

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Kiel

**TRANSFEKTION VON EXPRESSIONSPLOSMIDEN
(BMP-2 UND BFGF) IM BESTRAHLTEN ERSATZSCHWACHEN
LAGER IN VIVO**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
- Campus Kiel -

vorgelegt von

HAGEN INGMAR VÖHRS

aus Eckernförde

Kiel 2010

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ingo Springer

Berichterstatter: Prof. Dr. Christof Dörfer

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2010

Zum Druck genehmigt; Kiel, den 21.09.2010

gez. Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Versuchsaufbau	7
2.2	Zeitliche Abfolge.....	8
2.3	Versuchstiere	8
2.4	Narkose.....	9
2.5	Computertomographie.....	10
2.6	Operativer Eingriff und Gewebeentnahme	11
2.7	Brachytherapie	11
2.8	Transfektion und Applikation der Zellen	13
2.9	Intravitale polychrome Sequenzmarkierung	13
2.10	Opferung der Versuchstiere	15
2.11	Aufbereitung der Präparate.....	15
2.11.1	Paraffineinbettung.....	16
2.11.2	Methacrylateinbettung.....	16
2.11.3	Vorbereitung für die Mikroradiographie.....	17
2.11.4	Vorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie	18
2.11.5	Vorbereitung für die Toluidinblaufärbung	18
2.12	Auswertungsverfahren	19
2.12.1	Bilderfassung	19
2.12.2	Bestimmung der Knochenanwachsrate	19
2.12.3	Knochendichtebestimmung.....	21
2.13	Statistik.....	22
3	ERGEBNISSE	23
3.1	Klinische Ergebnisse	23
3.2	Histomorphometrische Analyse.....	24
3.3	Knochenanwachsraten.....	25
3.4	Paraffinhistologie.....	39
4	DISKUSSION	41

4.1	Tiermodell.....	42
4.2	Bestrahlungsmodell	42
4.3	Wahl des Versuchszeitpunkts und der Versuchsdauer	43
4.4	Diskussion der Ergebnisse	43
4.5	Schlussfolgerung.....	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATUR	52
7	ANHANG	57
7.1	Streckenmessung.....	57
7.2	Flächenmessung	59
7.3	Knochendichtemessung	61
7.4	Markierungsschema	65
7.5	Gewichtsverlauf F344.....	66
7.6	Gewichtsverlauf LEW	67
7.7	Gewichtsverlauf WKY.....	68
7.8	Tierversuchsgenehmigung	69
	DANKSAGUNG	71
	LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
	PUBLIKATIONSLISTE.....	73

1 EINLEITUNG

Neben der Chemotherapie wird die Irradiatio als adjuvante, kurative oder palliative Maßnahme bei malignen Neoplasien im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich eingesetzt. In Kombination zeigen beide Therapieformen die beste Wirkung (MOHR *et al.* 1994). Die Bestrahlung erzeugt bei den therapierten Patienten zusätzlich zu der antineoplastischen Wirkung auch unerwünschte Nebenwirkungen. Mögliche Komplikationen sind unter anderem: Mukositis, Ageusie oder Hypogeusie, Xerostomie, Strahlenkaries und radiogene Neoplasien (SILVERMAN 1999). Durch die vaskuläre Fibrosierung und Verödung des Knochens nach Bestrahlung kann es außerdem zur Ausbildung einer Osteoradionekrose kommen, welche die schwerste lokale Nebenwirkung darstellt (CURI und DIB 1997; MARCIANI und OWNBY 1986). Coffin unterteilte 1983 die Osteoradionekrose in eine „minor form“ mit selbstlimitierendem Verlauf, ohne radiologisch nachweisbare Osteolysen und eine „major form“, die eine starke Schwächung des Knochens verursacht und nicht selten zu Spontanfrakturen führt (COFFIN 1983; FUJITA *et al.* 1996).

Heute wird klinisch und histologisch zwischen strahlengeschädigtem Knochen, Osteoradionekrose und infizierter Osteoradionekrose unterschieden (SCHWENZER und EHRENFELD 2000). Durch die Bestrahlung des Knochens wird eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen, die initial klassische klinische Entzündungszeichen erzeugt. Durch Stase mit nachfolgender Ödembildung kommt es zur Thromboisierung. Die Durchblutung des Knochens wird herabgesetzt. Es folgt lokal ein vermehrter Anbau mineralisierter Knochensubstanz, so dass sklerosierte Knochenabschnitte mit herabgesetzter Vitalität entstehen. In diesem Stadium spricht man von strahlengeschädigtem Knochen. Kommt es zur Ausbildung von umschriebenen Nekrosen des knöchernen Gewebes, bezeichnet man dies als Osteoradionekrose. Wenn sich eine Infektionserkrankung ausgehend von dieser Gewebeschädigung bildet, wird dies als infizierte Osteoradionekrose bezeichnet. Neben der Bestrahlung kann auch eine Tumortherapie mittels Bisphosphonaten zu einer Osteonekrose führen. Im Kieferbereich spricht man von einer bisphosphonat-assoziierten Knochennekrose (BONJ - bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw), die klinisch den Symptomen einer Osteoradionekrose ähnelt und häufig

therapieresistent ist (SCHWENZER und EHRENFELD 2000). Als mögliche Ursache dieser Komplikation ist der starke Einfluss der Bisphosphonate auf den Knochenstoffwechsel zu sehen (FREIBERGER 2009).

Die oben angeführten Nebenwirkungen bei Patienten mit Osteoradionekrose der Kieferknochen führen zu einer deutlich reduzierten Lebensqualität, da eine normale Nahrungsaufnahme durch intraoral freiliegenden Knochen, starke Schmerzen und insbesondere die gestörte Kau- und Schluckfunktion in vielen Fällen nicht mehr möglich ist. Der hohe Leidensdruck der Patienten erfordert eine zügige und nachhaltige Therapie mit folgenden Zielen: Schmerzbeseitigung, Deckung von freiliegendem Knochen, Frakturprophylaxe, Erhalt des Knochens und benachbarter Organstrukturen, Prophylaxe eines Rezidivs, Vermeidung einer Infektion bzw. deren Ausbreitung, ebenso wie die Wiederherstellung von Form und Funktion.

Obwohl das gesunde knöcherne Skelett eine außergewöhnliche Adaptations- und Regenerationsfähigkeit besitzt (SPRINGER *et al.* 2002; TERHEYDEN *et al.* 1997), verliert der Knochen nach Radiotherapie diese Eigenschaften. Dies ist auf die eingangs erwähnte Fibrosierung der Blutgefäße und die damit verbundene Minderdurchblutung zurückzuführen. Gerade bei chronischen oder rezidivierenden Verlaufsformen der Osteonekrose wird daher eine hyperbare Sauerstofftherapie zur Verbesserung der Gewebeoxygenierung durchgeführt. Der Patient wird hierzu in einer Überdruckkammer einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt. In der Folge steigt die Aktivität der Zellen der Körperabwehr und Reparationsvorgänge werden beschleunigt. Diese therapeutische Maßnahme wird meistens als Unterstützung der chirurgischen und antibiotischen Therapie angewendet; bei geringer Ausprägung der Osteoradionekrose kann aber auch die alleinige hyperbare Oxygenierung zur Heilung führen (FREIBERGER *et al.* 2009).

Die chirurgische Wiederherstellung der Funktion und Ästhetik im Bereich der erkrankten und verloren gegangenen Knochenareale erfolgt in der Regel mit mikrovaskulären Knochentransplantaten der Scapula oder Fibula. Insbesondere das freie Fibulatransplantat führt zu guten funktionellen Ergebnissen. Allerdings bedingt die verminderte Durchblutung und die damit verbundene reduzierte Regenerationsfähigkeit des Lagers ein begrenzt erfolgreiches Ergebnis des Eingriffs (BOZEC *et al.* 2007; NEUKAM 1992). Zu berücksichtigen ist auch, dass in der

Spenderregion postoperative Komplikationen mit entsprechenden Folgen für den Patienten auftreten können.

Gerade vor diesem Hintergrund bildet das Tissue Engineering eine hoffnungsvolle Methode, mit dem Ziel, aus autologen Zellen Gewebe *in vitro* zu züchten und anschließend dem Patienten zu implantieren. Ein weiterer Therapieansatz ist körpereigenes Gewebe zur Differenzierung oder zur Expression von lokalen Faktoren anzuregen (WARNKE *et al.* 2004). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie konzentriert sich die Forschung intensiv auf die ektope Bildung von Knochen und Knorpel (WARNKE *et al.* 2004). Diese könnten zur Therapie von Defekten in Gelenken oder zur plastischen, rekonstruktiven Versorgung größerer Defekte genutzt werden (BREITBART *et al.* 1998; VACANTI *et al.* 1993). Ein wichtiger Faktor für die Geweberekonstruktion ist das Material der Biomatrix, welche als Leitschiene für das wachsende Gewebe dient (WANG *et al.* 2004). Die Nutzung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark oder Periost, sog. Osteoprogenitorzellen, die mit Hilfe verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in Kombination geeigneter Matrices als Zelladhäsive zu den entsprechenden Zelltypen differenziert werden können, gewinnt bei der *in-vitro*-Osteogenese zunehmend an Bedeutung (HILDEBRANDT *et al.* 2009; WARNKE *et al.* 2004). Die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren haben hierbei eine Schlüsselfunktion. Mit ihrer Hilfe können Zellen nicht nur *in vitro* sondern auch lokal *in vivo* stimuliert und aktiviert werden. Die Applikation einer therapeutisch ausreichenden Menge dieser Faktoren kann die im perivaskulären Gewebe vorhandenen Stammzellen zur Regeneration anregen.

Zu den wichtigsten osteogenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zählen die zur Transforming growth factor- β (TGF- β)-Superfamilie gehörenden Bone morphogenetic proteins (BMPs). Sie sind in der embryonalen Organentwicklung als universelle Differenzierungsfaktoren in zahlreichen Geweben nachweisbar. Die Anfänge der Untersuchung der körpereigenen Osteoinduktion gehen auf Urist zurück, der im Tierexperiment demineralisierten und gefriergetrockneten Knochen in eine Muskeltasche verpflanzte und damit ektop neues Wachstum von Knochen induzieren konnte (URIST 1965). Er sah dies als Nachweis, dass es in der Knochenmatrix bestimmte Substanzen gibt, die für eine Knochenneubildung

verantwortlich sind. Im Zuge weiterer Forschungsarbeit prägte er dafür den Begriff „Bone Morphogenetic Protein“ (BMP) (URIST und STRATES 1971).

BMPs sind dimere Proteine, die vom Organismus als große inaktive Vorläufermoleküle synthetisiert werden. Sie bestehen aus einer Signalpeptidsequenz, die das Verlassen der Zelle ermöglicht, sowie einer Propeptid-Domäne und einer endständigen Carboxyl-Region aus 100-130 Aminosäureresten, die den aktiven Teil dieser Proteine bilden (WOZNEY 1998). Für therapeutische Anwendungen hat die rekombinante Form der BMPs gegenüber dem aus menschlichem oder tierischem Knochen extrahierten BMP den Vorteil, dass sie quasi unbegrenzt zur Verfügung steht. Des Weiteren stellt sie in dieser Form kein Infektionsrisiko für den Empfänger dar. BMP-2 bis BMP-13 werden aufgrund der genetischen Ähnlichkeit der TGF- β Proteinfamilie zugeordnet. BMP-1 ist eine übergeordnete, nicht zur TGF- β Familie gehörige Protease, die wichtige Funktionen in der Regulation aller BMPs besitzt, jedoch strukturell nicht mit ihnen verwandt ist (KESSLER *et al.* 1996). Auch postfetal können BMPs eine Differenzierung von Vorläuferzellen in Stammzellen verschiedener Gewebe bewirken. Dabei werden auf zellulärer Ebene die gleichen Abläufe wie in der Embryonalentwicklung wiederholt (WOZNEY 1998). So werden nach einer Knochenfraktur oder einer Zahnextraktion beispielsweise BMP-2, -4 und -7 freigesetzt. Durch osteoinduktive Proteine werden dabei chemotaktisch undifferenzierte, pluripotente Bindegewebsstammzellen aus der Umgebung angelockt und bewirken deren Proliferation und Differenzierung in Osteoblasten und Chondroblasten (RIPAMONTI und REDDI 1994; WOZNEY 1995). Auch wenn BMPs zuerst im Knochen entdeckt wurden, spielen sie nicht nur dort eine zentrale Rolle. Sie sind maßgeblich an der embryonalen Entwicklung und an postfetalen Heilungsprozessen beteiligt; zudem an Wachstums- und Differenzierungsvorgängen anderer Hart- und Weichgewebe (RIPAMONTI und DUNEAS 1998). Die internationale Literatur beschreibt nicht nur eine Fülle von tierexperimentellen Untersuchungen zur Wirksamkeit von BMPs unter dem Aspekt der Osteoinduktion, sondern auch viele andere Wirkbereiche, wie zum Beispiel die Beschleunigung der Callusmaturation bei der Osteodistraktion (TERHEYDEN *et al.* 2003), oder den Einsatz von BMP-7 zur Dentinregeneration in der konservierenden Zahnheilkunde. Jepsen und Ripamonti konnten zeigen, dass bei Applikation von

BMPs in parodontale Defekte eine Induktion der Zementbildung und Desmodontalregeneration ausgelöst werden kann (JEPSEN *et al.* 1997; RIPAMONTI und REDDI 1994).

Internationale Patente beschreiben derzeit ca. 30 verschiedene Typen von BMPs. In der Literatur werden 20 BMPs unterschieden (CHEN *et al.* 2004). BMP-2 und -7 sind zurzeit die wichtigsten dieser Gruppe, wenn man die Induktion und Differenzierung von humanen Osteoblasten aus Knochenmark-Stromazellen betrachtet (AKITA *et al.* 2004; CHANG *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2001). Der am meisten verbreitete Therapieansatz liegt in der direkten Applikation von BMPs in Kombination mit unterschiedlichen Trägermaterialien auf einen knöchernen Defekt (HUANG *et al.* 2008; WIKESJO *et al.* 2009). Dabei konnte in tierexperimentellen Arbeiten an bestrahlten Ratten eine verstärkte knöcherne Regeneration erzielt werden (SPRINGER *et al.* 2008). Ein weiterer Ansatz liegt in der ektopen Knochenneubildung zur zweizeitigen Rekonstruktion von Knochendefekten im Sinne eines autologen Transplantats (WARNKE *et al.* 2004).

Neben der Bedeutung von BMPs konnte in vielen Untersuchungen die Bedeutung des basic fibroblast growth factor (bFGF) sowie des fibroblast growth factor-2 (FGF-2) für die Angiogenese als Voraussetzung zur Knochenneubildung gezeigt werden (DRAENERT *et al.* 2009; SPRINGER *et al.* 2008; WILTFANG und MERTEN 1996). Gerade im ersatzschwachen Lager ist die Wiederherstellung einer adäquaten Vaskularisierung und die damit verbundene Sauerstoffsättigung des Gewebes von entscheidender Bedeutung für die Regeneration (SCHLIEPHAKE *et al.* 1995). Die klinische Anwendung von Wachstumsfaktoren ist mit der Problematik verknüpft, dass vor Ort nur über einen kurzen Zeitraum die notwendige Konzentration aufrechterhalten bleibt (WILTFANG und MERTEN 1996). Die Gentransfermethode im Sinne einer lokalen Gentherapie bietet hier einen vielversprechenden Ansatz. Der Vorteil der anhaltenden hohen Konzentration von Zytokinen im Gewebe könnte in einem kontrollierten experimentellen Versuch zur kurativen Behandlung der Osteoradionekrose durch Transfer von BMP-2 sowie bFGF ausgenutzt werden. Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet (LOTTSPREICH 2006). Beim Gentransfer wird

zwischen zwei Strategien, der ex-vivo- und dem in-vivo-Ansatz, unterschieden. Bei der ex-vivo-Technik werden ausgewählte Zellen isoliert, kultiviert und *in vitro* mit den gewünschten Genen transfiziert. Danach erfolgt die Transplantation in den Empfänger. Die in-vivo-Technik beruht auf einer direkten Transfektion der Zielzellen ohne den Umweg über Zellkulturen (BRANSKI *et al.* 2007). Die Transfektion kann mittels chemischer Verfahren wie z.B. Calcium-Phosphat-Präzipitation, physikalischer Verfahren wie z.B. Elektroporation oder durch biologische Verfahren unter anderem mit Viren als Vektoren durchgeführt werden. Bei der Verwendung von Gentherapie im Allgemeinen werden bis heute bevorzugt virale Vektoren wegen ihrer spezifischen Transfektionsmöglichkeiten zum Gentransport benutzt (GARDLIK *et al.* 2005).

Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe eines etablierten Tiermodells die Knochenregeneration sowie das regenerative Potential von transfizierten Zellen (BMP-2 und bFGF) *in vivo* zu untersuchen. Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass die Verwendung von BMP-2 oder bFGF im bestrahlten Tiermodell zu einer verbesserten Regeneration führte. Die Studienhypothese besagte, dass insbesondere die kontinuierlichere Abgabe von Wachstumsfaktoren durch transfizierte Zellen die Geweberegeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager verbessert.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet daher: Kann die Geweberegeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager durch Transfektion von Expressionsplasmiden (BMP-2 und bFGF) signifikant verbessert werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche lassen sich in zwei Phasen aufteilen:

1. Irradiation der Versuchstiere zur Induktion einer Osteoradionekrose
2. Implantation der transfizierten Expressionsplasmide

Die Tiere wurden für die Versuche in folgende Gruppen eingeteilt:

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

	Irradiatio	n	Wachstumsfaktor/ Marker	Tiere
Gruppe 1	bestrahlt	6	BMP-2-plasmid transfizierte Periostzellen	WKY Nr. 5,6 F344 Nr. 5,6 Lew Nr. 5,6
Gruppe 2	bestrahlt	6	bFGF-plasmid transfizierte Periostzellen	WKY Nr. 7,8 F344 Nr. (7), 8 Lew Nr. 7,8
Gruppe 3	bestrahlt	9	bFGF- und BMP-2-plasmid transfizierte Periostzellen	WKY Nr. 9-11 F344 Nr. 9,10,12 Lew Nr. 9-11
Gruppe 4	bestrahlt	6	Keine Wachstumsfaktoren	WKY Nr. 1,2 F344 Nr. 1,2 Lew Nr. 1,2
Gruppe 5	nicht bestrahlt	6	Keine Wachstumsfaktoren	WKY Nr. 13,14 F344 Nr. 13,14 Lew Nr. 13,14
Gruppe 6	bestrahlt	6	MOCK Kontrolle, Zellen OHNE BMP-2 oder bFGF Gen	WKY Nr. 3,4 F344 Nr. 3,4 Lew Nr. 3,(4)

In Klammern: Vor Versuchsende verendete Tiere (nicht ausgewertet)

2.2 Zeitliche Abfolge

Die Tiere wurden nach Anlieferung für eine Woche an die Umgebung des Tierstalls gewöhnt. Während dieser Zeit erfolgte das Markieren und das regelmäßige Wiegen der Tiere. Nach ca. sieben Tagen wurde die Bestrahlung der Tiere wie unter Punkt 2.7 beschrieben vorgenommen. Die Applikation der Wachstumsfaktoren erfolgte nach drei Monaten. Parallel erfolgte die intraperitoneale Injektion für die polychrome Sequenzmarkierung, die unter Punkt 2.9 beschrieben wird. Viereinhalb Monate nach Versuchsbeginn wurden die Tiere geopfert und zur Herstellung von Präparaten vorbereitet.

