

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

**FEHLENDE IN VIVO OSTEOGENESE VON IN VITRO PRÄFABRIZIERTEN,  
DREIDIMENSIONALEN AUTOLOGEN OSTEOBLASTENKULTUREN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**CHRISTIAN ANDRES SCHNEIDER**  
aus Erfurt

Kiel 2010

<b>1. Berichterstatter:</b>	<b>Prof. Dr. Dr. Terheyden</b>
<b>2. Berichterstatter:</b>	<b>Prof. Dr. Dörfer</b>
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	<b>08.02.2011</b>
<b>Zum Druck genehmigt, Kiel, den</b>	<b>08.02.2011</b>

**gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi**  
**(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Knochengewebe	1
1.2	Knochenersatz	2
1.3	Bioartifizielle Gewebezüchtung (Tissue engineering)	4
1.4	Fragestellung	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b>	<b>9</b>
2.1	Versuchstiere	9
2.2	Narkose, Schmerzkontrolle und Antibiose	9
2.3	Erster operativer Eingriff: Knochen- und Blutentnahme	10
2.4	Anwachskulturen und Hydroxylapatit-Granulat	10
2.5	Zweiter operativer Eingriff: Transplantation	11
2.6	Intravitale polychrome Sequenzmarkierung	13
2.7	Opferung und Perfusionsfixierung	13
2.8	Präparatgewinnung und Präparatherstellung	14
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>19</b>
3.1	In vitro Zellenachweis auf Bio-Oss <sup>®</sup>	19
3.2	Vitalfärbung der Osteoblasten	20
3.3	Mikroradiographie	21
3.4	Fluoreszenzmikroskopie	24
3.5	Toluidinblau-Histologie	27
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>32</b>
4.1	Beurteilung des Tiermodells	32
4.2	Beurteilung des Transplantatlagers	32
4.3	Beurteilung der dreidimensionalen autologen Osteoblastenkultur	33
4.4	Schlussfolgerung	36
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>55</b>

# 1 EINLEITUNG

Die Versorgung angeborener oder erworbener Knochendefekte stellt eine große Herausforderung in der Chirurgie dar. Neben der Wiederherstellung von Funktion und Belastbarkeit spielt die Ästhetik für die Lebensqualität der Patienten, besonders in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, eine entscheidende Rolle.

## 1.1 Knochengewebe

Physikalische Härte und biologische Plastizität zeichnen den Knochen aus (Leonhardt 1990). Zwar erscheint Knochengewebe als widerstandsfähige Hartsubstanz mit mechanischer Stabilität, die für Lastbeanspruchung, Fortbewegung und Schutz der inneren Organe benötigt wird (Kneser et al. 2006), dennoch erfolgt unter Aufrechterhaltung der Funktion ein ständiger Umbau (Schiebler 1999). Der Knochen zeigt eine Anpassung an veränderte funktionelle Beanspruchung (Schiebler 1999). Diese besondere Leistungsfähigkeit der funktionellen Anpassung und der Heilung geschieht durch Umbau, ohne eine Narbe zu hinterlassen (Buckwalter et al. 1996b, a). Die ausgezeichnete Vaskularisierung des Gewebes ermöglicht einen intensiven Stoffaustausch (Leonhardt 1990). Im Knochen sind 99% des Calciums und 75 % des Phosphates des Körpers enthalten, die hormonell gesteuert freigesetzt werden (Leonhardt 1990). Die Hämatopoese findet im Knochenmark statt (Leonhardt 1990).

Die unterschiedlichen funktionellen Erfordernisse des Knochengewebes spiegeln sich in seinem komplexen Aufbau wider. Im adulten Skelettknochen unterscheidet man die äußere *Substantia compacta (Corticalis)*, ein verdichtetes Gewebe mit weniger als 10% Porositäten, und die innere *Substantia spongiosa*, die schwammartig in Trabekeln organisiert ist und das Knochenmark enthält (Leonhardt 1990, Kneser et al. 2006).

Auch wenn das Knochengewebe von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen besiedelt ist, wird die funktionelle Integrität von drei funktionell verschiedenen Zelltypen aufrecht erhalten: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Owen 1970, Buckwalter et al. 1996a, Aubin 1998b).

Osteoblasten produzieren die kollagenen und nicht kollagenen Bausteine der Knochenmatrix, sie entstehen aus stromalen Stammzellen bzw. Progenitorzellen (Schroeder 1992).

Osteozyten regulieren die Ausreifung und Mineralisation der neu gebildeten Knochenmatrix, ausgereifte Osteozyten weisen proteinsynthetisierende Aktivität auf (Baud 1968, Schroeder 1992). Sie sind für die Osteolyse (Knochenabbau) und die Osteoplasie (Knochenanbau) verantwortlich und am Mineralstoffwechsel beteiligt (Belanger 1969, Jande & Belanger 1971, Schroeder 1992).

Osteoklasten bauen mittels hydrolytischer Enzyme, wie der sauren Phosphatase, Knochen ab und bilden so mit den Osteoblasten und Osteozyten ein den Knochen remodellierendes System (Schroeder 1992).

Diese gewebespezifischen Zellen sind in einer hochkomplexen Matrix aus mineralisiertem Hydroxylapatit und einem nicht mineralisierten organischen Anteil, der Kollagen, Glycoproteine, Proteoglycane und Sialoproteine enthält, eingebettet (Heinegard & Oldberg 1989, Robey et al. 1993). Der anorganische Anteil spielt eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung und der Kontrolle des Wachstums der drei genannten Zelltypen und der Umbildung des Knochens (Robey et al. 1993, Lian & Stein 1995, Huang & Ingber 1999, Nomura & Takano-Yamamoto 2000). Durch eine Fülle verschiedener Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, die die Zell- und Matrixinteraktion als Antwort auf interne und externe Reize koordinieren, wird die Entwicklung und Regeneration des Knochens in komplexen Prozessen reguliert (Urist et al. 1983, Stein et al. 1990, Lian & Stein 1995, Mundy 1996, Stein et al. 1996, Probst & Spiegel 1997, Ducy & Karsenty 1998, Reddi 1998a, Ducy 2000, Olsen et al. 2000, Karsenty 2001).

## **1.2 Knochenersatz**

Zwischen Knochenimplantat und –transplantat kann hinsichtlich der Vitalität unterschieden werden. Die Übertragung von Knochengewebe mit vitalen knochenbildenden Zellen wird mit dem Terminus „Transplantation“ bezeichnet, die von toter Materie dagegen als „Implantation“ (Alloplastik) (Kübler 1997).

Um Defekte mit einer kritischen Größe, das heißt von einer Größe, die keine Spontanheilung mehr zulässt, zu ersetzen, sind die klinischen Möglichkeiten eingeschränkt. Knochenersatzmaterialien werden bezüglich ihrer Herkunft unterschieden (Kübler 1997). Der heutige Goldstandard für Knochenersatz ist das autologe, das heißt körpereigene, Knochentransplantat (Gazdag et al. 1995, Kneser et al. 2006), welches eine gute Einheilungstendenz und nur geringe postoperative Resorptionsvorgänge aufweist. Ein weiterer Vorteil ist, dass Knochen durch Zellen des Transplantates selbst und durch Induktion im Transplantatlager befindlicher undifferenzierter mesenchymale Stammzellen in Knochenzellen neu gebildet werden kann (Reuther 1998). Ein tumorbedingt fehlender Unterkiefer kann zum Beispiel mit einem freien, mikrochirurgisch anastomosierten Fibula-, Scapula-, Beckenkamm-, oder Rippentransplantat ersetzt werden (Swartz et al. 1986, Ozaki et al. 1997, Shea et al. 1997). Zwar ist in der Entnahmeregion meist nicht mit

Langzeitproblemen zu rechnen (Anthony et al. 1997, Shpitzer et al. 1997), dennoch sind Blutungen, Hämatome, Infektionen und chronische Schmerzen immer wieder auftretende Komplikationen (Banwart et al. 1995, Arrington et al. 1996, Behrens et al. 2001, Ebraheim et al. 2001). Zusätzlich können Sekundäroperationen notwendig werden, wenn die Kontur von Knochentransplantat und Empfängerregion angeglichen werden muss (Miller & Schusterman 1997) oder Osteosynthesematerialien entfernt werden müssen. Der zusätzliche Einsatz von Knochenersatzmaterialien in Kombination mit autologen Knochentransplantaten setzt den Bedarf des benötigten Gewebes zur Rekonstruktion herab (Sassard et al. 2000). Dennoch bleibt der mögliche Ersatz in Qualität und Quantität eingeschränkt (Kneser et al. 2006).

Ist der Einsatz von autologen Knochentransplantaten nicht möglich oder nicht ausreichend, können weitere Knochenersatzmaterialien verwendet werden.

Aufbereitetes allogenes, das heißt von einem genetisch anderen Individuum derselben Spezies stammend, also von einem anderen Menschen, xenogenes, das heißt von artfremden Lebewesen, zum Beispiel vom Rind stammendes (Aho et al. 1994, Gazdag et al. 1995, Cetiner et al. 2003, Lobo Gajiwala 2003), oder alloplastisches, das heißt künstlich hergestelltes Material kann implantiert werden. Verpflanzt man frischen Fremdknochen, so finden Antigen-Antikörperreaktionen statt, die vor allem auf das Fremdeiweiß zurückzuführen sind (Fuchs et al. 1963). Die daher notwendige Aufbereitung zu sogenannten Biomaterialien geschieht zum Beispiel durch Gefriertrocknung, Erhitzen, Tiefkühlung oder chemische Bearbeitung, so dass die Transplantate keine immunologische Abwehrreaktion induzieren (Schmelzle 1978, Wolff 2006). Zu den Biomaterialien gehören natürliche, synthetische oder anorganische (xenogene und alloplastische) Materialien, die als Implantate im Organismus eingesetzt werden. So werden zum Beispiel Knochenersatzmaterialien auf Basis von Rinderknochen (Bio-Oss<sup>®</sup>, Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) (Smiler & Holmes 1987, Wetzell et al. 1995, Jensen et al. 1996, Artzi et al. 2002, Haas et al. 2002), des hochporösen, biologischen Kalziumcarbonats kalkinkrustierender Meeresalgen (Algipore<sup>®</sup>, Friadent GmbH, Mannheim, Deutschland) (Ewers 2005), von Korallen (Interpore Cross International, Irvine, Kalifornien, U.S.A.) und Acrylat, Kalziumphosphat, oder apatitbasierte Knochenzemente zur Versorgung von Knochendefekten angewendet (Jupiter et al. 1997, Cassidy et al. 2003, Zijderfeld et al. 2005).

Osteoinduktion ist ein "Prozess, bei dem die Osteogenese induziert wird" (Albrektsson & Johansson 2001). Durch osteoinduzierende Faktoren angeregt (Marx & Garg 1998), wird die

Mitogenese von undifferenzierten mesenchymalen Zellen und ihre Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen unterstützt (Albrektsson & Johansson 2001), so dass neuer Knochen gebildet werden kann (Cooper et al. 1998).

Osteoinduktive Substanzen werden klinisch genutzt, aber ihr Einsatz ist noch nicht vollständig standardisiert (Kneser et al. 2006).

Thrombozytenreiches Plasma, auch plättchenreiches Plasma (PRP) genannt, enthält neben dem vom Thrombozyten abstammenden Wachstumsfaktor (platelet derived growth Factor, PDGF) eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (Altmeyen et al. 2004, Sammartino et al. 2005, Thorwarth et al. 2006), die die Knochenbildung verstärken.

Bei der Osteoinduktion spielen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) eine bedeutende Rolle (Albrektsson & Johansson 2001). Sie sind lösliche Glykoproteine der Transforming Growth Faktor (TGF)- $\beta$ -Familie und werden natürlicherweise bei einem Trauma oder dem Remodelling (Umbau) freigesetzt (Albrektsson & Johansson 2001). BMPs sind als die wichtigsten osteoinduktiven Faktoren in demineralisierter Knochenmatrix (demineralised bone matrix, DBM) identifiziert worden (Reddi 1998b, Ducky 2000). Aktuelle Studien beschreiben jedoch auch kanzerogene Eigenschaften der BMPs (Dai et al. 2008, Gordon et al. 2008, Liu et al. 2008).

DBM ist in verschiedenen Formen für den klinischen Einsatz erhältlich und kann aus allogenen oder xenogenen Knochen gewonnen werden (Maddox et al. 2000, Moghadam et al. 2004, Traianedes et al. 2004, Pietrzak et al. 2005). Das osteoinduktive Potential ist stark von der Anwendung und der Spenderseite abhängig (Kneser et al. 2006).

### **1.3 Bioartifizielle Gewebezüchtung (Tissue engineering)**

Das Tissue engineering, wie die Züchtung von bioartifiziellen Geweben auch genannt wird, ist ein interdisziplinäres Gebiet der Technologien der Ingenieurs-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften (Life Sciences oder Biowissenschaften, umfassen die Biologie und verwandte Bereiche, wie Biochemie, Molekularbiologie, Biophysik), mit dem Ziel Gewebefunktionen aufrecht zu erhalten, zu ersetzen, zu verbessern, oder grundlegend zu erforschen (Langer & Vacanti 1993).

Bausteine der Gewebezüchtung sind die Bestandteile des Knochengewebes und die bereits genannten Knochenersatzmaterialien. Die klinische Nutzung definiert die gewünschten Eigenschaften des zu züchtenden Ersatzknochens (Kneser et al. 2006). Um erfolgreich zu sein, müssen diese Materialien in einer genau koordinierten räumlichen und zeitlichen Abhängigkeit mit präzise ausgearbeiteten chirurgischen Konzepten eingesetzt werden (Kneser

et al. 2006). Vorsicht bedarf es mit ansteigender Komplexität der gezüchteten Gewebemischungen, um einer Schädigung der anfälligen Zellen oder bioaktiven Substanzen während der Transplantation vorzubeugen (Kneser et al. 2006). Optional kann der Transplantation eine von einem Tag bis zu mehreren Monaten dauernde in vitro Phase, zum Beispiel zur Zellvermehrung oder zur Induktion von gewebespezifischer Zelldifferenzierung, voraus gehen (Kneser et al. 2006).

Ganz allgemein sind zur Neubildung von Gewebe drei Grundelemente notwendig:

- strukturelles Gerüst
- Zellen
- Wachstumsfaktoren

Dieses sogenannte trianguläre Konzept der Knochenregeneration wird von einigen Autoren noch um den Faktor der mechanischen Stimulation ergänzt (Soucacos et al. 2008, Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

Eine Vielzahl von Materialien, die zum Teil auch schon als Knochenersatzmaterialien genannt wurden, sind als Matrix zur Knochengewebszüchtung genutzt worden (Yang et al. 2002, Shin et al. 2003). Aufgabe der extrazellulären Matrix ist es, für Gewebszellen ein biologisches, der spezifischen Architektur entsprechendes, dreidimensionales Gerüst mit dem kennzeichnenden Milieu zu bilden (Huang & Ingber 1999). Sowohl die dreidimensionale Architektur mit Oberflächenbeschaffenheit, Porosität und mechanischer Stabilität als auch die Oberflächenchemie und die damit verbundene Immunogenität der verwendeten Materialien haben einen bedeutenden Einfluss auf das bioartifizielle Gewebe (Logeart-Avramoglou et al. 2005). Die Anwendung vieler verschiedener Stoffe wird erprobt, darunter bewährte Materialien, deren klinischer Einsatz im Zusammenhang mit bioartifiziellem Knochenersatz etabliert ist (Petite et al. 2000, Groger et al. 2003, Schantz et al. 2003, Sikavitsas et al. 2003, Timmer et al. 2003, Stangenberg et al. 2005, Mankani et al. 2006).

Es ist bisher noch nicht bekannt, welche Art von osteogenen Zellen am Besten zur Generierung von Knochengewebe ist, dennoch sind sie integraler Bestandteil jedes Konzeptes von bioartifiziellem Knochen (Kneser et al. 2006). Osteogene Zellen sind eine Zellpopulation mit einem den hämatopoetischen Zellen ähnlichem Differenzierungsweg (Bruder & Caplan 1990, Bruder & Fox 1999). Es wurden zum Beispiel mesenchymale Stammzellen, periostale Zellen, Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten mit Erfolg zur Züchtung angewendet (Bruder et al. 1994, Kuznetsov et al. 1997, Aubin 1998b, a, Groger et al. 2003,



Stangenberg et al. 2005).

Um die Zellen klinisch erfolgreich einzusetzen, sind Parameter wie die Isolations- und Expansionstauglichkeit, die Stabilität der osteoblastischen Phänotypen und die in vivo Langzeit- und Knochenbildungsstabilität von entscheidender Bedeutung (Kneser et al. 2006). Stromazellen des Knochenmarks (bone marrow stromal cells/BMSCs) in Verbindung mit geeigneten Knochenersatzmaterialien sind als vorteilhaft für die Knochenbildung in Knochendefekten bei Schafen, Hunden und Ratten beschrieben worden (Petite et al. 2000, van den Dolder et al. 2003, Weng et al. 2006).

Acil et al. haben erstmalig eine dreidimensionale Osteoblastenkultur beschrieben, bei der humane Osteoblasten sechs Wochen nach Besiedelung mehrere Zellschichten auf der Oberfläche von Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) bildeten. Es konnten Hydroxylsilylpyridinoline (HP) und Lysylpyridinoline (LP) nachgewiesen werden, deren Gehalt als Zeichen der Kollagensynthese zeitabhängig stieg (Acil et al. 2000, Acil et al. 2002).

