

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

**„Etablierung eines Messverfahrens zum Monitoring von
Sauerstoff, pH und Wirbelstrominduktion während der
heterotopen Osteoinduktion“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
David William Christofzik
aus Bremen

Kiel **2012**

1. Berichterstatter: PD Dr. Dr. Becker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wenz

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.08.2012

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

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Versuchsablauf	7
2.2	Computertomografische Untersuchung	10
2.3	Opto-chemische Sensoren	11
2.3.1	<i>pH-Messung.....</i>	13
2.3.2	<i>Sauerstoff-Messung.....</i>	14
2.4	Wirbelstrom.....	15
2.5	Präparateherstellung.....	18
2.5.1	<i>Hartschliffpräparat-Herstellung (Methylmethacrylat)</i>	18
2.5.2	<i>Toluidinblaufärbung.....</i>	20
2.5.3	<i>Paraffinpräparate</i>	20
2.5.4	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....</i>	21
2.5.5	<i>Masson-Goldner-Trichromfärbung.....</i>	22
2.5.6	<i>Immunhistochemische Färbung gegen CD31 (PECAM-1).....</i>	22
2.6	Mikroradiographie.....	23
3	ERGEBNISSE.....	24
3.1	Klinischer Verlauf	24
3.2	pH-Wert-Messung	24
3.3	Sauerstoffmessung	27
3.4	Wirbelstrommessung	29
3.5	Computertomografische Untersuchung	31
3.6	Korrelation von Wirbelstrommessung mit dem pH-Wert	33
3.7	Korrelation von Wirbelstrommessung mit der Knochendichte	34
3.8	Mikroradiographie.....	36
3.9	Toluidinblaufärbung	37
3.10	Masson-Goldner-Färbung.....	40

3.11	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	42
3.12	Immunhistochemische <i>Färbung PECAM-1</i>	44
4	DISKUSSION	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	53
6	ANHANG	54
6.1	Dielektrische Eigenschaften von Geweben	54
6.2	Beispieldatei einer Wirbelstrommessung	55
6.3	Beispieldatei pH-Sonde/Sauerstoff-Sonde	55
6.4	Bildnachweis	56
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	62
9	DANKSAGUNG	64
10	LEBENS LAUF	65

1 Einleitung

Knochen ist ein dynamisches, hoch vaskularisiertes Gewebe. Es hat die einzigartige Fähigkeit ohne Narbe zu heilen. Diese Feststellung machte Hippokrates von Kos schon vor knapp 2500 Jahren im alten Griechenland (DE MOULIN 1974). Diese Eigenschaft in Verbindung mit der Bereitstellung von Mineralien bei Stoffwechselbedarf macht es zu einem höchst komplexen Material. Seine Hauptaufgabe ist die strukturelle Unterstützung des Körpers (RODAN 1992). Hieraus folgt, dass Defekte oder Krankheiten dieses Systems dramatische Auswirkungen auf Funktion, Ästhetik und schließlich auch auf die Lebensqualität des Patienten haben können. Knochen stellt nach Blut das am häufigsten transplantierte Gewebe in der modernen Medizin dar (VAN HEEST & SWIONTKOWSKI 1999).

Die Rekonstruktion von ossären Defekten im Bereich des Gesichtsschädels, die nach Trauma, angeborenen Defekten oder bösartigen Neubildungen der Mundhöhle verbleiben, stellt die operative Medizin vor die große Herausforderung, sowohl Funktion als auch Ästhetik wiederherzustellen. Aufgrund der großen Bedeutung des Gesichts für die Lebensqualität des Patienten, ist die Belastung besonders groß (FEDERSPIL et al. 1998). Selbst die Partner der Patienten leiden unter einer signifikant höheren psychischen Belastung, als Partner von Patienten mit anderen Fehlbildungen (VICKERY et al. 2003).

Zur Behandlung von Defekten mit einer kritischen Größe, die keine Spontanheilung erfahren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Je nach Defektgröße werden vor allem sowohl vaskularisierte als auch nicht-vaskularisierte autologe Transplantate gewonnen. Typische Entnahmeregionen sind Rippe, Scapula, Fibula oder der Beckenkamm (BAUER & MUSCHLER 2000, SPRINGER et al. 2004). Diese Transplantate haben den großen Vorteil, dass sie sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften besitzen (GIANNOUDIS et al. 2005). Das heißt sie erleichtern als Leitgerüst das natürliche Knochenwachstum und regen Knochenneubildung an. Der größte Nachteil ist jedoch der geschaffene zweite Knochendefekt (WARNKE et al. 2004), mit den Risiken Transplantatverlust, Wundinfektion, Narbenbildung und Mobilitätseinschränkung und damit signifikant erhöhter Morbidität durch die Wunde

der Spenderregion (BANWART et al. 1995, POU 2003, HERFORD & DEAN 2011). Zudem kann es in 8,5-20 % der Fälle zu Nervverletzungen, Blutungen, Frakturen und chronischen Schmerzen kommen (GIANNOUDIS et al. 2005). Begrenzt wird diese Operationsmethode vor allem durch die verfügbare Menge an zu gewinnendem Knochenmaterial. Zudem muss die Form des Transplantats an den vorhandenen Defekt angepasst werden. Eine Anbindung an die ortsständige Blutversorgung ist nur bedingt möglich. Darüber hinaus haben die Transplantate lediglich reparative Eigenschaften (z.B. fehlende Innervation) und führen zumeist nur zu einer wenig befriedigenden ästhetischen und funktionellen Rehabilitation des Patienten.

Ein visionärer Ansatz zur Lösung stellt das Verfahren des Tissue Engineerings dar. Langer und Vacanti definierten das Tissue Engineering als „ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, bei dem Ingenieurs- und Lebenswissenschaften an der Entwicklung biologischer Ersatzstoffe zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Ersatz von Gewebefunktionen arbeiten“ (LANGER & VACANTI 1993). Das Prinzip beruht dabei darauf, dass gewonnene Zellen in einem dreidimensionalen Konstrukt kultiviert werden und später meist dem Spender replantiert werden, um Gewebefunktionen wiederherzustellen oder zu erhalten. Somit spielt das Tissue Engineering eine zentrale Rolle in der regenerativen Medizin der Gegenwart und vor allem der Zukunft (LINDL & GSTRALTHALER 2008).

Das Tissue Engineering beinhaltet vier Grundpfeiler: ein strukturelles Gerüst (*Scaffold*), Zellen, Wachstumsfaktoren und ein Kulturmedium (dies kann auch der Organismus selber sein). Als ein Hauptvorteil wird die Immunakzeptanz des Empfängers gegenüber dem Implantat gesehen (SALGADO et al. 2004). Eine Subspezialisierung des Tissue Engineering ist das Bone Engineering, welches sich zum Ziel gesetzt hat, in erforderlicher Menge neuen Knochen zu züchten.

Meist wird unter dem Begriff des Tissue Engineering das extrakorporale Anzüchten von Geweben unter Laborbedingungen verstanden. Dies bedingt, dass alle für das Wachstum nötigen Stoffe zur Verfügung gestellt werden müssen, um einen Organismus zu simulieren. Da die Vorgänge komplex und noch nicht komplett verstanden werden, ist das *in vitro* Verfahren zum Züchten von Knochen nur bedingt geeignet. Beim Verfahren der Endokultivierung erfolgt das Züchten des Gewebes *in vivo* an einer heterotopen Lokalisation im Körper, z.B. in der Muskulatur (TERHEYDEN

et al. 2001a) des Patienten. Dies unterscheidet sich von der orthotopen Züchtung am Ort des Defektes. So werden alle notwendigen Bestandteile zur Knochenneubildung vom Organismus selbst bereit gestellt, ein Labor ist somit nicht notwendig. Das orthotope Transplantatlager bietet bei Patienten mit Zustand nach Radiatio eine zumeist ungenügende Durchblutung (TERHEYDEN et al. 2001b). Durch die gute Blutversorgung im Muskel außerhalb des bestrahlten Areals kann die Versorgung des Transplantats gewährleistet werden. Das mittels Endokultivierung gezüchtete Gewebe kann in einer weiteren Operation samt Gefäßstiel der Muskulatur entnommen und als mikrochirurgisch anastomosiertes Gewebstransplantat in die Empfängerregion transplantiert werden. Dieses Verfahren wurde experimentell entwickelt und in ersten klinischen Fällen eingesetzt (WARNKE et al. 2006).

Die Zellen benötigen eine poröse Matrix als Leitstruktur (KÜBLER 1998, MUSCHLER et al. 2004). Hierzu eignen sich diverse Materialien, wie z.B. Hydroxylapatit, Komposite, Calciumphosphat, bioaktive Gläser und Kollagen. Hydroxylapatit wird seit vielen Jahren zum Knochenersatz genutzt und scheint sich hervorragend aufgrund seiner guten Biokompatibilität zum Bone Engineering zu eignen (BECKER et al. 2009). Hinzu kommt die gute Bioaktivität, die dem Material durch seine Ähnlichkeit der Oberfläche und Zusammensetzung zum Knochen zugeschrieben werden (TURHANI et al. 2007). Hydroxylapatit besitzt lediglich osteokonduktive Eigenschaften (EL-GHANNAM 2005), osteoinduktive Fähigkeiten konnten bei keinem Knochenersatzmaterial nachgewiesen werden (BISHOP & EINHORN 2007).

Aufgrund der fehlenden osteoinduktiven Fähigkeiten der Knochenersatzmaterialien müssen Differenzierungsfaktoren zugegeben werden, die dazu führen, dass Stammzellen angelockt werden und zu knochenbildenden Zellen umgeformt werden. Diese heterotope Knochenbildung wurde das erste Mal 1965 mit demineralisiertem Knochen nachgewiesen (URIST 1965). Später stellte Urist fest, dass sogenannte Knochenmatrixgelantine noch potenter Knochenbildung induzieren können. Diese nannte er Bone Morphogenetic Proteins (BMP) (URIST et al. 1979). Heute sind über 20 verschiedene BMPs bekannt, die im Menschen nachgewiesen wurden (GAUTSCHI et al. 2007). Sie wurden charakterisiert und können gentechnisch hergestellt werden (DUCY & KARSENTY 2000). Bei Zugabe von BMPs auf ein Scaffold läuft eine ähnliche Kaskade ab wie bei der Osteoneogenese. Die Menge an gebildetem Knochengewebe korreliert theoretisch mit der zugegebenen Menge an BMP (KÜBLER

1997) und kann sowohl orthotop als auch heterotop erfolgen (WANG et al. 1988). BMPs gehören zu der Transforming-Growth-Factor- β Großfamilie der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und stellen den größten Anteil dieser Gruppe dar. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung von Gehirn (ADACHI et al. 2005) und Knochen (CHEIFETZ 1999).