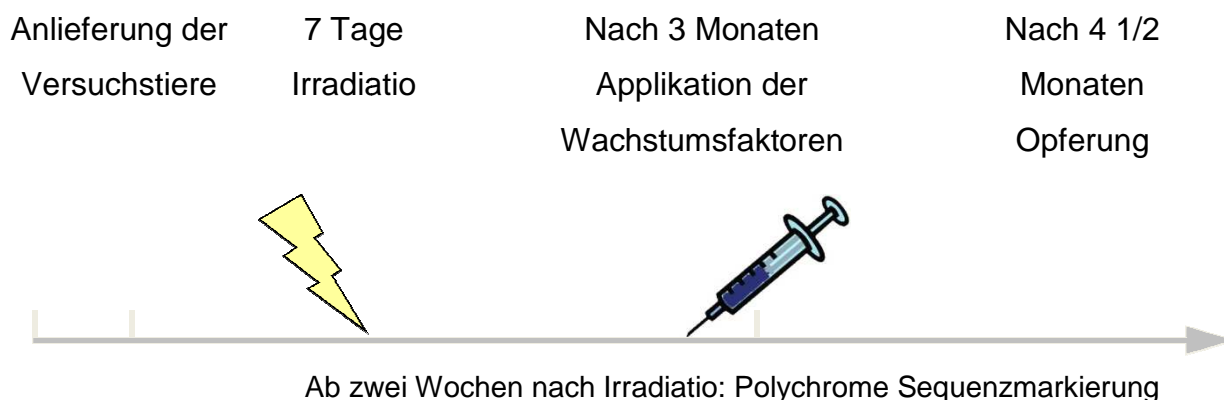


Abbildung 1: Grafische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Versuche

2.3 Versuchstiere

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden an jeweils 13 männlichen Ratten der Stämme F344, Lewis und WKY durchgeführt. Das Gewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn durchschnittlich 250 g (F344), 275 g (Lewis) und 265 g (WKY). Zum Zeitpunkt der Opfung der Tiere lag das Gewicht im Mittel bei 390 g (F344), 455 g (Lewis) und 440 g (WKY). Die Versuchstiere wurden über den zentralen Tierstall des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel bezogen und dort unter standardisierten Bedingungen gehalten: Raumtemperatur 23°C, Luftfeuchtigkeit 45% in einem Polycarbonatkäfig von 40 x 60 cm

(Ehret Labor und Pharmatechnik GmbH und Co. KD, Emmendingen). Die Fütterung erfolgte mit Alleinfutter, Pellets 10 mm, für Rattenzucht (Ssniff R-Z, Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Leitungswasser ad libitum. Der Tag- und Nachtrhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Tiere wurden täglich von Tierpflegern versorgt und nach den Eingriffen auch an den Wochenenden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe betreut. Die Markierung der einzelnen Tiere zwecks Unterscheidung wurde nach eigenem Schema (siehe Anhang) mittels Anbringen von Kerben und Löchern in den Ohren der Tiere mit Hilfe einer Markierzange vorgenommen.

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz. Eine Tierversuchsgenehmigung des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft, Schleswig-Holstein lag unter dem Aktenzeichen V 742-72241.121-14 (39-5/04) vor (siehe Anhang). Je ein Tier aus den Gruppen (F344) und (Lewis) verendete vor Versuchsabschluss während der Narkose.

2.4 Narkose

Vor Implantation des Katheters für die Brachytherapie und vor Applikation der Wachstumsfaktoren wurden die Versuchstiere in eine Narkose versetzt. Die Zusammensetzung der Medikation war wie folgt:

Rompun 2% (Bayer AG, Leverkusen)

Grenzdosis: 10 mg / kg

Verwendet: 1 mg Wirkstoff/ 100 g Tiergewicht, entspricht 0,05 ml Rompun 2%

Ketanest S 5 mg/ ml (Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe)

Grenzdosis: 90 mg/ kg

Verwendet: 9 mg Wirkstoff/ 100 g Tiergewicht, entspricht 1,8 ml Ketanest 5 mg/ ml

Die Applikation erfolgte intraperitoneal mittels Einmalspritze und Kanüle nach Bestimmung des aktuellen Gewichtes des Versuchstieres.

2.5 Computertomographie

Zur Kontrolle der korrekten anatomischen Lage des Bestrahlungskatheters in Relation zur Mandibula und zur computergestützten Berechnung des Bestrahlungsfeldes wurde einem zuvor narkotisierten Tier ein Führungskatheter für Brachytherapie implantiert. Dieser Eingriff erfolgte basierend auf den Erfahrungen einer anderen Arbeitsgruppe innerhalb des Forschungsprojektes (NIEHOFF *et al.* 2008). Das narkotisierte Tier wurde innerhalb der Transportbox fixiert und der Schädel im Computertomographen röntgenologisch erfasst. Die Berechnung und grafische Darstellung erfolgte mit der Software BrachyVision™ 6.5 (Varian MedicalSystems Inc., Charlottesville, VA. USA).

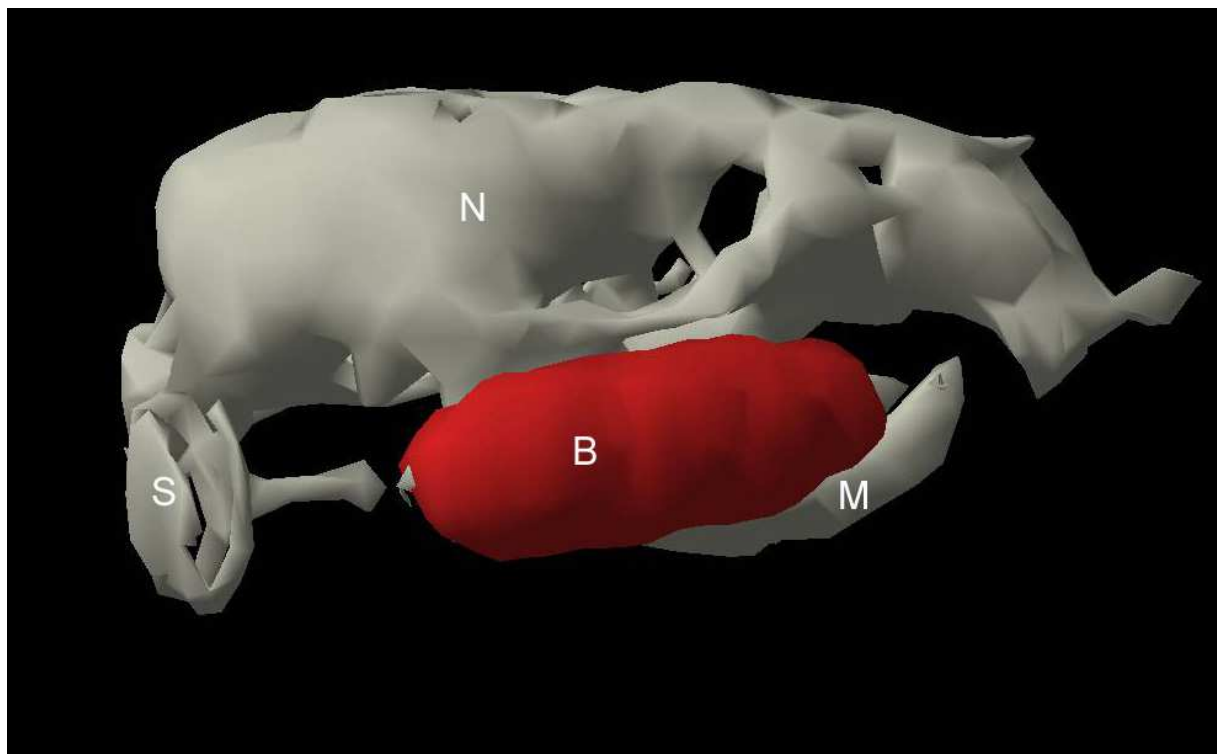


Abbildung 2: Computermodell der CT Daten. Dargestellt ist der Rattenschädel aus einer Ansicht von leicht schräg dorsal rechts. B= Bestrahlungsfeld, N= Neurokranium, M= Mandibula, S= Stopper des Katheters.

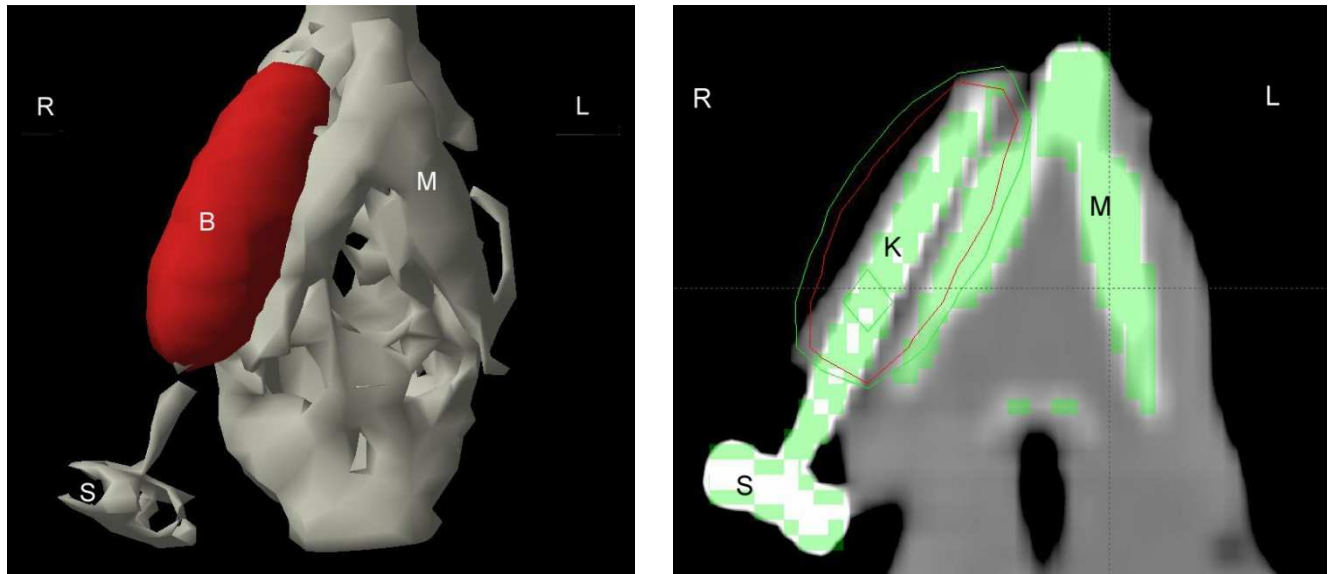


Abbildung 3: Computermodell 2 der CT Daten. Dargestellt ist der Rattenschädel von kaudal gesehen. B= Bestrahlungsfeld, M= Mandibula, S= Stopper des Katheters.

2.6 Operativer Eingriff und Gewebeentnahme

Zur Herstellung von Zellkulturen wurden drei Tiere der Isotypen F344, Lewis und WKY aus dem Vorversuch geopfert. Diesen Tieren wurden Fibroblasten der Dermis unter sterilen Bedingungen entnommen, welche durch eine weitere Arbeitsgruppe im Zellkulturlabor für die Transfektion vorbereitet wurden. Durch die Verwendung von drei Tieren je eines Isotyps war es möglich die Zellen für die anderen Tiere des jeweiligen Tierstammes zu verwenden. Das Risiko einer Abwehrreaktion auf die später zu implantierenden Zellen wurde hierdurch reduziert.

2.7 Brachytherapie

Zur Induktion einer Osteoradionekrose wurde die rechte Mandibulahälfte der Versuchstiere über einen Katheter für Brachytherapie bestrahlt. Dies erfolgte mit einer HDR afterloading remote machine (VariSourceTM 200, Varian Medical Systems Inc., Charlottesville, VA. USA) Die Einzeldosis mit der jedes Tier bestrahlt wurde betrug 20 Gray, was einer bioäquivalenten Dosis von 45 x 2 Gray entspricht.

Die Implantation der Katheter erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zuvor wurden die Versuchstiere, wie unter Punkt 2.4 beschrieben, narkotisiert. Der anschließende Transport der Tiere vom Tierstall zur Strahlenquelle in der Klinik für Onkologie erfolgte in handelsüblichen Kunststoffboxen, in denen die Tiere warm und gepolstert untergebracht waren. Während des Bestrahlungsvorgangs verblieben die Tiere in den Transportboxen um eine sichere Lagerung zu gewährleisten und ein Auskühlen der narkotisierten Tiere zu verhindern.

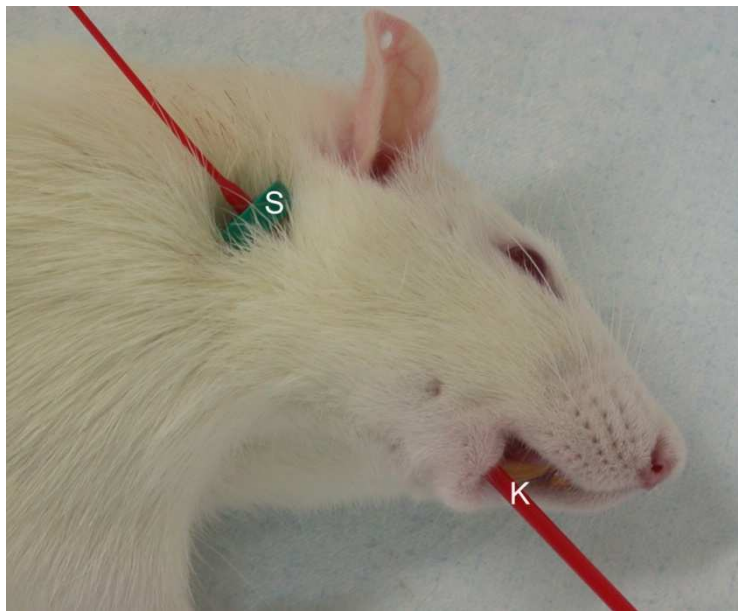


Abbildung 4: Implantierter Katheter (K).
Der Stopp (S) verhindert ein Verrutschen während der Irradiation.

Nach Bestrahlung wurde der oben abgebildete Stopper entfernt und der Katheter explantiert. Die Gewebeirritation durch den Eingriff war lediglich minimal. Es kam zu keinerlei Nachblutungen, so dass auf ein Vernähen der Wundränder verzichtet werden konnte.

2.8 Transfektion und Applikation der Zellen

Innerhalb des Forschungsprojektes beschäftigte sich eine weitere Arbeitsgruppe mit der Transfektion der Expressionsplasmide. Die, wie unter Punkt 2.6 beschrieben, entnommenen Fibroblasten wurden in Kultur gebracht und vermehrt. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 200 μ l Medium resuspendiert und mit 20 μ g (in maximal 20 μ l Medium) des gewünschten Expressionsplasmides (BMP-2 und bFGF) in Elektroporationsküvetten vermischt. Im Anschluss erfolgte die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad GmbH, München). Die Transfektionseffizienz der Elektroporation lag bei den Expressionsvektoren basierend auf pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) zwischen 60 – 70%. Pro Tier wurden 2×10^5 autologe transfizierte Zellen in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und unter Narkose in die Ratten an den Ort der Osteoradionekrose eingespritzt. Dies erfolgte über eine 14er Braunüle die lateral des rechten unteren Nagezahnes eingeführt und unter Palpationskontrolle bis zum Kieferwinkel vorgeschoben wurde. Nach Entfernen der Führungsnadel erfolgte unter langsamem Zurückziehen bis zur Hälfte der inserierten Länge die kontinuierliche Abgabe der Zellsuspension. Nach Entfernung der Braunüle wurde die Einstichwunde für etwa 60 Sekunden mit einem Tupfer komprimiert, um ein Nachbluten mit möglichem Verlust der injizierten Zellen zu verhindern.

2.9 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

Die Arbeiten von Rahn bilden die Grundlage für die intravitale polychrome Sequenzmarkierung mit Fluorochromen (RAHN und PERREN 1971; RAHN und PERREN 1972). Basierend auf der standardisierten Anwendung am Minischwein (SPRINGER *et al.* 2002) wurde die Irradiatio zwei Wochen nach Sequenzmarkierung in folgender Reihenfolge begonnen:

1. Alizarinkomplexon, 3%ige Lösung in 2% NaHCO_3 , 0,8 ml/ kg Körpergewicht;
2. Doxycyclin, 1 ml/ kg Körpergewicht (Doxycyclin Ratiopharm SF[®], Fa. Ratiopharm GmbH & Co., Ulm)
3. Calceingrün, 1%ige Lösung in 2% NaHCO_3 , 5 ml/ kg Körpergewicht;
4. Xylenolorange, 6%ige Lösung in 2% NaHCO_3 , 1,5 ml/ kg Körpergewicht

Jeder dieser vier Farbstoffe wurde in oben angegebener Reihenfolge im Abstand von zwei Wochen intraperitoneal injiziert, um im späteren fluoreszenzmikroskopischen Bild vier initiale Banden zu erzeugen. Die zweite Sequenz begann eine Woche nach Injektion der Wachstumsfaktoren. Der Abstand zwischen den Markierungen der zweiten Sequenz betrug eine Woche, wobei Alizarinkomplexon und Tetracyclin als Doppel- und Calcein-grün sowie Xylenolorange als Einzelapplikation verabreicht wurden, so dass sechs weitere Banden erzeugt wurden (siehe Tabelle 2).

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die sich im Rahmen der Mineralisation durch Chelatbindung an Calciumionen binden und somit in den neugebildeten Knochen eingebaut werden, können im Präparat unter Blaulicht-Anregung sichtbar gemacht werden. Die intraperitoneale Markerapplikation erfolgte bei manueller Fixation der Tiere unter einem herkömmlichen OP Tuch. Diese, für das Tier höhlenartige Abdeckung beruhigte die Tiere, was eine einfachere Therapie mit geringerer Verletzungsgefahr für Behandler und Tier durch dessen Extremitäten und Kauapparat ermöglichte. Das für die Dosierung der Markersubstanzen notwendige Gewicht wurde unmittelbar vor dem Eingriff mit einer digitalen Waage ermittelt und dokumentiert.

Tabelle 2: Zeitliche Abfolge der Markierung. Angabe der Wochenanzahl nach Irradiatio.

Farbstoff	Alizarin-Komplexon	Doxycyclin	Calcein-grün	Xylenol-Orange
Farbe der Bande unter Blaulicht	rot	braun	grün	orange
Zeitpunkt der Markierung	2., 7. und 8. Woche	3., 9. und 10. Woche	4., und 11. Woche	5., und 12. Woche

2.10 Opferung der Versuchstiere

Viereinhalb Monate nach Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere geopfert. Hierzu wurden die zuvor mit Ether sedierten Tiere dekapitiert. Die großen Kopfgefäße wurden mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült und die Köpfe anschließend in Formalin (10%) gelagert.

2.11 Aufbereitung der Präparate

Nach Kontrolle der Schnittebene mittels Metallkanülen und Röntgenaufbisszahnfilmen (Fa. Kodak, NY, USA) wurde der Kopf mit einer wassergespülten Tischbandsäge (Fa. Exakt, Norderstedt) transversal für die weitere Aufarbeitung geteilt. Der ventrale Anteil wurde für die Hartschliffhistologie weiterverarbeitet und die dorsale Hälfte für die Paraffineinbettung vorbereitet.