Osteogene Wachstumsfaktoren können die Proliferation und Differenzierung von transplantierten osteogenen Zellen modulieren. Sie besitzen die Fähigkeit, Knochenvorläuferzellen des Wirtes anzuziehen und deren Differenzierung zu induzieren (Kneser et al. 2006). Das Wachstum und die Integration von gezüchtetem Knochen können somit verbessert werden (Kneser et al. 2006). Es werden sowohl isolierte Faktoren als auch wenig standardisierte Gemische, wie das trombozytenreiche Plasma oder die demineralisierte Knochenmatrix verwendet (Maddox et al. 2000, Lieberman et al. 2002, Sammartino et al. 2005). Zu den potentesten osteoinduktiven Faktoren gehören die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) (Kneser et al. 2006).

Der erfolgreiche Einsatz von gezüchteten Knochengewebe ist unter anderem durch das Überleben der Zellen im zum Teil suboptimal durchbluteten Transplantat limitiert (Kneser et al. 1999). Kritisch ist die Überführung von in vitro gezüchteten Geweben in den Organismus, da diese auf interstitielle Diffusion und die Durchblutung angewiesen ist (Kneser et al. 2006). Diffusion ermöglicht jedoch nur die Versorgung in einem Radius von 200µm (Folkman & Hochberg 1973, Goldstein et al. 2001). Die Gefäßeinsprossung aus dem Transplantatlager ist ein langsamer Prozess, so dass die Transplantate ausreichend dünn sein müssen, um ein Überleben zu gewährleisten (Eiselt et al. 1998). Mögliche Hilfe können angiogene Wachstumsfaktoren leisten, die bereits erfolgreich eingesetzt wurden (Ahrendt 1998, Elcin et

al. 2001, Tabata 2003). Um sich nicht allein auf die Gefäßeinsprossung aus der Peripherie des Konstrukts zu verlassen, was eine Umgebung mit hohem Vaskularisierungspotential notwendig macht, ist es möglich, „axial vaskularisierte“ (gefäßgestielte) Gewebe zu züchten (Kneser et al. 2006). Diese wurden mit mikrochirurgischen Gefäßanastomosen, ähnlich einem freien Transplantat, in die Defekte eingebracht (Kneser et al. 2006).

Mittels kultivierter Zellen und verschiedener Matrices Knochendefekte aufzufüllen, ist in Kleintiermodellen (Breitbart et al. 1998, Perka et al. 2000), Großtiermodellen (Schliephake et al. 2001, Abukawa et al. 2004) und auch am Menschen (Lendeckel et al. 2004, Pradel et al. 2006, Gimbel et al. 2007, Mesimaki et al. 2009) untersucht worden. Diese Technik kommt auch in zahlreichen Studien zum Knochenaufbau vor Insertion von dentalen Implantaten zur Anwendung (Fuerst et al. 2004, Yamada et al. 2004, Ohya et al. 2005).

Die Falldarstellungen bei Mensch und Tier sind oftmals ohne Kontrollgruppen durchgeführt worden (Fuerst et al. 2004, Schimming & Schmelzeisen 2004, Yamada et al. 2004, Chen et al. 2005, Ueda et al. 2005, Fuerst et al. 2009) oder es wurden verschiedene Techniken miteinander verglichen (Ohya et al. 2005, Pradel et al. 2006, Springer et al. 2006, Zizelmann et al. 2007, Pradel et al. 2008, Shayesteh et al. 2008). Die Darstellung einzelner Patientenfälle zeigt mögliche Lösungsansätze auf (Lendeckel et al. 2004, Mesimaki et al. 2009). Die geringe Fallzahl und die Dokumentation von Verlaufsbeobachtungen sind allerdings kennzeichnend für die bisherigen Studien (Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

Die Knochenregeneration mit gezüchteten Zellen zeigt beim Menschen eine Verminderung der Spenderseitenmorbidity, Schmerzintensität und -frequenz im Vergleich zum autologen Transplantat (Gimbel et al. 2007). Die Ergebnisse bei Mensch und Tier deuten darauf hin, dass diese Technik geeignet ist, die Augmentation von Knochen zur Insertion von dentalen Implantaten zu unterstützen (Schimming & Schmelzeisen 2004, Fuerst et al. 2009) und auch die Auffüllung von Knochendefekten zu ermöglichen (Breitbart et al. 1998, Lendeckel et al. 2004). Trotzdem wird auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen hingewiesen (Zizelmann et al. 2007, Shayesteh et al. 2008), die besonders durch die jeweils unterschiedlichen und nicht vergleichbaren Verfahren unerlässlich erscheinen (Kneser et al. 2006).

Die Präfabrikation ist eine Technik, die eine Züchtung von Ersatzorganen oder Körperteilen im eigenen Körper ermöglichen kann (Cao et al. 1997, Campbell et al. 1999, Warnke et al. 2004). 1997 präfabrizierten *Cao und Vacanti* auf dem Rücken einer Maus eine knorpelige

Ohrmuschel mit menschlicher Form (Cao et al. 1997).

*Terheyden et al.* ersetzten den Unterkiefer von Minischweinen mittels eines im Musculus latissimus dorsi präfabrizierten Knochentransplantates (Terheyden et al. 2001a, Terheyden et al. 2001b), und dieselbe Arbeitsgruppe konnte erstmals erfolgreich den tumorbedingt entfernten Unterkiefer eines Patienten durch ein in dessen Musculus latissimus dorsi präfabriziertes Knochentransplantat ersetzen (Warnke et al. 2004). Beim Minischwein wurden rekombinantes humanes osteogenes Protein I (rhopI), auch BMP7 genannt, und Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) verwendet (Terheyden et al. 2001a, Terheyden et al. 2001b), bei dem behandelten Tumorpatienten fand zusätzlich eine Anreicherung mit körpereigenem Knochenmark statt (Warnke et al. 2004).

#### **1.4 Fragestellung**

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Knochenbildung nach Transplantation von in vitro präfabrizierten, dreidimensionalen autologen Knochenzellkulturen in einem ektopen Lager zu untersuchen.

Systematische Versuche am Großtier sind notwendig für das Verständnis der Knochenregeneration im Tissue engineering, um so klinische Alternativen zu konventionellen autologen Knochentransplantaten zu finden.

## **2 MATERIAL UND METHODE**

Diese Studie wurde vom Minister für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 genehmigt.

Die vorliegende Studie ist ein Beitrag, klinische Alternativen zu konventionellen autologen Knochentransplantaten zu finden und damit einen Fortschritt für zukünftige Patienten zu erzielen, indem operative Eingriffe in ihrem Umfang reduziert werden können. Anhand eines Tierversuchsmodells sollte der minimalinvasive therapeutische Ansatz der Präfabrikation durch in vitro gezüchtete, dreidimensionale autologe Osteoblastenkulturen evaluiert werden.

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Studie wurden sechs ausgewachsene, weibliche Göttinger Minischweine (Ellegard Göttingen Minipigs ApS, Dalmose, Dänemark) im durchschnittlichen Alter von 25 Monaten, mit einem Gewicht von circa 35 kg verwendet.

Die artgerechte Versorgung der Minischweine wurde durch ausgebildete Tierpfleger in Stallhaltung mit Einzelgehegen bei 20°C, 50-70% Luftfeuchtigkeit und 12 Stunden Lichtangebot sichergestellt. Die Tiere bekamen Minischwein Diät-Futter in Pelletform (Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) und ein unbeschränktes Wasserangebot.

### **2.2 Narkose, Schmerzkontrolle und Antibiose**

Alle operativen Eingriffe an den Tieren fanden in Intubationsnarkose statt. Zunächst wurde die Narkose der Minischweine mit einer intramuskulären Injektion, in einem handbreiten Abstand hinter dem Ohrgrund, eingeleitet. In einer Mischspritze wurden dabei 0,5 ml Stresnil (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) und 1-3 ml pro 10 kg Körpergewicht Ketamin 10% (Ketavet<sup>®</sup>, Upjohn GmbH, Heppenheim, Deutschland) verabreicht.

Unter Zuhilfenahme eines geraden Miller-Laryngoskopes der Größe IV konnte nun ein blockbarer gerader Standard-Tubus (Portex<sup>®</sup>, Kent, England, Größe 8/8,5) eingeführt werden. Die Intubationsnarkose fand mit O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O im Verhältnis 2:1 und 2% Isoflurane (Forene<sup>®</sup>, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) statt.

Puls und Blutsauerstoffgehalt wurden mit einem Pulsoxymeter (Oxypac 2000, Dräger<sup>®</sup> Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland) fortwährend überwacht.

Perioperativ bekamen die Tiere intravenös 10 Mega Penicillin (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) als Antibiose und 1ml Novaminsulfon-ratiopharm<sup>®</sup> 2,5 (Wirkstoff: Metamizol-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zur Schmerzkontrolle. Postoperativ wurde

die Schmerzkontrolle mit 4x40mg Tramadol (Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) als Futterzusatz weitergeführt.

### **2.3 Erster operativer Eingriff: Knochen- und Blutentnahme**

In einer ersten Operation wurde den Tieren Knochen vom Beckenkamm entnommen. Die Tiere wurden sediert und in Linksseitenlage gebracht. Rechtsseitig wurde die Schulterchwarte auf Höhe der tastbaren Spina iliaca anterior superior großzügig rasiert, anschließend wurde eine Hautdesinfektion mit Betaisodona<sup>®</sup>-Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) und die sterile Abdeckung des Operationsfeldes durchgeführt. Zur Freilegung des Beckenkamms wurde eine etwa 4 cm lange Schnittführung in dorsoventraler Richtung vorgenommen. Mit Hilfe eines kleinen Knochenmeißels wurden etwa 3 cm<sup>3</sup> Knochen entnommen und die Inzisionswunde schichtweise verschlossen. Die Muskelnnaht wurde mit Vicryl<sup>®</sup> der Stärke 5-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) ausgeführt, danach folgte eine subkutane Naht mit Dexon<sup>®</sup> 3-0 (Braun-Dexon, GmbH, Spangenberg, Deutschland) und die äußere Hautnaht mit Supramid<sup>®</sup> 2-0 (Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg, Deutschland). Zusätzlich wurden jeweils 250 ml Blut aus den Ohrvenen zur Herstellung von Nährmedium entnommen.

### **2.4 Anwachskulturen und Hydroxylapatit-Granulat**

Nach der Entnahme wurden die Knochenbiopsien in circa 0,4 cm große Stücke zerkleinert und mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um anschließend Anwachskulturen herzustellen. Deren Kulturbedingungen und das Medium förderten über 90% reines Osteoblastenwachstum (Acil et al. 2000). Das als Nährmedium dienende Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Dem DMEM wurde anstatt von fetalem Kälberserum jeweils das autologe Serum der Versuchstiere, 100 mg / L Streptomycin, 10<sup>5</sup> i. E. Penicillin, 100 nM Dexamethason (Biochrom, Berlin, Deutschland) und ein mM L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt. Sechs Wochen wurden die Osteoblasten in einem Begasungsbrutschrank kultiviert (wasserdampfgesättigte Atmosphäre bei 37° C, 95% Außenluft und 5% CO<sub>2</sub>; Haereus Christ, Osterode, Deutschland). Das Nährmedium wurde in Zellkulturflaschen (Tissue culture flasks, 175 cm<sup>2</sup>, Sarstedt, Newton, North Carolina, U.S.A.) gesammelt.

Nach den sechs Wochen Kulturdauer fand eine zweite Passage statt, und die Osteoblasten wurden auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) aufgebracht.

Das xenogene Knochenersatzmaterial (Biomaterial) Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) ist ein aus australischer Rinderknochenspongiosa gewonnenes natürliches Knochenmineral. Die Struktur ist chemisch mit dem natürlichen feinkristallinen Apatit der mineralisierten menschlichen Knochenmatrix vergleichbar. In einem mehrstufigen Herstellungsprozess entsteht eine hochgereinigte Mineralstruktur, die mit trockener Hitze sterilisiert wird. Bei der Herstellung werden alle organischen Anteile des bovinen Knochens entfernt und es bleibt nur die poröse, nicht resorbierbare Hydroxylapatitmatrix übrig, die als ein Gerüst für das Einwachsen von Osteoblasten und Gefäßen dient. Diese als Osteokundktivität bezeichnete Eigenschaft und auch eine gute Biokompatibilität sind experimentell und klinisch für Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) ausführlich dokumentiert worden (Smiler & Holmes 1987, Wetzel et al. 1995, Jensen et al. 1996, Artzi et al. 2002, Haas et al. 2002).

Um die Osteoblastennatur der Zellen nachweisen zu können, wurde eine Parallelkultur auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) angelegt, deren Überstand man auf Knochenkollagen Typ I mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatographie, HPLC) sowie immunhistochemisch durch Osteocalcinnachweis untersuchen konnte. Die durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachweisbaren Hydroxylysylpyridinoline (HP) und Lysylpyridinoline (LP) sind nicht reduzierbare Quervernetzungen, die während der Kollagenreifung entstehen. LP ist spezifisch für Knochen und Dentin (Eyre 1981). Osteocalcin ist ein Protein, welches ausschließlich von Osteoblasten und Odontoblasten gebildet wird und ein weit verbreiteter Marker zum Nachweis von Knochenbildung (Houben et al. 1997).

Um bei einer Knochenneubildung implantierte Osteoblasten von eingewanderten Osteoblasten unterscheiden zu können, wurde ein Teil der expandierten Osteoblasten, bevor sie auf das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat gesät wurden, mit dem Lebendfarbstoff PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. PKH26 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff (Emissionsmaximum 567 nm), der sich in die Zellmembran einlagert und zum Nachweis von verschiedenen Zelltypen in vitro und in vivo gut dokumentiert ist (Horan et al. 1990, Chawla et al. 2006, Yang et al. 2008, Kang et al. 2009).

## **2.5 Zweiter operativer Eingriff: Transplantation**

Die Transplantationsterminologie dieser Arbeit folgt der bewährten Einteilung in Tabelle 1 (Kübler 1997).

**Tabelle 1:** Transplantationsterminologie (Kübler 1997)

Autologes Knochenimplantat	Verpflanzung innerhalb eines Individuums
Allogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen derselben Spezies
Xenogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen verschiedener Spezies
Alloplastisches Knochenimplantat bzw. Knochenersatzmaterial	Vollsynthetische Herstellung eines Biomaterials, bzw. ausgiebige physikalische und oder chemische Bearbeitung xenogener (speziesfremder) Gewebearten bzw. Gerüstbausteine

Nach einer Woche Inkubationszeit auf dem Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) wurden die dreidimensionalen Osteoblastenkulturen in das jeweilige Schwein transplantiert.

In der zweiten Operation wurde den Tieren in den rechten Musculus latissimus dorsi die auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat gezüchteten Osteoblasten transplantiert. Schon 1896 erstmals als gestielter Lappen (Tansini 1896) und 1976 als freie Transplantation beschrieben (Baudet et al. 1976), wird der Musculus latissimus dorsi Lappen heute in der rekonstruktiven Chirurgie gängig angewendet. Der großflächige und fächerförmige Musculus latissimus dorsi wird durch die aus der Arteria subscapularis entspringende Arteria thoracodorsalis versorgt (Tillmann 1987), die aufgrund ihres Gefäßlumens zur Reanastomosierung geeignet ist (Riediger 1995). Eine Reinnervation über den Nervus thoracodorsalis ist zum Beispiel bei der Zungenrekonstruktion (Howaldt & Bitter 1990, Wolff 2006), oder zur Wiederherstellung der Gesichtsmotorik (Harii et al. 1976, Wolff 2006) möglich. Am Schweinemodell wurde der Musculus latissimus dorsi Lappen in der experimentellen Chirurgie verwendet (Picard-Ami et al. 1990, Banic et al. 1997, Terheyden et al. 2004).

Die Tiere wurden, wie bei der ersten Operation beschrieben, in Narkose gebracht, auf Höhe der Schulterblätter großzügig rasiert und desinfiziert. Zunächst wurde in Linksseitenlage nach steriler Abdeckung des Operationsfeldes der rechte Musculus latissimus dorsi über einen Flankenschnitt freigelegt und längs des Muskelfaserverlaufs eine 3 cm lange und 2 cm tiefe Tasche präpariert, die, mit Hilfe eines scharfen Löffels nach Partsch, mit circa 2 ml von dem von Osteoblasten überwachsenen Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat gefüllt wurde. Die Muskelränder wurden anschließend mit resorbierbarer Naht adaptiert und die Wunde schichtweise verschlossen.

Als Kontrolle diente der linke Musculus latissimus dorsi, bei dem ebenso verfahren wurde, aber das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat war hier nur mit Zellkulturmedium (DMEM) vorbehandelt und enthielt keine vitalen Zellen.

Die zum Zellenachweis mit PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gefärbten Osteoblasten auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat wurden in einer separaten Muskeltasche des M. infraspinatus eingebracht.

## 2.6 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

In den folgenden sechs Wochen wurde einmal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von Fluorochromen vorgenommen.

Eine Woche nach der Transplantation des mit Osteoblasten überwachsenen Bio-Oss<sup>®</sup> Granulates in den Musculus latissimus dorsi beginnend wurde mit der intraperitonealen Injektion der in Tabelle 2 aufgelisteten Fluorochrome begonnen. Mittels einer Braunüle<sup>®</sup> (grün: 1,3 x 45 mm, G 18, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden diese zwischen der zweiten und dritten linken Brustwarze der Minischweine injiziert.