Neben der Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung besteht vor allem Interesse an der Fähigkeit, heterotopes Knochenwachstum zu induzieren. Diese Fähigkeit besitzen die BMPs 2-7 (KANG et al. 2004). Die höchste Potenz, Knochen zu bilden, haben jedoch BMP-2 und BMP-6 (CHENG et al. 2003). Mit Zulassung der Food and Drug Administration wird klinisch vor allem rhBMP-2 genutzt (MONT et al. 2004). In vorangegangenen Studien hat sich gezeigt, dass eine verzögerte Gabe der Wachstumsfaktoren zu einer größeren Menge an Knochenneubildung im Scaffold (BECKER et al. 2010) und einer geringeren Menge an ektopen Knochenneubildungen außerhalb des Scaffolds geführt hat (WARNKE et al. 2010a). Es konnte nachgewiesen werden, dass Hydroxylapatit die Fähigkeit besitzt, diese Differenzierungsfaktoren zu speichern und als Depot zu fungieren (ULUDAG et al. 2000).

In allen Situationen, in denen Gewebe gezüchtet werden, ist der Zugang zu Substraten wie Sauerstoff, Glucose und Aminosäuren, sowie der Abtransport der Abbauprodukte (z.B. Laktat und CO_2) lebenswichtig für die Zellen. Bei dem Transport dieser Moleküle in und aus dem Transplantat handelt es sich um einen Massetransport, welcher hauptsächlich aufgrund von Druckgradienten und durch passive Diffusion stattfindet (WEI & RUSS 1977). In metabolisch aktivem Gewebe ist die Distanz zwischen Kapillarwand und Zellmembran, den der Sauerstoff durch Diffusion zurücklegen muss, selten mehr als 40 bis 200 μm (CHOW et al. 2001a). Nach Implantation des Scaffolds, befinden sich nur im Bereich um das Transplantat Gefäße, sodass die Zellen um die vorhandenen Ressourcen konkurrieren. Dies führt dazu, dass im zentralen Bereich des Scaffolds zuerst kein ausreichender Stoffwechsel stattfinden kann und es so zu einem Gradienten von Zellproliferation und Differenzierung im Scaffold kommt (MALDA et al. 2007, VOLKMER et al. 2008). Da die Diffusion von Sauerstoff langsam abläuft und der Verbrauch hoch ist, ist dies der limitierende Faktor bei der Versorgung tieferliegender Anteile des Scaffolds und schlussendlich ausschlaggebend für das Überleben der Zellen, da Hypoxie

zelltoxisch wirken kann (VILLARRUEL et al. 2008). Hierdurch wird die Größe des Implantates unter das klinisch notwendige Maß begrenzt.

Eine weitere Folge der Hypoxie ist eine vorliegende Azidose ausgehend vom anaeroben Stoffwechsel der Zellen und der verminderten Durchblutung im Implantat (UTTING et al. 2006). Es ist bekannt, dass Osteoblasten extrem empfindlich auf pH-Wertveränderungen reagieren (ARNETT 2010). Die adjuvante Wirkung von Hypoxie und Azidose führt zur Osteoklastenbildung und verringert die Mineralisation durch Osteoblasten (JONITZ et al. 2011). Trotz der dargestellten Wichtigkeit der Parameter Sauerstoff-Sättigung und pH-Wert liegen noch keine Daten zum Verlauf dieser Werte während der Knochenneubildung *in vivo* vor. Das Verständnis der Stoffwechselvorgänge im Implantat ist zweifellos von großer Bedeutung.

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit soll die Messung der oben genannten Werte Sauerstoffsättigung und pH-Wert *in vivo* sein. Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Parametern sollen Aufschluss über Stoffwechselvorgänge im Scaffold liefern. Bis dato ist wenig über den Ablauf der heterotopen Knocheninduktion bekannt. Sauerstoffsättigung und pH-Wert könnten als Basisparameter dienen, um ein grundlegendes Verständnis der Vorgänge im Scaffold während der Endokultivierung zu erhalten.

Die Überwachung der Knochenneubildung findet heutzutage durch computertomografische Untersuchungen und Szintigramme statt (WARNKE et al. 2004). Diese Verfahren lassen aufgrund ihrer ionisierenden Strahlung keine regelmäßige Untersuchung der Osteoneogenese zu. Auftretende Komplikationen lassen sich nur unsicher und mit zeitlichem Verzug diagnostizieren. Diese Studie soll zur Etablierung eines neuen Verfahrens zum non-invasiven, strahlungsfreien Monitoring der Endokultivierung mittels Wirbelstrom dienen. Die Wirbelstrommessung gehört zum Fachgebiet der Hochfrequenztechnik, die sich mit Frequenzen im Bereich von 1 kHz bis 1 THz beschäftigt. Eines ihrer Hauptanwendungsgebiete ist die medizinische Diagnostik.

Das zu untersuchende Material besteht zu einem Großteil aus Wasser. Wasser wiederum besteht aus einem negativ geladenen Sauerstoffatom und zwei positiv geladenen Wasserstoffatomen. Zusammen bilden sie einen elektrischen Dipol. Befinden sich diese Dipole nun in einem elektrischen Wechselfeld, so führt das

ständige Umorientieren der Dipole zu einem messbaren Polarisationsverlust (WANG et al. 2010). Diese Polarisationsverluste lassen sich zusammen mit ohmschen Verlusten mithilfe der Wirbelstrominduktion messen. Unter Anwendung von Rechenmodellen und Parameterwerten von C. Gabriel (GABRIEL et al. 1996) lassen sich die verlustbehafteten dielektrischen Eigenschaften von menschlichen und tierischen Geweben im Frequenzbereich von 10 Hz bis 20 GHz berechnen (siehe Tabelle 5 und 6). So könnte eine non-invasive strahlungsfreie Beobachtung der Ladungsveränderung während der Knocheninduktion möglich sein.

Bei der zugrundeliegenden Studie wird die Methode der Wirbelstrominduktion, nach vorheriger reiner Computersimulation, das erste Mal im Tiermodell angewandt. Unter der Zuhilfenahme von computertomografischen Knochendichtemessungen soll eine Korrelation zwischen Knochendichte und Wirbelstrommessung hergestellt werden. Da pH-Wert-Änderungen ebenfalls zu Ladungsänderungen führen, wird desweiteren versucht werden, einen Zusammenhang zum pH-Wert herzustellen.

Die so gewonnenen Erkenntnisse könnten sowohl Aufschluss über physiologische Vorgänge während der heterotopen Knocheninduktion geben, als auch eine strahlungsfreie Alternative zur computertomografischen Untersuchung, zur Überwachung der Knochenneubildung nach durchgeführter Implantation aufzeigen.

2 Material und Methoden

Die durchgeführte Studie wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein – V31 Tierschutz – nach sorgfältiger Prüfung gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Nr. V 312-72241.121-14 (12-1/11)).

2.1 Versuchsablauf

Im durchgeführten Versuch wurden 6 weibliche Farbratten vom Wistar-Stamm (Wistar HanTM, Charles River Laboratories, Sulzfeld, D) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 220 g und einem Alter von 12 Wochen eingesetzt. Die Körpertemperatur der Versuchstiere liegt bei 37,1 °C (MÜSCHEN 1978, HELMS 1996).

Die Tierhaltung erfolgte in klimatisierten Räumen mit einer Raumtemperatur von 20 °C, rel. Luftfeuchte von 55 ± 10 % und einem durch Leuchtstoffröhren (5100 Lux) künstlich erzeugtem Tag-Nacht-Rhythmus (jeweils 12h). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen mit einer Größe von 37 x 22 cm (825 cm²) und einer Höhe von 15 cm gehalten (Cage Type III-1290.PC, Ehret, Schönwalde, D). Den Tieren stand über den gesamten Versuchszeitraum Futter (ssniff[®]-Trockenfutter AM R/M-H + 3 g/kg Fenbendat[®] 5 %, ssniff[®] Spezialdiäten GmbH, Soest, D) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Als Scaffold wurde ein synthetischer Hydroxylapatitblock mit einer Größe von ca. 2 cm x 1 cm x 1 cm verwendet, bestehend aus Hydroxylapatit-Granulat (HA SP19, Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien, Bayreuth, D). Abbildung 1 zeigt im elektronenmikroskopischen Bild die Oberflächenstruktur des Hydroxylapatit-Granulats und die interkonnektierenden Kanalstrukturen. Abbildung 2 zeigt einen Block vor der Implantation.

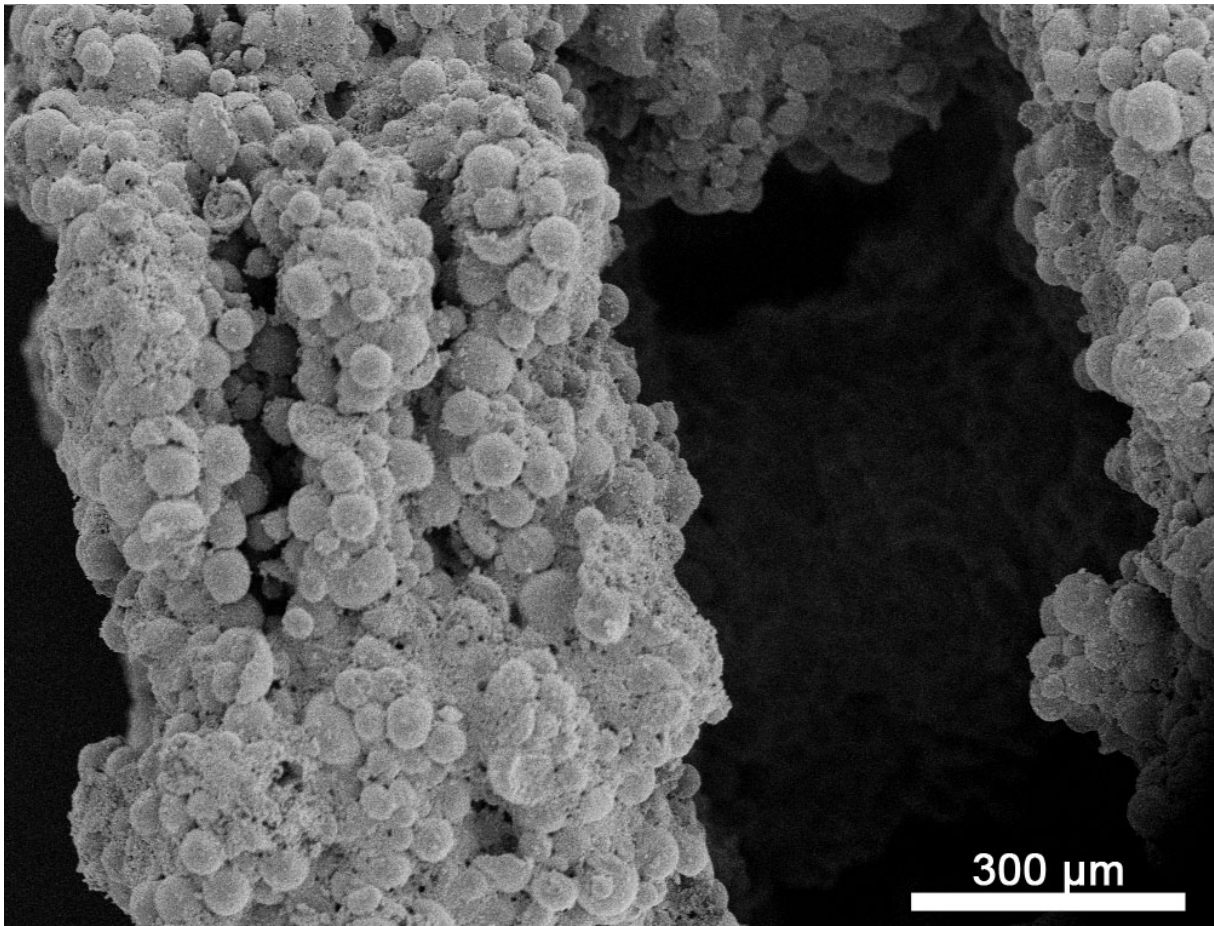


Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Ausschnittsbild des Scaffolds. Gut zu erkennen ist die poröse Oberfläche des HA-Blocks und die interkonnektierenden Kanalstrukturen.