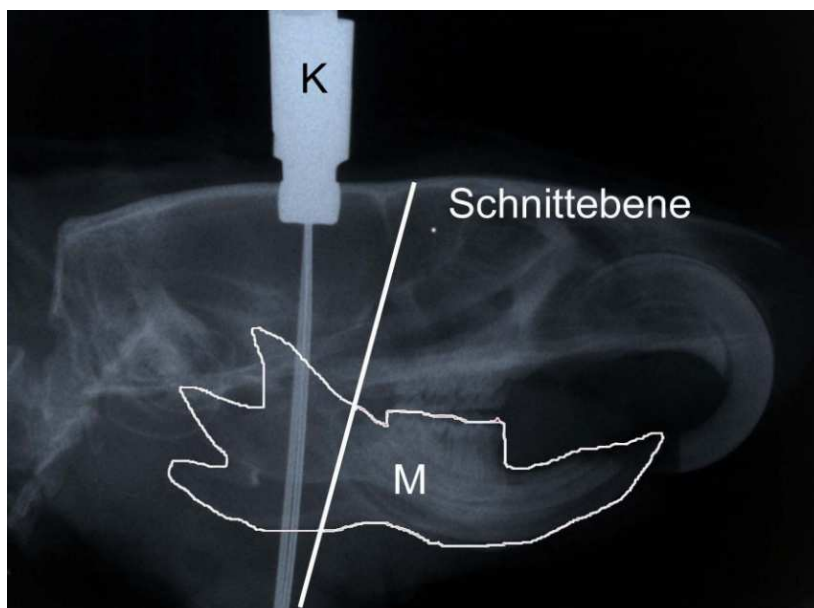


Abbildung 5: Das Röntgenbild zeigt die Kanülen (K) als Orientierungshilfen für die lagegerechte Schnittführung durch die Mandibula (M).

2.11.1 Paraffineinbettung

Die dorsalen Anteile der Präparate wurden für 2-3 Tage in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend erfolgte die Entkalkung mit EDTA 0,5 Molar; pH 7,4; für 6 Wochen. Das nachfolgende Entwässern und Einbetten der Präparate fand in dem geschlossenen linearem Gewebereinbettssystem TPC 15 Tissue Processor (MEDITE GmbH, Burgdorf) statt. Für die weitere Verarbeitung wurden ein Schlittenmicrotom HM 430 (Microm International GmbH, Walldorf) und ein Objektträgerstrecktisch TFP40 (MEDITE GmbH, Burgdorf) verwendet. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte nach etabliertem Laborstandard.

2.11.2 Methacrylateinbettung

Zur Anfertigung von Hartschliffpräparaten erfolgte eine Methacrylateinbettung mit Hilfe eines Einbettautomaten (Fa. PSI, Pool of Scientific Instruments, Ltd., Basel, Schweiz). Nach Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe folgte die Entfettung in einem Äthanol-/ Acetongemisch und anschließend eine Spülung mit reinem Alkohol. Die Präparate wurden 12 Stunden mit reinem Methacrylsäuremethylester und für weitere 5 Tage mit dem Einbettmedium durchtränkt.

Zusammensetzung des Einbettmediums (PMMA):

500 ml	Methacrylsäuremethylester (Fa. Fluka, Neu-Ulm)
100 ml	Nonylphenol (WIV, Fa. Walter, Kiel)
5 ml	Phtalsäuredibutylester (Fa. Merck, Darmstadt)
3 g	α - α' Azoisobutyronitril (Fa. Merck, Darmstadt)

Zur vollständigen Polymerisation wurden die Präparate in einem Laborglas mit einem bereits vorbereiteten ca. 10mm hohen Sockel aus Einbettmaterial für 3-4 Tage bei 37°C im Wärmebad gelagert. Die Gläser wurden nach vollständiger Aushärtung des Einbettmediums zerschlagen und die Blöcke mit einer Tischbandsäge (Typ BS 1638, Fa. Metabo, Bochum) unter visueller Kontrolle zur Schonung des Präparates maximal reduziert. Die so entstandenen Präparateblöcke wurden markiert und mit dem Schleifgerät Saphir 360 E (Fa. ATM, Altenkirchen, Deutschland) und Silikonkarbidpapier (Körnung 500, 1200, 2400 und 4000) hochglanzpoliert.

Es wurde darauf geachtet, dass die Schnittebene exakt symmetrisch im Bezug auf das Präparat getrimmt wurde. Um dies zu gewährleisten wurde jeweils bis zum Erreichen der Distalfläche der distalen Molaren getrimmt, bevor die Hochglanzpolitur erfolgte. Nach der Politur wurden die Kunststoffblöckchen mit Sekundenkleber (Instant Adhesive 493, Fa. Loctite, Herts, UK) auf einen mit Kunststoffolie versehenen Objektträger aus Plexiglas geklebt. Dies erfolgte mit der dorsalen Seite des Präparates (siehe Abbildung 6).

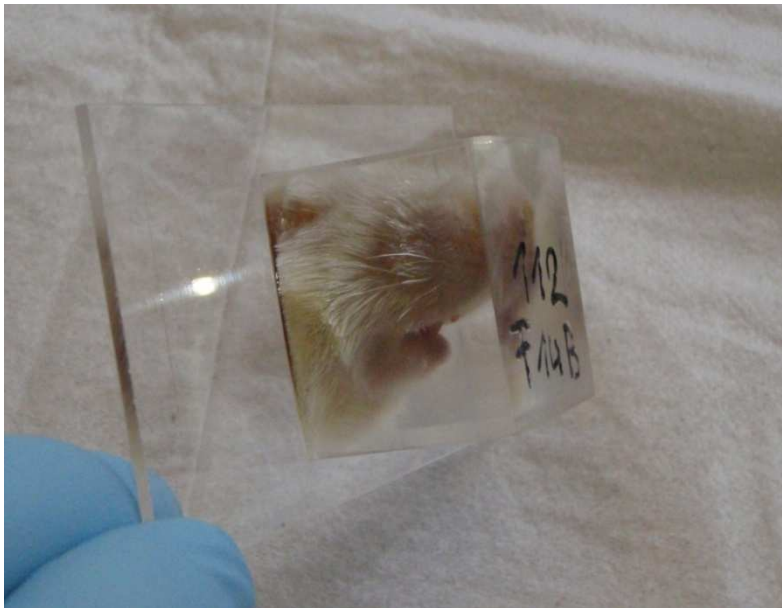


Abbildung 6: Das in Methacrylat eingebettete Präparat wird auf der dorsalen Seite mit Sekundenkleber auf dem Objektträger fixiert.

Mit Hilfe einer diamantierten Präzisionssäge (331 CP/ N, Fa. Exakt, Norderstedt) wurde ein circa 120 μm dicker transversaler Sägeschnitt angefertigt. Es wurden vier bis sechs Serienschnitte pro Präparat angefertigt, um für alle Tiere vergleichbare Ebenen sicherzustellen. Jeder dieser unentkalkten Schliffe wurde im Rahmen der Aufarbeitung nach der Hartschlifftechnik sequentiell den nachfolgenden Untersuchungen unterworfen.

2.11.3 Vorbereitung für die Mikroradiographie

Mit dem Mikroschleifsystem AW 110 (Fa. Exakt, Norderstedt) wurden die Sägeschnitte auf eine Dicke von 90-100 μm präzisionsgeschliffen und hochglanzpoliert.

Anschließend wurden die Schnitte mit der Folie vom Objektträger gelöst. Die so entstandenen Präparate wurden mikroradiografiert. Nach dem 1913 von Goby beschriebenen Verfahren lassen sich Röntgenaufnahmen histologischer Präparate realisieren. Dabei wurden die 90-100 µm dicken Sägeschnitte ohne Objektträger auf lichtempfindlich beschichteten Glasplatten mit einem Auflösungsvermögen von 2000 Linien pro mm: High Resolution Platten 1a (Fa. HTA Enterprises Microchrome Technologie Products, San Jose, USA) fixiert. Mit dem Gerät Faxitron der Firma Hewlett-Packard (Belichtungsdaten: Heizstrom: 3 mAs, Spannung: 25 kV, Belichtungszeit: 10 min, Fokusabstand: 16 cm) wurden die Platten belichtet. Die Entwicklung erfolgte mit Periomat Intra 1:5 (Fa. Dürr Dental, Bissingen) und Fixierkonzentrat (Fa. Kodak, NY, USA). Zur Konservierung der Mikroradiographien wurden die Präparate mit Einschlußmittel Eukitt (Fa. O. Kindler GmbH & Co., Freiburg) und Deckgläschen eingedeckelt. Die angefertigten Aufnahmen ermöglichen eine histomorphometrische Analyse der Hartgewebsverteilung.

2.11.4 Vorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf einen neuen Objektträger umgeklebt, auf eine Dicke von 50-60 µm präzisionsgeschliffen und im Fotomikroskop FXA (Nikon GmbH, Düsseldorf) unter Fluoreszenzauflicht untersucht. Durch die vorangegangene intravitale polychrome Sequenzmarkierung besteht die Möglichkeit die Menge des Knochenzuwachses zu bestimmen.

2.11.5 Vorbereitung für die Toluidinblaufärbung

Nach Abschluss der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Präparate für die Toluidinblaufärbung vorbereitet. Hierzu setzten wir alle Präparate für drei Minuten 0,1%iger Ameisensäure aus. Es folgt eine Spülung mit destilliertem Wasser und eine anschließende Verweildauer in 20%igem Methanol für 90 Minuten. Nach erneuter Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Präparate für zwei Minuten in einer Toluidinblau Lösung gefärbt. Zuletzt wurden die Präparate mit einem Einschlußmittel (siehe oben) und Deckgläschen versiegelt.

2.12 Auswertungsverfahren

2.12.1 Bilderfassung

Von allen Präparaten wurden Übersichtsaufnahmen mit 1- und 2-facher Objektivvergrößerung gemacht. Die Aufnahmen zur Auswertung der Fluoreszenzpräparate und der Mikroradiografien wurden schließlich mit 4-facher Objektivvergrößerung durchgeführt. Aufnahmen der paraffinhistologischen Präparate wurden mit 10- und 20-facher Objektivvergrößerung erstellt. Die Systemvergrößerung des Mikroskops betrug Faktor 1,25, die des Kameraadapters Faktor 0,7. Die Chipdiagonale der Kamera lag bei 2/3 Zoll; bei Darstellung in dieser Größe erfolgt keine Vergrößerung durch die Kamera.

Die digitale Erfassung der Bilder erfolgte mit der AxioCam MRc5, (Zeiss Imaging Solutions GmbH, Göttingen) und der Steuer- und Bearbeitungssoftware AxioVision Version 4.6.3.0 (Zeiss Imaging Solutions GmbH, Göttingen). Die Bilder wurden sowohl im *.tif als auch im *.jpg Format gespeichert. Die kompressionsfreie *.tif Formatierung wurde zur digitalen Weiterverarbeitung der Bilder, wie Streckenmessung und Dichtebestimmung genutzt, die *.jpg Dateien wurden zur Übersicht und Katalogisierung des Bildmaterials verwendet.

2.12.2 Bestimmung der Knochenanwachsrate

Alle Präparate wurden mit dem Fotomikroskop Microphot-FXA (Nikon GmbH, Düsseldorf) unter Fluoreszenzauflicht untersucht. Als Filterkombination wurde der Erregerfilter EX420~490, der Farbfilter DM 510 sowie der Sperrfilter B2A verwendet. Die Anregung mit Blaulicht machte die durch die intravitale polychrome Sequenzmarkierung induzierten Fluoreszenzbanden sichtbar. Im Bereich der Linea buccalis wurde ein Lot von der ersten Bande (Baseline) auf die periphere Bande gefällt und der Knochenzuwachs in μm gemessen. Wegen der unterschiedlichen Morphologie der Knochenareale wurde als zusätzliche Kontrolle eine Flächenmessung durchgeführt. Hierzu wurde ein Kreis mit dem Radius von 500 μm auf den Scheitelpunkt der ersten Bande (Baseline) gelegt. Die Schnittpunkte des Kreises mit der äußeren Fluoreszenzbande dienten als äußere Begrenzung für die

Flächenmessung. Mit der Bearbeitungssoftware AxioVision Version 4.6.3.0 (Zeiss Imaging Solutions GmbH, Göttingen) wurde sowohl die Strecken- als auch die Flächenmessung im Bereich der linea buccalis durchgeführt.

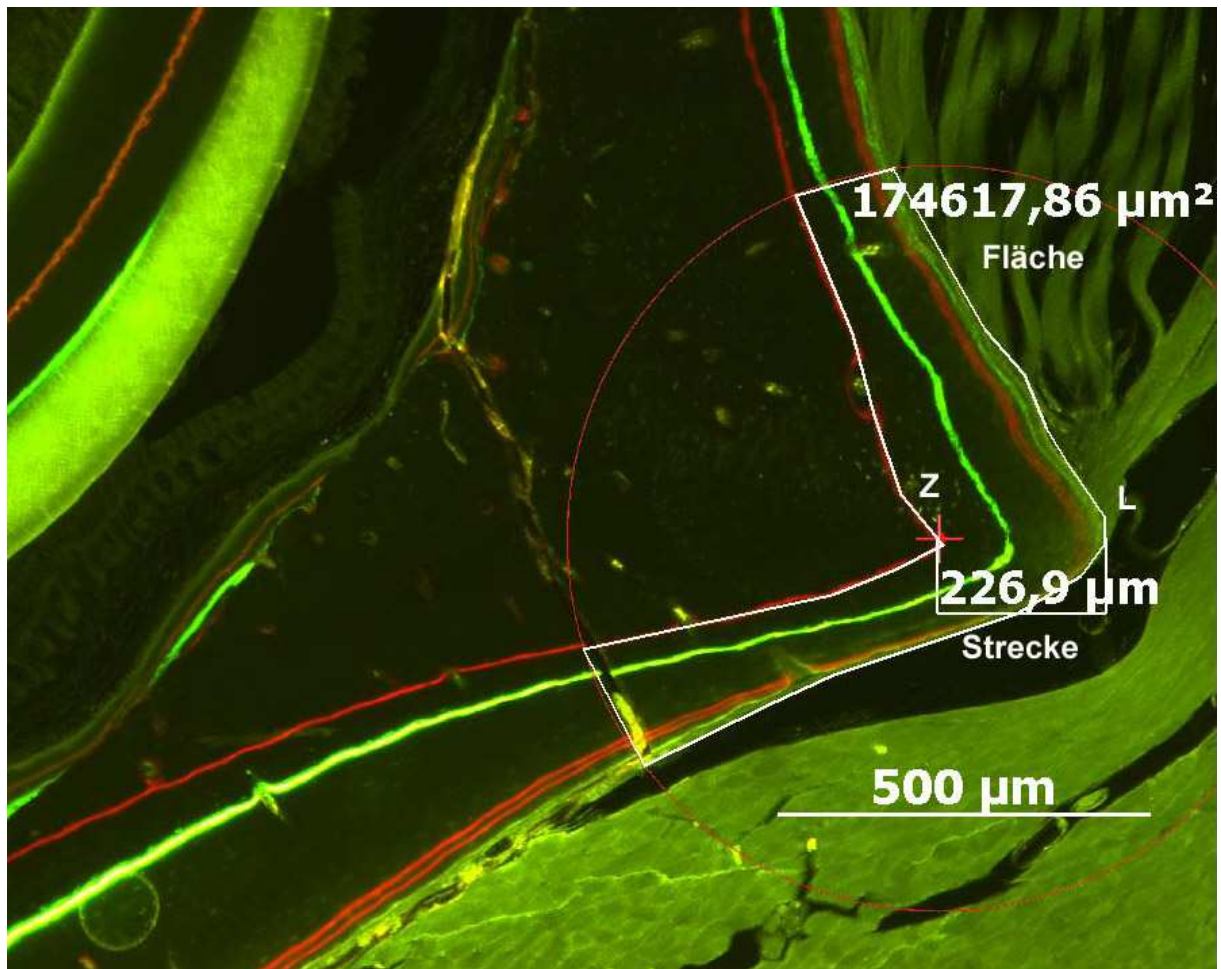


Abbildung 7: Screenshot aus AxioVision, beispielhafte Darstellung der Strecken- und Flächenmessung. Z (Zentrum des 500 µm Messkreises) L (linea buccalis).

2.12.3 Knochendichtebestimmung

Nach digitaler Erfassung der Mikroradiographien wurden mit der Software Leica QWin Standard V3.2.0 (Leica Microsystems Imaging Solution, Cambridge, UK) eine Feldmessung nach Detektion durchgeführt. Die Messung des jeweiligen Präparates wurde dreimal durchgeführt und die Daten notiert. Das Knochenareal wurde mit $0,025 \text{ mm}^2$ gewählt. Die Detektionsschwelle wurde mit dem dimensionslosen Empfindlichkeitswert 20 festgelegt.

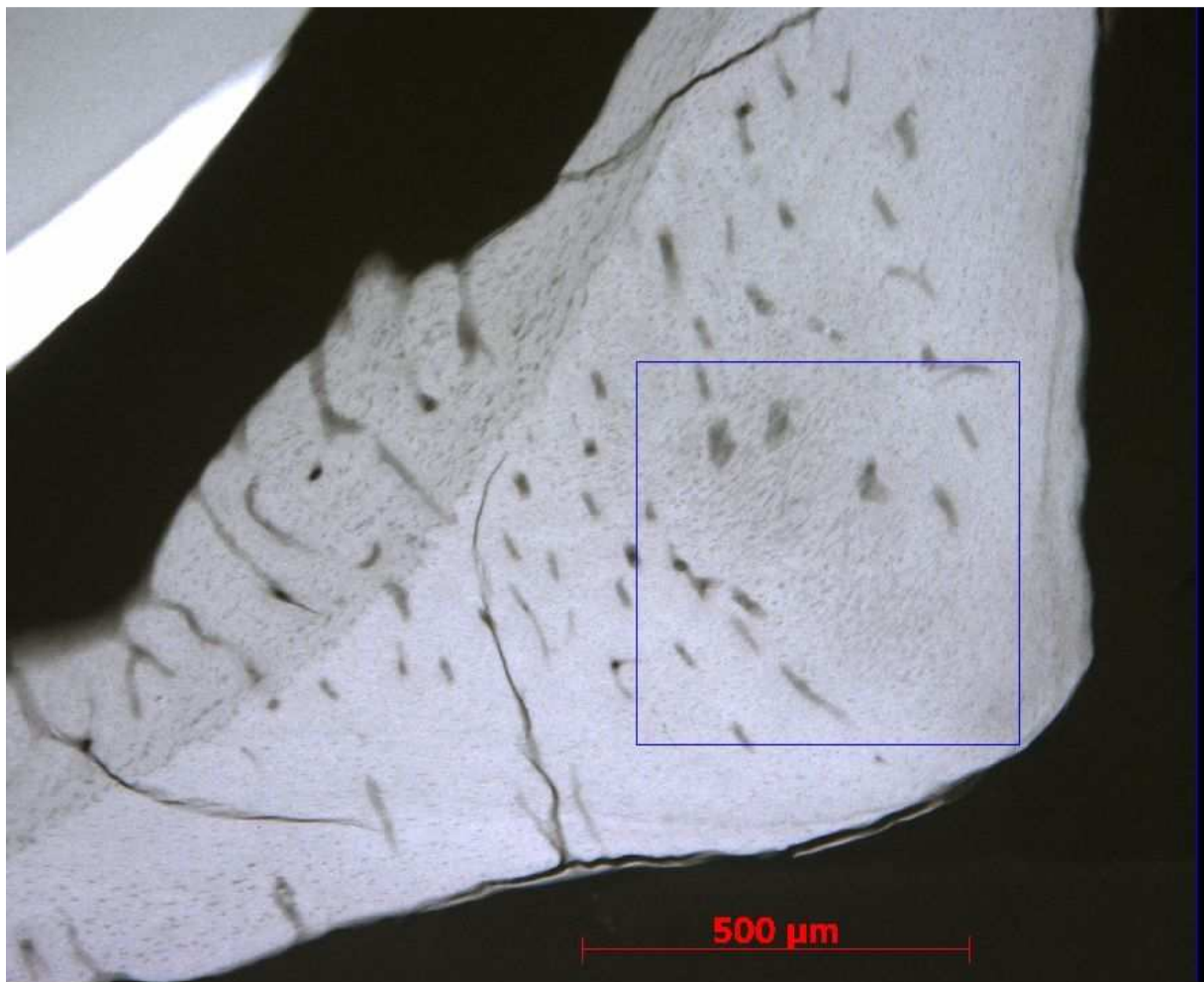


Abbildung 8: Screenshot aus QWin Standard, selektiertes Knochenareal vor Detektion und Messung.