**Tabelle 2:** Reihenfolge der Fluorochrommarkierung nach Transplantation

<b>Fluorochrome</b>	<b>Notwendige Dosis</b>	<b>Injektionszeitpunkt</b>
<b>1.</b> Xylenol-Orange, 6% in 2% NaHCO <sub>3</sub> Lösung	1,5 ml/kg Körpergewicht	1. und 2. Woche nach Transplantation
<b>2.</b> Calcein-Grün, 1% in 2% NaHCO <sub>3</sub> Lösung	0,5 ml/kg Körpergewicht	3. und 4. Woche nach Transplantation
<b>3.</b> Alizarinkomplexon 3% in 2% NaHCO <sub>3</sub> Lösung	0,8 ml/kg Körpergewicht	5. Woche nach Transplantation
<b>4.</b> Tetrazyklin Doxycyclin- ratiopharm <sup>®</sup> SF (Injektionslösung), Ratiopharm <sup>®</sup> GmbH, 89070 Ulm	1,5 ml/kg Körpergewicht	6. Woche nach Transplantation

## 2.7 Opferung und Perfusionsfixierung

Nach sechs Wochen wurden die Tiere geopfert. Die Minischweine wurden in eine tiefe Narkose versetzt. In Rückenlage erfolgte ein etwa 25 cm langer Längsschnitt über dem



Sternum, welches anschließend dargestellt wurde. Der Brustkorb wurde mittels einer Knochensäge, der dargestellte Herzbeutel mit einem Skalpell eröffnet. Es wurden 5000 i.E. Heparin (Liquimin<sup>®</sup>, Fa. Hoffmann la Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) intrakardial injiziert. Anschließend folgte eine Stichinzision in den linken Ventrikel. Von dort ausgehend wurde durch die Aortenklappe eine Knopfsonde in die Aorta vorgeschoben und mittels einer Ligatur fixiert. Mit einem Windkesselsystem konnte nun das Gefäßsystem der Tiere über die Knopfkanüle mit 10 Liter Ringerlösung bei einem physiologischen Druck von 120 mm Hg durchspült werden und mit dem Blut über eine Eröffnung des rechten Vorhofs abfließen. Nachdem der austretende Rückfluss gleichbleibend klar blieb, wurde mit 10 Liter Fixierlösung (siehe Tabelle 3 und 4) nachgespült und so das Gewebe fixiert.

**Tabelle 3:** Herstellung des Sörensenpuffers für die Fixierlösung

<b>Sörensenpuffer (10 Liter)</b>
136,09 g Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) in 10 Liter Aqua destilata lösen; 178,00 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) in 10 Liter Aqua destilata lösen; davon 1600 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 8400 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mischen und den pH-Wert bestimmen (pH = 7,4). Wenn notwendig mit HCL oder Natronlauge einstellen.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der Fixierlösung

<b>Fixierlösung (10 Liter)</b>	
Formalin 37%	400 ml
Sörensenpuffer	4100 ml
Glutardialdehyd 4%	5000 ml

## 2.10 Präparatgewinnung und Präparatherstellung

Nach der Perfusionsfixierung wurden die Tiere mittels Skalpell und einer großen Bügelsäge zerteilt und so die operierten Areale mit einem großzügigen Sicherheitsabstand von etwa 15 cm gewonnen.

Die mit PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gefärbten Transplantate wurden röntgenologisch geborgen und zur histologischen Auswertung zunächst für 4 Tage im Bewegungsbad entkalkt (Tabelle 5). Die entkalkten Proben wurden bei -70°C gefroren und mit dem Kryotom (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Depew, New York, U.S.A.) 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die hergestellten Schnitte wurden auf dem Objektträger für eine Stunde

getrocknet und unter dem Mikrophot-FXA-Fotomikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mikroskopiert, fotografiert und qualitativ analysiert.

**Tabelle 5:** Entkalkungsverfahren nach Romeis (Romeis 1968)

Materialien	Anleitung
250 g Äthylendinitrolotetraessigsäure Dinatriumsalz (Titriplex III, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) 1000 ml Aqua bidestillata 50 ml Natriumhydroxidlösung 40%	250 g Äthylendinitrolotetraessigsäure Dinatriumsalz mit 200 g Aqua bidestillata versetzen und auf 80°C erhitzen.  Unter Rühren auf 50°C abkühlen und 50 ml Natriumhydroxidlösung 40% dazugeben.  Mit Aqua bidestillata auf 800ml auffüllen und mit weiterer Natriumhydroxidlösung 40% auf pH 7,4 einstellen.  Mit Aquabidestillata auf 1000ml auffüllen.

Für die Präparate aus dem *M. latissimus dorsi* fand zur weiteren Konservierung nach der Gewinnung eine zwei Wochen dauernde Lagerung in der Fixierlösung statt.

Die Präparate wurden anschließend mit Kreuzen aus selbstgebogenen Drahtklammern definierter Größe markiert und in zwei Ebenen geröntgt (Optimus RAD, Bucky Diagnost TS, Philips medical systems, Hamburg, Deutschland und Kodak T-MAT Plus DG Röntgenfilme, Kodak, Rochester, New York, U.S.A.). Mit Hilfe eines Lineals konnte die genaue Position der Transplantate und Implantate am Röntgenbild ermittelt und auf die Tierteile übertragen werden. Schrittweise wurden die Präparate so durch Entfernung der nicht relevanten Strukturen verkleinert.

Die Präparate in endgültiger Größe wurden nochmals für eine Woche in 10%igem Formalin gelagert.

Im PSI<sup>®</sup>-Einbettautomaten (Pool of Scientific Instruments<sup>®</sup> Grünwald GmbH & Co KG, Laudenbach, Deutschland) wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und im Kühlschrank bei 6° Celsius mit Einbettmedium durchtränkt (Tabelle 6 und 7). Einzelne wurden die Präparate dann mit Einbettmedium in ein verschließbares Glas gefüllt und im Wärmebad bei 37° Celsius ausgehärtet.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Einbettmediums

Menge	Material
500 g	Methacrylsäuremethylester 99% (Fluka <sup>®</sup> , Sigma Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
3g	a-a-Azoisobutyronitril (Fluka <sup>®</sup> , Sigma Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
100 ml	Nonylphenol-polyethylenglycolacetate (Fluka <sup>®</sup> , Sigma Aldrich <sup>®</sup> Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
5 ml	Phthalsäuredibutylester (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland)

**Tabelle 7:** Einbettprotokoll

Reihenfolge	Einbettmedium	Temperatur	Zeit
1.	60% Ethanol	20° C	2 Stunden
2.	80% Ethanol	“	“
3.	90% Ethanol	“	4 Stunden
4.	96% Ethanol	“	5 Stunden
5.	100% Ethanol	“	4 Stunden
6.	1:1 Aceton-Ethanol	“	5 Stunden
7.	Ethanol	“	8 Stunden
8.	Reines Methylmetacrylat	“	10-24 Stunden
9.	Einbettmedium	6°C	10 Tage
10.	Einbettmedium	37°C	bis zur Aushärtung

Nach dem Aushärten der Präparate wurden die Gläser zerschlagen und die Präparate grob mit einer Tischbandsäge (Metabo<sup>®</sup>, Bochum, Deutschland) zugesägt. Um die exakte Position der mineralisierten Strukturen zu lokalisieren und die Schnittebene optimal (möglichst große Querschnitte) auszurichten, wurden wieder Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen angefertigt (Optimus RAD, Bucky Diagnost TS, Philips medical systems, Hamburg, Deutschland und Kodak T-MAT Plus DG Röntgenfilme, Kodak, Rochester, New York, U.S.A.). Die Schnittflächen wurden unter Verwendung von Silikonkarbidpapier absteigender Körnunggröße (500 bis 4000), mit einem DP-U4<sup>®</sup> Schleifgerät (Struers<sup>®</sup>, Erkrath, Deutschland) hochglanzpoliert.

Die polierte Fläche wurde auf mit Klebefolie beschichtete Objektträger (Technovit<sup>®</sup>, Exact, Norderstedt, Deutschland) geklebt und Schnitte von circa 120 µm gesägt.

Um die beim Sägen entstandenen Rauigkeiten zu beseitigen, erfolgte die Weiterbearbeitung elektronisch gesteuert mit einem Mikroschleifgerät (EXAKT Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) und manuell wieder mit dem Schleifgerät der Firma Struers<sup>®</sup>. Gleichzeitig wurde so auch die für die Mikroradiografien benötigte Schichtdicke von 80-90 µm erreicht. Die Schnitte wurden mit der Klebefolie vorsichtig von ihrem Objektträger gelöst, um Mikroradiographien anfertigen zu können.

In einer Dunkelkammer wurden die sich auf einer Folie befindlichen 80-90 µm dicken Präparatschnitte in engem Kontakt auf Mikroradiographieplatten (High Resolution Platten 1a mit 2000 Linien pro Millimeter Auflösungsvermögen (Kodak<sup>®</sup>, Rochester, New York, U.S.A.)) fixiert.

Im Mikroradiographieautomaten (Faxitron X-ray systems<sup>®</sup>, Hewlet Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) wurde bei einem Focusabstand von 16 cm eine 10 minütige Belichtung bei 3 mA und 25 kV der Platten durchgeführt. Anschließend wurden die Mikroradiographien mit Kodak<sup>®</sup> High Resolution Entwickler 1:4 entwickelt und mit Periomat Fixierkonzentrat (Kodak, Rochester, New York, U.S.A.) fixiert.

Das Ergebnis ist die Röntgenaufnahme eines histologischen Präparates.

Zum Schutz der Beschichtung wurden die Mikroradiographieplatten mit Deckgläschen und Einschussmittel (Eukitt, Milan AG, Basel, Schweiz) eingedeckelt.

Aufgrund der Graustufenunterschiede lässt sich in der Mikroradiographie neu gebildeter, junger und schwach mineralisierter Knochen gut gegen alten und stärker mineralisierten Knochen abgrenzen. Auf der Aufnahme erscheint neuer Knochen dunkler, da die schwache Mineralisation nur wenig Röntgenstrahlung absorbiert.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Schnitte mit ihrer folienfreien Seite auf neue Objektträger geklebt und in ihrer Dicke auf 30 µm reduziert (Mikroschleifgerät, EXAKT Apparatebau, Norderstedt, Deutschland und DP-U4<sup>®</sup> Schleifgerät, Struers<sup>®</sup>, Erkrath, Deutschland). Unter einer Quecksilberlampe konnten so die Präparate bei vierfacher Vergrößerung mit dem Mikrophot-FXA<sup>®</sup>-Fotomikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mikroskopiert, fotografiert und qualitativ analysiert werden.

Zur weiteren histologischen Auswertung wurden die Schiffe drei Minuten in 0,1%ige Ameisensäure getaucht, mit destilliertem Wasser zwischengespült und für 90 Minuten in

20%iges Methanol getaucht. Anschließend fand erneut eine Spülung mit destilliertem Wasser statt, um dann die Schnitte für zwei Minuten in einer Toluidinblaulösung zu färben. Zum Schutz wurden die Präparate wieder mit Deckgläschen abgedeckt.

### 3 ERGEBNISSE

Alle sechs Minischweine überlebten die gesamte Versuchsdauer komplikationsfrei, sie zeigten klinisch keinerlei Anzeichen einer Infektion oder Abstoßungsreaktionen vom ersten operativen Eingriff bis zur Perfundierung. Bei allen Versuchstieren heilten die Wunden reizlos ab. Die Tiere nahmen an Gewicht zu und verhielten sich der Norm entsprechend.

#### 3.1 In vitro Zellenachweis auf Bio-Oss®

Zum Nachweis der Osteoblastennatur der auf dem Bio-Oss® Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) befindlichen Zellen wurden Parallelkulturen angelegt und die Marker Osteocalcin, Hydroxylylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) bestimmt.

Die Osteocalcinfärbung der Zellen war positiv (Tabelle 10) und somit ein Nachweis für die Osteoblastennatur der Zellen auf dem Bio-Oss®.

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatographie, HPLC) konnten, wie in Tabelle 8, 9 und 10 dargestellt, die für Knochenkollagen Typ I spezifischen Quervernetzungen von HP und LP nachgewiesen werden, die während der Kollagenreifung entstehen. LP ist spezifisch für Knochen und Dentin (Eyre 1981).

In der Kontrollprobe des Bio-Oss® waren die Marker nicht nachweisbar.

**Tabelle 8:** Analyse der Hydroxylylpyridinolkonzentration (HP) in pmol/ml in den Mediumüberständen der Osteoblastenkultivation auf Bio-Oss® Granulat. Die Konzentrationsunterschiede waren <5%.

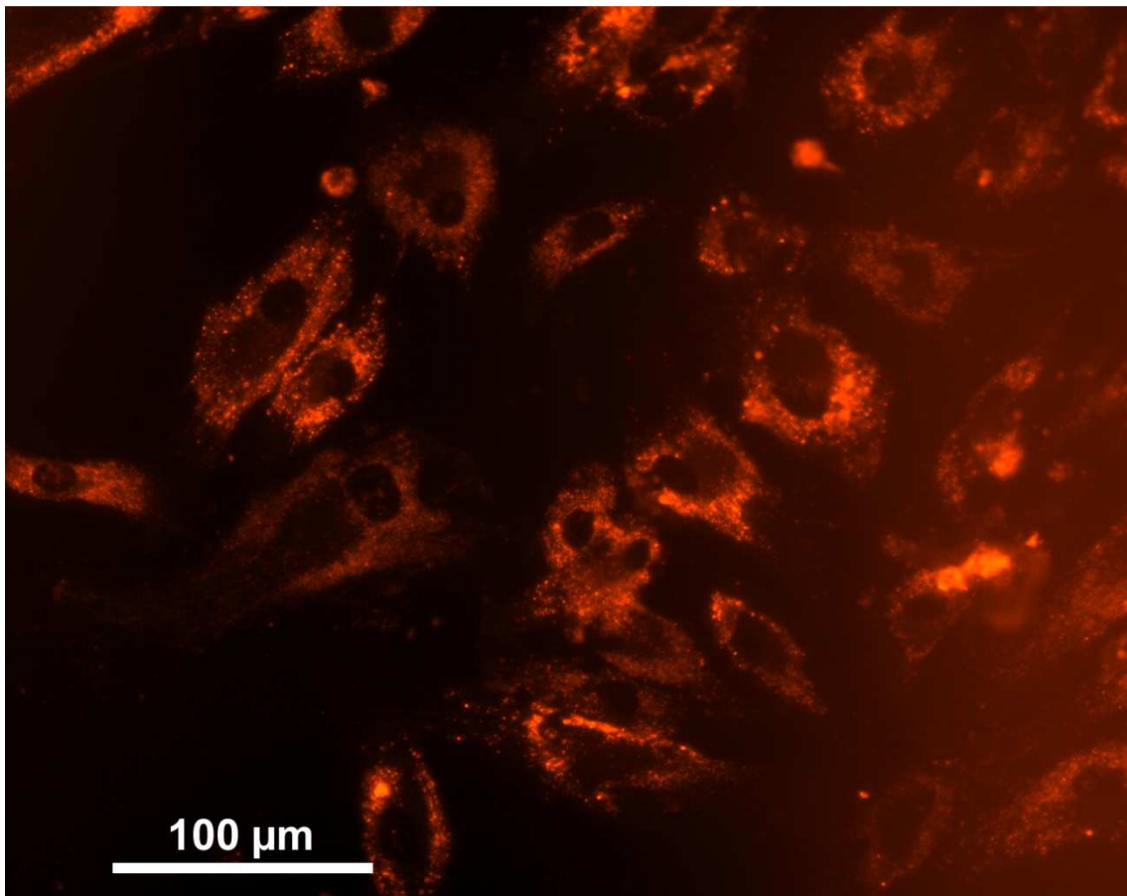
Tier	Messung A	Messung B	Messung C	Mittelwert
1	85,268	88,917	84,187	86,124
2	44,654	45,642	46,018	45,438
3	80,131	74,92	75,682	76,911
4	58,333	59,295	54,752	57,46
5	61,035	57,719	59,95	59,568
6	47,314	48,596	50,685	48,865

**Tabelle 9:** Analyse der Lysylpyridinolkonzentration (LP) in pmol/ml in den Mediumüberständen der Osteoblastenkultivation auf Bio-Oss® Granulat. Die Konzentrationsunterschiede waren <5%.