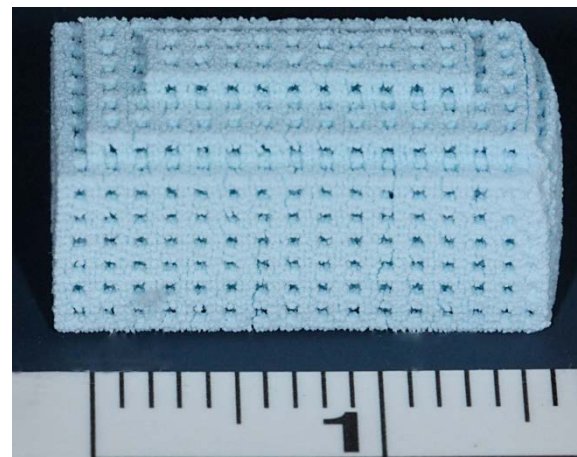
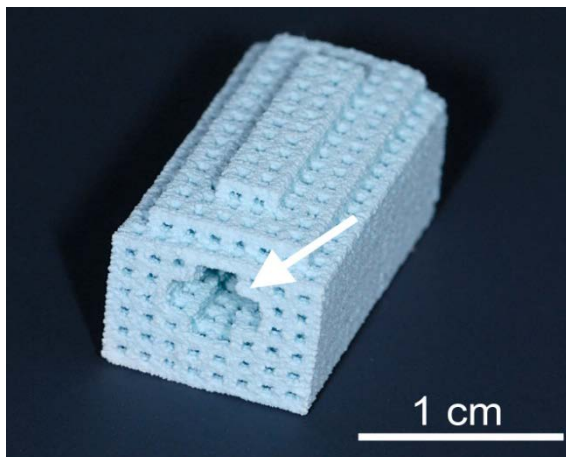


Abbildung 2: *Front- und Seitenansicht.* Hydroxylapatit-Block mit interkonnektierender Kanalstruktur und Zentralkanal (Pfeil). Gut zu erkennen ist die nach oben hin verjüngte Struktur des Körpers zur besseren Wundadaptation.

Nach eingeleiteter Allgemeinanästhesie wurde das Operationsgebiet rasiert und anschließend mit Hautantiseptikum desinfiziert (Kodan[®] Tinktur forte, Fa. Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D). Nach Längsinzision der Haut im Bereich der thorakalen Wirbelsäule erfolgte die stumpfe Präparation der Subkutis und die Ausformung einer Muskeltasche im Bereich des langen Rückenmuskels. Die sterilisierten Implantate wurden mittels Pinzette so positioniert, dass ein späterer Zugang zum Zentralkanal der Blocks einfach möglich war (siehe Abbildung 3). Nach Einlage des Blocks wurden die Wundränder spannungsfrei adaptiert und die Inzision schichtweise in Einzelknopfnahntechnik mit resorbierbarer Naht (Vicryl[®], Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, D) verschlossen.

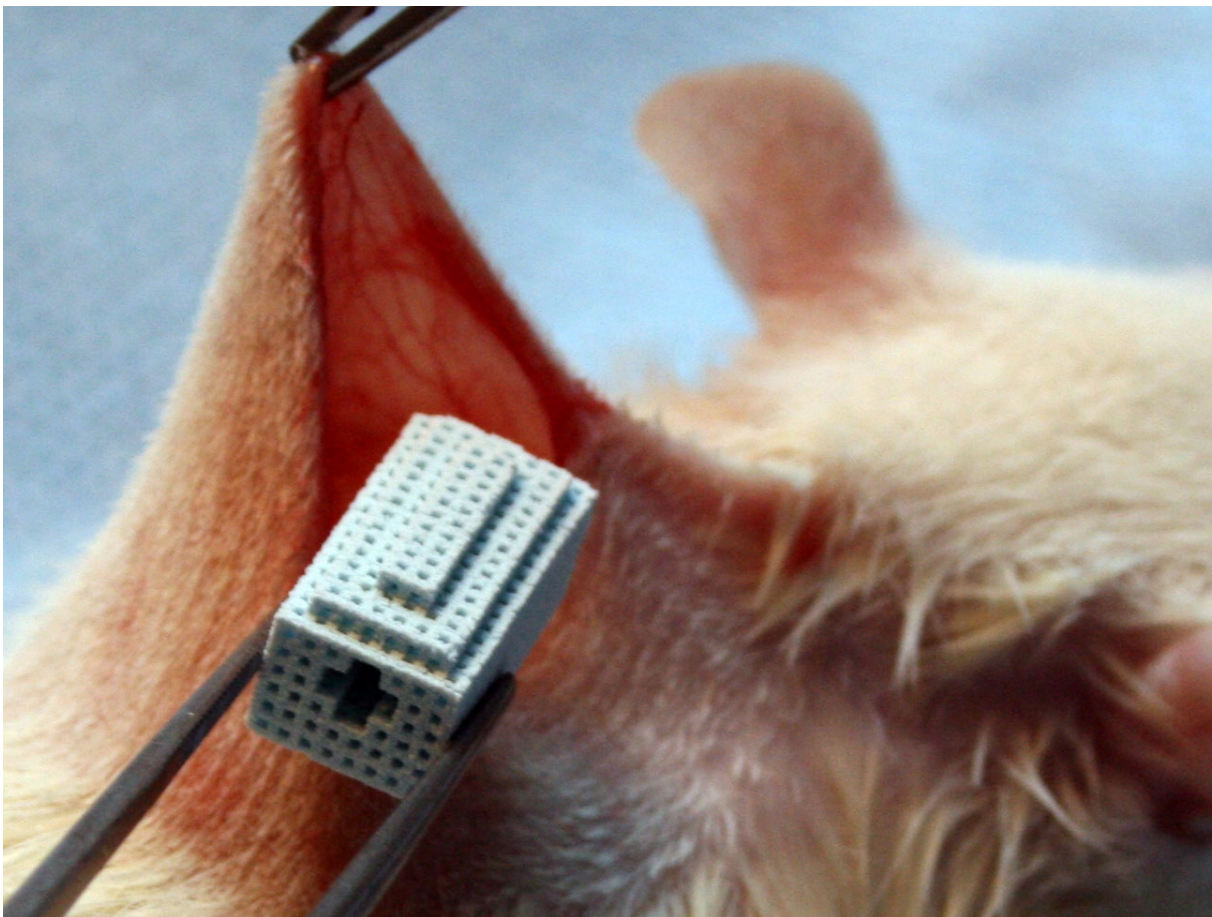


Abbildung 3: Insertion des HA-Scaffolds in die zuvor präparierte Tasche auf dem linken Musculus latissimus dorsi.

Die Operation und die Untersuchungen im Computertomographen wurden unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin (10 %, 1 μ l/g Körpergewicht Ketavet[®], Fa. Upjohn GmbH, Heppenheim, D) und Xylazin (2 %, 0,6 μ l/g Körpergewicht, Rompun[®], Fa. Bayer AG, Leverkusen, D) durchgeführt. Für die wöchentlichen Messungen wurden

die Tiere mittels volatillem Inhalationsanästhetikum Sevofluran (Sevorane[®], Fa. Abbott AG, Baar, CH) dargereicht mittels Verdampfer (Vapor[®] 2000, Fa. Drägerwerk AG, Lübeck, D) betäubt. Zur Analgesie wurde die Einstichstelle mit Lidocain (100 mg pro Einstichstelle, Xylocain[®], Fa. AstraZeneca GmbH, Wedel, D) behandelt. Zum Schutz vor Austrocknung während der Narkosen wurden die Augen der Tiere mit Dexpanthenol-Salbe (5 %, Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D) versorgt. Die Tiefe der Narkose wurde durch Atemtiefe und Augenlidreflex begutachtet und gegebenenfalls angepasst.

Zur Induktion der heterotopen Knocheninduktion wurde nach 7 und 14 Tagen nach Implantation rhBMP-2 verabreicht. Mittels spitzer Kanüle wurden 200 µg rhBMP-2 (InductOs[®], Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, D), gelöst in 1 ml NaCl, zentral in das Scaffold injiziert.

Nach den letzten Messungen und vor dem letzten Computertomogramm wurden die Versuchstiere, die sich noch in Allgemeinanästhesie befanden, durch Kohlenstoffdioxid-Insufflation getötet. Nach Tötung der Tiere wurde die abschließende Computertomographie durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2). Anschließend wurden die Blöcke explantiert und in 4 %igen Formalin für 2 Wochen gelagert.

Abbildung 4 zeigt grafisch die zeitliche Abfolge des Versuchsablaufs.

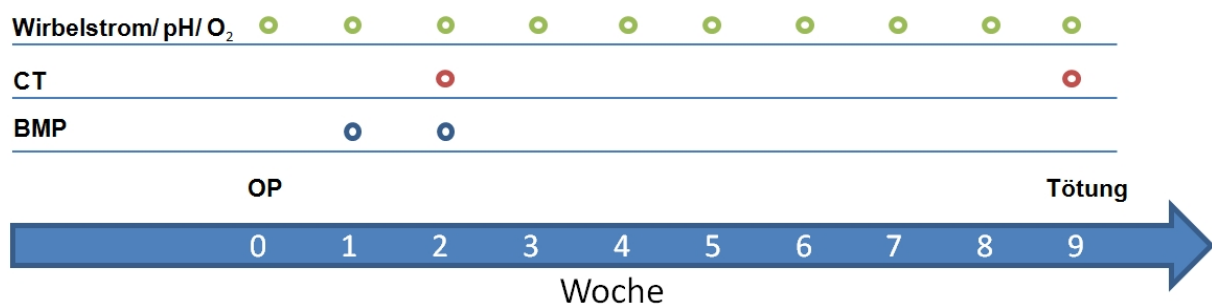


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

2.2 Computertomografische Untersuchung

Die computertomografische Darstellung der Implantatregion erfolgte 2 Wochen post operationem und direkt nach der Tötung der Tiere. Die erste Untersuchung wurde in Allgemeinanästhesie durchgeführt (siehe Kapitel 2.1). Der Scan erfolgte mit dem

Somatom[®]-Gerät (Siemens AG, München, D; 120 kV, 210 mAs, 46,82 mGys, Schichtstärke 0,5 mm). Die oben genannten Einstellungen wurden bei beiden Untersuchungen verwendet.