2.13 Statistik

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) wurde für die analytische Statistik als signifikant angesehen (Software: SPSS 10.0, SPSS GmbH, München). Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung, Median und 25. sowie 75. Perzentile angegeben.

Ein zweiseitiger Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Wilcoxon matched pair signed rank test) wurde zum Vergleich der mittleren Anbauraten von Knochen auf der linken mit den Anbauraten auf der rechten Seite angewendet.

Der Kruskal-Wallis Test und der multiple zweiseitige Mann-Whitney (U-Test) wurden durchgeführt, um die interindividuellen Unterschiede der Knochendichte und Wachstumsraten der Behandlungsgruppen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 zu evaluieren.

Für alle Gruppen wurde die statistische Power berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Ergebnisse

Die Auswirkungen der Irradiatio ließen sich klinisch als Alopezie und als Wachstumsstörung (verlangsamte Eruption) des Unterkiefernagezahnes (U) auf der bestrahlten Kieferseite feststellen. Diese Zeichen waren bei allen bestrahlten Individuen in unterschiedlicher Ausprägung, aber jeweils eindeutig zu erkennen und entsprechen den von Grimm am Kaninchen gemachten Beobachtungen (GRIMM 1969). Die Ergebnisse der Hartschliffhistologie, die eine inhomogene Struktur im Bereich der Nagezahnwurzel auf der bestrahlten Kieferseite zeigten, untermauern die Hypothese einer Schädigung des bestrahlten Gewebes. Neben der Wachstumsstörung kam es vereinzelt zu Fehlbildungen des Nagezahnes der bestrahlten Seite, was sich in Form einer Teilinvagination oder einer dens in dente Anomalie darstellte. Die Oberkiefernagezähne (O) zeigten lediglich Fehlstellungen durch die unregelmäßig gewachsenen Antagonisten.

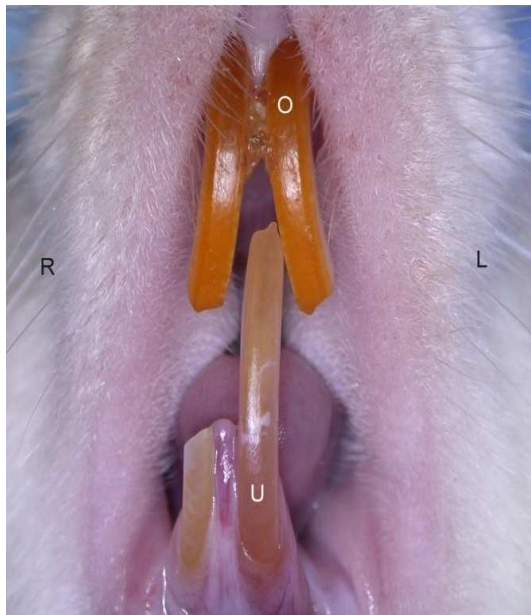


Abbildung 9: bestrahltes Versuchstier

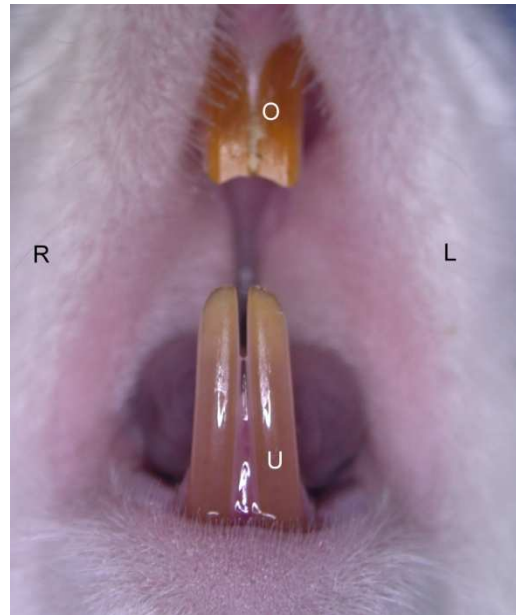


Abbildung 10: unbestrahltes Versuchstier

3.2 Histomorphometrische Analyse

Die in der Mikroradiographie gemessene Knochendichte an der äußeren kortikalen Zone der Mandibula (linea buccalis, LB) erbrachte äquivalente Werte im Vergleich der bestrahlten mit der unbestrahlten Seite für die Gruppen 1 (Transfektion mit dem BMP-2 Gen), 2 (Transfektion mit dem bFGF Gen), 3 (Transfektion mit BMP-2 und bFGF-Gen), 4 (nur Bestrahlung, keine Wachstumsfaktoren), 5 (keine Behandlung und keine Bestrahlung auf beiden Seiten) und 6 (MOCK-Kontrolle, Anwendung lediglich des Transfektionsverfahrens ohne Transfektion mit dem Gen eines Wachstumsfaktors). Für alle gilt: $p > 0.05$. Auch im interindividuellen Vergleich wurde kein signifikanter Unterschied für die durchschnittliche Knochendichte gefunden (behandelt gegen unbehandelt und Kontrolle gegen Kontrollseite, für alle Gruppen $p > 0,05$). In Abbildung 11 ist ein repräsentativer Querschnitt der Mandibula und Maxilla in Übersichtsvergrößerung dargestellt. Auf der rechten, bestrahlten Seite zeigt sich deutlich eine Störungen im Hartgewebe des apikalen Anteils des rechten Nagezahnes (ZR) im Vergleich zur linken unbehandelten Seite (Z).



Abbildung 11: Mikroradiographie beider Kiefer auf Höhe der distalen Molaren.

3.3 Knochenanwachsraten

Die Knochenanwachsraten wurden wie unter Punkt 12.2.2 bestimmt.

Statistischer Vergleich der Gruppen mittels Wilcoxon-Test (Paarvergleiche nicht normal verteilter Stichproben).

Tabelle 3: Zusammenfassung der Daten für die Erstellung des Box-Plots aus Abb. 12

Gruppe	n	Mittelwert	Std.- Abweichung	Min.	Max.	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Gr.1 links	6	169,32	49,68	73,50	215,60	141,98	185,47	197,23
Gr.2 links	5	182,38	45,60	129,70	223,40	132,85	208,00	219,10
Gr.3 links	9	120,54	71,66	0,00	253,10	81,52	107,00	167,40
Gr.4 links	6	205,04	66,12	130,80	289,81	148,20	192,20	275,85
Gr.5 links	6	201,21	35,21	162,91	265,20	173,10	198,82	220,05
Gr.6 links	5	216,87	59,06	136,80	274,80	156,02	234,30	269,00
Gr.1 rechts	6	49,17	44,87	0,00	100,70	0,00	52,05	92,83
Gr.2 rechts	5	57,54	44,33	0,00	104,70	19,70	43,60	102,35
Gr.3 rechts	9	45,01	46,62	0,00	143,00	0,00	36,70	68,45
Gr.4 rechts	6	50,64	45,18	0,00	102,36	0,00	51,65	99,20
Gr.5 rechts	6	215,49	37,84	163,20	261,20	191,33	204,52	259,40
Gr.6 rechts	5	61,62	45,81	0,00	106,40	15,11	70,90	103,50

(Werte in μm)

Statistische Power: Gruppe 1: 0,994; Gruppe 2: 0,987; Gruppe 3: 0,917

Gruppe 4: 0,996; Gruppe 5: 0,97; Gruppe 6: 0,991

Tabelle 4: Statistik für Test

	Gr.1 links Gr.1 rechts	Gr.2 links Gr.2 rechts	Gr.3 links Gr.3 rechts	Gr.4 links Gr.4 rechts	Gr.5 links Gr.5 rechts	Gr.6 links Gr.6 rechts
Zweiseitiger Test	-2,201(a)	-2,023(a)	-2,521(a)	-2,201(a)	-1,153(b)	-2,023(a)
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,028	,043	,012	,028	,249	,043

a Basiert auf positiven Rängen.

b Basiert auf negativen Rängen.

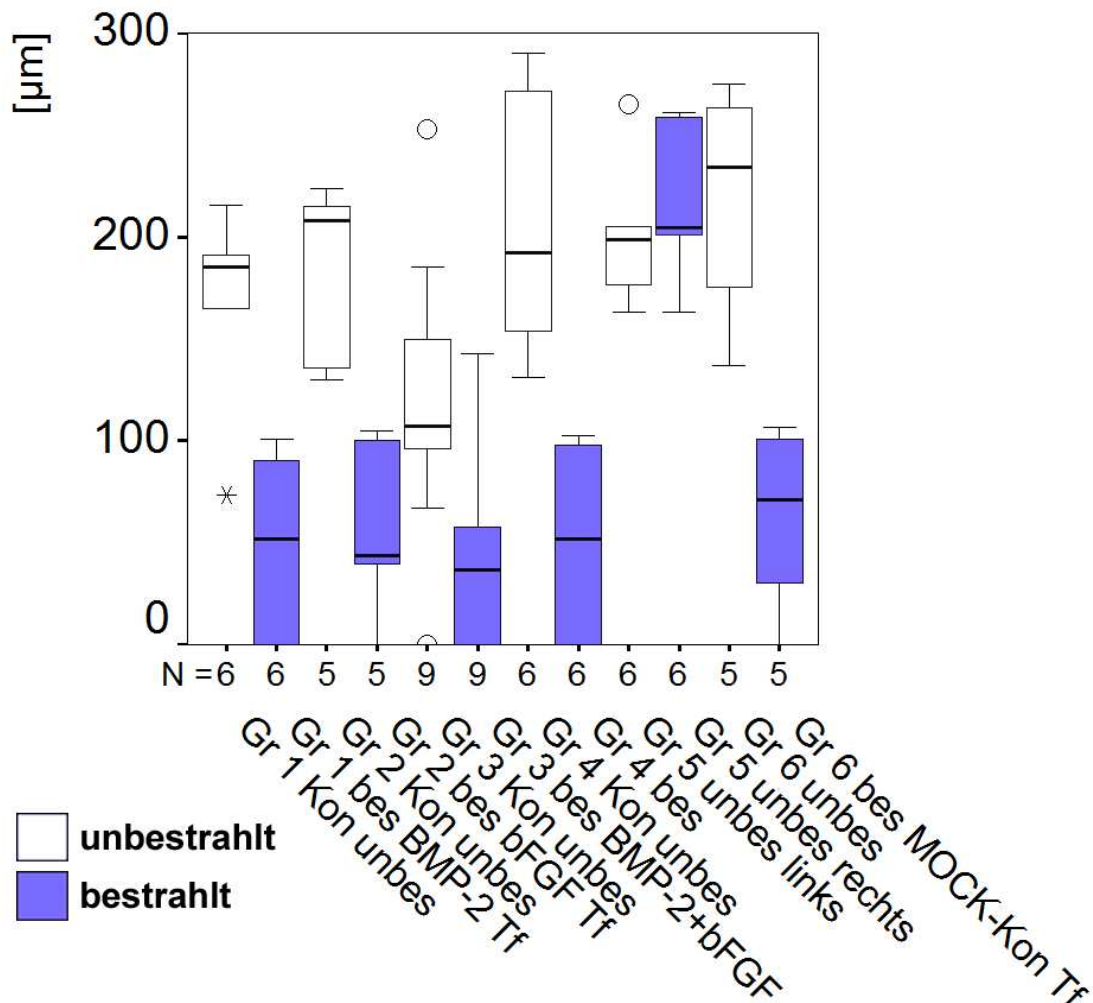


Abbildung 12: Boxplotdiagramm des Knochenzuwachs gemäß Tabelle 3
 N: Anzahl der Tiere pro Gruppe, O: Outlier, *:Extremwert

Abbildung 12 zeigt den durchschnittlichen Knochenzuwachs (in μm) an der Linea buccalis des Unterkiefers. Gruppe 2 und 6 $n=5$; Gruppe 1, 4 und 5 $n=6$; Gruppe 1 und 3 $n=9$. Jede Box gibt den Median, die Quartile und die Extremwerte an. Ein signifikanter Unterschied der Knochenapposition zwischen Kontrollseite und behandelter Seite trat in den Gruppen 1,2,3,4 und 6 auf (siehe Tabelle 4).

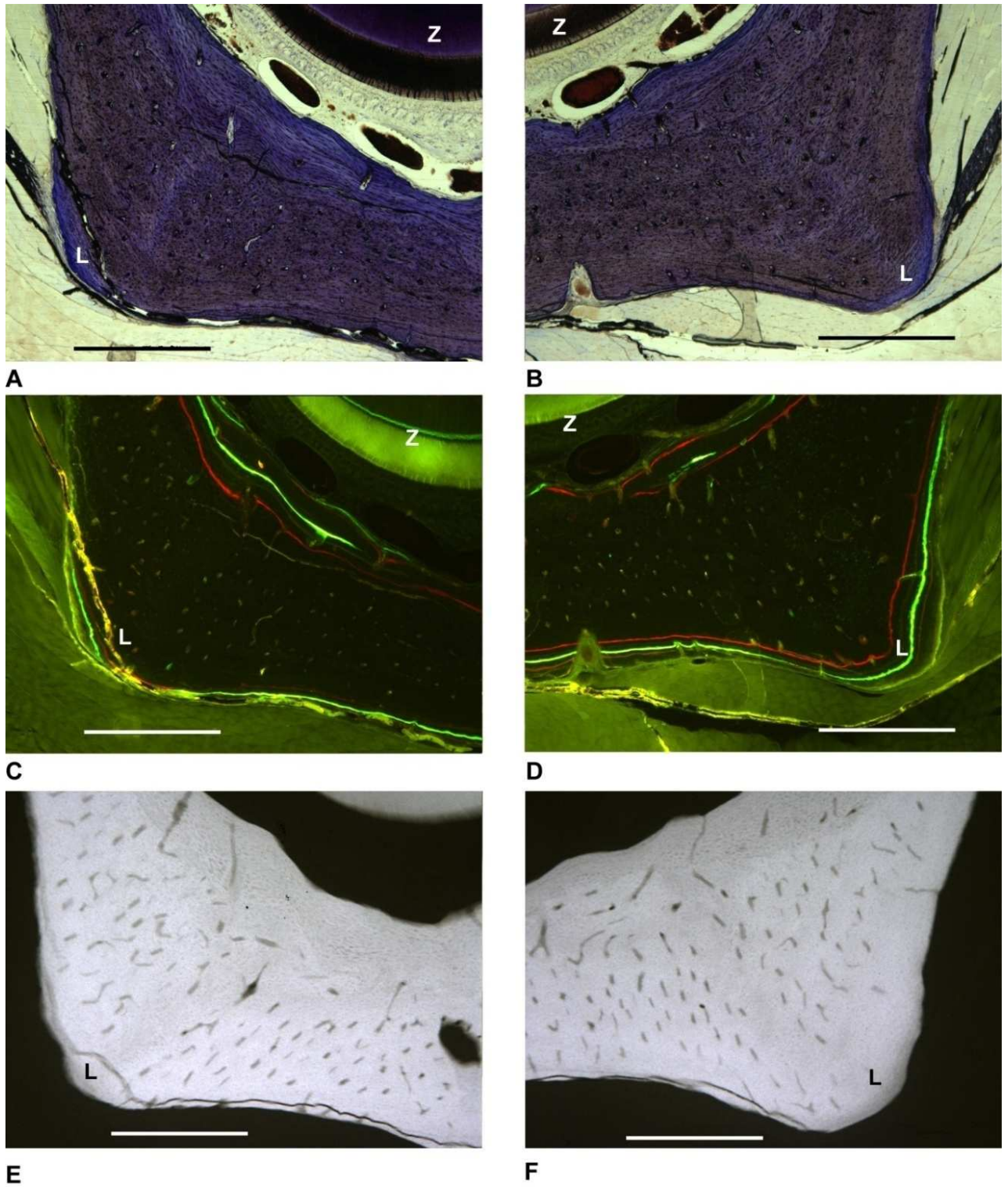


Abbildung 13: Collage Gruppe 1 (BMP-2- Gruppe)

Abbildung 13:

Toluidinblaufärbung (1. Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (2. Reihe) und Mikroradiographie (3. Reihe). Die Abbildungen zeigen repräsentative und vergleichbare transversale Anteile der Mandibula eines Tieres der Gruppe 1 (BMP-2- Gruppe). Die Knochenapposition im Bereich der Linea Buccalis (L) war auf der bestrahlten Seite (A, C, E) der Gruppe 1 trotz Transfektion mit dem BMP-2 Gen signifikant kleiner als auf der unbestrahlten, unbehandelten Seite (B, D, F) ($p=0,028$), wobei dieser Unterschied in etwa dem zwischen bestrahlter und unbestrahlter Seite der einseitig bestrahlten Gruppe 4 ohne Transfektion ($p<0,028$) entsprach. Die Mikroradiographie zeigt keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen den beiden Seiten.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

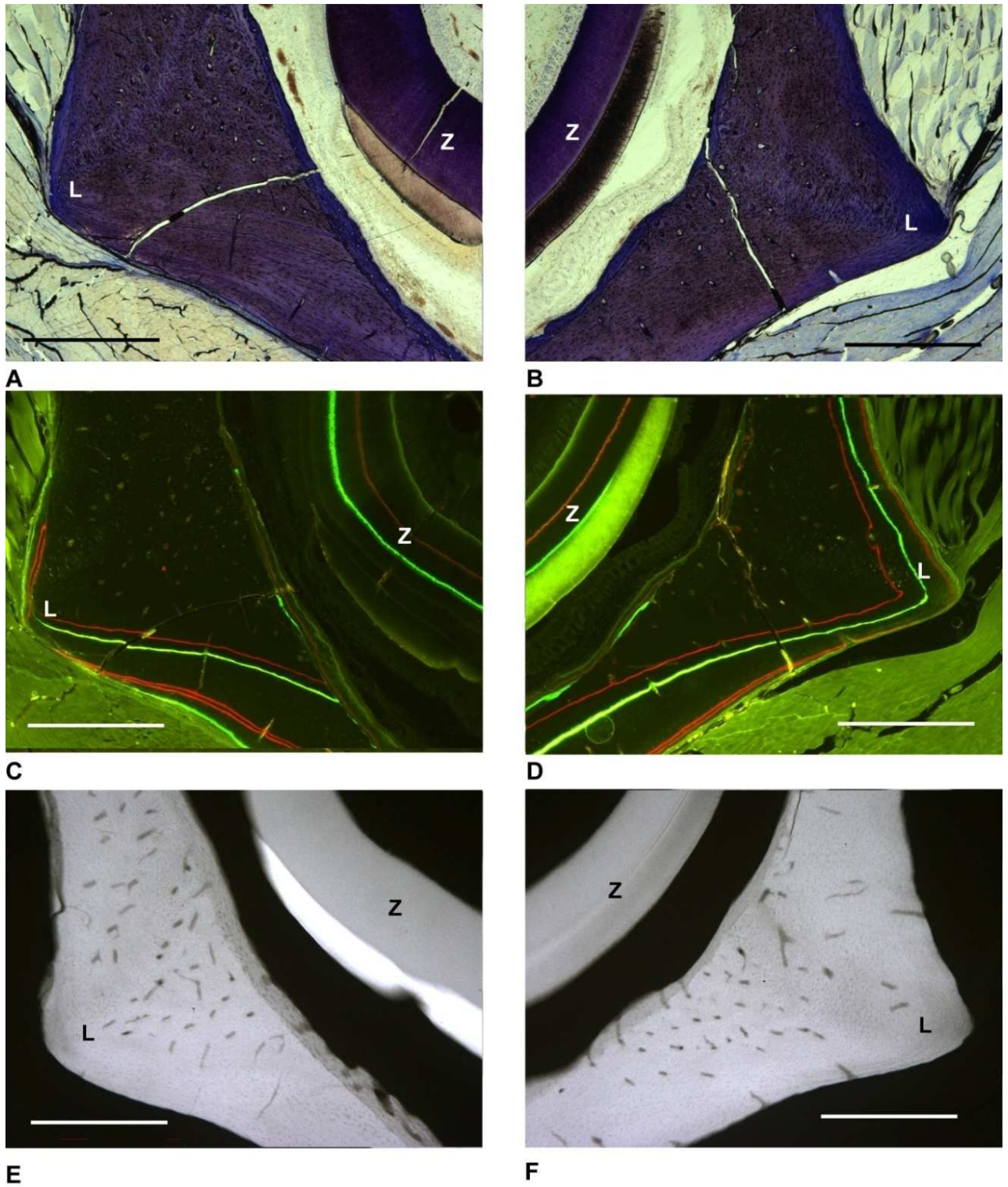


Abbildung 14: Collage Gruppe 2 (bFGF- Gruppe)

