuchs-Winkelmann, S., et al. (2011). Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*, 22(7), 1753-1762.
- Schopper, C., Moser, D., Sabbas, A., Lagogiannis, G., Spassova, E., Konig, F., et al. (2003). The fluorohydroxyapatite (FHA) FRIOS Algipore is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. *Clin Oral Implants Res*, 14(6), 743-749.
- Sen, M. K., & Miclau, T. (2007). Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, 38 Suppl 1, S75-80.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., & Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(5-6), 343-355.
- Siebert, H. R., & Klonz, A. (2005). Distale Radiusfraktur. *Unfallchirurg*, 108, 135-153.
- Spector, J. A., Luchs, J. S., Mehrara, B. J., Greenwald, J. A., Smith, L. P., & Longaker, M. T. (2001). Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg*, 107(1), 124-134.
- Su, Y., Su, Q., Liu, W., Lim, M., Venugopal, J. R., Mo, X., et al. (2012). Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 8(2), 763-771.
- Sung, H. J., Meredith, C., Johnson, C., & Galis, Z. S. (2004). The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, 25(26), 5735-5742.
- Timlin, M. M., Toomey, D. P., Condon, C. P., Power, C. M., Street, J. M., Murray, P. F. O., et al. (2005). Fracture hematoma is a potent proinflammatory mediator of neutrophil function. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*, 58(6), 1223-1229.
- Tuli, S. M., & Singh, A. D. (1978). The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br*, 60(1), 116-123.
- Tzioupis, C., & Giannoudis, P. V. (2007). Prevalence of long-bone non-unions. *Injury*, 38 Suppl 2, S3-9.
- Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.
- Urist, M. R., & Strates, B. S. (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50(6), 1392-1406.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., et al. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93(3), 411-422.
- Walton, M., & Cotton, N. J. (2007). Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. *J Biomater Appl*, 21(4), 395-411.
- Wiltfang, J., Merten, H. A., Rieger, M., & Luhr, H. G. (1997). Scanning electron microscopic study of primary fracture healing. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1(3), 165-168.
- Woo, K. M., Chen, V. J., Jung, H. M., Kim, T. I., Shin, H. I., Baek, J. H., et al. (2009). Comparative evaluation of nanofibrous scaffolding for bone regeneration in critical-size calvarial defects. *Tissue Eng Part A*, 15(8), 2155-2162.
- Yoshikawa, H., Nakase, T., Myoui, A., & Ueda, T. (2004). Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J Orthop Sci*, 9(3), 334-340.
- Zur, B. (2005). Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*, 94 ff.



## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Jan Thomas Schaefer  
Adresse: Struthrain 32  
36381 Schlüchtern  
Deutschland  
Geburtstag, -ort: 10.06.1985, Fulda  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Telefon: 06661 / 18 73  
E-mail: sendmeane-mail@gmx.net  
Sprachkenntnisse: deutsch, englisch, latein  
EDV-Kenntnisse: Office, Bildbearbeitung

### **Ausbildung**

1990 Einschulung Grundschule Rückers, Hessen  
1994 Ulrich-von-Hutten Gymnasium Schlüchtern, Leistungsfächer Deutsch  
und Biologie  
2004-2005 Zivildienst, Diakoniestation/mobile Pflege Schlüchtern  
WS 05/06 Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg  
SS 2007 Physikum  
WS 07/08 Beginn des klinischen Studienabschnittes  
WS 10/11 Beginn des praktischen Jahres  
*1. Tertian: Chirurgie, Klinikum Fulda*  
*2. Tertian: Innere Medizin, Unispital Basel*  
*3. Tertian: Pädiatrie, DRK Kinderklinik Siegen*  
SS 2011 „Hammerexamen“, mündliche Prüfungen am Städtischen Klinikum  
Fulda  
Seit Februar 2012 Assistenzarzt Pädiatrie, Städtischen Klinikum Fulda