Zur Untersuchung der Knochendichte und des Knochenvolumens mittels Volumenmessung wurde die Software Syngo[®] (Siemens AG, Erlangen, D) verwendet. Die Auswertung erfolgte verblindet. Die Auswertgrenzen wurden auf 150 HU (Hounsfield Units) als untere und 3000 HU als obere Grenze festgelegt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass nur Knochen gemessen wurde. Durch manuelle schichtweise Markierung und grafische Darstellung des zu messenden Gebiets konnten sowohl Volumen, als auch Dichte bestimmt werden. Als Ausgangswert zum Nachweis der Knocheninduktion diente die erste Untersuchung, die mit der zweiten computertomografische Auswertung verglichen wurde. Aus der Differenz zwischen Anfangs- und Endbefund konnte so ein Dichtezuwachs durch Mineralisation des Implantats nachgewiesen werden. Die Untersuchung auf Signifikanz erfolgte mittels GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Hierbei wurde das 95 %-Konfidenzintervall ermittelt, von einer statistischen Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

2.3 Opto-chemische Sensoren

In opto-chemischen Sensoren reagiert das Medium mit dem Indikator, ohne dieses jedoch zu verändern. Der Sensor verändert daraufhin seine optischen Eigenschaften. Das Ergebnis ist entweder eine Änderung der Farbe (Extinktion) oder der Lumineszenz-Eigenschaften (Stärke, Lebensdauer, Polarisation). Licht wirkt hierbei als Träger der Information (KASIK et al. 2006).

Die wesentlichen Bestandteile sind:

- eine Lichtquelle zur Beleuchtung des Sensors (Laser, Leuchtdiode, Lampe)
- eine optische Faser als Signalgeber (Kunststoff oder Glasfaser)
- ein Photodetektor (Photodiode, Photomultiplier, CCD-Array)
- der optische Sensor (in einer festen Matrix immobilisiert).

Abbildung 6 zeigt den verwendeten opto-chemischen Sensor.

Bei den genutzten Sensoren wird die Lumineszenzabklingzeit des immobilisierten Luminophors als Analyt-abhängiger Parameter bestimmt. Hierzu nutzt man die Phasen-Modulations-Technik. Die Abklingzeit des sinusförmig emittierten Lichts verursacht eine Zeitveränderung des zurückgesandten Lichts. Technisch gesehen ist dies eine Verzögerung des Phasenwinkels zwischen ausgesandtem und austretendem Licht (KLIMANT 1999). Ein Vorteil dieses Messverfahrens ist, dass durch die räumliche Trennung von Lichtquelle, Detektor und optischer Faser, der Sensor extrem klein ist und so gut in das Implantat eingeführt werden kann. Die Kollision zwischen dem Farbstoff und dem zu messenden Stoff (z.B. Sauerstoff) führt zu einer Übertragung der Energie vom Luminophor auf das zu messende Analyt. Das Analyt wird in einen angeregten Zustand überführt, der Luminophor empfängt weniger Licht und somit kommt es zu einer messbaren Veränderung des Signals.



Abbildung 5: Zeigt die Meßsonde mit ausgefahrener Glaserfaserspitze. Das weiße Quadrat markiert den Ausschnitt, der in Abbildung 6 zu sehen ist.



Abbildung 6: Zeigt die ausgefahrene Glasfaser sonde mit dem aufgebracht Farbstoff. Der Farbstoff wurde auf eine Länge von 280 µm (weiße Balken), bei einem Durchmesser von 140 µm (schwarzer Balken) aufgebracht.

2.3.1 pH-Messung

Zur wöchentlichen Messung des pH-Werts im Implantat wurde das Gerät pH-1 micro[®] (PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, D) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein 1-Kanal pH-Meter. Die Aufzeichnung erfolgte mittels Datenübertragung an einen PC mit der dazugehörigen Software HView[®] in der Version 5.25b (PreSens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, D). Wie alle pH-Messverfahren ist auch dieses temperaturabhängig. Die Temperatur bei der Messung wurde auf die durchschnittliche Körpertemperatur der Wistar-Ratten von 37,1 °C eingestellt. Eine abweichende Körpertemperatur von einem Grad hätte einen Drift der Sonde von 0,01 pH bedeutet. Vor der Messung wurde eine Aufwärmzeit von mindestens fünf Minuten eingehalten. Zur Messung wurde die Sonde 1,5 cm in den Zentralkanal des Transplantats eingeführt und zur Vermeidung von Luftblasen vollständig aus dem Spritzengehäuse ausgefahren.

Die optische pH-Sonde funktioniert nach dem Prinzip des DLR (Dual Luminophor Reference) (KLIMANT et al. 2001). Die optische Faser ist mit zwei Farbstoffen beschichtet (siehe Abbildung 6), einem mit langsamer und einem mit schneller Abklingzeit, der eine im Nanosekunden-, der andere im Millisekunden-Bereich. Die Fluoreszenzintensität ändert sich je nach pH-Wert. Die gemessenen Werte der Abklingzeiten stellen ein Verhältnis zwischen den beiden Farbstoffen dar. Hierdurch ist der gemessene Wert unabhängig von Schwankungen in der Lichtquelle. Die Sonden reagieren nach dem Massewirkungsgesetz. Sie zeigen somit kein lineares Verhalten wie potentiometrische pH-Sonden, was ihren Einsatz auf einen Bereich von 3-4 pH-Einheiten einschränkt. Auf der anderen Seite ist die Auflösung in dem gegebenen Bereich sehr hoch. Ein Anstieg des pH-Werts führt zum Sinken des Phasen-Winkels Φ . Der typische Einsatzbereich der Sonde befindet sich im Bereich von pH 5,5-8,5 bei einer Genauigkeit von 0,01 und einer Reaktionszeit von maximal 30 Sekunden. Da die Sonde durch Bleichung des Farbstoffs einen Drift von 0,03 pro 1000 Messungen hat, wurden die Sonden nach jeder Versuchstag gewechselt. Die Messungshäufigkeit wurde auf eine Messung pro Sekunde eingestellt (KOSCH et al. 1998). Die Kalibrierung erfolgte im Werk. Durch die kurze Nutzungsdauer der einzelnen Sonden war eine erneute Kalibrierung nicht nötig. Nach dem Start der Messung wurde mindestens 30 Sekunden und danach solange bis sich ein stabiler

Wert eingestellt hatte gewartet. Diese Messwerte wurden anschließend in einer Datei gespeichert. Zur Auswertung wurden jeweils 10 Messpunkte um den Median bestimmt. Nun folgte eine Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren *Untersuchungszeitpunkt* (Wochen nach Implantation) und *Tier* als zufälliger Effekt. Anschließend folgte die Berechnung der Least squares means. Für diese Werte wurde das 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Die signifikante Abweichung der Paare zueinander wurde mittels Tukey HSD Test überprüft.

Im Anhang ist unter 6.3 eine Beispieldatei einer durchgeführten Messung dargestellt.

2.3.2 Sauerstoff-Messung

Zur wöchentlichen Messung des Sauerstoffgehaltes im Implantat wurde das Gerät Microx TX3[®] (PreSens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, D) verwendet. Auch bei dieser Messung wurde kein Temperatenausgleich vorgenommen, sondern von der Durchschnittskörpertemperatur der Ratten ausgegangen. Im Gegensatz zu anderen Messverfahren wird bei dem genutzten Verfahren kein Sauerstoff während der Messung verbraucht. Zur Messung wurde die Sonde 1,5 cm in das Transplantat des jeweiligen Versuchstiers eingeführt. Besonders bei dieser Messung musste größte Aufmerksamkeit auf das vollständige Ausfahren der Sonde gelegt werden, um Lufteinschlüsse an der Sondenspitze auszuschließen.

Das Prinzip der Sonde beruht auf der Abnahme der Lumineszenz durch Kollision mit molekularem Sauerstoff. Der optimale Messbereich der Sauerstoff-Sonde bewegt sich zwischen 0-250 % Luftsauerstoff. Die Genauigkeit der Sonde wird bei einer Temperatur von 20 °C bei $\pm 0,2$ % Luftsauerstoff angegeben. Kreuzsensibilitäten sind nicht bekannt (z.B. gegen CO₂, H₂S, NH₃ oder pH). Für die Versuche wurde eine Sonde mit geradem Glasfaserende (140 μ m) verwendet. Diese Sonde hat den Vorteil, dass sie beim Einführen ins Gewebe stabiler ist und weniger Drift durch Bleichung erfährt. Nachteilig ist die verlängerte Reaktionszeit von bis zu 30 Sekunden zu bewerten. Aus diesem Grund wurden die Messungen für mindestens 30 Sekunden und bis zum Erreichen stabiler Werte durchgeführt. Die Kalibrierung der Sonden erfolgte im Werk, so dass durch die kurze Nutzungsdauer von jeweils einer Versuchsreihe, eine erneute Kalibrierung vermieden werden konnte. Aufgrund der ähnlichen Maxima der Fluoreszenz von Sonde und Blut (540 nm bis 700 nm)

(WOLFBEIS & LEINER 1985) wurden isolierte Sonden genutzt. Diese verhinderten, dass die Messung durch Eigenfluoreszenz des Blutes verfälscht wurde.

Zur Aufzeichnung wurde die Software OxyView[®] in der Version TX3-V.5.31 (PreSens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, D) genutzt. Die Lichtintensität der Sonde wurde automatisch geregelt. Der Luftsauerstoff wurde in Prozent gemessen. Es wurde so lange gemessen, bis sich stabile Werte eingestellt hatten. Die statistische Auswertung erfolgt auf gleiche Weise wie in 2.3.1 beschrieben.

Unter 6.3 ist eine Beispieldatei dieser Messungen gezeigt.