Abbildung 14:

Toluidinblaufärbung (1. Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (2. Reihe) und Mikroradiographie (3. Reihe). Die Abbildungen zeigen repräsentative und vergleichbare transversale Anteile der Mandibula eines Tieres der Gruppe 2 (bFGF- Gruppe). Die Knochenapposition im Bereich der Linea Buccalis (L) war auf der bestrahlten Seite (A, C, E) der Gruppe 2 trotz Transfektion mit dem bFGF Gen signifikant kleiner als auf der unbestrahlten, unbehandelten Seite (B, D, F) ($p=0,043$), wobei dieser Unterschied in etwa dem zwischen bestrahlter und unbestrahlter Seite der einseitig bestrahlten Gruppe 4 ohne Transfektion ($p<0,028$) entsprach. Die Mikroradiographie zeigt keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen den beiden Seiten.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

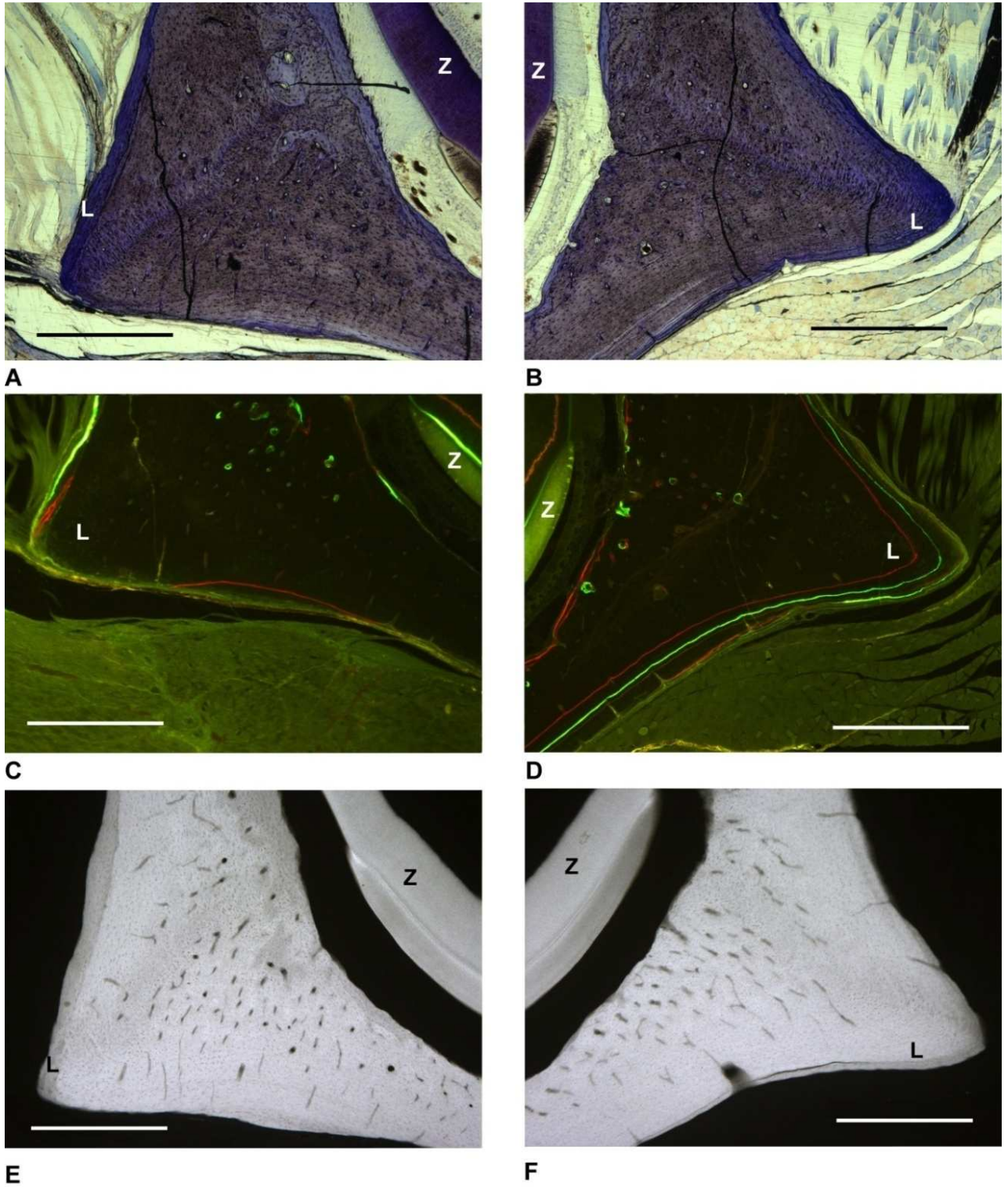


Abbildung 15: Collage Gruppe 3 (BMP-2 und bFGF- Gruppe)

Abbildung 15:

Toluidinblaufärbung (1. Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (2. Reihe) und Mikroradiographie (3. Reihe). Die Abbildungen zeigen repräsentative und vergleichbare transversale Anteile der Mandibula eines Tieres der Gruppe 3 (BMP-2 und bFGF-Gruppe). Die Knochenapposition im Bereich der Linea Buccalis (L) war auf der bestrahlten Seite (A, C, E) der Gruppe 3 trotz Transfektion mit dem BMP-2 und bFGF-Gen signifikant kleiner als auf der unbestrahlten, unbehandelten Seite (B, D, F) ($p=0,012$), wobei dieser Unterschied in etwa dem zwischen bestrahlter und unbestrahlter Seite der einseitig bestrahlten Gruppe 4 ohne Transfektion ($p<0,028$) entsprach. Die Mikroradiographie zeigt keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen den beiden Seiten.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

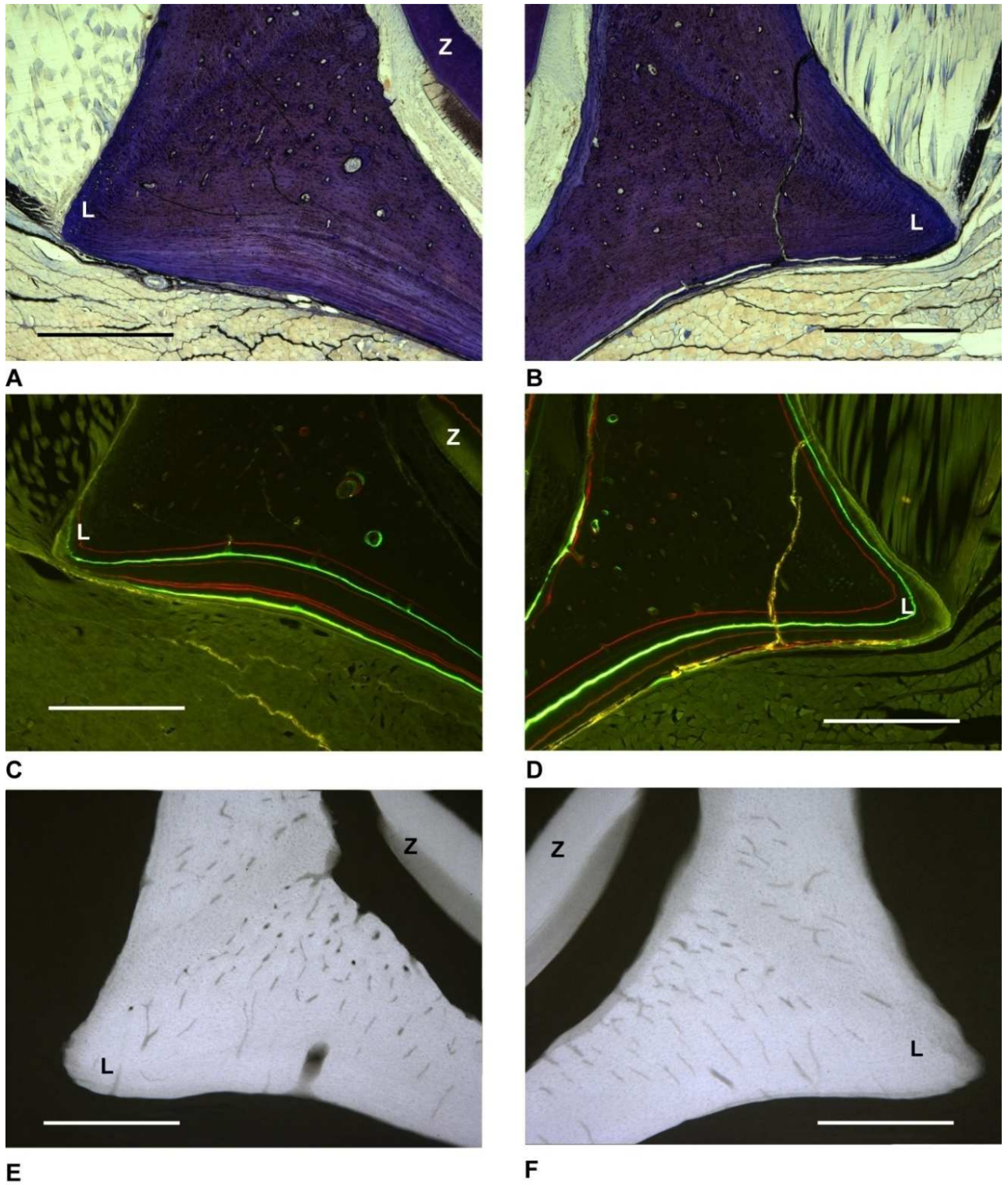


Abbildung 16: Collage Gruppe 4 (bestrahlte Gruppe ohne Wachstumsfaktoren)

Abbildung 16:

Toluidinblaufärbung (1. Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (2. Reihe) und Mikroradiographie (3. Reihe). Die Abbildungen zeigen repräsentative und vergleichbare transversale Anteile der Mandibula eines Tieres der Gruppe 4 (bestrahlte Gruppe ohne Wachstumsfaktoren). Die Knochenapposition im Bereich der Linea Buccalis (L) war auf der bestrahlten Seite (A, C, E) der Gruppe 4 signifikant kleiner als auf der unbestrahlten, unbehandelten Seite (B, D, F) ($p=0,028$). Die Mikroradiographie zeigt keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen den beiden Seiten.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

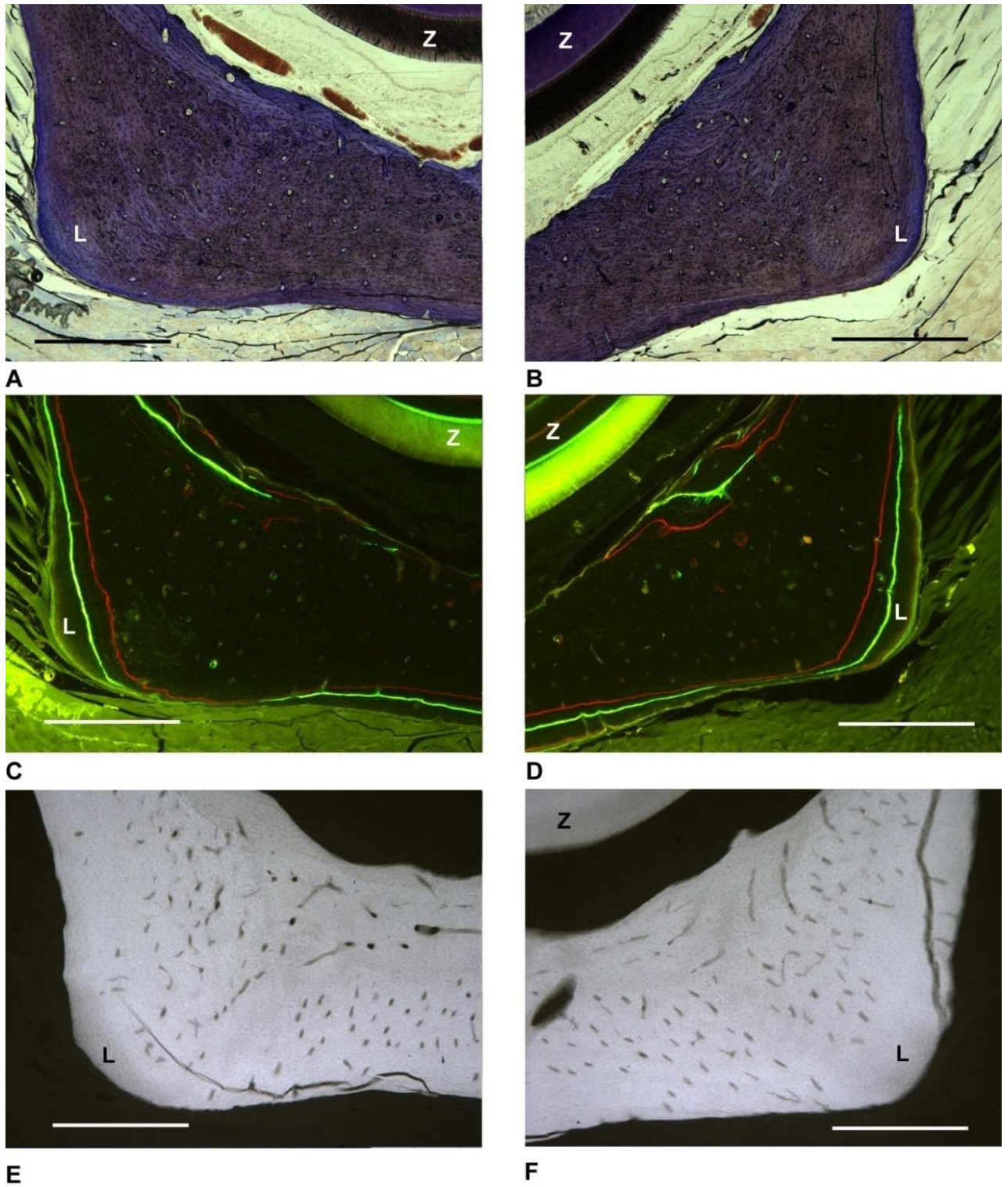


Abbildung 17: Collage Gruppe 5 (unbestrahlte Gruppe ohne Wachstumsfaktoren)

Abbildung 17:

Toluidinblaufärbung (1. Reihe), Fluoreszenzmikroskopie (2. Reihe) und Mikroradiographie (3. Reihe). Die Abbildungen zeigen repräsentative und vergleichbare transversale Anteile der Mandibula eines Tieres der Gruppe 5 (unbestrahlte Gruppe ohne Wachstumsfaktoren). Die Knochenanbaurate im Bereich der Linea Buccalis (L) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Seiten ($p=0,249$). Die Mikroradiographie zeigt keinen Unterschied in der Knochendichte zwischen den beiden Seiten.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

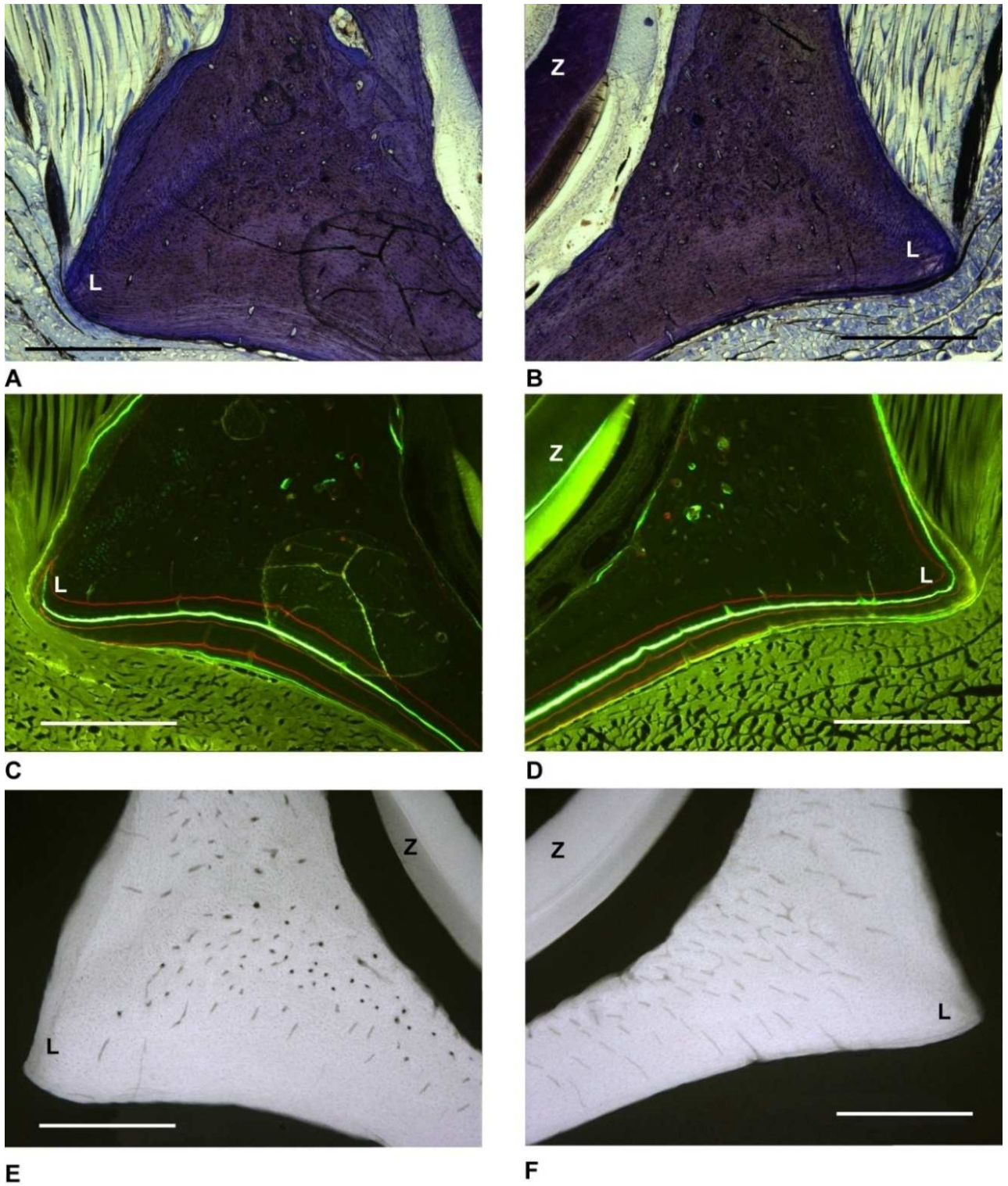


Abbildung 18: Collage Gruppe 6 (MOCK-Kontrolle)

Abbildung 18:

Entsprechend der Gruppe 4 (Bestrahlung einseitig entsprechend Gruppe 1-3 ohne Anwendung von Wachstumsfaktoren, $p=0,028$), zeigte die Gruppe 6 (MOCK-Kontrolle, Anwendung lediglich des Transfektionsverfahrens ohne Transfektion mit dem Gen eines Wachstumsfaktors) eine signifikant reduzierte Knochenapposition auf der bestrahlten Seite im Vergleich zur unbestrahlten Seite ($p=0,043$). Damit hatte das Transfektionsverfahren alleine wie unter Übertragung von Expressionsplasmiden keine messbare Wirkung auf die Knochenapposition.