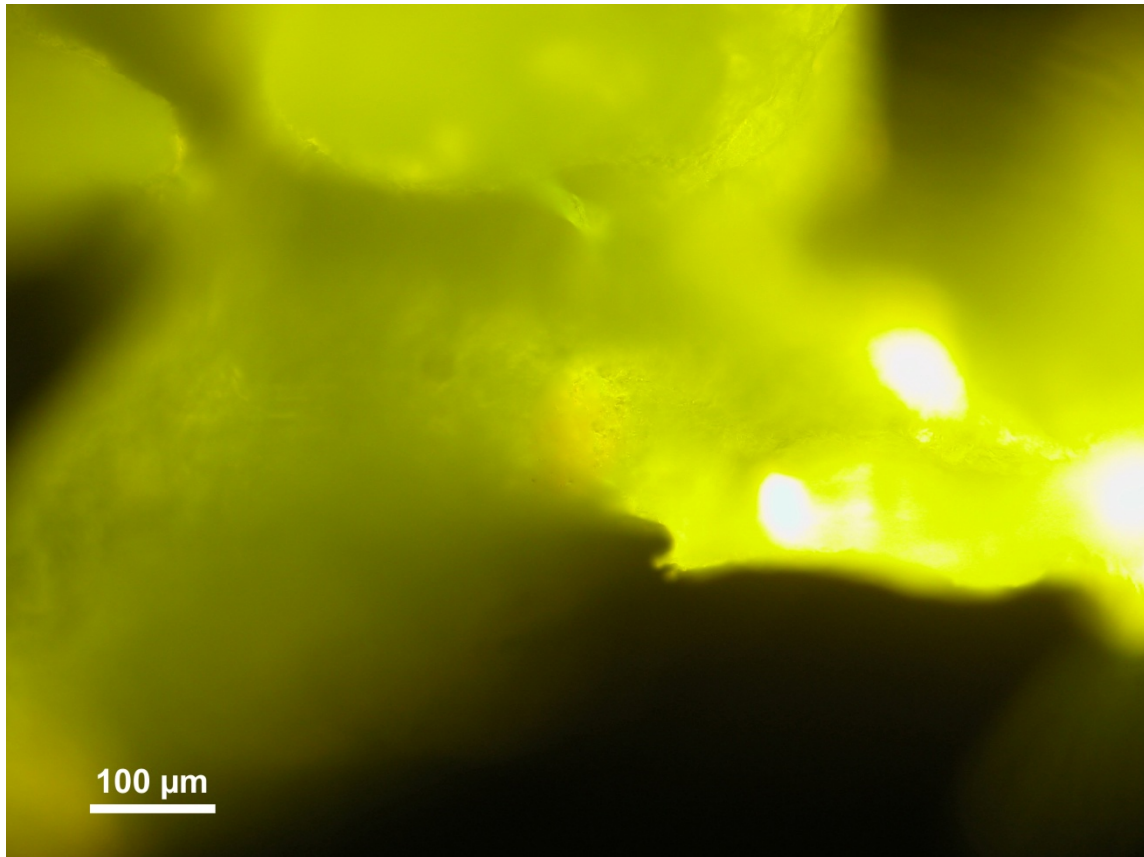
Tier	Messung A	Messung B	Messung C	Mittelwert
1	70,142	75,598	75,222	73,654
2	41,075	37,991	39,164	39,41
3	70,194	75,631	72,578	72,801
4	51,952	53,273	51,534	52,253
5	28,866	31,06	31,157	30,361
6	25,787	25,412	26,303	25,834

### 3.2 Vitalfärbung der Osteoblasten

Die mit dem Vitalfarbstoff PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gefärbten Osteoblasten (Abb. 1) konnten in den geborgenen Implantaten nicht mehr nachgewiesen werden (Tabelle 10). Stattdessen war die grünliche Eigenfluoreszenz des entkalkten Bio-Oss® Granulat zu beobachten (Abb. 2)



**Abbildung 1:** Durch Vitalfärbung mit PKH26 rot fluoreszierende Osteoblasten.



**Abbildung 2:** Der Kryoschnitt des Transplantates zeigt keinerlei rot fluoreszierende Osteoblasten, stattdessen die Eigenfluoreszenz des entkalkten Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat.

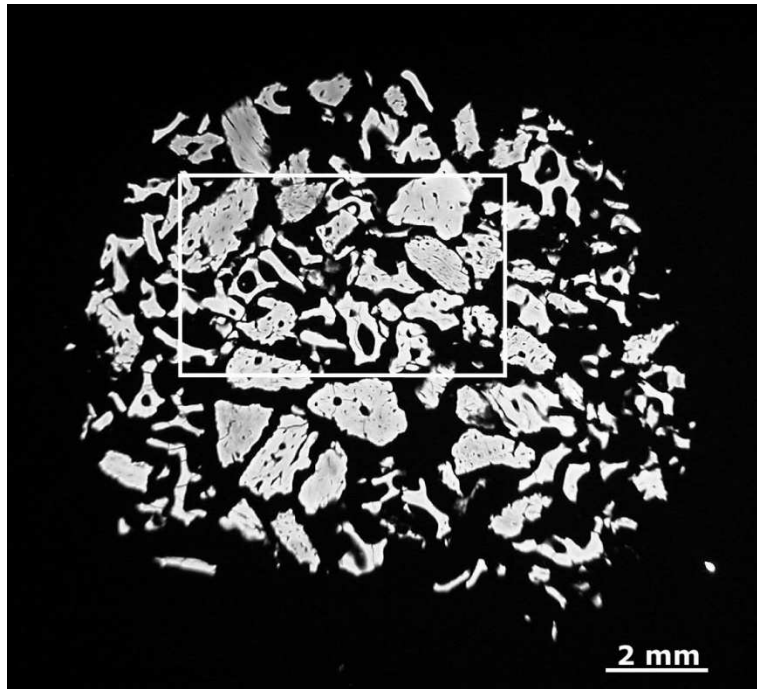
**Tabelle 10:** Übersicht der positiven (+) und negativen (-) Osteoblastennachweise durch Osteocalcinfärbung, der Marker Hydroxylylpyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Vitalfärbung (PKH26) für die einzelnen Versuchstiere.

Osteoblastennachweis	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Tier 6
Osteocalcin	+	+	+	+	+	+
HP	+	+	+	+	+	+
LP	+	+	+	+	+	+
PKH26	-	-	-	-	-	-

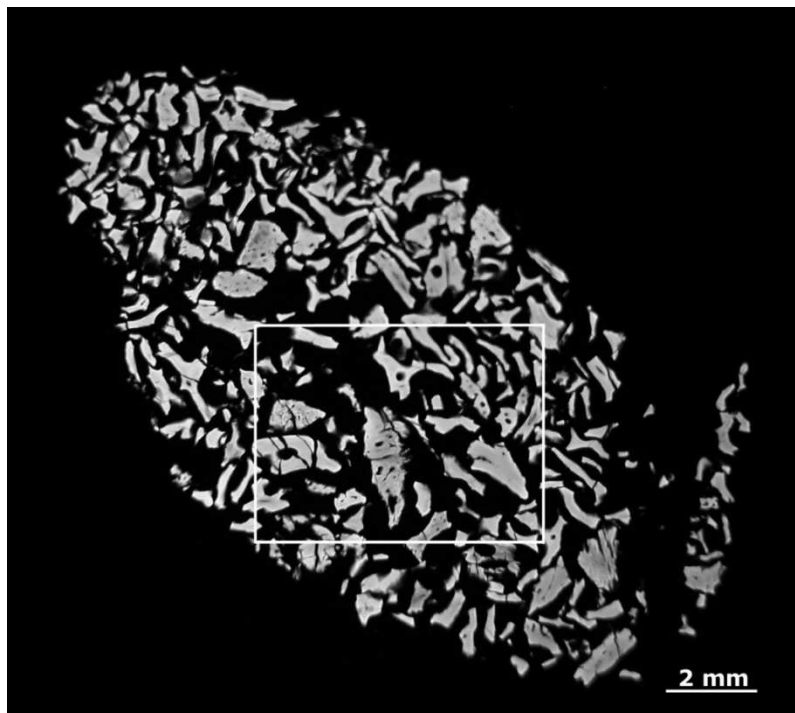
### 3.3 Mikroradiographie

In den Mikroradiographien sind ausschließlich Teile des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulates zu finden. Die Bildung von neuem Knochen konnte weder auf der Versuchs- (Abbildungen 3 und 5) noch auf der Kontrollseite (Abbildungen 4 und 6) beobachtet werden. So konnte kein Unterschied zwischen beiden Seiten festgestellt werden. Das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat zeigte beidseitig keinerlei Zeichen einer Dislokation.

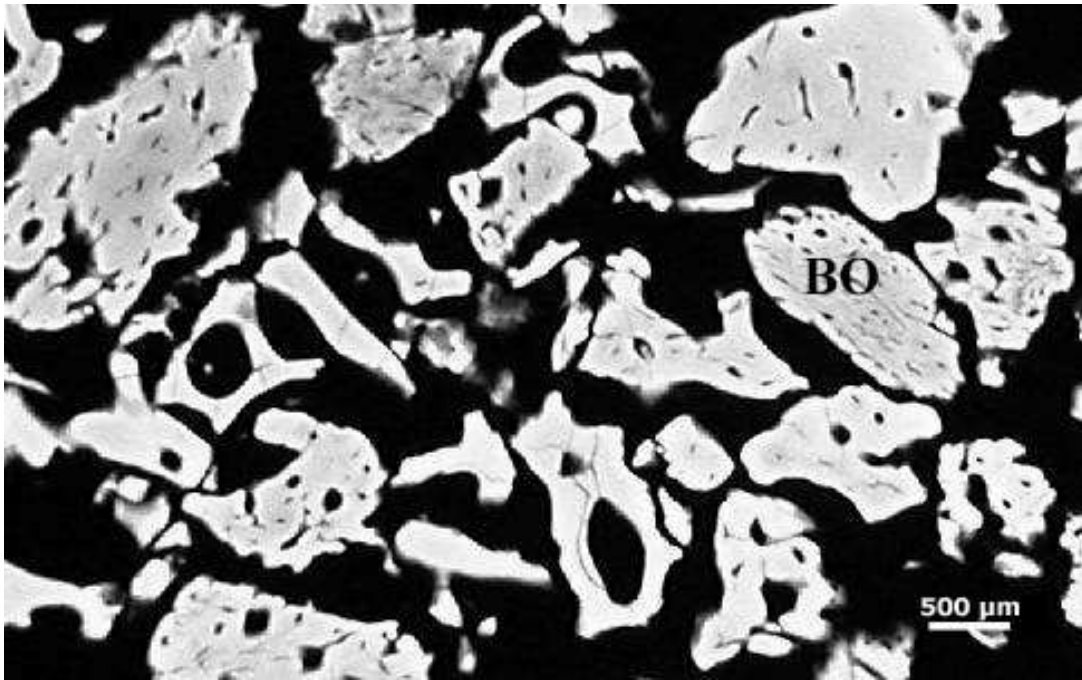




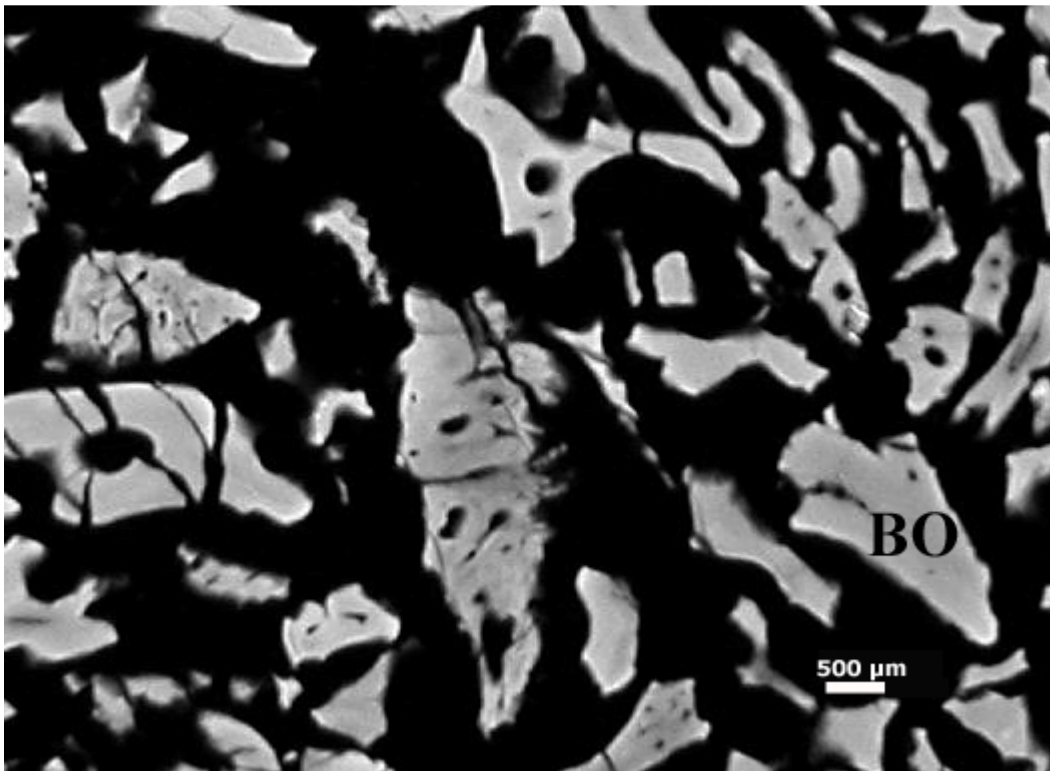
**Abbildung 3:** Mikroradiographie Versuchssseite, Übersichtsvergrößerung des gesamten Transplantates, es sind ausschließlich Teile des Bio-Oss® Granulates sichtbar, kein neugebildeter Knochen.



**Abbildung 4:** Mikroradiographie Kontrollseite, Übersichtsvergrößerung des gesamten Implantates, es sind ausschließlich Teile des Bio-Oss® Granulates sichtbar, kein neugebildeter Knochen.



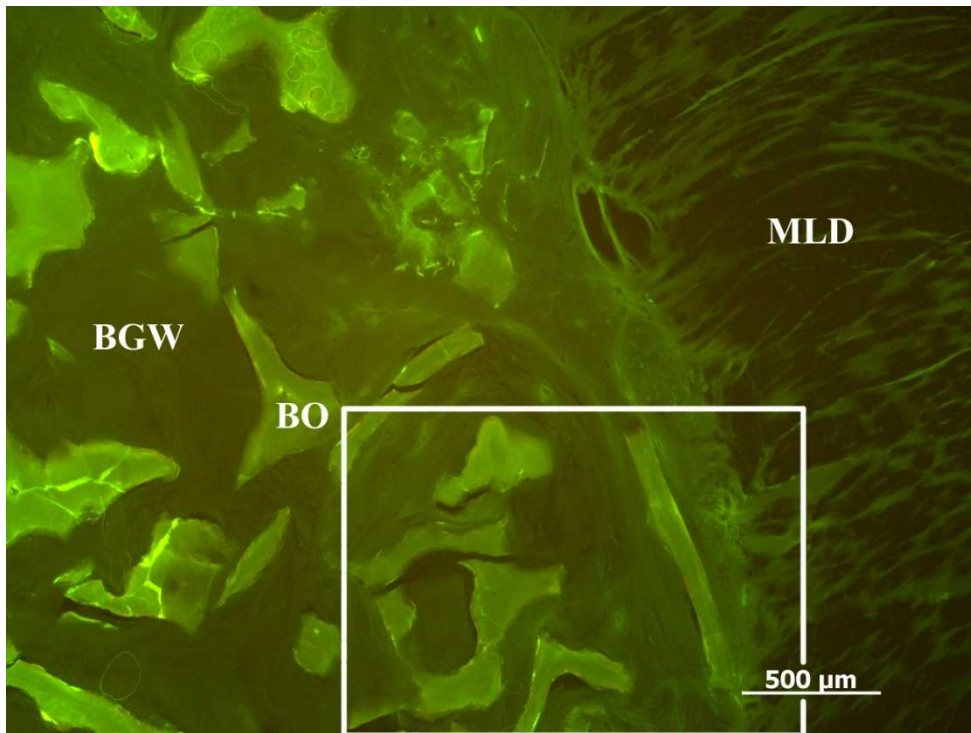
**Abbildung 5:** Mikroradiographie Versuchsseite, Detail aus Abbildung 3, das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (BO) erscheint ohne neugebildeten Knochen.



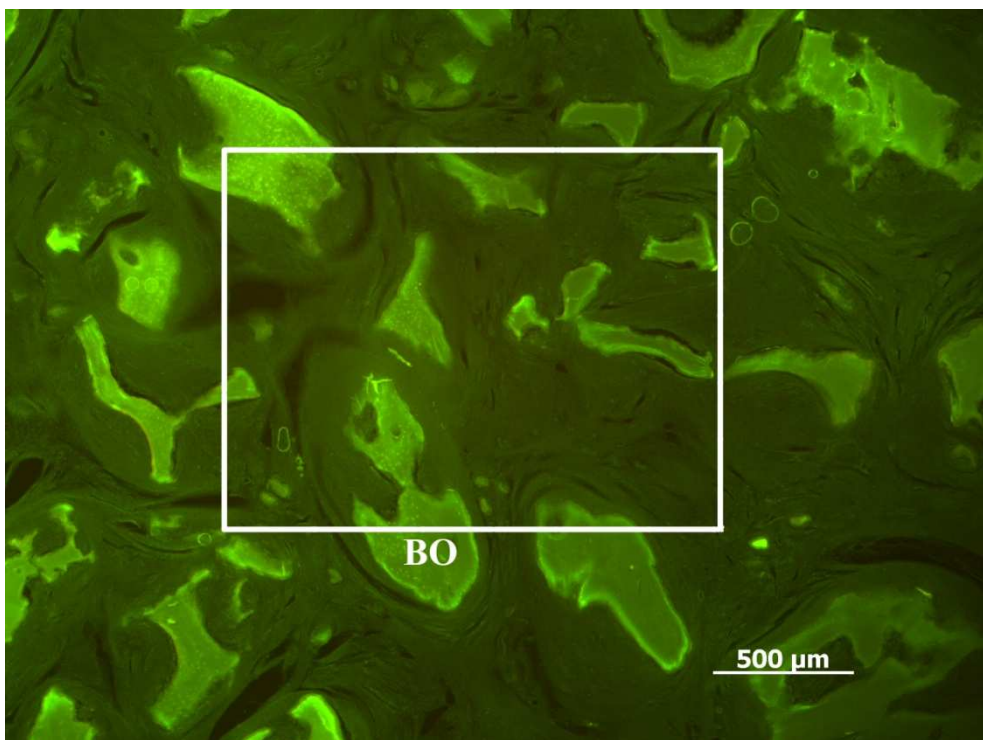
**Abbildung 6:** Mikroradiographie Kontrollseite, Detail aus Abbildung 4, das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (BO) erscheint ohne neugebildeten Knochen.