2.4 Wirbelstrom

Die Wirbelstrommessung beruht auf dem physikalischen Prinzip eines elektrischen Schwingkreises. Der Wirbelstromsensor ist eine resonanzfähige elektrische Schaltung aus einer Spule und einem Kondensator, die elektrische Schwingungen ausführen können. Gemessen wurde im Bereich der Frequenzen von 850 bis 950 MHz im Abstand von 0,25 MHz-Schritten. Simulationen haben gezeigt, dass in diesem Frequenzbereich die Empfindlichkeit des Sensors am höchsten war (WANG et al. 2010). Zur Untersuchung wurde die Sonde auf das zu untersuchende Objekt gelegt. Die im Sensor gelegene Spule wurde von Wechselstrom durchflossen. Es entstand ein Magnetfeld, welches zu einer Induktion von Wirbelströmen im Gewebe führte. Je nach Zusammensetzung des Gewebes und des Implantats veränderte sich die elektrische Leitfähigkeit. Dies führte zu unterschiedlichen Größen und Verteilungen der Wirbelströme. Diese Wirbelströme erzeugten ein sekundäres Magnetfeld, welches das primäre destruktiv überlagerte. Die Schwächung des Ausgangsmagnetfeldes konnte gemessen werden, da sich dadurch die Eingangsimpedanz des Sensors änderte. Letztlich hing die Eingangsimpedanz von der Zusammensetzung und damit verbundener elektrischer Leitfähigkeit der Probe ab. Die Eingangsleistung des Sensors lag bei 1 mW. Somit waren die Messungen non-invasiv und schmerzfrei durchzuführen. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der Wirbelstrommessung.

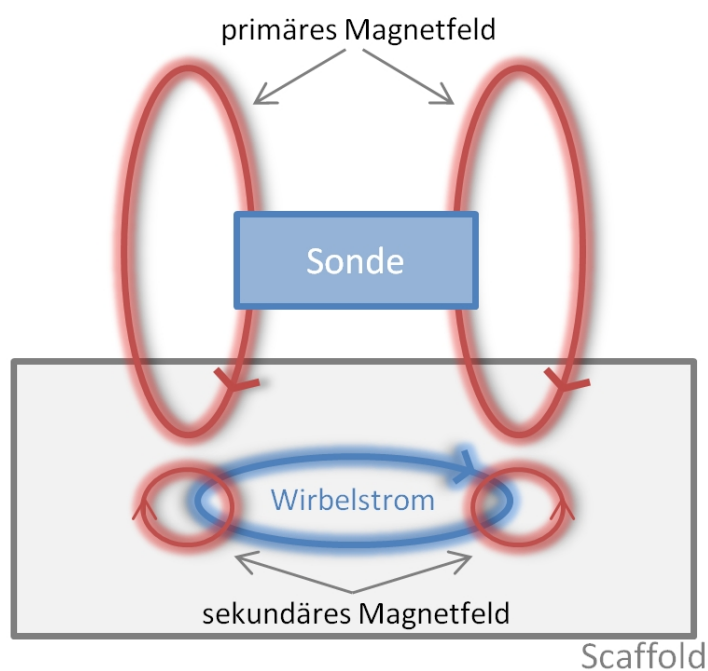


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirbelstrommessung. Das von der Sonde erzeugte primäre Magnetfeld induziert einen Wirbelstrom im Scaffold, der wiederum ein entgegengesetztes sekundäres Feld erzeugt.

Die Messeinheit umfasste eine Meßsonde mit einem Durchmesser der Untersuchungsfläche von 24,8 mm (siehe Abbildung 8), eine Zuleitung (Koaxial-Kabel), einen skalaren Netzwerkanalysator (HP-8277, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA) und einen Computer zur Darstellung und Speicherung der Ergebnisse. Der Netzwerkanalysator erzeugt ein Signal mit definierter Amplitude, Phase und Frequenzen zur Sonde zu schicken. Das Signal erzeugte im Messkörper ein Gegenfeld, somit wurde das ausgesandte Signal phasenverschoben und reflektiert. Dieses Signal wurde vom Netzwerkanalysator registriert und mit dem von ihm erzeugten verglichen.

Vor Beginn jeder Messreihe wurde eine Referenzmessung durchgeführt. Hierbei wurde der Sensor in die Luft gehalten. Danach wurde der Sensor in einem 90° Winkel auf das zu untersuchende Implantat mit Kontakt zur Haut der Ratte gestellt. Die Ratten befanden sich hierbei in Bauchlage (siehe Abbildung 9). Nach Kontakt des Sensors mit der Ratte wurde die erste Messung durchgeführt und der Sensor wieder vom Rattenkörper angehoben. Dieser Vorgang wurde pro Ratte jeweils fünf Mal wiederholt. Die Wirbelstrommessungen wurden jede Woche zusammen mit den pH- und Sauerstoff-Messungen durchgeführt.



Abbildung 8: Wirbelstromsensor mit angeschlossenem Koaxial-Netzwerkkabel



Abbildung 9: Zeigt eine durchgeführte Wirbelstrommessung. Hierbei wurde die Ratte in Bauchlage gelegt und der Wirbelstromsensor im 90° Winkel, unter Hautkontakt auf das Scaffold gehalten. Nach jeder durchgeführten Messung wurde der Sensor angehoben und erneut platziert.

Zur Auslösung der Messung und Speicherung der Messwerte wurde die Software MATLAB® (MathWorks, Ismaning, D) in der Version 7.11 (R2010b) verwendet. Tabelle 7 zeigt einen Ausschnitt aus einer der Messreihen. Untersucht wurden die Resonanzfrequenz f_{res} und die Kreisgüte Q .

Die Resonanzfrequenz f_{res} ist die Frequenz, in der Energie zwischen Spule und Kondensator ausgetauscht werden. Dieser Parameter wird durch das Untersuchungsmaterial beeinflusst. So spiegeln sich Veränderungen im Scaffold in unterschiedenen Resonanzfrequenzen wider (DEMTRÖDER 2009).

Im System des Wirbelstromsensors treten Verluste auf (z.B. ohmscher Widerstand, dielektrische Verluste, Abstrahlung). Diese Verluste sind zusätzlich abhängig vom Untersuchungsmaterial. Dies führt dazu, dass die Schwingungen eines Resonators gedämpft werden. Die Dämpfung ist abhängig von der jeweiligen Frequenz und wird durch die Kreisgüte Q angegeben (WEISSGERBER 2009).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels MATLAB® (MathWorks, Ismaning, D). Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen Knochendichte, sowie pH-Wert und Wirbelstromparametern. Die Korrelation erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse. Von einer statistischen Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

2.5 Präparateherstellung

Die in Formalin gelagerten Blöcke wurden mittels Tischbandsäge (Magnum BS 1638, Metabowerke GmbH, Nürtingen, D) in zwei Hälften geteilt, eine zur Hartschliffhistologie die andere zur Aufbereitung mit Paraffin.

2.5.1 Hartschliffpräparat-Herstellung (Methylmethacrylat)

Die Hälften der Präparate für den Hartschliff wurden nach Spülung in Wasser für 30 min in aufsteigender Alkohol-Konzentration über 42 Stunden mittels Einbettautomat (PSI® Medizintechnik Grünewald GmbH & Co.KG, Laudenbach, D) dehydriert und in verschließbaren Gläsern in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet (siehe Tabelle 1), das sich wie folgt zusammensetzte:

- 500 ml Methacrylsäuremethylester (Fluka[®], Sigma Aldrich[®] Chemie GmbH, Steinheim, D)
- 100 ml Nonylphenol-polyethylenglycolacetat (Fluka[®] Sigma Aldrich[®] Chemie GmbH, Steinheim, D)
- 5 ml Phtalsäuredibutylester (Merck Chemicals, Darmstadt, D)
- 3 g 2,2 Azobis (2-Methylpropionitril; Fluka[®] Sigma Aldrich[®] Chemie GmbH, Steinheim, D)

Reihenfolge	Medium	Dauer (in Std.)	Temperatur
1.1	60 % Ethanol	2	24 C°
1.2	80 % Ethanol	2	24 C°
1.3	90 % Ethanol	4	24 C°
1.4	96 % Ethanol	5	24 C°
1.5	100 % Ethanol	4	24 C°
2	Aceton u. Ethanol (1:1)	5	24 C°
3	100 % Ethanol	8	24 C°
4	100 % Methacrylsäuremethylester	24	24 C°
5	PMMA	bis zur Aushärtung	38 C°

Tabelle 1: Einbettreihenfolge für die Herstellung der Hartschliffe.

Zur Auspolymerisation wurden die Proben in ein 38 °C warmes Wasserbad für 48 Stunden gestellt. Nach Aushärtung des Kunststoffes wurden die Gläser zerschlagen und die Proben mit einer Tischbandsäge (Magnum BS 1638, Metabowerke GmbH, Nürtingen, D) zugeschnitten. Die Präparateseite des Probenkörpers wurde mit Silikonkarbid-Schleifpapier in aufsteigender Körnung (500-4000 nach DIN ISO 6344) am Schleifgerät (Saphir 360E, ATM GmbH, Mammelzen, D) hochglanzpoliert und auf Kunststoffobjektträger mit Folienbeschichtung (gudy 831[®], Neschen AG, Bückeberg, D) mittels Sofortklebstoff (LOCTITE[®] 493, Henkel AG & Co., Düsseldorf, D) geklebt. Diese wurden nun mit einer Diamantbandsäge (EXAKT 300, EXAKT GmbH, Norderstedt, D) zugeschnitten und mit einem Präzisionsschleifgerät (EXAKT 400CS, EXAKT GmbH, Norderstedt, D) auf eine Dicke von 90 µm geschliffen und anschließend poliert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Mikroradiografie (vgl. Kapitel 2.6). Nach durchgeführter Mikroradiographie erfolgte das erneute Aufkleben der Proben auf einen Kunststoffobjektträger für die Färbung mit Toluidinblau (vgl. Kapitel 2.5.2). Hierzu wurde ein lichthärtender Kunststoff (Technovit[®] 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, D) verwendet, der durch die Polymerisationslampe (EXACT 402, EXAKT GmbH, Norderstedt, D) ausgehärtet wurde. Durch die oben genannten

Schleifgeräte wurden die Proben auf eine endgültige Schichtdicke von 40 µm geschliffen und anschließend poliert.

2.5.2 Toluidinblaufärbung

Die in 2.5.1 hergestellten Proben wurden für 3 Minuten mit 0,1 %iger Ameisensäure behandelt, um eine oberflächliche Entkalkung zu erreichen, die eine bessere Anfärbbarkeit zur Folge hatte. Nach Zwischenspülung mit destilliertem Wasser, wurden die Schnitte für eine Stunde in 20 %iges Methanol gegeben. Dies führte zu einer Quellung der Präparatoberfläche. So konnte die Färbung besser aufgenommen werden. Die eigentliche Färbung erfolgte nach einer weiteren Zwischenspülung mit Aqua dest. im Anschluss mit Toluidinblaulösung (0,5 g auf 100 ml Aqua dest.) für 2 Minuten. Darauf erfolgte eine Nachdifferenzierung mit HCl-Alkohol 1 % bis kein Farbstoff mehr gelöst werden konnte und die erneute Färbung mit Toluidinblaulösung unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Zum Schutz der Präparatoberfläche wurden die Proben mit Eukitt[®] (Sigma Aldrich[®] Chemie GmbH, Steinheim, D) und Deckgläschen versiegelt. Mittels MICROPHOT-FXA (EPI-FL3, Nikon, Tokyo, J) (vgl. Kapitel 2.6) wurden digitale Photographien und Kollagen der Färbungen von gleichen Bildausschnitten wie die der Mikroradiographien in 12-facher und 30-facher Vergrößerung angefertigt.