Z: Zahn, Maßstabsbalken: 500 μm

3.4 Paraffinhistologie

Die paraffineingebetteten Präparate zeigen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowohl in der Übersichtsvergrößerung als auch in stärkerer Vergrößerung nur geringe histologische Anzeichen für eine Osteoradionekrose. Untersucht wurden die dorsalen Anteile des Kiefers (siehe Punkt 2.11) distal der Molaren im Bereich der Linea buccalis (L). Der Kiefer ist an dieser Stelle deutlich schmaler als die in der Hartschliffhistologie untersuchten Kieferanteile und beinhaltet keine Zähne. In den nachfolgenden repräsentativen Bildern sind keine pathohistologischen Merkmale zu erkennen, die auf eine „major form“ und somit auf eine ausgeprägte, irreversible Osteoradionekrose hinweisen. Auch bei stärkerer Vergrößerung der Präparate zeigte keines die von Grimm (GRIMM 1969; GRIMM 1970) als deutlich beschriebenen histologischen Zeichen einer Osteoradionekrose.



Abbildung 19: Repräsentatives Bild der bestrahlten Seite (HE- Färbung)
Dargestellt ist der kaudale Anteil der Mandibula im Bereich des Kieferwinkels.

Es zeigte sich lediglich bei einzelnen Präparaten eine auf der bestrahlten Seite erhöhte Anzahl von Osteozyten, sowie eine sporadische, beginnende Fibrosierung der Gefäße. Nekrosen des Knochens mit entsprechenden Resorptionslakunen waren an keinem Präparat zu beobachten, dies zeigen auch die repräsentativen Abbildungen 19 und 20.

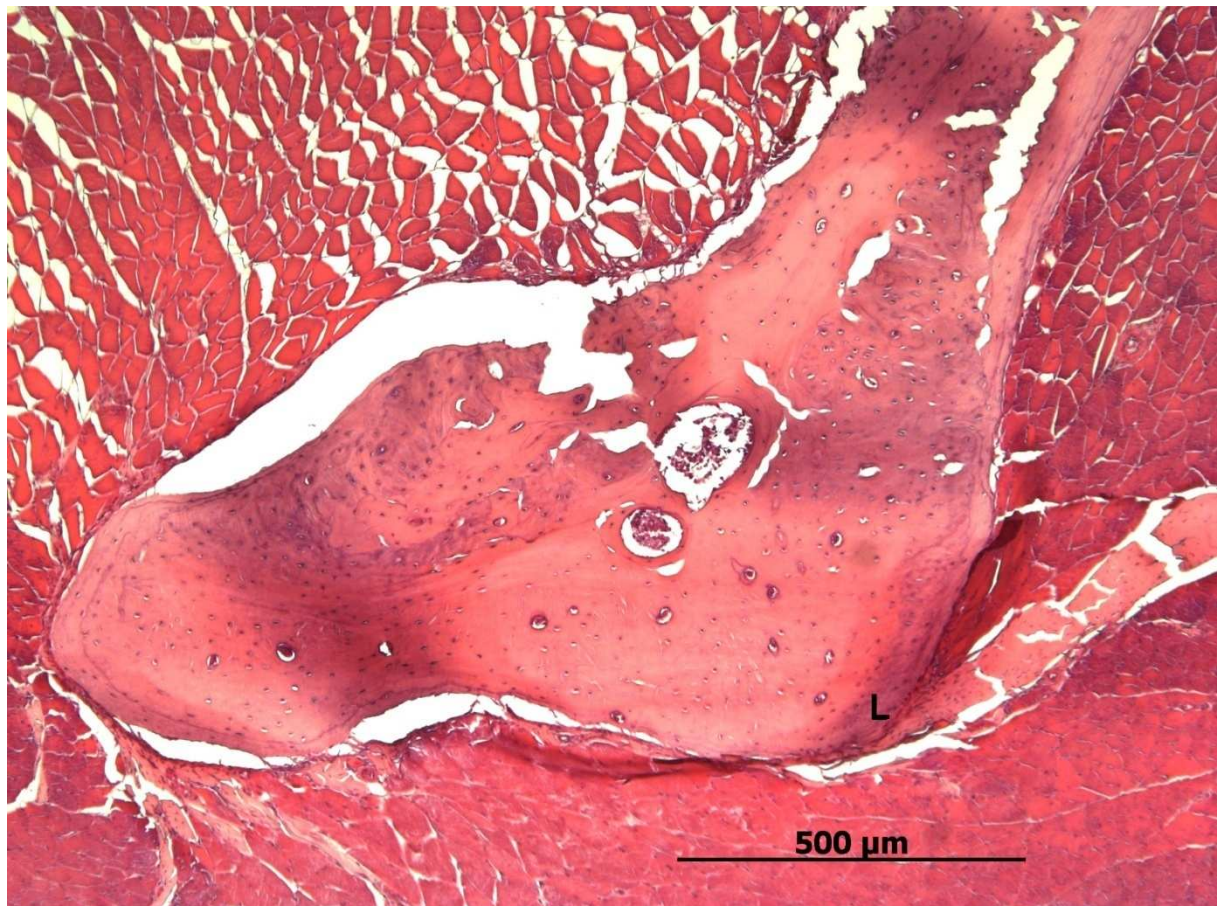


Abbildung 20: Repräsentatives Bild der unbestrahlten Seite (HE- Färbung)
Dargestellt ist der kaudale Anteil der Mandibula im Bereich des Kieferwinkels.

4 DISKUSSION

Die Osteoradionekrose ist eine der größten Herausforderungen für die Knochenregeneration. Nur wenige Arbeitsgruppen konnten bisher Ansätze zur Behandlung von regenerationsschwachen Geweben mit Hilfe von Wachstumsfaktoren aufzeigen (THALLER *et al.* 1998; WILTFANG und MERTEN 1996; WURZLER *et al.* 1998). In der Arbeitsgruppe um Würzler wurde das Neurokranium der Ratte mit einer Dosis von 1200 rad bestrahlt. Nach 2 bzw. 7 Tagen wurden im bestrahlten Bereich knöcherne Defekte gesetzt. In der Folge wurde versucht eine Regeneration der Defekte mittels BMPs und einem Kollagenträger zu erlangen.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Verbesserung der knöchernen Ausheilung unter Einsatz der Zytokine (WURZLER *et al.* 1998). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob in dieser Studie eine persistierende Osteoradionekrose herbeigeführt wurde, so dass lediglich von einer durch die Bestrahlung entstandenen Reduzierung der Regenerationsfähigkeit ausgegangen werden kann. In der Literatur fanden sich außer dem von Niehoff beschriebenen Verfahren (NIEHOFF *et al.* 2008) bislang keine Studien, die ein für unser Vorhaben geeignetes Modell an der Ratte beschreiben. Es wurden entweder andere Spezies wie z.B. Affen (ZACH *et al.* 1973) und Kaninchen (GRIMM 1969; GRIMM 1970; TAKAHASHI *et al.* 1992) verwendet oder es wurde ein für unsere Zwecke ungeeignetes Bestrahlungsmuster gewählt (siehe 4.2).

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob es durch die kontinuierliche Abgabe von BMP-2 und bFGF durch transfizierte Zellen zu einer Knochenregeneration im ersatzschwachen Lager kommt und den möglichen Knochenzuwachs zu quantifizieren. Die Verwendung von transfizierten Zellen zur kontinuierlichen Abgabe der Wachstumsfaktoren sollte eine im Vergleich zu lokal eingebrachten Wachstumsfaktoren verbesserte Knochenregeneration bewirken. Ein weiterer Doktorand der Arbeitsgruppe hatte zeigen können, dass durch die lokale Therapie mit entweder bFGF oder BMP-2 die Knochenapposition auf der bestrahlten Kieferseite verbessert werden konnte. Die gleichzeitige Verwendung von bFGF und BMP-2 zeigte keinen signifikanten Unterschied (SPRINGER *et al.* 2008). Die Autoren

verwendeten das gleiche Bestrahlungsmodell wie in dieser Arbeit (NIEHOFF *et al.* 2008).

4.1 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden Ratten verwendet. Für diese Spezies lag ein geeignetes Bestrahlungsmodell vor, welches in der Arbeitsgruppe bereits evaluiert wurde. Größere Tiere wie Affen, Hunde und Minischweine schieden aus ethischen Belangen, sowie aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit der Versuche aus. Die tägliche Knochenappositionsrate von adulten Ratten liegt bei 2 - 4 μm pro Tag und weicht damit nur mäßig von der des Menschen (0,5 – 3,8 μm Tag) ab. Die hohe Regenerationsrate des Knochens beim Kaninchen und seine insgesamt große Knochenneubildungstendenz (20-120 μm pro Tag) ist nicht auf den Menschen zu übertragen und lässt diese Spezies für den geplante Versuch als ungeeignet erscheinen (AITASALO 1986; EPPLEY *et al.* 1991). In neuerer Zeit haben weitere Studien zur Knochenregeneration nach Bestrahlung im Kieferbereich Ratten als geeignete Versuchstiere bestätigt (HOSOKAWA *et al.* 2007; LEROUXEL *et al.* 2009).

4.2 Bestrahlungsmodell

Das von Niehoff beschriebene Modell zur Irradiatio (NIEHOFF *et al.* 2008) wurde vor dem Hintergrund der vom Autor beschriebenen positiven Ergebnisse und der bereits erfolgreichen Verwendung des Bestrahlungsmodells durch einen weiteren Doktoranden unserer Arbeitsgruppe ausgewählt. Das Bestrahlungsmodell erwies sich in Hinsicht auf die praktische Durchführbarkeit als sehr geeignet. Das Implantieren der Katheter für die Brachytherapie in die Versuchstiere erfolgte problemlos. Der instrumentelle und personelle Aufwand war gering. Durch die einmalige Strahlenapposition sank das Narkoserisiko insgesamt deutlich ab, da wiederholte Eingriffe mit dem für das Tier verbundenem Stress vermieden werden konnten. Die klinisch zu beobachtenden Folgen der Bestrahlung wie Alopezie und verzögertes Wachstum des Nagezahnes im bestrahlten Areal waren eindeutig erkennbar und stimmen mit den von Grimm am Kaninchen gemachten Beobachtungen überein (GRIMM 1969). Die Tiere wurden mit einer nach Joiners „linear quadratic model“ (JOINER und VAN DER KOGEL 1997) berechneten Einzeldosis

von 20 Gy bestrahlt. Andere Autoren (ARNOLD *et al.* 1998) beschreiben eine reduzierte Knochenheilung bei Einzeldosen über 15 Gy. Würzler bestrahlte die Versuchstiere mit 12 Gy (WURZLER *et al.* 1998). Im Extraktionsmodell konnten Hosokawa *et al.* bereits mit einer Dosis von 8 Gy deutliche Veränderungen der Zahl und der Morphologie von Osteoklasten zeigen (HOSOKAWA *et al.* 2007). Der von Grimm gewählte Versuchsaufbau mit deutlicher Schädigung des Knochens und die starke Beeinträchtigung der Versuchstiere wäre heute aus ethischen Gründen nicht mehr durchführbar.

4.3 Wahl des Versuchszeitpunkts und der Versuchsdauer

Die Wahl des Versuchszeitpunktes, der Versuchsdauer und des Alters der Versuchstiere richtete sich im Wesentlichen nach den Ergebnissen und Vorgaben der vorausgegangenen Versuche der Arbeitsgruppe (NIEHOFF *et al.* 2008; SPRINGER *et al.* 2008). In Bezug auf das Alter der Versuchstiere war eine Abwägung zwischen ausreichender Knochenapposition für die Auswertbarkeit der intravitalem polychromen Sequenzmarkierung (wachsendes Modell) und die Vergleichbarkeit mit der Knochenappositionsrate des Menschen notwendig. Die Knochenappositionsrate der Ratte sinkt mit zunehmendem Alter ab. Eine vergleichbare Rate liegt ab der 10.-12. Lebenswoche vor (RAMAN 1969). Durch die Studien von Grimm (GRIMM 1970) ist bekannt, dass für die sichtbare Ausbildung von Gewebeschäden mindestens vier Wochen nach Bestrahlung vergehen müssen. Basierend auf Erfahrungen der Arbeitsgruppe wurde der Zeitpunkt für die Applikation der Wachstumsfaktoren auf 12 Wochen nach Irradiation festgelegt. Nach sechs weiteren Wochen wurden die Tiere geopfert.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Das von Niehoff *et al.* etablierte Tiermodell zur Erzeugung eines ersatzschwachen Lagers an der Ratte (NIEHOFF *et al.* 2008) konnte erfolgreich am Versuchstier umgesetzt werden. Die im Vergleich zu Grimm schwache Ausprägung der

histopathologischen Befunde wirft aber die Frage auf, ob die Voraussetzungen für ein ersatzschwaches Lager vollständig gegeben sind. Grimm hatte resorptive Erscheinungen, fibröse Markveränderungen und den Untergang der Osteozytenzellkerne beobachtet, die ein Stadium der Pyknose und Kariorexis durchliefen. Sucht man nach den klinisch relevanten Bestrahlungsmerkmalen, so treten diese wie weiter oben erwähnt in vollem Umfang auf. Die angefertigten Mikroradiographien zeigen zudem eine deutliche Schädigung der Wurzel des unteren Nagezahnes der longitudinal durch die Mandibula verläuft. Die durch die intravitale polychrome Sequenzmarkierung im Hartschliffpräparat sichtbar gemachte Knochenapposition ist bei der unbestrahlten Gruppe Nr.5 im Seitenvergleich ohne signifikante Unterschiede. Bei der bestrahlten Kontrollgruppe und den bestrahlten und therapierten Gruppen zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Kieferseiten in Form einer reduzierten Knochenapposition auf der bestrahlten Seite. Die klinischen Merkmale mit einbezogen, kann insgesamt von einem strahlengeschädigten, ersatzschwachen Lager gesprochen werden. Aus histologischer Sicht sollte daher eher von einem strahlengeschädigten Knochen anstelle von einer Osteoradionekrose gesprochen werden. Histologische Anzeichen für eine Osteoradionekrose lagen lediglich in Form einer erhöhten Anzahl von Osteoblasten bei einigen Präparaten vor. Dies entspricht den Befunden von Niehoff et al. 2008 (NIEHOFF *et al.* 2008).

Die geringe Schädigung des Knochens und die daraus resultierende geringe Beeinträchtigung der Versuchstiere in diesem Tierversuchsmodell ist aus ethischer Sichtweise positiv zu bewerten, da die Belastung für die Tiere und die Wahrscheinlichkeit möglicher Ausfälle durch Komplikationen der Bestrahlung als gering anzusehen sind. Die deutliche Reduktion des Wachstums des Kieferknochens ist ausreichend, um einen möglichen positiven Effekt auf die Knochenapposition zu beurteilen. Dies konnte nicht nur in dieser Arbeit gezeigt werden, sondern auch durch die Arbeit eines anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe (SPRINGER *et al.* 2008). Hätte die reduzierte Knochenapposition der bestrahlten Kieferseite durch die Applikation von Plasmiden oder transfizierten Zellen stärker kompensiert werden können, wären weitere Versuche mit höherer Strahlendosis oder auch mit iatrogen erzeugter infizierter Osteoradionekrose geeignet gewesen, das Potential der Heilung

zu verifizieren. Die Erklärung der gering ausgeprägten Strahlenschäden auf histologischer Ebene könnte einerseits an der gewählten Zeitdauer von 18 Wochen liegen, die eine ausreichende Regeneration der Gewebe auf Zellebene ermöglicht hat, andererseits aber für eine quantitative Regeneration im Sinne eines kompensierenden Knochenzuwachses nicht als ausreichend anzusehen ist. Wahrscheinlich ist allerdings, dass durch die Irradiation zwar topisch die ausdifferenzierten Zellen geschädigt wurden, es aber zu Reparaturvorgängen durch eingewanderte Osteoprogenitorzellen kommt. Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von Hosokawa (HOSOKAWA *et al.* 2007; HOSOKAWA *et al.* 2010) unterstützt. Auch frühere Versuche an ganzkörperbestrahlten Mäusen denen Knochenmark transplantiert wurde, führten nicht nur zur Bestätigung der Hypothese, dass Stammzellen zur Selbsterneuerung fähig sind, sondern zeigten eindrucksvoll das regenerative Potential dieses Zelltyps (BECKER *et al.* 1963; McCULLOCH und TILL 1960).

Die in dieser Arbeit untersuchten plasmidtransfizierten Zellen zeigten keine signifikante Verbesserung der Regeneration des ersatzschwachen Lagers. Da in der Arbeitsgruppe (SPRINGER *et al.* 2008) im Vorfeld aber bereits die positive Wirkung von BMP-2 und bFGF auf die Knochenregeneration *in vivo* gezeigt werden konnte, ist zu überlegen, durch welche Faktoren die Regeneration der Gewebe in diesem Versuchsmodell ausblieb. Da beide Versuche, bis auf die Art der Wachstumsfaktorenapplikation, in der Vorbehandlung der Versuchstiere identisch waren, ist eine unzureichende Plasmidexpression der transfizierten Zellen naheliegend. Zwar wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Vitalität der Zellen sowie deren Plasmidexpression *in vitro* bestätigt, die uneingeschränkte Funktion sowie das Überleben der Zellen *in vivo* konnte allerdings mangels diagnostischer Möglichkeiten nicht beurteilt werden. Für weitere Versuche wäre ein Monitoring der Vitalität der Zellen *in vivo* anzustreben. Mesenchymale Stammzellen, wie in anderen Studien verwendet, könnten zudem alternativ als potentiell Transfektionsziel eine vielversprechende Ergänzung bieten (DRAGOO *et al.* 2005). Als nachteilig für dieses Modell ist die aufwendige Gewinnung und die geringe Anzahl von mesenchymalen Zellen im Spendergewebe anzusehen (PANSKY *et al.* 2007). Der bisher meist beschrittene Weg, eine effektive Expression mittels retroviraler Transfektion zu

erreichen, wurde in dieser Arbeit aus Gründen der späteren Übertragbarkeit für eine Therapie am Menschen bewusst nicht unternommen. Die kontinuierliche Abgabe von Wachstumsfaktoren scheint für die erfolgreiche Geweberegeneration äußerst wichtig zu sein (SPRINGER *et al.* 2008; WEBER *et al.* 2002). Neben der in dieser Arbeit eingesetzten Methode wäre auch die Abgabe dieser Faktoren mit Hilfe von kleinsten Pumpen, die durch die fortschreitende Entwicklung in der Nanotechnologie möglicherweise in naher Zukunft erzeugt werden könnten, möglich (PUGNO 2008).