### **3.4 Fluoreszenzmikroskopie**

In der Fluoreszenzmikroskopie wurde das ausgebliebene Knochenwachstum auf der Versuchs- (Abbildungen 7 und 9) und auf der Kontrollseite (Abbildungen 8 und 10) durch das Fehlen von Farbbanden von der polychromen Sequenzmarkierung bestätigt. In allen Fällen zeigte das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) eine Eigenfluoreszenz. Die Transplantate beziehungsweise Implantate waren bindegewebig im Muskellager eingewachsen. Allgemein konnte kein Vorteil bei der Knochenbildung durch die vorgezüchteten Zellen gefunden werden.

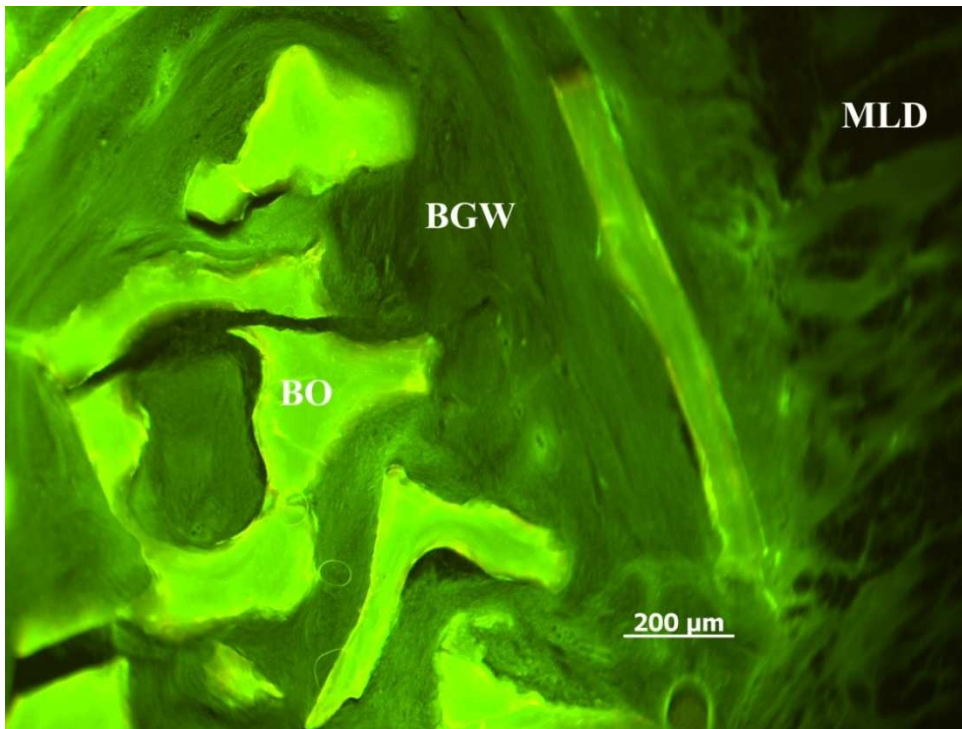


**Abbildung 7:** Fluoreszenzmikroskopie des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat Transplantates der Versuchsseite, die Stücke des Granulates (BO) sind in Bindegewebe (BGW) eingebaut, MLD = Musculus latissimus dorsi.

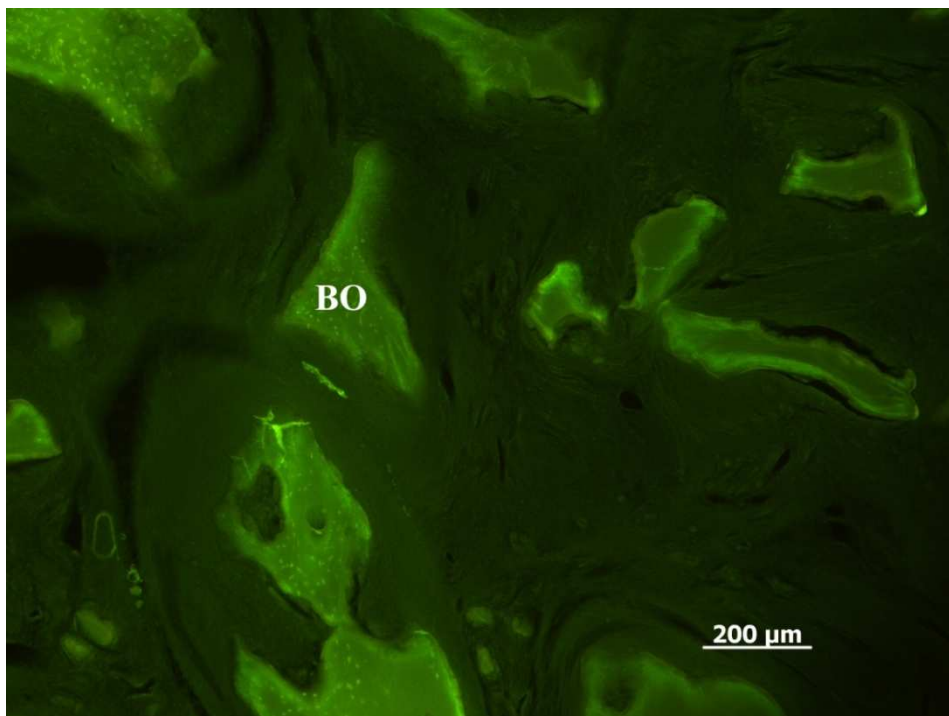


**Abbildung 8:** Fluoreszenzmikroskopie des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat Implantates der Kontrollseite, die Stücke des Granulates (BO) sind in Bindegewebe (BGW) eingebaut, MLD = Musculus latissimus dorsi.





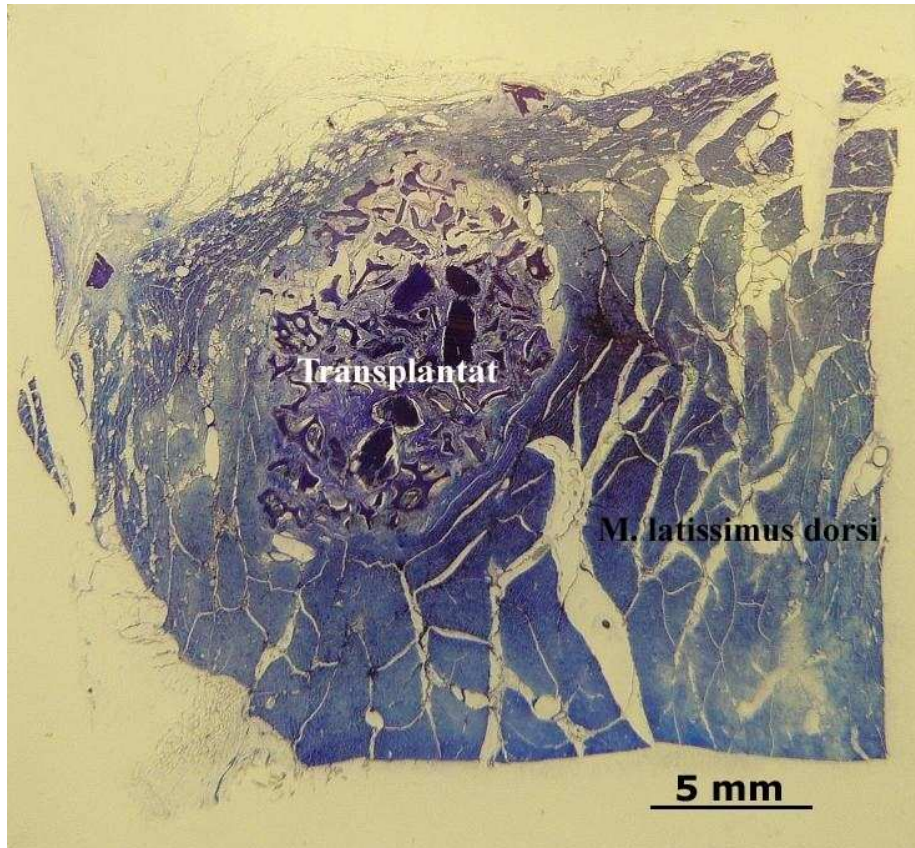
**Abbildung 9:** Fluoreszenzmikroskopie der Versuchsseite, Ausschnitt von Abbildung 7, die Stücke des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulates (BO) sind in Bindegewebe (BGW) eingebaut, es finden sich keine Markierungen durch die Fluoreszenz, MLD = Musculus latissimus dorsi.



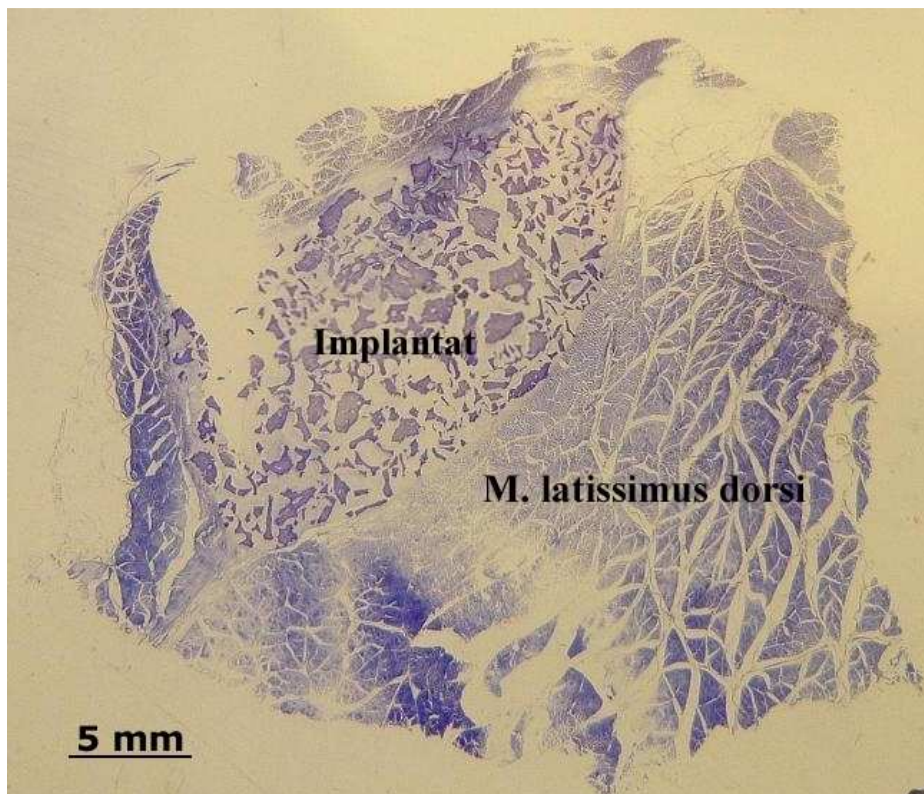
**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopie der Kontrollseite, Ausschnitt von Abbildung 8, die Stücke des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulates (BO) sind in Bindegewebe (BGW) eingebaut, es finden sich keine Markierungen durch die Fluoreszenz, MLD = Musculus latissimus dorsi.

### **3.5 Toluidinblau-Histologie**

Das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat war auf der Versuchs- und Kontrollseite (Abbildungen 11 bis 14) bindegewebig und mit vereinzelter Kapillarisierung in die Muskeltaschen des M. latissimus dorsi eingewachsen. Dislokationen waren nicht zu beobachten. Osteoblasten konnten nicht nachgewiesen werden. Das Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat zeigte teilweise eine oberflächliche Demineralisation oder deutliche Resorptionslakunen mit mehrkernigen Osteoklasten (Abbildung 15). Diese Zellen bildeten außerdem konzentrische Schichten um Reste des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulates, wie bei einem Fremdkörpergranulom. Die Granulome waren in einem faserreichen Gewebe eingebettet und von Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert (Abbildungen 16 und 17).

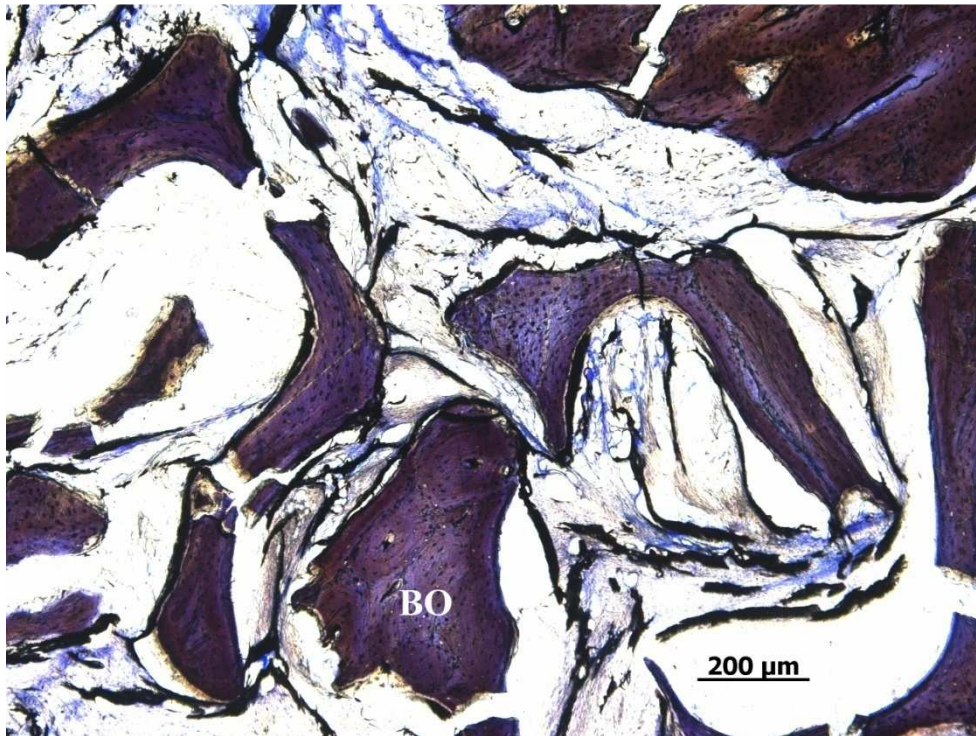


**Abbildung 11:** Toluidinblaufärbung des Bio-Oss® Granulat Transplantates der Versuchsseite, Übersichtsabbildung.



**Abbildung 12:** Toluidinblaufärbung des Bio-Oss® Granulat Implantates der Kontrollseite, Übersichtsabbildung.



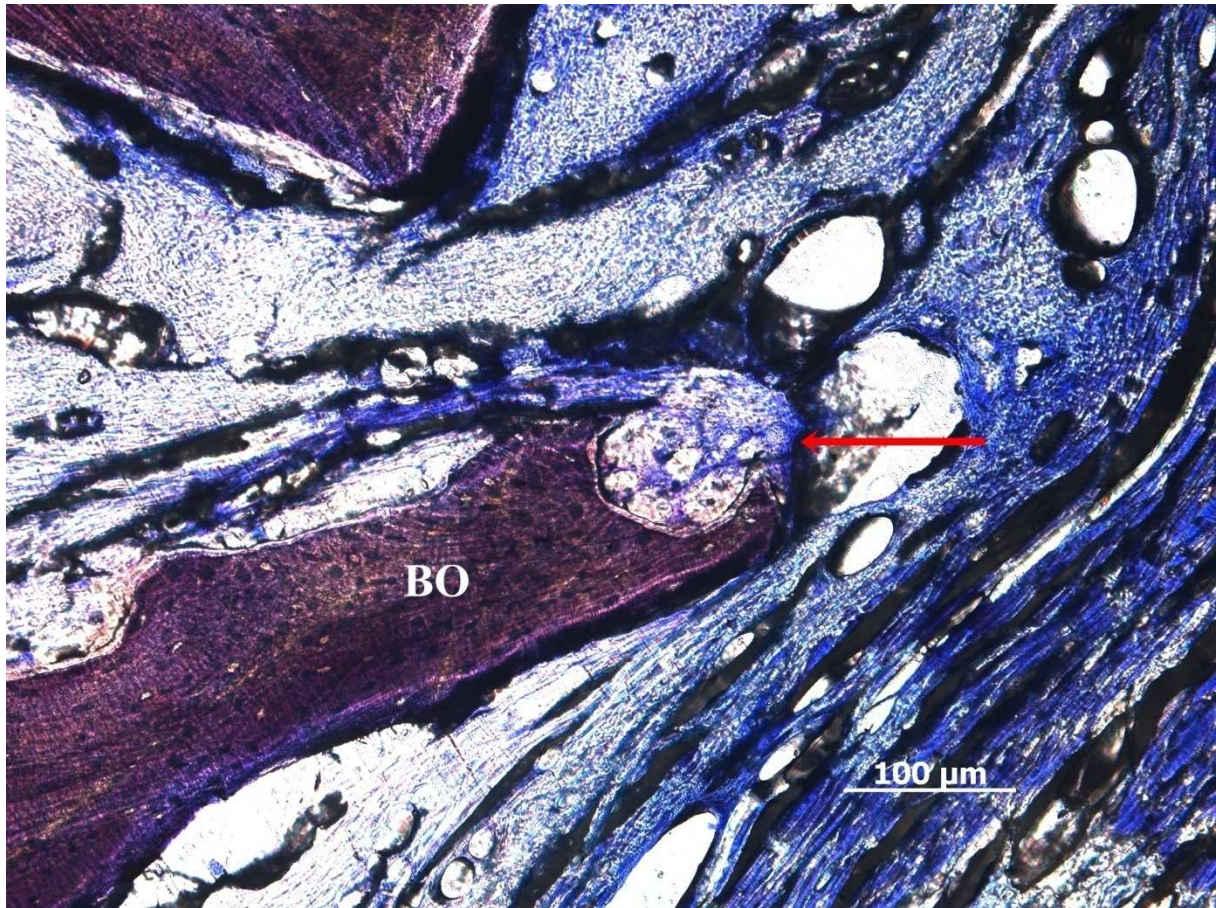


**Abbildung 13:** Toluidinblaufärbung des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (BO) Transplantates der Versuchsseite, die einzelnen Stücke des Granulates sind bindegewebig eingewachsen.