2.5.3 Paraffinpräparate

Zur Paraffinschnittherstellung wurde die zweite Hälfte des Blocks für 6 Wochen mit Hilfe des Ultraschall-Schnell-Entkalkungsautomaten USE 33[®] (MEDITE GmbH, Burgdorf, D) in einer Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA; 0,5 mol; 7,4 pH), die halbwöchentlich gewechselt wurde, entkalkt. Nach durchgeführter Entkalkung folgte die Dehydratation mit Alkohol, die Überführung in Xylol und schließlich in Paraffin (siehe auch Tabelle 2) im Einbettautomat (TPC 15[®] Duo, MEDITE GmbH, Burgdorf, D), anschließend das Ausgießen mit Paraffin im Paraffin-Einbettssystem TES 99[®] (MEDITE GmbH, Burgdorf, D). Die hergestellten Paraffinpräparate wurden nach entsprechender Kühlung mit dem Mikrotom HM 430[®] (Microm International GmbH, Walldorf, D) bearbeitet, um 3-4 µm dicke Schnitte herzustellen. Diese Schnitte wurden in destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 55 °C gestreckt,

auf Objektträger aufgebracht und anschließend bei 37 °C getrocknet. So vorbereitet wurde nun eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (siehe 2.5.4), nach Masson-Goldner (siehe 2.5.4) und eine immunhistochemische Darstellung der Endothelzellen mittels Antikörper CD31 (PECAM-1) (siehe 2.5.6) durchgeführt. Von den verschiedenen durchgeführten Färbungen der Paraffinschnitte wurden im Folgenden mit Hilfe des MICROPHOT-FXA (EPI-FL3, Nikon, Tokyo, J) sowohl Kollagen der Präparate (vgl. Kapitel 2.6) als auch repräsentative Ausschnitte in mehreren Vergrößerungsstufen (12-fache und 30-fache Vergrößerung) aufgenommen und anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop® CS 5.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) weiterverarbeitet.

Reihenfolge	Bad	Dauer (in Std.)	Temperatur	Vakuum
1.1	Ethanol 70 %	2	30 C°	nein
1.2	Ethanol 80 %	2	30 C°	nein
1.3	Ethanol 90 %	2	30 C°	nein
1.4	Ethanol 100 %	2	30 C°	nein
1.5	Ethanol 100 %	2	30 C°	nein
1.6	Ethanol 100 %	2	30 C°	nein
2.1	Xylol	2	30 C°	nein
2.2	Xylol	2	30 C°	nein
2.3	Xylol	2	30 C°	nein
3.1	Paraffin	2	30 C°	nein
3.2	Paraffin	2	30 C°	nein
3.3	Paraffin	2	62 C°	ja

Tabelle 2: Zeigt die Reihenfolge der Einbettung für Paraffin im Einbettautomat TPC 15® Duo.

2.5.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Sukzedanfärbung begann mit der dreimaligen Entparaffinierung der Präparate für 10 Minuten in Xylol. Gefolgt von einer Rehydrierung mit Ethanol in absteigender Konzentration. Die Proben wurden nun zur Kernfärbung in saurem Hämalaun nach Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, D) für 3 Minuten gefärbt und unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Nach Abspülen mit Aqua. dest. folgte die Plasmafärbung für 30 Sekunden mit Eosin G (Merck KGaA, Darmstadt, D). Die zu Beginn durchgeführte Rehydrierung wurde mittels aufsteigender Ethanolkonzentration rückgängig gemacht. Die fertig gefärbten Schnitte wurden im Anschluss daran mittels Eindeckmedium Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, D) eingedeckelt.

2.5.5 Masson-Goldner-Trichromfärbung

Die in 2.5.3 vorbereiteten Präparate wurden nach fünfminütiger Färbung in Eisenhämatoxylin nach Weigert mit HCl-Alkohol nachdifferenziert. Nach der Darstellung der Zellkerne durch Aqua dest. wurden die Schnitte sukzedan jeweils mit Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin und Phosphormolybdänsäure Orange-G für 7 Minuten, sowie mit Lichtgrün für 6 Minuten gefärbt. Zur Differenzierung zwischen den einzelnen Färbungsschritten wurden die Proben mit schwacher Essigsäurelösung zwischengespült. Zum Abschluss der Färbung erfolgte die Entwässerung mit Ethanol und die Konservierung der Proben mit dem Eindeckmedium Aquatex[®] (Merck KGaA, Darmstadt, D).

2.5.6 Immunhistochemische Färbung gegen CD31 (PECAM-1)

In der Immunhistochemie ist der Antikörper CD31 in erster Linie dafür geeignet, die Anwesenheit von Endothelzellen, insbesondere an Gefäßwänden in histologischen Gewebeschnitten, darzustellen (NEWMAN et al. 1990, PARUMS et al. 1990).

Die zuvor im Brutschrank bei 37 °C getrockneten Paraffinschnitte wurden dreimalig für 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Hiernach folgte eine Rehydrierung in absteigender Alkoholkonzentration, gefolgt von einer Spülung in Aqua dest.. Zum Andauen der Präparate kamen die Proben für 3 Minuten in einen Drucktopf mit Desmaskierungslösung (TEC-Puffer, pH 6, Dako GmbH, Hamburg, D). Nach Abkühlung erfolgte die erneute Dehydrierung in Ethanol. Zum Blocken der Präparate folgte nun ein Bad für 15 Minuten in H₂O₂ (0,6 %) und die wiederholte Rehydrierung. Nachfolgend erfolgte eine Spülung in PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,96 mM KH₂PO₄, pH 7,4) in Verbindung mit Donkey-Normal-Serum (4 %; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D). Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper PECAM-1 (M20; polyklonaler Ziegen IgG, 200 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D) für eine Stunde inkubiert. Darauf erfolgte das Aufbringen des Sekundärantikörpers mittels Visualisierungskit (LSAB+ System-HRP[®], K0079, Dako GmbH, Hamburg, D). Bereiche mit Neoangiogenesen stellten sich im Präparat in Form einer braunen Färbung dar und sind spezifisch für die Lokalisation des Antigens. Abschließend erfolgte die Färbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck KGaA, Darmstadt, D) für 3 Minuten und das Blaufärben der Kerne

unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten (siehe hierzu auch 2.5.4). Die Alkoholreihe wurde nun ein letztes Mal zur Rehydrierung durchwandert. Zum Schutz erfolgte das Versiegeln der Präparate im Eindeckmedium Aquatex[®] (Merck KGaA, Darmstadt, D).

2.6 Mikroradiographie

Die in Kapitel 2.5.1 hergestellten Dünnschnitte wurden vom Objektträger gelöst und auf Mikroradiographieplatten (High Resolution HD Plate (Type 2 HD), Auflösung: 2000 Linien/mm, Microchrome Technology Inc. [®], San Jose CA, USA) spaltfrei aufgeklebt. Zur Belichtung der Röntgenplatten wurde das Mikroröntgengerät (Cabinet X-Ray System, Faxitron Series[®], Fa. Hewlett Packard GmbH, Böblingen, D) mit einer Stromstärke von 3 mAs bei 25 kV und einem Film-Fokus-Abstand von 16 cm genutzt. Je nach Dicke des Präparats wurde die Belichtungszeit gewählt: für den Folienträger 1 min und je 10 µm Schichtdicke eine weitere Minute, so dass die durchschnittliche Belichtungsdauer bei 10 min lag. Die Entwicklung und anschließende Fixierung erfolgte mit Perimat Intra[®] bei 20° C für 5 Minuten (Dürr Dental AG, Bietigheim-Bissingen, D) und RA3000 Part A Fixer[®] für 10 Minuten (Kodak GmbH, Stuttgart, D) mit anschließender Wässerung für 10 Minuten unter fließendem Wasser. Wie in Kapitel 2.5.2 wurden auch die Mikroradiographien mittels Deckgläschen und Eukitt[®] geschützt.

Zur Auswertung der belichteten Radiographien wurden zuerst mittels Fotomikroskop (MICROPHOT-FXA EPI-FL3, Nikon, Tokyo, J) bei sechsfacher Vergrößerung Aufnahmen der gesamten Präparate erstellt. Diese wurden im Anschluss zu einer Übersichtskollage mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop[®] CS 5.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) zusammengefügt, sodass das gesamte Scaffold und die angrenzenden Bereiche abgebildet waren. Des Weiteren wurden Vergrößerungsausschnitte in 12- und 30-facher Vergrößerung angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Verlauf

Die Operation wurde von den Ratten gut toleriert. Klinisch zeigten sich post operationem bei keinem der Tiere Wundheilungsstörungen, Zeichen einer Infektion oder Abstoßungsreaktionen bis zum Ende der durchgeführten Studie. Die Ratten zeigten über den gesamten Versuchsverlauf ein natürliches Verhalten und eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 200 g. Zu Versuchsende wogen die Ratten im Mittel 440 g.

Die Inhalationsnarkose mittels Sevofluran[®] wurde an allen Untersuchungstagen gut toleriert. Keines der Versuchstiere zeigte postnarkotische Nebenwirkungen. Ein Tier verstarb in Allgemeinanästhesie in der zweiten Woche.

3.2 pH-Wert-Messung

Der pH-Wert wurde über den gesamten Versuchszeitraum wöchentlich gemessen. Der Untersuchungszeitraum der pH-Messung betrug 9 Wochen und begann 7 Tage nach durchgeführter Operation. Die ersten Messungen (0. Versuchswoche) ergaben einen pH-Wert von pH 6,83 (95 % Konfidenzintervall (KI) 6,78-6,88). Nach einem signifikant gesunkenen pH-Wert in der 1. Woche auf pH 6,42 (KI 6,37-6,48) setzte ein stetiger Anstieg der Werte ein (2. Woche pH 6,60 (KI 6,55-6,66)), der sich auch 3 Wochen nach Implantation fortsetzte (pH 6,75 (KI 6,69-6,80)). Zwischen Woche 3 und 4 sank der pH-Wert leicht auf pH 6,55 (KI 6,50- 6,61), allerdings nicht mehr so stark wie noch zu Beginn der Messungen. Sechs Wochen nach Implantation setzte eine konstante Aufwärtsbewegung bis zum Versuchsende auf pH 6,79 (KI 6,74-6,85) ein und lag damit nahezu auf dem Niveau der ersten pH-Messung. Der Post-Hoc-Test ergab eine signifikante Veränderung der pH-Werte über die Zeit für die meisten Differenzen (siehe Tabelle 3).