Eine weitere Erklärung für das Ausbleiben eines signifikanten regenerativen Effektes ist die Möglichkeit, dass die Zellen den Applikationsbereich verlassen haben. In weiteren Versuchen könnte dies durch Markierung der Zellen z.B. mittels des enhanced green fluorescent protein (eGFP) überprüft werden. Die zwischenzeitlich im tissue engineering gemachten Fortschritte bieten zudem neue Möglichkeiten mit dem Einsatz von geeigneten Matrices, sogenannte Scaffolds, die Zellen im Defektbereich zu verankern. Die Verwendung von Scaffolds kann weiterhin ein formgebendes Gerüst für die heranwachsenden Zellen bieten (WARNKE *et al.* 2008), sowie die Stimulation von Zellen durch entsprechend behandelte Oberflächen erreichen. Scaffolds werden zurzeit aus diversen resorbierbaren Materialien angefertigt, wie z.B. auf Kollagen-, Polylactid-, Tricalciumphosphat- und Hydroxylapatitbasis. Es werden aber auch nichtresorbierbare Scaffolds unter anderem aus Titan-Mesh hergestellt (WARNKE *et al.* 2008).

Die in dieser Studie verwendeten transfizierten Zellen sollten per Plasmidexpression die Ausdifferenzierung von im Gewebe vorhandenen Osteoprogenitorzellen bewirken (LONG *et al.* 1995; ZUR NIEDEN *et al.* 2005). Im bestrahlten Gewebe ist die Anzahl von Stammzellen deutlich reduziert. Ein weiterer Ansatz wäre daher die Regeneration durch die kombinierte Applikation von Wachstumsfaktoren und Stammzellen zu unterstützen. Die Hypothese von Hosokawa (HOSOKAWA *et al.* 2007; HOSOKAWA *et al.* 2010), wonach es im bestrahlten Areal zu Reparationsvorgängen durch eingewanderte Osteoprogenitorzellen kommt, wäre die Basis für weitere Studien.

Stammzellen aus Knochenmark stellen zurzeit die etablierteste Ziellinie für die Therapie mit Stammzellen dar. Das erforderliche Substrat wird entweder operativ aus

der Beckenregion entnommen oder in neueren Verfahren minimalinvasiv als Aspirat gewonnen. Die defektauffüllende Therapie erfolgt häufig in Kombination und Vermischung mit entsprechenden Knochenersatzmaterialien wie z.B. dem xenogenen BioOss®. Durch die Entdeckung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) durch Takahashi et al. (TAKAHASHI und YAMANAKA 2006) und der damit verbundenen Möglichkeit cell lineages zu überwinden, könnten neue vielversprechende Spenderregionen in den Fokus rücken. Pluripotente Zellen monozytären Ursprungs (PCMOs) stellen eine neue hoffnungsvolle Quelle zur Produktion unterschiedlicher Zielzellen dar (RUHNKE *et al.* 2005a; RUHNKE *et al.* 2005b). An einer anderen CD 14 positiven Zelllinie konnte bereits eine osteogene Differenzierung nachgewiesen werden (KUWANA *et al.* 2003). Mitglieder unserer Arbeitsgruppe konnten in bis dato unveröffentlichten Studien ähnliche Beobachtungen machen. Die Redifferenzierung der PCMOs erfolgte mittels geeigneter Wachstumsfaktoren.

Wenn man neuere Therapiemethoden in Betracht zieht, stellt der Bereich der Stammzelltherapie den vielversprechendsten Therapiezweig dar. Der Weg in die klinische Anwendung kann allerdings noch viele Jahre dauern und zunächst die klassischen Therapieoption unterstützen, bis es möglich sein wird lokale Defekte mit Hilfe von Stammzellen zu heilen. Für diesen Zeitraum bleibt die chirurgische Therapie der Goldstandard.

Die Anwendung von Wachstumsfaktoren in der Defektheilung und der Differenzierung von Zellen wird an Bedeutung gewinnen. Die Verwendung von BMP-2 (Infuse® Bone Graft, Medtronic, Minneapolis, USA) und BMP-7 (OP-1, Stryker Biotech, Hopkinton, Massachusetts, USA) besitzt für bestimmte Anwendungsbereiche die Zulassung der U.S. Food and Drug Administration. Allerdings wird darauf hingewiesen, dass BMP-7 in einer Tierstudie an Ratten vermutlich für die Ausbildung der in einigen Tieren aufgetretenen pleomorphen Sarkome ist. Gordon et al. konnten zeigen, dass BMPs über Smad1-Induktion und Hochregulation von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2), ein wichtiger Mediator und somit mögliches Therapieziel gegen die Invasivität von Bauchspeicheldrüsenkrebs ist (GORDON *et al.* 2008; GORDON *et al.* 2009). Weitere Autoren sahen BMPs an der Bildung von Knochenmetastasen beteiligt (DAI *et al.* 2008) und als wichtiges

Signalprotein für Prostatakrebs (BRUBAKER *et al.* 2004). Aktuelle Arbeiten konnten zeigen, dass BMPs an der Entstehung und Ausprägung der Nebennierenkarzinome einen wichtigen Anteil haben. In einer in Cancer Research publizierten Arbeit konnte an operiertem Tumormaterial beobachtet werden, dass in der Mehrzahl der Nebennierenkarzinome die Produktion von BMP-2 und BMP-5 verloren geht. Wurden diese Faktoren den Tumorzellen jedoch wieder zugeführt, konnte damit das Tumorwachstum und auch die überschießende Hormonproduktion unterdrückt werden. Interessanterweise konnten die Tumorzellen auch durch die Behandlung mit pharmakologischen Substanzen dazu gebracht werden, erneut BMP-2 und BMP-5 zu bilden (JOHNSEN *et al.* 2009).

Diese Ergebnisse zeigen mögliche Risiken aber auch weitere Anwendungsgebiete, wie eine mögliche Tumoringhibition, für die Verwendung von BMPs auf. In wie weit die therapeutische Anwendung im Bereich der ossären Rehabilitation Risiken für die maligne Entartung bildet, muss in Zukunft aufmerksam beobachtet werden. Ein aktuelles Review von Thawani *et al.* kam zu der Feststellung, dass keine eindeutige Assoziation zwischen BMPs und der definitiven Förderung von Metastasierung und Tumorentstehung vorliegt. Angesichts der relativ großen Zahl von Studien die berichten, dass BMPs die Entstehung von Tumoren und deren Metastasierung begünstigen, sollte die Anwendung von BMPs am Patienten sorgfältig geprüft werden (THAWANI *et al.* 2010).

Abschließend ist festzustellen, dass aufgrund der immer noch sehr eingeschränkten Möglichkeiten zur Behandlung der Osteoradionekrose nicht nur die Nebenwirkungen der Bestrahlung möglichst gering zu halten sind, sondern auf eine Irradiatio im Sinne einer Früherkennung von malignen Entartungen in optimaler Weise verzichtet werden könnte. Es stellt sich als Problem dar, dass viele Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung einen Arzt oder Zahnarzt aufsuchen. Eine aktuelle Studie in Norddeutschland zeigte zudem, dass unter anderem das Wissen der Zahnärzte über Präkanzerosen und maligne Entartungen im Mundbereich in ihrem Frühstadium verbesserungswürdig ist (HERTRAMPF *et al.* 2010).

4.5 Schlussfolgerung

In keiner der bestrahlten Versuchsgruppen konnte eine signifikante Knochenregeneration beobachtet werden. Wie in der Poweranalyse (siehe 3.3) gezeigt, ist die Anzahl der Versuchstiere für eine solche Aussage ausreichend. Die in der Studienhypothese formulierte Annahme, dass die kontinuierlichere Abgabe von Wachstumsfaktoren durch transfizierte Zellen die Geweberegeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager verbessert, konnte somit nicht betätigt werden. Als Ursache ist das Versagen der transfizierten Zellen *in vivo* wahrscheinlich. In weiteren Studien sollte die hierfür verantwortliche Ursache genauer untersucht und mögliche Störfaktoren ausgeräumt werden. Weiterhin ist nach alternativen Möglichkeiten für die kontinuierliche Abgabe der Wachstumsfaktoren zu suchen.

Basierend auf den Arbeiten von Hosokawa (HOSOKAWA *et al.* 2007; HOSOKAWA *et al.* 2010) ist die Untersuchung des regenerativen Effektes von zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren applizierten Stammzellen ein weiterer Anhaltspunkt für die Optimierung der untersuchten Methode.

Ein minimalinvasives Vorgehen bei der Strahlentherapie zur größtmöglichen Schonung des umliegenden Gewebes mit den darin enthaltenen Quellen zur autologen Regeneration ist nicht nur der Schlüssel zur Minderung des Osteoradionekroserisikos selbst, sondern auch Voraussetzung für einen größtmöglichen Heilungserfolg durch sowohl konventionelle als auch innovative Therapien. Die in dieser Studie verwendete Brachytherapie kann als geeignete Applikationsform für eine Bestrahlung mit streng begrenztem Wirkungsbereich angesehen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich mittels chirurgischer Eingriffe wird häufig durch eine Bestrahlungstherapie begleitet. Die Nebenwirkungen einer Bestrahlung führen oft zu einem langsamen, stark gestörtem Heilverlauf insbesondere des Knochens, da das regenerative Potential des Gewebes deutlich vermindert ist. Sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Studien konnten zeigen, dass die Anwendung von Wachstumsfaktoren, wie sie bei der Gewebeheilung und auch in der Embryonalzeit exprimiert werden, ein großes regeneratives Potential bietet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher im Tiermodell das Potential von transfizierten Zellen auf die Knochenregeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager zu untersuchen.

Die Studienhypothese war, dass insbesondere die kontinuierlichere Abgabe von Wachstumsfaktoren durch transfizierte Zellen die Geweberegeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager verbessert. Bei insgesamt 34 von 40 Ratten der Stämme WKY, F344 und Lewis wurde mittels Brachytherapieapplikatoren lokal und einseitig („split mouth model“) eine Strahlendosis von 20 Gy (ungefähr 45 x 2 Gy beim Menschen) appliziert. Gruppe 5 blieb als Kontrolle unbestrahlt. Nach 12 Wochen wurden zuvor *ex vivo* mit Expressionsplasmiden transfizierte autologe Zellen in das Gewebe der bestrahlten Kieferhälfte injiziert, die entweder mit dem BMP-2- Gen (Gruppe 1), dem bFGF- Gen (Gruppe 2) oder beiden Genen (Gruppe 3) behandelt wurden. Gruppe 4 blieb unbehandelt und Gruppe 6 diente als Mock-Kontrolle (Transfektion ohne Gen eines Wachstumsfaktors). Nach weiteren sechs Wochen wurden die Tiere geopfert und Präparate für Mikroradiografie, Fluoreszenzmikroskopie und Paraffinhistologie erstellt.

Die Auswertung ergab auf der bestrahlten Seite der Gruppe 1 (n=6 Ratten) trotz Transfektion mit dem BMP-2 Gen eine signifikant geringere Knochenanbaurrate im Vergleich zur unbestrahlten und unbehandelten Seite (p=0,028). Gruppe 2 (n=5 Ratten; p=0,043) und Gruppe 3 (n=9 Ratten; p=0,012) zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Unterschiede entsprachen in etwa denen der bestrahlten aber unbehandelten

Gruppe 4 (n=9; p=0,028) und Gruppe 6 (n=5 Ratten; p=0,043). Gruppe 5 (n=6 Ratten; p=0,249) zeigte keinen signifikanten Unterschied der Knochenapposition zwischen den beiden Seiten (keine Behandlung und keine Bestrahlung auf beiden Seiten).

Damit hatte das Transfektionsverfahren alleine sowie unter Übertragung von Expressionsplasmiden keine signifikant messbare Wirkung auf die Knochenapposition. Die Hypothese, dass die kontinuierlichere Abgabe von Wachstumsfaktoren durch transfizierte Zellen die Geweberegeneration im bestrahlten ersatzschwachen Lager verbessert wird, konnte somit nicht bestätigt werden. Es wurde aber gezeigt, dass durch das gewählte Bestrahlungsmodell ein geeignetes ersatzschwaches Lager erzeugt wird, welches als Basis für zukünftige Untersuchungen dienen kann. Diese sollten die Schwächen des Transfektionsverfahrens ermitteln und ausräumen sowie Alternativen für die kontinuierliche Wachstumsfaktorenapplikation entwickeln.

6 LITERATUR

1. **AITASALO K** (1986). Bone tissue response to irradiation and treatment model of mandibular irradiation injury. An experimental and clinical study. *Acta Otolaryngol Suppl* 428:1-54.
2. **AKITA S, FUKUI M, NAKAGAWA H, FUJII T, AKINO K** (2004). Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen* 12:252-9.
3. **ARNOLD M, STAS P, KUMMERMEHR J, SCHULTZ-HECTOR S, TROTT KR** (1998). Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiother Oncol* 48:259-65.
4. **BECKER AJ, MC CE, TILL JE** (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-4.
5. **BOZEC A, POISSONNET G, CONVERSE S, LATTES L, CHAMOREY E, VALLICIONI J, DEMARD F, DASSONVILLE O** (2007). [Mandibular reconstruction with osseous free flaps: functional results]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 124:16-24.
6. **BRANSKI LK, PEREIRA CT, HERNDON DN, JESCHKE MG** (2007). Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther* 14:1-10.
7. **BREITBART AS, GRANDE DA, KESSLER R, RYABY JT, FITZSIMMONS RJ, GRANT RT** (1998). Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 101:567-74; discussion 75-6.
8. **BRUBAKER KD, COREY E, BROWN LG, VESSELLA RL** (2004). Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem* 91:151-60.
9. **CHANG SC, CHUANG H, CHEN YR, YANG LC, CHEN JK, MARDINI S, CHUNG HY, LU YL, MA WC, LOU J** (2004). Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells. *J Surg Res* 119:85-91.
10. **CHEN D, ZHAO M, MUNDY GR** (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22:233-41.
11. **CHEN TL, SHEN WJ, KRAEMER FB** (2001). Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* 82:187-99.
12. **COFFIN F** (1983). The incidence and management of osteoradionecrosis of the jaws following head and neck radiotherapy. *Br J Radiol* 56:851-7.
13. **CURI MM, DIB LL** (1997). Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 55:540-4; discussion 5-6.
14. **DAI J, HALL CL, ESCARA-WILKE J, MIZOKAMI A, KELLER JM, KELLER ET** (2008). Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res* 68:5785-94.
15. **DRAENERT GF, DRAENERT K, TISCHER T** (2009). Dose-dependent osteoinductive effects of bFGF in rabbits. *Growth Factors* 27:419-24.
16. **DRAGOO JL, LIEBERMAN JR, LEE RS, DEUGARTE DA, LEE Y, ZUK PA, HEDRICK MH, BENHAIM P** (2005). Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* 115:1665-73.

17. **EPPLEY BL, CONNOLLY DT, WINKELMANN T, SADOVE AM, HEUVELMAN D, FEDER J** (1991). Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. *Plast Reconstr Surg* 88:1-11.
18. **FREIBERGER JJ** (2009). Utility of hyperbaric oxygen in treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67:96-106.
19. **FREIBERGER JJ, YOO DS, DE LISLE DEAR G, MCGRAW TA, BLAKEY GH, PADILLA BURGOS R, KRAFT K, NELSON JW, MOON RE, PIANTADOSI CA** (2009). MultiModality Surgical and Hyperbaric Management of Mandibular Osteoradionecrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
20. **FUJITA M, HIROKAWA Y, KASHIWADO K, AKAGI Y, KASHIMOTO K, KIRIU H, OHTANI K, WADA T** (1996). An analysis of mandibular bone complications in radiotherapy for T1 and T2 carcinoma of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34:333-9.
21. **GARDLIK R, PALFFY R, HODOSY J, LUKACS J, TURNA J, CELEC P** (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 11:RA110-21.
22. **GORDON KJ, DONG M, CHISLOCK EM, FIELDS TA, BLOBE GC** (2008). Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis* 29:252-62.
23. **GORDON KJ, KIRKBRIDE KC, HOW T, BLOBE GC** (2009). Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* 30:238-48.
24. **GRIMM G** (1969). [Animal experimental studies on the radiation injuries in the mandibles of full grown rabbits. I. Morphological and histochemical findings]. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl Gesamte* 53:307-35.
25. **GRIMM G** (1970). [Animal experimental studies on the pathogenesis of radiogenic bone injuries in the mandibles of adult rabbits. II. Histometric data]. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl Gesamte* 54:352-62.
26. **HERTRAMPF K, WILTFANG J, KOLLER M, KLOSA K, WENZ HJ** (2010). Dentists' perspectives on oral cancer: a survey in Northern Germany and a comparison with international data. *Eur J Cancer Prev* 19:144-52.
27. **HILDEBRANDT C, BUTH H, THIELECKE H** (2009). Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 191:23-32.
28. **HOSOKAWA Y, SAKAKURA Y, TANAKA L, OKUMURA K, YAJIMA T, KANEKO M** (2007). Effects of local and whole body irradiation on appearance of osteoclasts during wound healing of tooth extraction sockets in rats. *J Radiat Res (Tokyo)* 48:273-80.
29. **HOSOKAWA Y, SAKAKURA Y, IRIE K, KUDO K, KASHIWAKURA I** (2010). Effects of Local and Whole Body Irradiation on the Appearance of Osteoblasts During Wound Healing in Tooth Extraction Sockets in Rats. *J Radiat Res (Tokyo)*.
30. **HUANG YH, POLIMENI G, QAHASH M, WIKESJO UM** (2008). Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge - future possibilities. *Periodontol* 2000 47:206-23.
31. **JEPSEN S, ALBERS HK, FLEINER B, TUCKER M, RUEGER D** (1997). Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod* 23:378-82.

32. **JOHNSEN IK, KAPPLER R, AUERNHAMMER CJ, BEUSCHLEIN F** (2009). Bone morphogenetic proteins 2 and 5 are down-regulated in adrenocortical carcinoma and modulate adrenal cell proliferation and steroidogenesis. *Cancer Res* 69:5784-92.
33. **JOINER M, VAN DER KOGEL A** (1997). linear quadratic model. In: G S, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology*; 106- 21.
34. **KESSLER E, TAKAHARA K, BINIAMINOV L, BRUSEL M, GREENSPAN DS** (1996). Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271:360-2.
35. **KUWANA M, OKAZAKI Y, KODAMA H, IZUMI K, YASUOKA H, OGAWA Y, KAWAKAMI Y, IKEDA Y** (2003). Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol* 74:833-45.
36. **LEROUXEL E, MOREAU A, BOULER JM, GIUMELLI B, DACULSI G, WEISS P, MALARD O** (2009). Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: A new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg*.
37. **LONG MW, ROBINSON JA, ASHCRAFT EA, MANN KG** (1995). Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 95:881-7.
38. **LOTTSPREICH FUE, J.W** (2006). Bioanalytik: Spektrum Akademischer Verlag.
39. **MARCIANI RD, OWNBY HE** (1986). Osteoradionecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 44:218-23.
40. **MCCULLOCH EA, TILL JE** (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13:115-25.
41. **MOHR C, BOHNDORF W, CARSTENS J, HARLE F, HAUSAMEN JE, HIRCHE H, KIMMIG H, KUTZNER J, MUHLING J, REUTHER J, ET AL.** (1994). Preoperative radiochemotherapy and radical surgery in comparison with radical surgery alone. A prospective, multicentric, randomized DOSAK study of advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx (a 3-year follow-up). *Int J Oral Maxillofac Surg* 23:140-8.
42. **NEUKAM FW, HAUSAMEN, J. E., SCHMELZEISEN, R., AND SCHELLER, H.** (1992). Plastisch rekonstruktive Maßnahmen mit freien mikrovaskulären Knochentransplantaten in Kombination mit Implantaten nach Tumorresektion im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich. *Anonymous Hefte zur Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie Stuttgart: Thieme*:66-73.
43. **NIEHOFF P, SPRINGER IN, ACIL Y, LANGE A, MARGET M, ROLDAN JC, KOPPE K, WARNEKE PH, KIMMIG B, WILTFANG J** (2008). HDR brachytherapy irradiation of the jaw - as a new experimental model of radiogenic bone damage. *J Craniomaxillofac Surg* 36:203-9.
44. **PANSKY A, ROITZHEIM B, TOBIASCH E** (2007). Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab* 53:81-4.
45. **PUGNO NM** (2008). A new concept for smart drug delivery: adhesion induced nanovector implosion. *Open Med Chem J* 2:62-5.
46. **RAHN BA, PERREN SM** (1971). Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol* 46:125-9.
47. **RAHN BA, PERREN SM** (1972). [Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling]. *Experientia* 28:180.
48. **RAMAN A** (1969). Appositional growth rate in rat bones using the tetracycline labelling method. *Acta Orthop Scand* 40:193-7.