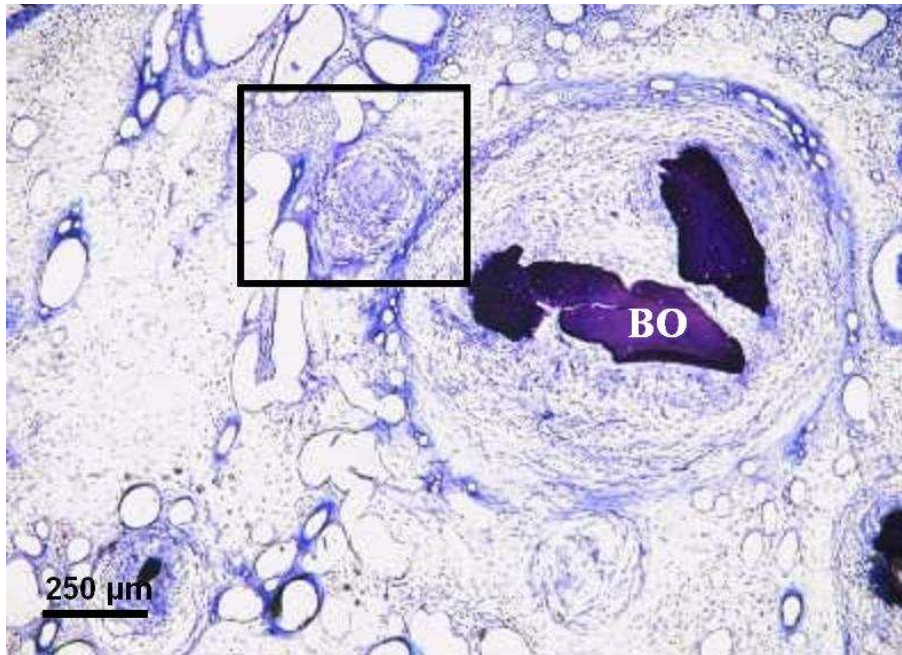
**Abbildung 14:** Toluidinblaufärbung des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (BO) Implantates der Kontrollseite, die einzelnen Stücke des Granulates sind bindegewebig eingewachsen.



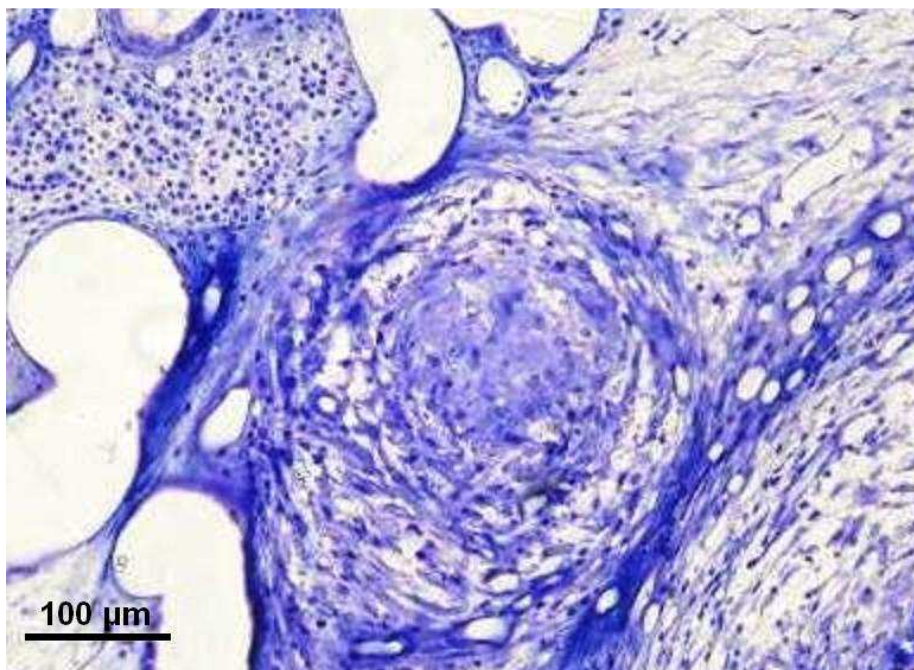


**Abbildung 15:** Toluidinblaufärbung des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulats (BO) mit Resorptionslakune und Osteoklast (Pfeil), Versuchsseite.





**Abbildung 16:** Toluidinblaufärbung mit Fremdkörperreaktion um stark oder vollständig abgebautes Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (BO).



**Abbildung 17:** Toluidinblaufärbung eines Fremdkörpergranuloms aus vielkernigen Zellen und Schichten von Fasergewebe mit Lymphozyteninfiltration.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurden bei sechs Göttinger Minischweinen *in vitro* gezüchtete, dreidimensionale autologe Osteoblastenkulturen dazu genutzt, vaskularisierte Knochentransplantate an einem ektopen Ort, dem *Musculus latissimus dorsi*, zu präfabrizieren. Im Vergleich wurde den Tieren auf einer Seite Bio-Oss® Graulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) mit Osteoblasten und auf der anderen Seite Bio-Oss® Granulat ohne Zellen eingepflanzt. Mit Osteoblasten besiedeltes Bio-Oss® Granulat zeigte keine Vorteile zu zellfreiem Bio-Oss® bei der Knochenformation innerhalb von sechs Wochen.

### 4.1 Beurteilung des Tiermodells

Es wurde berichtet, dass autogene osteogene Zellen wirksam die Knochenformation in Kleintier-Modellen verstärken. So beschreiben *Ohya et al.*, dass autogene mesenchymale Stammzellen/Trombozytenreiches Plasma (PRP) bei Kaninchen die Knochenapposition ähnlich verbessern wie autogene Spongiosa-Stückchen / PRP, was als eine vielversprechende Methode betrachtet wird (*Ohya et al.* 2005). Studien über die Präfabrikation eines Knochentransplantates in einem ektopen Lager eines Großtiers oder sogar am Menschen sind nach dieser Recherche nur aus der Kieler Arbeitsgruppe bekannt (*Terheyden et al.* 2001a, *Terheyden et al.* 2001b, *Terheyden et al.* 2004, *Warnke et al.* 2004). Insofern ist der Versuch der Präfabrikation von Knochentransplantaten an Großtiermodellen zukunftsweisend, wenn auch im Erfolg des jeweiligen Ansatzes noch schwer abschätzbar. Erfolgreiche Ergebnisse beim Minischwein wären bedeutsamer für den potentiellen klinischen Einsatz als in Kleintiermodellen, da das Minischwein dem Menschen ähnlicher ist. Das Göttinger Minischwein ähnelt in seiner Physiologie und Anatomie dem Menschen und macht daher eine Übertragbarkeit der Ergebnisse möglich (*Hönig* 1993). Der Mensch besitzt eine Knochenapposition von 0,9  $\mu\text{m}$ , die mit 1,2  $\mu\text{m}$  beim Schwein vergleichbar ist (*Hönig* 1993). Auch bei der hohen Gewebedurchblutung ähneln sich Mensch und Schwein (*Hönig* 1993). Obgleich das Minischwein dem Menschen in Physiologie und Anatomie ähnelt, kann man nicht von einer vollständigen Übertragbarkeit ausgehen.

### 4.2 Beurteilung des Transplantatlagers

Das Transplantatlager ist ein bestimmender Faktor, der das Verhalten der transplantierten Zellen erheblich beeinflusst. In Tiermodellen, bei denen segmentale Knochendefekte (*Petite*

et al. 2000, Schliephake et al. 2001, Fialkov et al. 2003, Abukawa et al. 2004), Alveolarknochendefekte (Weng et al. 2006) und kraniale Defekte (van den Dolder et al. 2003) mit einer an osteoinduktiven Faktoren, Nährstoffen und sauerstoffreichen Umgebung untersucht wurden, konnte eine Beschleunigung und Verbesserung der Knochenbildung der osteogenen Zellen beschrieben werden. Über den Musculus latissimus dorsi zur Präfabrikation von Knochen liegen bisher nur wenige Ergebnisse und diese ausschließlich aus den Kieler Arbeitsgruppen der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie vor (Terheyden et al. 2001a, Terheyden et al. 2001b, Warnke et al. 2004).

Im vorliegenden Modell fand in der anfänglichen Phase nach der Transplantation die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion aus dem umgebenden Gewebe statt. Da eine solche Diffusionsversorgung jedoch nur innerhalb eines Radius von 200 µm möglich ist (Folkman & Hochberg 1973, Goldstein et al. 2001), stellte der absolute Durchmesser des Transplantates von circa 2 cm in dieser Studie eine große Herausforderung für die Zellen dar. Zusätzlich ist von einer sehr langsamen Einsprossung neuer Gefäße aus der Umgebung in das Transplantat auszugehen, worauf eine Vaskularisierungsrate von 0,09-0,25 mm/Tag in einem Kaninchenmodell hindeutet (Zawicki et al. 1981).

Daher ist es möglich, dass die vorgezüchteten Zellen aufgrund von Sauerstoff- und Nährstoffmangel nach der Transplantation abgestorben sind. Ein beträchtlicher Verlust an *in vivo* transplantierten Osteoblasten innerhalb der ersten Woche wurde ursächlich durch die Sauerstoff- und Nährstoffknappheit beschrieben (Kneser et al. 2006). So könnten viele der gezüchteten Zellen eine Phase der akuten Sauer- und Nährstoffknappheit erfahren haben und abgestorben sein, noch bevor sie durch Gefäßeinsprossung ernährt werden konnten. Eine Ausnahme hätten dabei die in direkter Nachbarschaft zum Transplantatlager stehenden Zellen bilden können. Das Überleben der Osteoblasten bis sechs Wochen nach Implantation konnte jedoch auch durch die Vitalfärbung mit PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) nicht nachgewiesen werden.

#### **4.3 Beurteilung der dreidimensionalen autologen Osteoblastenkultur**

Die bisherigen Untersuchungen zur Präfabrikation von Knochen am Großtier nutzten BMP 7 beziehungsweise BMP 7 und Knochenmark als Zusatz zum Bio-Oss<sup>®</sup> (Terheyden et al. 2001a, Terheyden et al. 2001b, Terheyden et al. 2004, Warnke et al. 2004). Es konnte daher nicht gezeigt werden, ob osteogene Zellen beziehungsweise ihre Vorläufer oder BMPs ursächlich an den erfolgversprechenden Ergebnissen beteiligt waren (Warnke et al. 2004). Obwohl bisher noch nicht bekannt ist, welche osteogenen Zellen sich am Besten zur

Generierung von Knochengewebe eignen, sind sie integraler Bestandteil der Konzepte für bioartifiziellen Knochen (Kneser et al. 2006). Die in dieser Studie verwendeten autologen Osteoblasten konnten keinen neuen Knochen bilden. Der Mangel an osteogenen Faktoren im Transplantatlager könnte zu dem Verlust der Osteogenizität der Osteoblasten beitragen. Knochenwachstum ist das Ergebnis eines konstanten Zusammenspiels zwischen Wachstumsfaktoren, Cytokinen und osteogenen Zellen (Robey et al. 1993, Reddi 1998a, Lieberman et al. 2002). Osteoinduktive Faktoren wie BMPs haben die Fähigkeit, die Proliferation und Differenzierung von transplantierten osteogenen Zellen zu modulieren (Kneser et al. 2006). Deshalb hängt vermutlich die osteogene Funktion der Osteoblasten von der kontinuierlichen Stimulation durch BMPs ab (Hu et al. 2005). Da Wachstumsfaktoren vom gewünschten Wirkungsort schnell weg diffundieren, sind intelligente Transportsysteme von entscheidender Bedeutung (Hollinger et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurden keine osteoinduktiven Faktoren in vivo verwendet, und Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) selbst fehlt die Osteoinduktivität, daher waren die gezüchteten Osteoblasten eventuell nicht in der Lage, die osteogenen Funktionen aufrecht zu erhalten. Die Verwendung von BMPs ist jedoch insgesamt kritisch zu bewerten, da neuere Studien auch kanzerogene Eigenschaften aufgezeigt haben (Dai et al. 2008, Gordon et al. 2008, Liu et al. 2008).

Die zu beobachtende Fremdkörperreaktion in den Präparaten mit Bildung von Granulomen um die Reste des Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Abbildungen 16 und 17) ist bemerkenswert, da es sich um ein gut dokumentiertes und weit verbreitetes Knochenersatzmaterial handelt. Durch seine Vorbehandlung ist es antigenfrei und es sind bisher keine derartigen Fremdkörperreaktionen bekannt (Wetzel et al. 1995, Berglundh & Lindhe 1997, Terheyden et al. 1999, Wiltfang et al. 2004). Um das Risiko einer Antigenreaktion mit dem zellbesiedelten Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat zu vermeiden, wurde bei der Kultivierung statt des üblichen fetalen Kälberserums autologes Serum verwendet. Die Quelle dieser Reaktion ist unklar, wirft aber die Frage auf, ob der Zellkultivierungsprozess dafür verantwortlich sein kann.

Die Arbeiten diverser Autoren haben gezeigt, dass der Einsatz des in dieser Studie verwendeten Knochenersatzmaterials (Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz)) in verschiedenen klinischen Situationen das Wachstum von neuem Knochen in ossären Defekten erleichtern kann (Wetzel et al. 1995, Berglundh & Lindhe 1997, Terheyden et al. 1999, Wiltfang et al. 2004). Es weist gute osteokonduktive Eigenschaften auf (Rey 1990, Begley et al. 1993, Valdres et al. 1995, Acil et al. 2000, Artzi et al. 2002, Haas et al. 2002). Dies ist von Bedeutung, da bei der Gewinnung autologer Transplantate ein neuer, zum

Teil beträchtlicher Knochendefekt geschaffen wird. Dieser kann weitere Morbidität nach sich ziehen und begrenzt so die zu entnehmende Menge. Trotzdem sind Knochenersatzmaterialien nicht unumstritten, beim Einsatz von allogenen Materialien sowohl aufgrund ethischer und psychologischer Gründe als auch dem Restrisiko von eventuellen Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Cook et al. 1995) und Hepatitis. Xenogene Materialien sind zum Beispiel durch die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) in die Diskussion geraten. Allogene und xenogene Materialien haben zwar keine Osteogenizität (Cooper et al. 2001), aber eine dem autologen Knochen vergleichbare Elastizität und biomechanische Stabilität.

Eine weitere mögliche Ursache für das unterbliebene Knochenwachstum in dieser Studie kann der Verlust der Osteogenizität der Osteoblasten bereits nach der Transplantation sein. Es ist möglich, dass osteogene Zellen nach wiederholtem Passagieren ihr osteogenes Potential verlieren (Muraglia et al. 2000). Es ist aber unwahrscheinlich, dass dies bei den Osteoblasten der vorliegenden Studie vor der Transplantation *in vivo* passierte, seit dem sie von der zweiten Passage geerntet wurden. Die positive Osteocalcinfärbung und der Nachweis von Hydroxylsilylpyridinolin (HP) und Lsilylpyridinolin (LP) bei den parallel kultivierten Zellen scheinen dies zu beweisen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter der Sauer- und Nährstoffknappheit nach der Transplantation die meisten Osteoblasten ihr osteogenes Potential möglicher Weise verloren haben, selbst wenn sie die mangelhafte Versorgung überlebt haben.

Das Ergebnis könnte auch zeigen, dass die Größe des transplantierten Volumens durch mangelhafte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kritisch für das Überleben und die osteogenen Funktionen der transplantierten dreidimensionalen autologen Osteoblastenkultur war (Folkman & Hochberg 1973, Zawicki et al. 1981, Goldstein et al. 2001).

Zumindest waren die ursprünglich transplantierten und mit dem Vitalfarbstoff PKH26 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) markierten Osteoblasten nach der sechswöchigen Einheilungsphase nicht mehr nachzuweisen.