Diagramm 1 stellt die Messungen des pH-Werts über die Zeit grafisch dar.

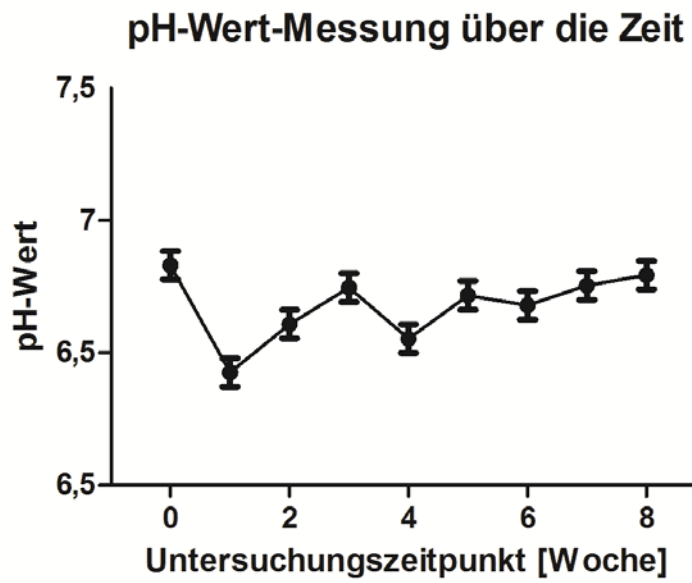


Diagramm 1: pH-Wert-Überwachung im Zentralkanal der Scaffolds über den gesamten Versuchszeitraum. Die Werte sind als kleinste mittlere Quadrate mit 95% Konfidenzintervall dargestellt.

Zeitpunkt I	Zeitpunkt II	Wertedifferenz	unteres KI	oberes KI	p-Wert
0	1	0,40	0,34	0,46	<0,001
8	1	0,37	0,03	0,43	<0,001
7	1	0,03	0,27	0,39	<0,001
3	1	0,32	0,26	0,38	<0,001
5	1	0,29	0,23	0,35	<0,001
0	4	0,28	0,22	0,34	<0,001
6	1	0,25	0,19	0,31	<0,001
8	4	0,24	0,18	0,30	<0,001
0	2	0,22	0,16	0,28	<0,001
7	4	0,20	0,14	0,26	<0,001
3	4	0,19	0,13	0,25	<0,001
8	2	0,18	0,12	0,24	<0,001
2	1	0,18	0,12	0,24	<0,001
5	4	0,16	0,10	0,23	<0,001
0	6	0,15	0,09	0,21	<0,001
7	2	0,15	0,09	0,21	<0,001
3	2	0,14	0,08	0,20	<0,001
6	4	0,13	0,07	0,19	<0,001
4	1	0,13	0,07	0,19	<0,001
8	6	0,11	0,05	0,17	<0,001
0	5	0,11	0,05	0,17	<0,001
5	2	0,11	0,05	0,17	<0,001
0	3	0,08	0,02	0,15	0,0007
8	5	0,08	0,01	0,14	0,0039
0	7	0,08	0,01	0,14	0,0041
7	6	0,08	0,01	0,14	0,0043
6	2	0,07	0,01	0,13	0,0101
3	6	0,07	0,01	0,13	0,0195
2	4	0,06	-0,01	0,12	0,1085
8	3	0,05	-0,01	0,20	0,2906
8	7	0,04	-0,02	0,10	0,5706
5	6	0,04	-0,02	0,10	0,5857
7	5	0,04	-0,02	0,10	0,607
0	8	0,04	-0,02	0,10	0,6134
3	5	0,03	-0,03	0,09	0,8645
7	3	0,01	-0,05	0,07	1

Tabelle 3: Vergleicht sämtliche Untersuchungszeitpunkte der pH-Werte auf deren signifikante Abweichung voneinander. Angeben ist jeweils die Wertedifferenz zwischen den Untersuchungszeitpunkten [*Wertedifferenz*], das untere und das obere Konfidenzintervall [*unteres/oberes KI*] und der Signifikanzwert [*p-Wert*], sortiert nach p-Wert. Die verschiedenen oben hell dargestellten pH-Werte der verglichenen Zeitpunkte weichen signifikant voneinander ab.

3.3 Sauerstoffmessung

Um zu überprüfen, wie sich der Sauerstoffgehalt im Scaffold ändert, wurden wöchentlich Sauerstoff-Messungen durchgeführt. Der Sauerstoff-Gehalt ist die entscheidende Kenngröße bei der Versorgung der Zellen in der Tiefe des Scaffolds (MUSCHLER et al. 2004). Im Beobachtungszeitraum waren analoge Verläufe zwischen Sauerstoffsättigung und pH-Wert zu erkennen (siehe 3.2). Zu Beginn zeigte die Sauerstoffsättigung einen ähnlich starken signifikanten Abfall des Sauerstoffgehalts von 70,92 % Sauerstoffsättigung (95 % Konfidenzintervall (KI) 67,95 %-73,89 %) auf 6,05 % (KI 3,09 %-9,03 %) innerhalb der ersten Untersuchungswoche. Das Absinken des Sauerstoffgehalts bis auf 4,42 % (KI 1,45 %-7,39 %) im Zentralkanal setzte sich auch in der 2. Woche fort. Genau wie bei dem pH-Wert stieg die Sättigung in den kommenden Wochen wieder an - hier konnten Maxima in der Versuchswoche 4 (21,25 % (KI 18,28 %- 24,22 %)) und 6 (22,63 % (KI 19,66 %-25,60 %)) nachgewiesen werden.

Diagramm 2 zeigt den Verlauf der Sauerstoffsättigung im Zentralkanal über die Zeit.

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse des Post-Hoc-Signifikanztests.

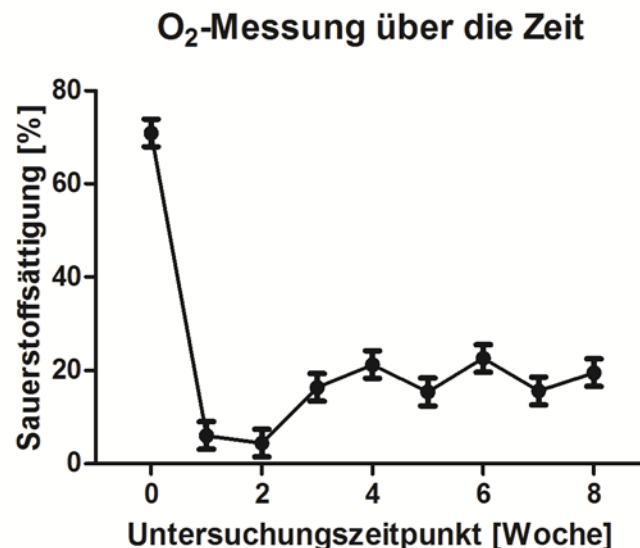


Diagramm 2: Zeigt den Sauerstoffgehalt im Zentralkanal des Scaffolds. Deutlich zu erkennen ist der starke Abfall zu Beginn der Untersuchung. Die Werte sind als kleinste mittlere Quadrate mit 95% Konfidenzintervall dargestellt.

Zeitpunkt I	Zeitpunkt II	Wertedifferenz	unteres KI	oberes KI	p-Wert
0	2	66,50	60,64	72,35	<0.0001
0	1	64,86	59,01	70,71	<0.0001
0	5	55,51	49,65	61,36	<0.0001
0	7	55,31	49,46	61,17	<0.0001
0	3	54,54	48,69	60,40	<0.0001
0	8	51,39	45,54	57,24	<0.0001
0	4	49,67	43,82	55,52	<0.0001
0	6	48,29	42,44	54,14	<0.0001
6	2	18,21	12,35	24,06	<0.0001
4	2	16,83	10,98	22,68	<0.0001
6	1	16,57	10,72	22,42	<0.0001
4	1	15,20	9,34	21,05	<0.0001
8	2	15,11	9,26	20,96	<0.0001
8	1	13,47	7,62	19,32	<0.0001
3	2	11,95	6,10	17,80	<0.0001
7	2	11,18	5,33	17,03	<0.0001
5	2	10,99	5,14	16,84	<0.0001
3	1	10,32	4,47	16,17	<0.0001
7	1	9,55	3,70	15,40	<0.0001
5	1	9,36	3,50	15,21	<0.0001
6	5	7,21	1,36	13,07	0,0044
6	7	7,02	1,17	12,87	0,0064
6	3	6,25	0,04	12,10	0,0261
4	5	5,84	-0,01	11,69	0,0511
4	7	5,65	-0,21	11,50	0,0683
4	3	4,88	-0,98	10,73	0,1905
8	5	4,12	-1,74	9,97	0,4123
8	7	3,92	-1,93	9,78	0,481
8	3	3,15	-2,70	9,01	0,7584
6	8	3,10	-2,75	8,95	0,776
4	8	1,72	-4,13	7,57	0,9919
1	2	1,63	-4,22	7,49	0,9943
6	4	1,38	-4,48	7,23	0,9983
3	5	0,96	-4,89	6,81	0,9999
3	7	0,77	-5,08	6,62	1
7	5	0,19	-5,66	6,04	1

Tabelle 4: Vergleicht sämtliche Untersuchungszeitpunkte der Sauerstoffmessungen auf deren signifikante Abweichung voneinander. Angeben ist jeweils die Wertedifferenz zwischen den Untersuchungszeitpunkten [*Wertedifferenz*], das untere und das obere Konfidenzintervall [*unteres/oberes KI*] und der Signifikanzwert [*p-Wert*], sortiert nach p-Wert. Die verschiedenen oben hell dargestellten Sauerstoffmessungen der verglichenen Zeitpunkte weichen signifikant voneinander ab.

3.4 Wirbelstrommessung

Nach Einleitung der Narkose wurde vor der pH- und Sauerstoff-Messung in jeder Untersuchungswoche eine Wirbelstrommessung durchgeführt. Um einen Drift der Sonde auszuschließen, wurde vor jeder Messung der einzelnen Ratten eine Referenzmessung in Luft durchgeführt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnten keine stärkeren Drifts der Sonde festgestellt werden. Pro Versuchstier wurden 5 Messungen durchgeführt und das Mittel gebildet. Die erhaltenen Werte f_{res} und Q wurden um den etwaigen Drift korrigiert und als Δf_{res} und ΔQ angegeben. Ähnlich den oben aufgeführten pH-Werten zeigten die Wirbelstrommessungen einen starken Abfall im Verlauf von der 1. bis hin zur 3. Untersuchungswoche. Ab diesem Zeitpunkt kam es zu einem stetigen Anstieg der Resonanzfrequenz und der Kreisgüte. In der 6. Woche stagnierte dieser Anstieg, um in Woche 7 das absolute Maximum der beiden Parameter zu erreichen. Nach diesem Maximum kam es zu einem leichten Rückgang der Frequenz auf ein ähnliches Niveau wie in Untersuchungswoche 5. Bei all diesen Messverläufen zeigten sich Parallelen zur pH-Messung in Kapitel 3.2.. Diese Entwicklung konnte bei allen Tieren in ähnlicher Weise beobachtet werden. Diagramm 3 und Diagramm 4 zeigen den jeweiligen zeitlichen Verlauf aller Tiere von Δf_{res} und ΔQ mit Angabe der Standardabweichung.