49. **RIPAMONTI U, REDDI AH** (1994). Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res* 29:225-35.
50. **RIPAMONTI U, DUNEAS N** (1998). Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg* 101:227-39.
51. **RUHNKE M, NUSSLER AK, UNGEFROREN H, HENGSTLER JG, KREMER B, HOECKH W, GOTTWALD T, HEECKT P, FANDRICH F** (2005a). Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* 79:1097-103.
52. **RUHNKE M, UNGEFROREN H, NUSSLER A, MARTIN F, BRULPORT M, SCHORMANN W, HENGSTLER JG, KLAPPER W, ULRICHS K, HUTCHINSON JA, SORIA B, PARWARESCH RM, HEECKT P, KREMER B, FANDRICH F** (2005b). Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128:1774-86.
53. **SCHLIEPHAKE H, NEUKAM FW, LOHR A, HUTMACHER D** (1995). The use of basic fibroblast growth factor (bFGF) for enhancement of bone ingrowth into pyrolyzed bovine bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 24:181-6.
54. **SCHWENZER N, EHRENFELD M** (2000). Zahn- Mund- und Kieferheilkunde, Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung, Thieme Verlag, Stuttgart 2000
55. **SILVERMAN S, JR.** (1999). Oral cancer: complications of therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88:122-6.
56. **SPRINGER IN, SUHR M, FLEINER B** (2002). Adaptive adjustment of the adolescent porcine mandibular condyle. *Bone* 31:230-5.
57. **SPRINGER IN, NIEHOFF P, ACIL Y, MARGET M, LANGE A, WARNKE PH, PIELENZ H, ROLDAN JC, WILTFANG J** (2008). BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg* 36:210-7.
58. **TAKAHASHI K, YAMANAKA S** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.
59. **TAKAHASHI S, SUGIMOTO M, KOTOURA Y, OKA M, SASAI K, ABE M, YAMAMURO T** (1992). Long-lasting tolerance of articular cartilage after experimental intraoperative radiation in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*:300-5.
60. **TERHEYDEN H, JEPSEN S, VOGELER S, TUCKER M, RUEGER DC** (1997). Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1:272-5.
61. **TERHEYDEN H, WANG H, WARNKE PH, SPRINGER I, ERXLEBEN A, LUDWIG K, RUEGER DC** (2003). Acceleration of callus maturation using rhOP-1 in mandibular distraction osteogenesis in a rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32:528-33.
62. **THALLER SR, SALZHAUER MA, RUBINSTEIN AJ, THION A, TESLUK H** (1998). Effect of insulin-like growth factor type I on critical size calvarial bone defects in irradiated rats. *J Craniofac Surg* 9:138-41.
63. **THAWANI JP, WANG AC, THAN KD, LIN CY, LA MARCA F, PARK P** (2010). Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery* 66:233-46; discussion 46.
64. **URIST MR** (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-9.
65. **URIST MR, STRATES BS** (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50:1392-406.
66. **VACANTI CA, KIM W, UPTON J, VACANTI MP, MOONEY D, SCHLOO B, VACANTI JP** (1993). Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25:1019-21.

67. **WANG H, SPRINGER IN, SCHILDBERG H, ACIL Y, LUDWIG K, RUEGER DR, TERHEYDEN H** (2004). Carboxymethylcellulose-stabilized collagenous rhOP-1 device-a novel carrier biomaterial for the repair of mandibular continuity defects. *J Biomed Mater Res A* 68:219-26.
68. **WARNKE PH, SPRINGER IN, WILTFANG J, ACIL Y, EUFINGER H, WEHMOLLER M, RUSSO PA, BOLTE H, SHERRY E, BEHRENS E, TERHEYDEN H** (2004). Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364:766-70.
69. **WARNKE PH, DOUGLAS T, WOLLNY P, SHERRY E, STEINER M, GALONSKA S, BECKER ST, SPRINGER IN, WILTFANG J, SIVANANTHAN S** (2008). Rapid Prototyping: Porous Titanium Alloy Scaffolds Produced by Selective Laser Melting (SLM) for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*.
70. **WEBER FE, EYRICH G, GRATZ KW, MALY FE, SAILER HF** (2002). Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:60-5.
71. **WIKESJO UM, QAHASH M, HUANG YH, XIROPAIDIS A, POLIMENI G, SUSIN C** (2009). Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications. *Orthod Craniofac Res* 12:263-70.
72. **WILTFANG J, MERTEN HA** (1996). Ectopic bone formation with the help of growth factor bFGF. *J Craniomaxillofac Surg* 24:300-4.
73. **WOZNEY JM** (1995). The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol* 66:506-10.
74. **WOZNEY JM** (1998). The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:160-6.
75. **WURZLER KK, DEWEESE TL, SEBALD W, REDDI AH** (1998). Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg* 9:131-7.
76. **ZACH L, COHEN G, SCOPP I, KAPLAN G** (1973). Experimental radio-osteonecrosis in Rhesus macaque jaws; therapeutic irradiation dose effect on dental extraction wound healing. *Am J Phys Anthropol* 38:325-30.
77. **ZUR NIEDEN NI, KEMPKA G, RANCOURT DE, AHR HJ** (2005). Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol* 5:1.

7 ANHANG

7.1 Streckenmessung

Rohdaten der Streckenmessung (Knochenzuwachs linea buccalis)

Individuum	Länge (in μm)		Quotient
	rechts	links	
Gruppe 1			
92.06_4	73,00	164,80	0,44
93.06_4	31,10	186,53	0,17
105.06_4	0,00	73,50	0,00
106.06_4	0,00	184,40	0,00
78.07_4	100,70	191,10	0,53
79.07_4	90,20	215,60	0,42
Durchschnitt			0,26
Gruppe 2			
94.06_2	104,70	208,00	0,50
95.06_2	0,00	223,40	0,00
107.06_4	100,00	129,70	0,77
80.07_4	43,60	214,80	0,20
81.07_4	39,40	136,00	0,29
Durchschnitt			0,35
Gruppe 3			
96.06_2	32,10	67,13	0,48
97.06_3	79,40	103,10	0,77
98.06_4	0,00	253,10	0,00
108.06_3	57,50	185,10	0,31
109.06_2	0,00	107,00	0,00
110.06_2	56,40	123,80	0,46
82.07_4	36,70	95,90	0,38
83.07_4	0,00	0,00	0,00
84.07_4	143,00	149,70	0,96
Durchschnitt			0,37

Fortgesetzt:

Rohdaten der Streckenmessung (Knochenzuwachs linea buccalis)

Individuum	Länge (in μm)		Quotient
	rechts	links	
Gruppe 4			
75.07_3	98,15	271,20	0,36
76.07_3	60,10	154,00	0,39
88.06_2	0,00	130,80	0,00
89.06_2	43,20	289,81	0,15
101.06_4	102,36	222,60	0,46
102.06_4	0,00	161,80	0,00
Durchschnitt			0,23
Gruppe 5			
99.06_1	205,44	199,00	1,03
100.06_2	163,20	176,50	0,92
111.06_2	261,20	265,20	0,98
112.06_4	258,80	205,00	1,26
85.07_3	200,70	162,91	1,23
86.07_3	203,60	198,64	1,02
Durchschnitt			1,08
Gruppe 6			
90.06_3	70,90	263,20	0,27
91.06_4	30,22	234,30	0,13
103.06_2	100,60	136,80	0,74
104.06_4	0,00	175,23	0,00
77.07_3	106,40	274,80	0,39
Durchschnitt			0,30

7.2 Flächenmessung

Rohdaten der Flächenmessung (Knochenzuwachs linea buccalis)

Individuum	Länge (in μm)		Quotient
	rechts	links	
Gruppe 1			
92.06_4	45514,00	123973,00	0,37
93.06_4	20455,00	104028,00	0,20
105.06_4	0,00	34396,00	0,00
106.06_4	0,00	130705,00	0,00
78.07_4	71757,00	91083,00	0,79
79.07_4	60696,00	115845,00	0,52
Durchschnitt			0,31
Gruppe 2			
94.06_2	50881,00	128691,00	0,40
95.06_2	31926,00	124189,00	0,26
107.06_4	77102,00	79418,00	0,97
80.07_4	93722,00	174575,00	0,54
81.07_4	37459,00	61218,00	0,61
Durchschnitt			0,55
Gruppe 3			
96.06_2	4559,00	55337,00	0,08
97.06_3	71944,00	110840,00	0,65
98.06_4	16460,00	167964,00	0,10
108.06_3	25385,00	132208,00	0,19
109.06_2	10694,00	92793,00	0,12
110.06_2	48280,00	87237,00	0,55
82.07_4	39677,00	62134,00	0,64
83.07_4	5411,00	75494,00	0,07
84.07_4	113196,00	80802,00	1,40
Durchschnitt			0,42

Fortgesetzt:

Rohdaten der Flächenmessung (Knochenzuwachs linea buccalis)

Individuum	Länge (in µm)		Quotient
	rechts	links	
Gruppe 4			
75.07_3	97231,00	172962,00	0,56
76.07_3	59092,00	95774,00	0,62
88.06_2	0,00	101474,00	0,00
89.06_2	62751,00	189887,00	0,33
101.06_4	94297,00	153463,00	0,61
102.06_4	27279,00	120897,00	0,23
Durchschnitt			0,39
Gruppe 5			
99.06_1	134862,00	128684,00	1,05
100.06_2	134494,00	119104,00	1,13
111.06_2	190006,00	157514,00	1,21
112.06_4	163045,00	151092,00	1,08
85.07_3	122549,00	120867,00	1,01
86.07_3	102211,00	115823,00	0,88
Durchschnitt			1,06
Gruppe 6			
90.06_3	54635,00	161366,00	0,34
91.06_4	146451,00	121036,00	1,21
103.06_2	119637,00	108192,00	1,11
104.06_4	9154,00	108861,00	0,08
77.07_3	65080,00	148867,00	0,44
Durchschnitt			0,64

7.3 Knochendichtemessung

Rohdaten der Knochendichtemessung (unbestrahlte Kieferhälfte)

Individuum	Dichte (%)			Durchschnitt
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	
Gruppe 1				
92.06_4	90,40	87,30	84,50	87,40
93.06_4	90,40	82,10	91,00	87,83
105.06_4	92,40	86,40	85,90	88,23
106.06_4	87,30	83,40	88,90	86,53
78.07_4	85,30	90,20	83,70	86,40
79.07_4	85,30	86,30	90,50	87,37
Durchschnitt				87,29
Gruppe 2				
94.06_2	96,50	84,30	85,80	88,87
95.06_2	94,60	91,30	89,90	91,93
107.06_4	86,00	89,80	85,60	87,13
80.07_4	84,90	90,00	93,40	89,43
81.07_4	86,40	87,90	86,50	86,93
Durchschnitt				88,86
Gruppe 3				
96.06_2	94,00	85,60	88,30	89,30
97.06_3	87,10	90,40	92,30	89,93
98.06_4	88,80	85,90	91,20	88,63
108.06_3	90,00	83,40	85,90	86,43
109.06_2	85,80	91,30	92,30	89,80
110.06_2	87,20	90,60	89,40	89,07
82.07_4	93,20	84,30	86,20	87,90
83.07_4	92,40	87,90	88,50	89,60
84.07_4	91,80	86,90	92,30	90,33
Durchschnitt				89,00
Gruppe 4				
75.07_3	89,50	89,40	87,00	88,63
76.07_3	92,20	91,30	87,40	90,30
88.06_2	89,00	83,40	88,30	86,90
89.06_2	85,60	91,40	86,50	87,83
101.06_4	89,60	87,00	86,80	87,80
102.06_4	93,10	87,20	86,10	88,80
Durchschnitt				88,38

Fortgesetzt:

Rohdaten der Knochendichtemessung (unbestrahlte Kieferhälfte)

Individuum	Dichte (%)			Durchschnitt
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	
Gruppe 5				
99.06_1	93,70	82,50	83,40	86,53
100.06_2	90,40	90,10	86,00	88,83
111.06_2	87,10	82,80	92,40	87,43
112.06_4	92,00	83,50	89,00	88,17
85.07_3	96,20	85,70	85,50	89,13
86.07_3	88,70	91,30	87,80	89,27
Durchschnitt				88,23
Gruppe 6				
90.06_3	85,90	87,30	91,70	88,30
91.06_4	83,70	89,80	85,30	86,27
103.06_2	83,90	87,30	92,60	87,93
104.06_4	86,10	90,50	86,90	87,83
77.07_3	91,70	85,90	89,40	89,00
Durchschnitt				87,87

Rohdaten der Knochendichtemessung (bestrahlte Kieferhälfte)

Individuum	Dichte (%)			Durchschnitt
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	
Gruppe 1				
92.06_4	93,40	85,40	92,30	90,37
93.06_4	88,30	85,60	87,10	87,00
105.06_4	88,40	85,40	90,80	88,20
106.06_4	82,30	91,30	87,00	86,87
78.07_4	88,30	84,00	86,30	86,20
79.07_4	91,50	84,90	82,40	86,27
Durchschnitt				87,48
Gruppe 2				
94.06_2	85,30	91,20	90,20	88,90
95.06_2	89,40	93,00	84,90	89,10
107.06_4	88,10	92,70	91,10	90,63
80.07_4	87,90	90,40	87,40	88,57
81.07_4	86,60	93,10	85,30	88,33
Durchschnitt				89,11
Gruppe 3				
96.06_2	92,30	91,20	86,40	89,97
97.06_3	88,20	90,80	87,40	88,80
98.06_4	85,30	88,90	90,30	88,17
108.06_3	88,10	90,20	87,50	88,60
109.06_2	89,60	92,00	87,40	89,67
110.06_2	85,90	90,20	93,00	89,70
82.07_4	93,00	88,10	88,30	89,80
83.07_4	90,20	87,30	90,50	89,33
84.07_4	87,40	90,10	89,40	88,97
Durchschnitt				89,22
Gruppe 4				
75.07_3	91,30	84,70	87,40	87,80
76.07_3	81,30	90,60	93,20	88,37
88.06_2	86,40	91,90	79,90	86,07
89.06_2	88,50	91,00	86,20	88,57
101.06_4	92,00	86,80	89,10	89,30
102.06_4	95,00	79,40	90,00	88,13
Durchschnitt				88,04

Fortgesetzt: Rohdaten der Knochendichtemessung (bestrahlte Kieferhälfte)

Individuum	Dichte (%)			Durchschnitt
	1. Messung	2. Messung	3. Messung	
Gruppe 5				
99.06_1	91,40	90,00	84,50	88,63
100.06_2	85,30	92,80	87,60	88,57
111.06_2	83,90	92,70	86,70	87,77
112.06_4	78,40	87,30	95,30	87,00
85.07_3	90,40	91,40	89,40	90,40
86.07_3	88,50	93,50	90,30	90,77
Durchschnitt				88,86
Gruppe 6				
90.06_3	94,60	87,20	85,90	89,23
91.06_4	87,20	88,50	89,50	88,40
103.06_2	91,40	90,00	83,60	88,33
104.06_4	88,80	86,90	93,80	89,83
77.07_3	93,40	79,40	87,30	86,70
Durchschnitt				88,50

7.4 Markierungsschema

Markierungsschema Teil B

	rechtes Ohr	linkes Ohr
Tier 1	F344 Kerbe	Lew Kerbe
Tier 2	o	Lew Kerbe
Tier 3	F344 Kerbe	o
Tier 4	o	o
Tier 5	oo	Lew Kerbe
Tier 6	F344 Kerbe	oo
Tier 7	o	oo
Tier 8	oo	o
Tier 9	oo	oo
Tier 10	oo	ooo
Tier 11	o	ooo
Tier 12	ooo	o
Tier 13	ooo	oo
Tier 14	ooo	ooo
F344	rechte Mark. Halbloch	
Lew		linke Mark. Halbloch

7.8 Tierversuchsgenehmigung

Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft • Postfach 5009 • 24062 Kiel

Herrn

Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-
und Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 16

24105 Kiel

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Ingo C. Reetz
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40

24098 Kiel

Ihr Zeichen / vom

**Antrag vom 28.04.2004,
Ergänzung vom 08.07.2004**

Mein Zeichen / vom

V 742-72241.121-14 (39-5/04)

Telefon (0431)

Datum

. Juli 2004

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Prof. Wiltfang,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Untersuchung zur Beeinflussung der Knochenregeneration mit Hilfe eines liposomalen BMP-2 Vektors am Osteoradionekrosemodell der Rattenmandibula

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 10 Ratten für eine Pilotstudie verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Juli 2005 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Prof. Dr. J. Wiltfang

4. Sein Stellvertreter:
Herr PD Dr. I. Springer

5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.

6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Ingo C. Reetz

7. Weitere Nebenbestimmungen:
Keine.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. Ingo Springer danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas. Weiterhin möchte ich mich für das sehr kollegiale Verhältnis und die Unterstützung bei der Auswertung der Befunde und bei der Abfassung der Arbeit bedanken.

Herrn PD. Dr. Peter Niehoff danke ich ebenfalls für seine Betreuung, seine Einführung in den radiologischen Themenbereich und seine engagierte Unterstützung bei der Narkose und Bestrahlung der Versuchstiere.

Herrn Professor Dr. Dr. Wiltfang danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. Açil, Herrn Professor Dr. Marget und Herrn Dr. Lange danke ich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der transfizierten Zellen.

Frau Gabriele Neßenius und Frau Betül Temel danke ich für die Hilfe im Bereich der Hartschliff- und Paraffinhistologie.

Für die Anleitung zum Umgang der Versuchstiere und deren Betreuung danke ich den Tierpflegern des Tierstalls des UKSH.

Meinem Bruder Eike Vöhrs danke ich für die praktische Unterstützung bei der intraperitonealen Sequenzmarkierung der Versuchstiere. Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung während des Studiums, der Examenzeit und der Promotion. Für Ihr Verständnis, ihre moralische Unterstützung und ihre große Hilfe beim Korrekturlesen der Arbeit danke ich besonders meiner Frau Inga.

Das Forschungsprojekt wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungs- Gemeinschaft durchgeführt. Hierfür spreche ich ebenfalls meinen Dank aus.

DER LEBENSLAUF WURDE AUS DER ELEKTRONISCHEN VERSION DER
ARBEIT ENTFERNT.

PUBLIKATIONSLISTE

Vorträge und Posterpräsentationen:

Springer IN, Niehoff P, Açil Y, Marget M, Lange A, Warnke PH, **Vöhrs H**, Roldán JC, Wiltfang J. (2008) RhBMP-2 und rhbFGF in einem bestrahlten Modell. 58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie, Wiesbaden, 01.-03.05.2008.

Vöhrs H, Wiltfang J, Niehoff P, Acil Y, Marget M, Lange A, F. El-Sayed KM, Dörfer CE, Springer IN. BMP-2 and bFGF gene transfection in an irradiated bone model. (2010) 89th General Session & Exhibition of the IADR San Diego, Calif., USA, 16 - 19.03.2011. Abstract eingereicht.

Publikationen:

Vöhrs H, Wiltfang J, Niehoff P, Açil Y, Marget M, Lange A, F. El-Sayed KM, Springer IN. Effect of BMP-2 and bFGF gene transfection on tissue regeneration in an irradiated bone model. Einreichung in *Tissue Engineering* (2010) vorgesehen.