Ein weiterer kritischer Faktor ist die Zahl und Dichte der Zellen auf dem Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat. Die Anzahl und Konzentration der osteogenen Zellen in einem Gerüst ist ausschlaggebend für die erfolgreiche Knochenbildung *in vivo* (Hernigou et al. 2005a, Hernigou et al. 2005b). Es wurde gezeigt, dass es den Zellen möglich war, sich auf Bio-Oss<sup>®</sup>-Oberflächen zu vereinigen, nachdem sie sechs Wochen wie in den Kulturbedingungen dieser Studie gezüchtet wurden (Acil et al. 2000). Allerdings wurden die Zellen in dieser Studie nur eine Woche auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat kultiviert. Daher ist es denkbar, dass die Zelldichte auf dem Bio-Oss<sup>®</sup>

Granulat nicht hoch genug war, um die Knochenneubildung signifikant zu verbessern. Die vorliegende Studie am Minischwein zeigt, dass die dreidimensionalen Osteoblastenkulturen keine Knochenapposition herbeiführen konnten.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im vorliegenden Modell dreidimensionale autologe Osteoblastenkulturen keinen Knochen bilden konnten. Zusätzliche Maßnahmen wie der Zusatz von angiogenen Faktoren, die die Angiogenese im Transplantatgebiet beschleunigen oder der Zusatz von osteoinduktiven Faktoren wie BMPs, unter Berücksichtigung der unkontrollierten Proliferation, könnten helfen, dass die Osteoblasten die Knochenneubildung verstärken.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Versorgung angeborener oder erworbener Knochendefekte und die damit verbundene Wieder- Herstellung von Funktion, Belastbarkeit und Ästhetik spielt für die Lebensqualität von Patienten eine große Rolle. Gleichzeitig stellt dies für die Chirurgie jedoch eine bedeutende Herausforderung dar.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Knochenbildung nach Transplantation von in vitro präfabrizierten, dreidimensionalen autologen Knochenzellkulturen in einem ektopen Lager zu untersuchen.

Systematische Versuche am Großtier sind notwendig für das Verständnis der Knochenregeneration im Tissue engineering, um so klinische Alternativen zu konventionellen autologen Knochentransplantaten zu finden.

Verschiedene Studien haben die Möglichkeiten der Präfabrikation von Ersatzgeweben aufgezeigt (Cao et al. 1997, Campbell et al. 1999, Kamil et al. 2004, Warnke et al. 2004).

Es stellte sich die Frage, ob in vitro gezüchtete, dreidimensionale autologe Osteoblastenkulturen zur extraskelletalen Präfabrikation eines gefäßgestielten osteomuskulären Transplantats geeignet sind. Der Vorteil bezüglich der Knochenwachstumsqualität und -quantität wurde gegenüber einem Kontrollimplantat, welches ausschließlich aus Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) bestand, untersucht. Bei sechs ausgewachsenen Minischweinen wurde in einer ersten Operation Knochenspongiosa entnommen. Die daraus gewonnenen Zellen wurden mit einem osteogenen Nährmedium, das durch autologes Serum ergänzt wurde, so kultiviert, dass die Anzucht reiner Osteoblastenkulturen gefördert wurde (Acil et al. 2000). Die Osteoblasten wurden auf Bio-Oss<sup>®</sup> Granulat (Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz) für eine Woche gezüchtet und die osteogenen Marker Hydroxylsilylpyridinolin (HP) Lsilylpyridinolin (LP) und Osteocalcin bestimmt. Diese dreidimensionale autologe Osteoblastenkultur wurde nach sechs Wochen in einer zweiten Operation in eine Muskeltasche des Musculus latissimus dorsi der Schweine transplantiert. Nach einer Einheilungszeit von weiteren sechs Wochen wurden die Tiere geopfert. Die Präparate wurden gewonnen und mit Hilfe von Mikroradiographien, Fluoreszenzmikroskopie und Toluidinblau-Histologie ausgewertet.

Die autologen dreidimensionalen Osteoblastenkulturen zeigten keinen Unterschied zu den Kontrollimplantaten. Es konnte kein Knochenwachstum beobachtet werden. Mit einem Vitalfarbstoff markierte Osteoblasten waren nach Einheilung nicht mehr nachweisbar.

Die vorliegende Studie am Minischwein zeigt, dass die dreidimensionalen autologen Osteoblastenkulturen die Knochenapposition nicht signifikant verbessern konnten.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abukawa, H., Shin, M., Williams, W.B., Vacanti, J.P., Kaban, L.B. & Troulis, M.J., (2004)** Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* **62**: 601-606.
- Acil, Y., Springer, I.N., Broek, V., Terheyden, H. & Jepsen, S., (2002)** Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. *J Cell Biochem* **86**: 90-98.
- Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B. & Jepsen, S., (2000)** Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* **51**: 703-710.
- Aho, A.J., Ekfors, T., Dean, P.B., Aro, H.T., Ahonen, A. & Nikkanen, V., (1994)** Incorporation and clinical results of large allografts of the extremities and pelvis. *Clin Orthop Relat Res*: 200-213.
- Ahrendt, G., Chickering, D.E. & Ranieri, J.P., (1998)** Angiogenic growth factors: A review for tissue engineering. *Tissue Eng.* **2**: 117-130.
- Albrektsson, T. & Johansson, C., (2001)** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* **10 Suppl 2**: S96-101.
- Altmeppen, J., Hansen, E., Bonnländer, G.L., Horch, R.E. & Jeschke, M.G., (2004)** Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res* **117**: 202-207.
- Anthony, J.P., Foster, R.D., Kaplan, M.J., Singer, M.I. & Pogrel, M.A., (1997)** Fibular free flap reconstruction of the "true" lateral mandibular defect. *Ann Plast Surg* **38**: 137-146.
- Arrington, E.D., Smith, W.J., Chambers, H.G., Bucknell, A.L. & Davino, N.A., (1996)** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*: 300-309.
- Artzi, Z., Nemcovsky, C.E. & Dayan, D., (2002)** Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological stainings in 10 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* **13**: 420-427.
- Aubin, J.E., (1998a)** Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* **76**: 899-910.
- Aubin, J.E., (1998b)** Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 73-82.
- Banic, A., Krejci, V., Erni, D., Petersen-Felix, S. & Sigurdsson, G.H., (1997)** Effects of extradural anesthesia on microcirculatory blood flow in free latissimus dorsi musculocutaneous flaps in pigs. *Plast Reconstr Surg* **100**: 945-955; discussion 956.
- Banwart, J.C., Asher, M.A. & Hassanein, R.S., (1995)** Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* **20**: 1055-1060.

- Baud, C.A., (1968)** Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. *Clin Orthop Relat Res* **56**: 227-236.
- Baudet, J., Guimberteau, J.C. & Nascimento, E., (1976)** Successful clinical transfer of two free thoraco-dorsal axillary flaps. *Plast Reconstr Surg* **58**: 680-688.
- Begley, C.T., Doherty, M.J., Hankey, D.P. & Wilson, D.J., (1993)** The culture of human osteoblasts upon bone graft substitutes. *Bone* **14**: 661-666.
- Behrens, E., Kreuzsch, Th., Jonas, S. & Silbernagel, E., (2001)** Komplikationen bei und nach Knochenentnahme aus dem Beckenkamm. *Dtsch Zahnärztl Z* **56**: 66-68.
- Belanger, L.F., (1969)** Osteocytic osteolysis. *Calcif Tissue Res* **4**: 1-12.
- Berglundh, T. & Lindhe, J., (1997)** Healing around implants placed in bone defects treated with bio-oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **8**: 117-124.
- Breitbart, A.S., Grande, D.A., Kessler, R., Ryaby, J.T., Fitzsimmons, R.J. & Grant, R.T., (1998)** Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* **101**: 567-574; Discussion 575-566.
- Bruder, S.P. & Caplan, A.I., (1990)** Terminal differentiation of osteogenic cells in the embryonic chick tibia is revealed by a monoclonal antibody against osteocytes. *Bone* **11**: 189-198.
- Bruder, S.P., Fink, D.J. & Caplan, A.I., (1994)** Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* **56**: 283-294.
- Bruder, S.P. & Fox, B.S., (1999)** Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res*: S68-83.
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. & Recker, R., (1996a)** Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* **45**: 371-386.
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. & Recker, R., (1996b)** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* **45**: 387-399.
- Campbell, J.H., Efendy, J.L. & Campbell, G.R., (1999)** Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity. *Circ Res* **85**: 1173-1178.
- Cao, Y., Vacanti, J.P., Paige, K.T., Upton, J. & Vacanti, C.A., (1997)** Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* **100**: 297-302; Discussion 303-294.
- Cassidy, C., Jupiter, J.B., Cohen, M., Delli-Santi, M., Fennell, C., Leinberry, C., Husband, J., Ladd, A., Seitz, W.R. & Constanz, B., (2003)** Norian SRS cement compared

with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *J Bone Joint Surg Am* **85-A**: 2127-2137.

**Cetiner, S., Esen, E., Ustun, Y., Oztunc, H. & Tuncer, I., (2003)** Long-term results of the application of solvent-dehydrated bone xenograft and duramater xenograft for the healing of oroantral osseous defects: A pilot experimental study. *Dent Traumatol* **19**: 30-35.

**Chawla, K., Klein, T.J., Schumacher, B.L., Schmidt, T.A., Voegtline, M.S., Thonar, E.J., Masuda, K. & Sah, R.L., (2006)** Tracking chondrocytes and assessing their proliferation with pkh26: Effects on secretion of proteoglycan 4 (PRG4). *J Orthop Res* **24**: 1499-1508.

**Chen, F., Ouyang, H., Feng, X., Gao, Z., Yang, Y., Zou, X., Liu, T., Zhao, G. & Mao, T., (2005)** Anchoring dental implant in tissue-engineered bone using composite scaffold: A preliminary study in nude mouse model. *J Oral Maxillofac Surg* **63**: 586-591.

**Cook, S.D., Salkeld, S.L. & Prewett, A.B., (1995)** Simian immunodeficiency virus (human HIV-II) transmission in allograft bone procedures. *Spine* **20**: 1338-1342.

**Cooper, L.F., Harris, C.T., Bruder, S.P., Kowalski, R. & Kadiyala, S., (2001)** Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res* **80**: 314-320.

**Cooper, L.F., Masuda, T., Yliheikkila, P.K. & Felton, D.A., (1998)** Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* **13**: 163-174.

**Dai, J., Hall, C. L., Escara-Wilke, J., Mizokami, A., Keller, J. M. & Keller E. T. (2008)** Prostate cancer induces bone metastasis through WNT-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.* **68**(14): 5785-94.

**Ducy, P., (2000)** CBFA1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* **219**: 461-471.

**Ducy, P. & Karsenty, G., (1998)** Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 614-619.

**Ebraheim, N.A., Elgafy, H. & Xu, R., (2001)** Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg* **9**: 210-218.

**Eiselt, P., Kim, B.S., Chacko, B., Isenberg, B., Peters, M.C., Greene, K.G., Roland, W.D., Loeb sack, A.B., Burg, K.J., Culberson, C., Halberstadt, C.R., Holder, W.D. & Mooney, D.J., (1998)** Development of technologies aiding large-tissue engineering. *Biotechnol Prog* **14**: 134-140.

**Elcin, Y.M., Dixit, V. & Gitnick, G., (2001)** Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs* **25**: 558-565.

- Ewers, R., (2005)** Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: A clinical report of long-term results. *J Oral Maxillofac Surg* **63**: 1712-1723.
- Eyre, D.R. (1981)** Crosslink maturation in bone collagen. In: A. Veiss, ed. *The chemistry and biology of mineralized connective tissue*, 51-55. New York: Elsevier North Holland.
- Fialkov, J.A., Holy, C.E., Shoichet, M.S. & Davies, J.E., (2003)** In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg* **14**: 324-332.
- Folkman, J. & Hochberg, M., (1973)** Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* **138**: 745-753.
- Fuchs, G., Stegemann, H. & Eger, W., (1963)** [Transplanted bone chips and their quality after partial and complete deproteinization in preserved inorganic substance.]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir* **303**: 240-260.
- Fuerst, G., Strbac, G.D., Vasak, C., Tangl, S., Leber, J., Gahleitner, A., Gruber, R. & Watzek, G., (2009)** Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? *Clin Oral Implants Res* **20**: 135-139.
- Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F. & Watzek, G., (2004)** Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: Preliminary findings. *Clin Oral Implants Res* **15**: 733-740.
- Gazdag, A.R., Lane, J.M., Glaser, D. & Forster, R.A., (1995)** Alternatives to autogenous bone graft: Efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* **3**: 1-8.
- Gimbel, M., Ashley, R.K., Sisodia, M., Gabbay, J.S., Wasson, K.L., Heller, J., Wilson, L., Kawamoto, H.K. & Bradley, J.P., (2007)** Repair of alveolar cleft defects: Reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. *J Craniofac Surg* **18**: 895-901.
- Goldstein, A.S., Juarez, T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C. & Mikos, A.G., (2001)** Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**: 1279-1288.
- Gordon, K.J., Kirkbride, K.C., How, T. & Blobe, G.C., (2008)** Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase protein-2. *Carcinogenesis*.
- Groger, A., Klaring, S., Merten, H.A., Holste, J., Kaps, C. & Sittinger, M., (2003)** Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: Preliminary study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **37**: 129-133.
- Haas, R., Baron, M., Donath, K., Zechner, W. & Watzek, G., (2002)** Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* **17**: 337-346.

- Harii, K., Ohmori, K. & Sekiguchi, J., (1976)** The free musculocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg* **57**: 294-303.
- Heinegard, D. & Oldberg, A., (1989)** Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* **3**: 2042-2051.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F. & Rouard, H., (2005a)** Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* **87**: 1430-1437.
- Hernigou, P., Poignard, A., Manicom, O., Mathieu, G. & Rouard, H., (2005b)** The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br* **87**: 896-902.
- Hollinger, J.O., Uludag, H. & Winn, S.R., (1998)** Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev* **31**: 303-318.
- Hönig, J., Merten, HA (1993)** Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der humanmedizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol* **2**: 237-243.
- Horan, P.K., Melnicoff, M.J., Jensen, B.D. & Slezak, S.E., (1990)** Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol* **33**: 469-490.
- Houben, R., Soute, B.A., Knapen, M.H. & Vermeer, C., (1997)** Strategies for developing human osteocalcin standards: A critical evaluation. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **227**: 100-104.
- Howaldt, H.P. & Bitter, K., (1990)** [Total tongue replacement by a microsurgical latissimus dorsi transplant.]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* **35**: 53-54.
- Hu, Z., Peel, S.A., Ho, S.K., Sandor, G.K. & Clokie, C.M., (2005)** Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. *J Craniofac Surg* **16**: 1006-1014.
- Huang, S. & Ingber, D.E., (1999)** The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol* **1**: E131-138.
- Jande, S.S. & Belanger, L.F., (1971)** Electron microscopy of osteocytes and the pericellular matrix in rat trabecular bone. *Calcif Tissue Res* **6**: 280-289.
- Jensen, S.S., Aaboe, M., Pinholt, E.M., Hjorting-Hansen, E., Melsen, F. & Ruyter, I.E., (1996)** Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* **11**: 55-66.

- Jupiter, J.B., Winters, S., Sigman, S., Lowe, C., Pappas, C., Ladd, A.L., Van Wagoner, M. & Smith, S.T., (1997)** Repair of five distal radius fractures with an investigational cancellous bone cement: A preliminary report. *J Orthop Trauma* **11**: 110-116.
- Kamil, S.H., Vacanti, M.P., Aminuddin, B.S., Jackson, M.J., Vacanti, C.A. & Eavey, R.D., (2004)** Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. *Laryngoscope* **114**: 867-870.
- Kang, E.J., Byun, J.H., Choi, Y.J., Maeng, G.H., Lee, S.L., Kang, D.H., Lee, J.S., Rho, G.J. & Park, B.W., (2009)** In vitro and in vivo osteogenesis of porcine skin-derived mesenchymal stem cell-like cells with a demineralized bone and fibrin glue scaffold. *Tissue Eng Part A*.
- Karsenty, G., (2001)** Minireview: Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* **142**: 2731-2733.
- Kneser, U., Kaufmann, P.M., Fiegel, H.C., Pollok, J.M., Kluth, D., Herbst, H. & Rogiers, X., (1999)** Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J Biomed Mater Res* **47**: 494-503.
- Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E. & Horch, R.E., (2006)** Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* **10**: 7-19.
- Kübler, N.R., (1997)** Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* **1**: 2-25.
- Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D. & Robey, P.G., (1997)** Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* **12**: 1335-1347.
- Langer, R. & Vacanti, J.P., (1993)** Tissue engineering. *Science* **260**: 920-926.
- Lendeckel, S., Jodicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J.K., Hedrick, M.H., Berthold, L. & Howaldt, H.P., (2004)** Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report. *J Craniomaxillofac Surg* **32**: 370-373.
- Leonhardt, H., (1990)** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. In Taschenbuch der gesamten Anatomie, Bd. 3, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 137ff.
- Lian, J.B. & Stein, G.S., (1995)** Development of the osteoblast phenotype: Molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J* **15**: 118-140.
- Lieberman, J.R., Daluiski, A. & Einhorn, T.A., (2002)** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* **84-A**: 1032-1044.