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Dr. J. Adamkiewicz; Prof. Dr. Dr. H.-D. Basler; Prof. Dr. E. Baum; J. Cordes; Prof. Dr. Dr. J. Daut; Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer; Prof. Dr. M. Eilers; Prof. Dr.K.-H. Grezschik; Dr. K. Grundmann; Prof. Dr. I. Hassan; Prof. Dr. M. Hertl; Prof. Dr. G. U. Höglinger; Prof. Dr. R. Jacob; Prof. Dr. T. Kircher; Prof. Dr. J. Klose; Prof. Dr. S. Knake; Prof. Dr. J. Koolman; Prof. Dr. R. Lill; Prof. Dr. B. Liss; Prof. Dr. M. Lohoff; Prof. Dr. F. MaierDr. Dr. Mandrek; Prof. Dr. R. Moll; Prof. Dr. Dr. U. O. Mueller; Prof. Dr. R. Mutters; Prof. Dr. A. Neubauer; Prof. Dr. B. Neumüller; Prof. Dr. W. Oertl; Dr. E. Opitz; Dr. J. Paletta; Prof. Dr. T. Plant; Prof. Dr. H. Renz; Prof. Dr. H. Schäfer; Dr. L. Schmidt; Prof. Dr. M. Schofer; Prof. Dr. A. J. Schrader; Prof. Dr.W. Sekundo; Prof. Dr. U. Wagner; Prof. Dr. J. Werner; Prof. Dr. H. Wulff

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht ohne die Zusammenarbeit eines großen Personenkreises zustande gekommen. Für die Kraft, Motivation und fachliche Unterstützung möchte ich mich daher an dieser Stelle bedanken.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. M. Schofer für die Bereitstellung des Forschungsthemas. Herr Schofer hat neben der Planung der Doktorarbeit auch vor allem während der experimentellen Phase dieser Dissertation fachlich-operative Hilfe geleistet, ohne die diese Arbeit nicht hätte verwirklicht werden können.

An nächster Stelle danke ich Herrn Dr. Jürgen Paletta für die Kooperation während dieses Forschungsthemas. Er stand mir bei Fragen primär während der Phasen deskriptiver und statistischer Auswertungen zur Seite, weshalb ihm ein großes Lob gebührt.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes T. Heverhagen für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie Mithilfe während der radiologischen Datenerfassung danken. Ebenfalls möchte ich Herrn Guido Schemken sowie seinen Mitarbeitern für die Betreuung der Versuchstiere in der Tierexperimentellen Einrichtung Marburg bedanken.

Die Liste der einzelnen Mitarbeiter der Universität Marburg könnte noch um einige Personen erweitert werden. All diesen Menschen gebührt mein herzliches Dankeschön. Dass diese nicht alle namentlich erwähnt werden können, bitte ich zu entschuldigen.

Ein nicht minder großer Dank verdient meine Familie, welche immer ein offenes Ohr für Wehklagen und andere Probleme hatte. Vielen Dank für die motivierenden Worte .

An letzter und besonderer Stelle möchte ich meiner Partnerin Frau Annika Schreiber für die Unterstützung und Ermutigung in besonders „antriebsarmen“ Phasen danken. Jeder, der einmal eine Dissertation, auch im medizinischen Bereich, geschrieben hat, weiß, wie lang sich das Ende ziehen kann. Aus einem 100m Sprint wird schnell eine ganze Stadionumrundung, welche bald ins Feld hinaus führt und dann am Ende doch in einem Marathon endet. Trotzdem, dass man sich in der Masse der Läufer befindet, muss jeder Einzelne selbst das Ziel finden. Sie war für mich wie die Person, die am Rande steht, der Trainer oder die Trainerin. Die Person, die immer wieder motivierend hinzu ruft, dass es nicht mehr lang ist, obwohl man erst das erste Drittel beendet hat. Sie war die Person, die Wasser reicht, sei es zum Trinken oder zur Kühlung des überhitzten Kopfes. Und sie war die Person, die am Ziel steht. Dort wartet und sich mit dir freut. Obwohl du nass geschwitzt bist und alles andere als Rosenduft mit dir führst. Dafür liebe ich dich. Ich danke dir.