- Liu, F., Bloch, N., Bhushan, K.R., De Grand, A.M., Tanaka, E., Solazzo, S., Mertyna, P.M., Goldberg, N., Frangioni, J.V. & Lenkinski, R.E., (2008)** Humoral bone morphogenetic protein 2 is sufficient for inducing breast cancer microcalcification. *Mol Imaging* **7**: 175-186.
- Lobo Gajiwala, A., Agarwal M., Puri, A., D`Lima C. Duggal, A., (2003)** Reconstructing tumor defects: Lysophilised, irradiated bone allografts. *Cell Tissue Bank* **4**: 109-118.
- Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R. & Petite, H., (2005)** Engineering bone: Challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* **9**: 72-84.
- Maddox, E., Zhan, M., Mundy, G.R., Drohan, W.N. & Burgess, W.H., (2000)** Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng* **6**: 441-448.
- Mankani, M.H., Kuznetsov, S.A., Wolfe, R.M., Marshall, G.W. & Robey, P.G., (2006)** In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: Reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells* **24**: 2140-2149.
- Marx, R.E. & Garg, A.K., (1998)** Bone structure, metabolism, and physiology: Its impact on dental implantology. *Implant Dent* **7**: 267-276.
- Mesimaki, K., Lindroos, B., Tornwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S. & Suuronen, R., (2009)** Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by gmp adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* **38**: 201-209.
- Miller, M.J. & Schusterman, M.A., (1997)** Secondary deformities following mandibular reconstruction. *Clin Plast Surg* **24**: 551-563.
- Moghadam, H.G., Sandor, G.K., Holmes, H.H. & Clokie, C.M., (2004)** Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg* **62**: 202-213.
- Mundy, G.R., (1996)** Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Relat Res*: 24-28.
- Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R., (2000)** Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113** (Pt 7): 1161-1166.
- Nomura, S. & Takano-Yamamoto, T., (2000)** Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* **19**: 91-96.
- Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M. & Ueda, M., (2005)** Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with prp complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* **16**: 622-629.

- Olsen, B.R., Reginato, A.M. & Wang, W., (2000)** Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 191-220.
- Owen, M., (1970)** The origin of bone cells. *Int Rev Cytol* **28**: 213-238.
- Ozaki, T., Hillmann, A., Wuisman, P. & Winkelmann, W., (1997)** Reconstruction of tibia by ipsilateral vascularized fibula and allograft. 12 cases with malignant bone tumors. *Acta Orthop Scand* **68**: 298-301.
- Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.S., Lindenhayn, K., Burmester, G.R. & Sittering, M., (2000)** Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* **21**: 1145-1153.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L. & Guillemin, G., (2000)** Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* **18**: 959-963.
- Picard-Ami, L.A., Jr., Thomson, J.G. & Kerrigan, C.L., (1990)** Critical ischemia times and survival patterns of experimental pig flaps. *Plast Reconstr Surg* **86**: 739-743; Discussion 744-735.
- Pietrzak, W.S., Perns, S.V., Keyes, J., Woodell-May, J. & McDonald, N.M., (2005)** Demineralized bone matrix graft: A scientific and clinical case study assessment. *J Foot Ankle Surg* **44**: 345-353.
- Pradel, W., Eckelt, U. & Lauer, G., (2006)** Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: Comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **101**: 285-290.
- Pradel, W., Mai, R., Manolo Hagedorn, G., Lauer, G. & Allegrini, S., Jr., (2008)** The biomaterial influences the ossification after sinus floor elevation using tissue-engineered bone grafts. *Biomed Tech (Berl)* **53**: 224-228.
- Probst, A. & Spiegel, H.U., (1997)** Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* **10**: 77-86.
- Reddi, A.H., (1998a)** Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*: S66-72.
- Reddi, A.H., (1998b)** Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* **16**: 247-252.
- Reuther, J.F., Bill, J.S., (1998)** Plastische- und wiederherstellende Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie In: Horch, H.-H. (Hrsg.): Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie II, Praxis der Zahnheilkunde, Bd. 10/II, Urban und Schwarzenberg, München, 771, 779.



- Rey, C., (1990)** Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials* **11**: 13-15.
- Riediger, D., Ehrenfeld, M., (1995)** Mikrochirurgie. 3, 2 (Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie), Heidelberg, Springer.
- Robey, P.G., Fedarko, N.S., Hefferan, T.E., Bianco, P., Vetter, U.K., Grzesik, W., Friedenstein, A., Van der Pluijm, G., Mintz, K.P., Young, M.F. & et al., (1993)** Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* **8 Suppl 2**: S483-487.
- Romeis, B. (1968)** Knochengewebe *Mikroskopische technik*. München, Wien: R. Oldenbourg Verlag.
- Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., di Lauro, A.E., D'Agostino, E. & Claudio, P.P., (2005)** Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* **63**: 766-770.
- Sassard, W.R., Eidman, D.K., Gray, P.M., Block, J.E., Russo, R., Russell, J.L. & Taboada, E.M., (2000)** Augmenting local bone with grafton demineralized bone matrix for posterolateral lumbar spine fusion: Avoiding second site autologous bone harvest. *Orthopedics* **23**: 1059-1064; discussion 1064-1055.
- Schantz, J.T., Teoh, S.H., Lim, T.C., Endres, M., Lam, C.X. & Hutmacher, D.W., (2003)** Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system. *Tissue Eng* **9 Suppl 1**: S113-126.
- Schiebler, T.H., Schmidt, W., Zilles, K., (1999)** Anatomie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 137.
- Schimming, R. & Schmelzeisen, R., (2004)** Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* **62**: 724-729.
- Schliephake, H., Knebel, J.W., Aufderheide, M. & Tauscher, M., (2001)** Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: An experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**: 531-537.
- Schmelzle, R., (1978)** Konservierte Transplantate in der Kiefer und Gesichtsregion, Hanser.
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C.L. & Pape, H.C., (2009)** [Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications]. *Unfallchirurg* **112**: 785-794; quiz 795.
- Schroeder, H.E., (1992)** Orale Strukturbiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart- New York, 203, 204ff.
- Shayesteh, Y.S., Khojasteh, A., Soleimani, M., Alikhasi, M., Khoshzaban, A. & Ahmadbeigi, N., (2008)** Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded

into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **106**: 203-209.

**Shea, K.G., Coleman, D.A., Scott, S.M., Coleman, S.S. & Christianson, M., (1997)** Microvascularized free fibular grafts for reconstruction of skeletal defects after tumor resection. *J Pediatr Orthop* **17**: 424-432.

**Shin, H., Jo, S. & Mikos, A.G., (2003)** Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**: 4353-4364.

**Shpitzer, T., Neligan, P., Boyd, B., Gullane, P., Gur, E. & Freeman, J., (1997)** Leg morbidity and function following fibular free flap harvest. *Ann Plast Surg* **38**: 460-464.

**Sikavitsas, V.I., van den Dolder, J., Bancroft, G.N., Jansen, J.A. & Mikos, A.G., (2003)** Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *J Biomed Mater Res A* **67**: 944-951.

**Smiler, D.G. & Holmes, R.E., (1987)** Sinus lift procedure using porous hydroxyapatite: A preliminary clinical report. *J Oral Implantol* **13**: 239-253.

**Soucacos, P.N., Johnson, E.O. & Babis, G., (2008)** An update on recent advances in bone regeneration. *Injury* **39 Suppl 2**: S1-4.

**Springer, I.N., Nocini, P.F., Schlegel, K.A., De Santis, D., Park, J., Warnke, P.H., Terheyden, H., Zimmermann, R., Chiarini, L., Gardner, K., Ferrari, F. & Wiltfang, J., (2006)** Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: Steps into clinical application. *Tissue Eng* **12**: 2649-2656.

**Stangenberg, L., Schaefer, D.J., Buettner, O., Ohnolz, J., Mobest, D., Horch, R.E., Stark, G.B. & Kneser, U., (2005)** Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: Quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng* **11**: 855-864.

**Stein, G.S., Lian, J.B. & Owen, T.A., (1990)** Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* **4**: 3111-3123.

**Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Van Wijnen, A.J. & Montecino, M., (1996)** Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* **76**: 593-629.

**Swartz, W.M., Banis, J.C., Newton, E.D., Ramasastry, S.S., Jones, N.F. & Acland, R., (1986)** The osteocutaneous scapular flap for mandibular and maxillary reconstruction. *Plast Reconstr Surg* **77**: 530-545.

**Tabata, Y., (2003)** Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng* **9 Suppl 1**: S5-15.

- Tansini, I., (1896)** Nuovo processo per l'amputazione della mamella canero. *Riforma Medica*.
- Terheyden, H., Jepsen, S., Moller, B., Tucker, M.M. & Rueger, D.C., (1999)** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* **10**: 510-521.
- Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S. & Rueger, D.R., (2001a)** Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: An experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**: 373-379.
- Terheyden, H., Menzel, C., Wang, H., Springer, I.N., Rueger, D.R. & Acil, Y., (2004)** Prefabrication of vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1-part 3: Dosage of rhop-1, the use of external and internal scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**: 164-172.
- Terheyden, H., Warnke, P., Dunsche, A., Jepsen, S., Brenner, W., Palmie, S., Toth, C. & Rueger, D.R., (2001b)** Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: An experimental study in miniature pigs. Part II: Transplantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**: 469-478.
- Thorwarth, M., Wehrhan, F., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A., (2006)** Prp modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* **38**: 30-40.
- Tillmann, B., Töndury, G., (1987)** Bewegungsapparat. In Leonhardt, H , Tillmann, B., Töndury, G., Zilles, K. (Hrsg.): Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen, Bd. 1, Thieme, Stuttgart 371-372.
- Timmer, M.D., Shin, H., Horch, R.A., Ambrose, C.G. & Mikos, A.G., (2003)** In vitro cytotoxicity of injectable and biodegradable poly(propylene fumarate)-based networks: Unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules* **4**: 1026-1033.
- Traianedes, K., Russell, J.L., Edwards, J.T., Stubbs, H.A., Shanahan, I.R. & Knaack, D., (2004)** Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **70**: 21-29.
- Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R. & Okazaki, Y., (2005)** Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent* **25**: 129-137.

- Urist, M.R., DeLange, R.J. & Finerman, G.A., (1983)** Bone cell differentiation and growth factors. *Science* **220**: 680-686.
- Valdre, G., Mongiorgi, R., Ferrieri, P., Corvo, G., Cattaneo, V. & Tartaro, G.P., (1995)** [Scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis (EDS) applied to the study of biomaterials for dental use. 6]. *Minerva Stomatol* **44**: 55-68.
- van den Dolder, J., Farber, E., Spauwen, P.H. & Jansen, J.A., (2003)** Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **24**: 1745-1750.
- Warnke, P.H., Springer, I.N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M., Russo, P.A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E. & Terheyden, H., (2004)** Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* **364**: 766-770.
- Weng, Y., Wang, M., Liu, W., Hu, X., Chai, G., Yan, Q., Zhu, L., Cui, L. & Cao, Y., (2006)** Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. *Tissue Eng* **12**: 1503-1513.
- Wetzel, A.C., Stich, H. & Caffesse, R.G., (1995)** Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* **6**: 155-163.
- Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R. & Schlegel, K.A., (2004)** Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* **15**: 187-193.
- Wolff, K.D., (2006)** Plastische und Rekonstruktive Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie. Urban und Fischer, München und Jena, 779.
- Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T. & Nagasaka, T., (2004)** Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* **15**: 589-597.
- Yang, Q., Peng, J., Guo, Q., Huang, J., Zhang, L., Yao, J., Yang, F., Wang, S., Xu, W., Wang, A. & Lu, S., (2008)** A cartilage ECM-derived 3-D-porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with pkh26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **29**: 2378-2387.
- Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. & Chua, C.K., (2002)** The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng* **8**: 1-11.
- Zawicki, D.F., Jain, R.K., Schmid-Schoenbein, G.W. & Chien, S., (1981)** Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res* **21**: 27-47.

**Zijderveld, S.A., Zerbo, I.R., van den Bergh, J.P., Schulten, E.A. & ten Bruggenkate, C.M., (2005)** Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**: 432-440.

**Zizelmann, C., Schoen, R., Metzger, M.C., Schmelzeisen, R., Schramm, A., Dott, B., Bormann, K.H. & Gellrich, N.C., (2007)** Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. *Clin Oral Implants Res* **18**: 69-73.

## 7 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG

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

Herrn  
 PD Dr. Dr. Hendrik Terheyden  
 Klinik für Mund-, Kiefer- und  
 Gesichtschirurgie  
 Universitätsklinikum 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 20.01.2004

Mein Zeichen / vom

V 742-72241.121-14 (15-2/04)

Telefon (0431)

988-7128

Datum

. März 2004

Herr Buttchereit

### Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Terheyden,

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

In vitro Präfabrikation von Knochentransplantaten durch dreidimensionale  
 Zellzüchtung zur Sinusbodenaugmentation am Minischwein

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 12 Schweine verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. März 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 PD Dr. Dr. H. Terheyden

4. Sein Stellvertreter:

Herr Dr. Dr. Ingo 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 (GVObI. 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

## 8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Terheyden danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang (Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel und der wissenschaftlichen Laboratorien.

Herrn Prof. Dr. Dr. I. Springer und Dr. Dr. B. Möller danke ich für die Unterstützung im experimentell-operativen Teil der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. E. Behrens für Ihre uneigennützigte Hilfe und Anregungen bei Fertigstellung der Dissertationsschrift.

Für die fachkundige Einweisung und Beratung beim Herstellen der Präparate gilt Frau M. Herrmann (MTA) mein freundschaftlicher Dank.

Den Tierpflegern der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel und Ernährung des Versuchsgutes Schädtkbek, namentlich Herrn H. Fischer, danke ich für die vorbildliche Betreuung der Versuchstiere und tatkräftige Unterstützung.

Meinen Co-Doktoranden Herrn O. Winkler, Herrn J. Voß, Herrn G. Hackmann und Frau U. Semrau danke ich für die gegenseitige Unterstützung.

Den Damen der Röntgenabteilung, Frau B. von Spreter, Frau M. Khalaj, Frau I. Oestreich und Frau A. Woyczikowski danke ich für ihre freundliche und unkomplizierte Hilfe.

Herrn Dr. Y. Liu danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Für die Hilfe in Computerfragen danke ich meinem Kollegen Hagen Vöhrs.

Für alle kleinen, aber dennoch wichtigen Unterstützungen danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Y. Açil, Frau A. Benning, Herrn K. Hartung von Hartungen, Frau J. Nau, Frau G. Neßenius, Frau G. Otto, Frau PD Dr. B. Schäfer, Frau B. Stenger, Frau Dr. S. Stolzmann, Herrn PD Dr. W. Stolzmann und Frau Dr. E. Wirsching.



## 9 LEBENSLAUF

### Persönliche Angaben

Name: Christian Andres Schneider  
 Geburtsdatum: 12.04.1979  
 Geburtsort: Erfurt  
 Familie: Vater: Reinhard Schneider, Lehrer  
 Mutter: Christine Schneider, geb. Roggow, Zahnärztin  
 Bruder: Jan Schneider, Architekt

### Schulbildung

1985-1989 50. Polytechnische Oberschule „Pablo Neruda“, Erfurt  
 1989 Ausbürgerung aus der Deutschen Demokratischen Republik  
 1989-1998 Christian-Dietrich-Grabbe-Gymnasium, Detmold  
 06/1998 Abitur (allgemeine Hochschulreife)

### Ausbildung

1998-2006 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 12/2006 Zahnmedizinisches Staatsexamen an der Christian-Albrechts-Universität zu  
 Kiel  
 12/2006 Approbation

### Beruflicher Werdegang

04/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Zahnerhaltungskunde und  
 Parodontologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des  
 Universitätsklinikums Schleswig-Holstein-Campus Kiel, Christian-  
 Albrechts-Universität zu Kiel (Prof. Dr. C. Dörfer)

### Wissenschaft

06/2004 Beginn der Arbeit zu vorliegenden experimentellen Studie in der  
 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. H. Terheyden

## 10. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Abstracts

#### Erstautor

**Schneider, C. A., Drosos, Z., Calic, I., Kern, M., Dörfer C., Eberhard J. (2008)**

Marginal adaptation of adhesive systems following different cavity disinfectants

*IADR Program Book* (Abstr. No. 0965)

**Schneider, C. A., Stolzmann, S., Dörfer, C. (2009)**

Apikaler Stop mit MTA nach orthograder Revision bei erfolgloser WSR

*Autoreferate-Band 23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für*

*Zahnerhaltung*, ISBN 978-3-86611-433-3, 64

#### Zweitautor

**Eberhard, J., Schneider, C., Drosos, Z. Calic, I., Kern, M., Dörfer, C. (2008)**

Kavitätendesinfektionsmaßnahmen haben einen negativen Einfluss auf die marginale

Adaptation von Dentinadhäsiven

*Autoreferate-Band 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für*

*Zahnerhaltung*, ISBN 978-3-86611-406-7, 47

### Publikation der vorliegenden Arbeit

Wesentliche Teile der Dissertationsschrift wurden in der nachfolgend bezeichneten Originalarbeit publiziert - Namensnennung in Danksagung:

**Liu, Y., Springer, I. N. G., Zimmermann, C. E., Açil, Y., Scholz-Ahrens, K.,**

**Wiltfang J., Terheyden, H. (2008)**

Missing osteogenic effect of expanded autogenous osteoblast-like cells in a minipig model of sinus augmentation with simultaneous dental implant installation.

*Clin. Oral Impl. Res.* **19**; 497-504