## Ehrenwörtlich Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die den Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Einfluss von biodegradierbaren PLLA(Poly-L-Lactid)-Nanofasern auf die Knochenheilung am standardisierten Kalotten-Defektmodell der Ratte*“ in der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Schofer mit Unterstützung durch Dr. Jürgen Paletta ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

*Public Library of Science, 2011. 6(9): p. e25462.*

*Schofer, M.D., et al., Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects*

Schlüchtern, den 21.05.2012

---

Jan Thomas Schaefer

## Summary

Pseudarthrosis and other bone defects are common problems in orthopaedic treatment. In addition to that, when harvesting bone from the iliac crest and other places, these procedures are charged with high donor morbidity. Postoperative pain, low amount of material, infections and instabilities at the donor side are to be ruled out. Allogenic grafts are limited and still have, despite very high precautions, the possibility of disease transmission.

Tissue engineering is a part of modern medicine, which tries to solve these problems. Three-dimensional, porous nanofibres made of poly-l-lactid acid (PLLA) are of huge scientific interest. Until now, data from *in vivo* studies testing biocompatibility of PLLA-nanofibres are still missing.

The aim of this study was to test the biocompatibility and possible osteoinductiv properties of PLLA nanofibres on a standardized rat-calotte model. Therefore, 90 rats (Sprague Dawley) were divided into three groups: negative control, Tutobone® and PLLA. Two calotte defects, each measuring 5mm in diameter, were placed and were either left unfilled, filled with Tutobone or PLLA. After four, eight and twelve weeks, 10 animals of each group were sacrificed and examined radiologically, per blood analysis and (immuno) histologically.

In blood analysis, there were no signs of systemic inflammatory response. By measuring the alkaline phosphatase, bone repair was evaluated. By measuring CRP, a systemic inflammatory reaction was excluded. There were now statistic significant differences between the groups concering blood samples. Moreover, there was no increase of infection parameters at all. A systemic relevant rejection reaction could not be seen.

In histological staining by HE and Masson Goldner, no inflammatory reaction by invasion of granulocytes, lymphocytes or loosening of tissue could be seen. However, PLLA implants were infiltrated with a large amount of cells. As a characteristic sign, large giant cells without forming granulomas were seen. Due to these foreign body cells, a local inflammatory reaction on the operation side could not be excluded.

Furthermore, cellcounts were performed to evaluate the adequacy of the implants as a leading compound for cell invasion. No significant differences were seen between the groups after four weeks. After eight and twelve weeks a difference between PLLA and negative control was seen. In PLLA-group, there were more cells. The same is true for the Tutobone© group. However, these differences were not significant. PLLA therefore seems to be an adequate leading structure for the invasion of cells and maybe is superior to negative control.

Histological sections were performed in order to quantify the rate of new formed bone. In every group, there was a significant increase of new formed bone between four and twelve

weeks except to the negative control group. However there was now significant difference between the groups, although there was a difference of 20% between negative control and Tutobone© at 12 weeks. More bone was formed in the PLLA group compared to the negative control but less bone when compares to Tutobone©. Hence there was no advantage for PLLA over Tutobone or negative control. The radiological examinations support these findings. Therefore, the hypothesis, that PLLA does not act osteoinductively, can be confirmed.

Immunohistological staining against COL1A1, Osteocalcin, BMP-2 and SMAD5 were performed and positive cells were counted. While in the negative control group low counts were measured, in the Tutobone© group, after a decrement from four to eight weeks, there was a maximum of positive cells at twelve weeks. In the PLLA group, this was contrary. After eight weeks there was a peak, which fell down to values under those of the negative control after twelve weeks. This could be associated with the downregulation of osteoblast genes by PLLA, which had been proofed by in vitro experiments before.

In summary, a good biocompatibility of PLLA-nanofibres without local or systemic signs of inflammatory reaction could be seen. There were significantly higher cell counts compared to negative control group, yet without apposition of new bone. This lack of osteoinductivity was confirmed by immunohistological staining.