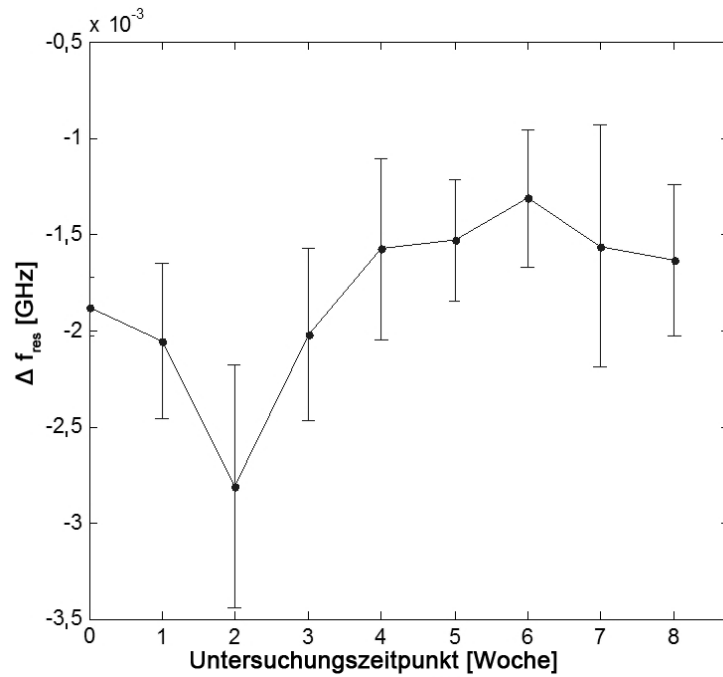


Diagramm 3: Zeigt den Verlauf von Δf_{res} über die Zeit, mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung. Wie auch bei der pH-Messung (vgl. hierzu 3.2) zeigt die Resonanzfrequenz einen deutlichen Abfall bis auf ein Minimum in der 3. Untersuchungswoche. Danach kommt es zu einem stetigen Anstieg mit einem Maximum in Woche 7.

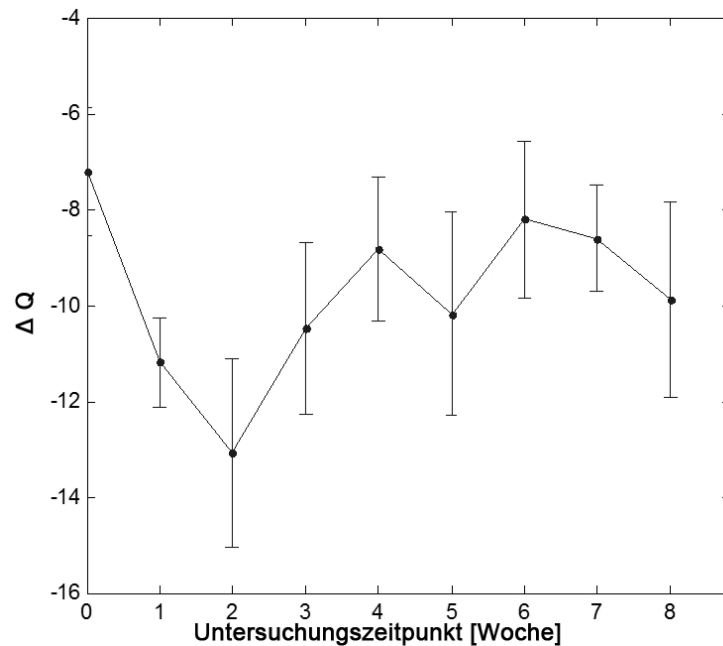


Diagramm 4: Zeigt die Kreisgüte ΔQ über die Zeit, mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung. Ähnlich dem Verlauf von Δf_{res} zeigt die Kreisgüte ΔQ ein Minimum in Woche 3 und ein Maximum in Woche 7.

3.5 Computertomografische Untersuchung

Zur späteren Korrelation mit den Wirbelstrommessungen und zur Kontrolle der Knocheninduktion wurde mit Hilfe der Computertomographie die Knochendichte des Scaffolds ermittelt. Dies erfolgte 2 Wochen post implantationem und nach Opferung der Tiere 10 Wochen nach Beginn der Studie. Die computertomografische Untersuchung der Versuchstiere ergab eine Knochenneubildung und eine Zunahme der Knochendichte in vier Proben. Somit konnte eine signifikante Knochenzunahme ermittelt werden ($p=0,03$). Die höchste Zunahme des Knochendichteniveaus betrug 74,1 HU; im Mittel nahm die Dichte um 40,2 HU ($\pm 35,8$ HU) zu; der Median ergab einen Wert von 60,6 HU. Diagramm 5 zeigt die Entwicklung der Knochendichte über den Versuchszeitraum. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen exemplarisch die Veränderungen, die röntgenologisch nachgewiesen werden konnten. Ektope Knochenneubildung, wie sie in vorangegangenen Studien beschrieben wurde (BECKER et al. 2009, WARNKE et al. 2010a), konnte nicht nachgewiesen werden.

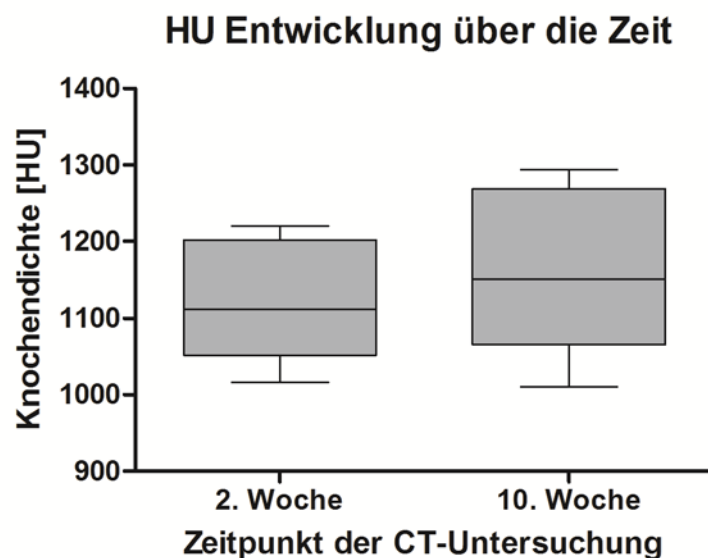


Diagramm 5: Knochendichtentwicklung aller Versuchstiere über die Zeit. Die erste Messung erfolgte zwei Wochen post operationem, bei gleichzeitiger Gabe von rh-BMP2, die zweite Messung wurde nach Tötung der Tiere in der 10. Woche durchgeführt. Bei drei Tieren konnte eine deutliche Knochendichtezunahme nachgewiesen werden, bei einem Versuchstier mäßige und bei einem weiteren keine messbare Veränderung im Knochendichteniveau.

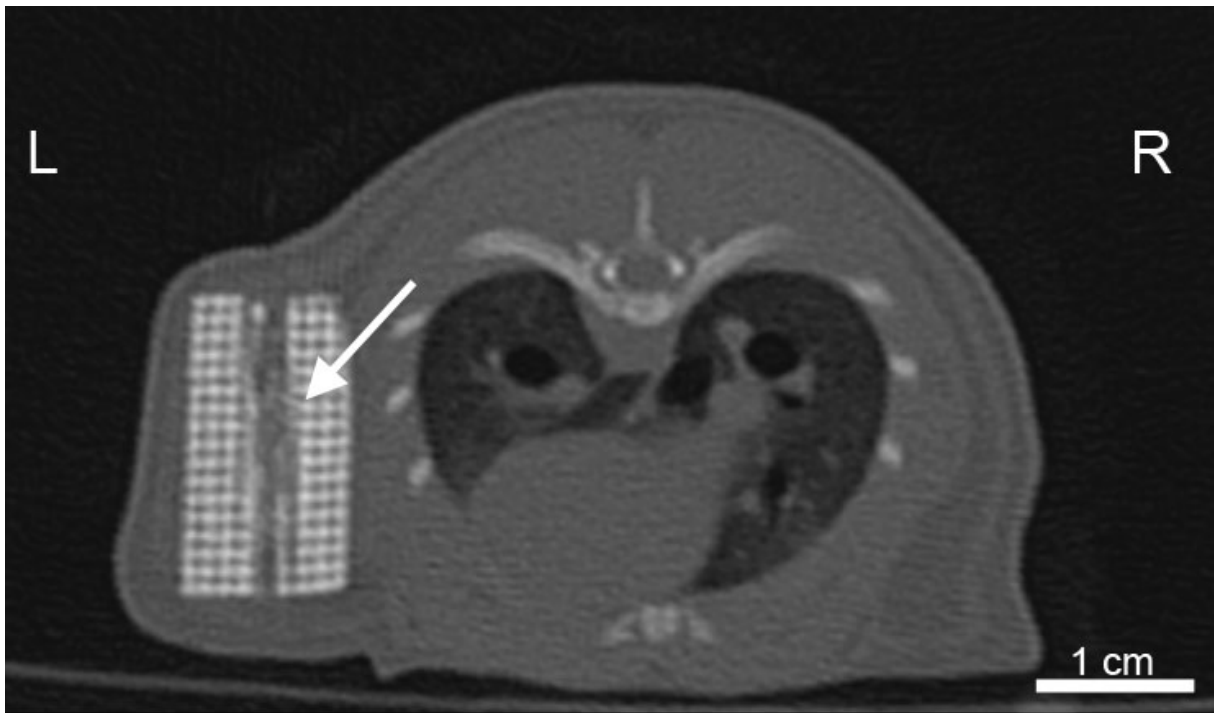


Abbildung 10: *Computertomografische Darstellung des Scaffolds, koronare Schichtung, 10 Wochen nach Implantation.* Das linksseitig oberhalb des M. latissimus dorsi eingebrachte Scaffold hat keinen Kontakt zum Knochengewebe des Versuchstiers. Der Pfeil markiert zentral im Implantat gebildete röntgendichte Strukturen, im Sinne einer Knochenbildung im Zentralkanal.

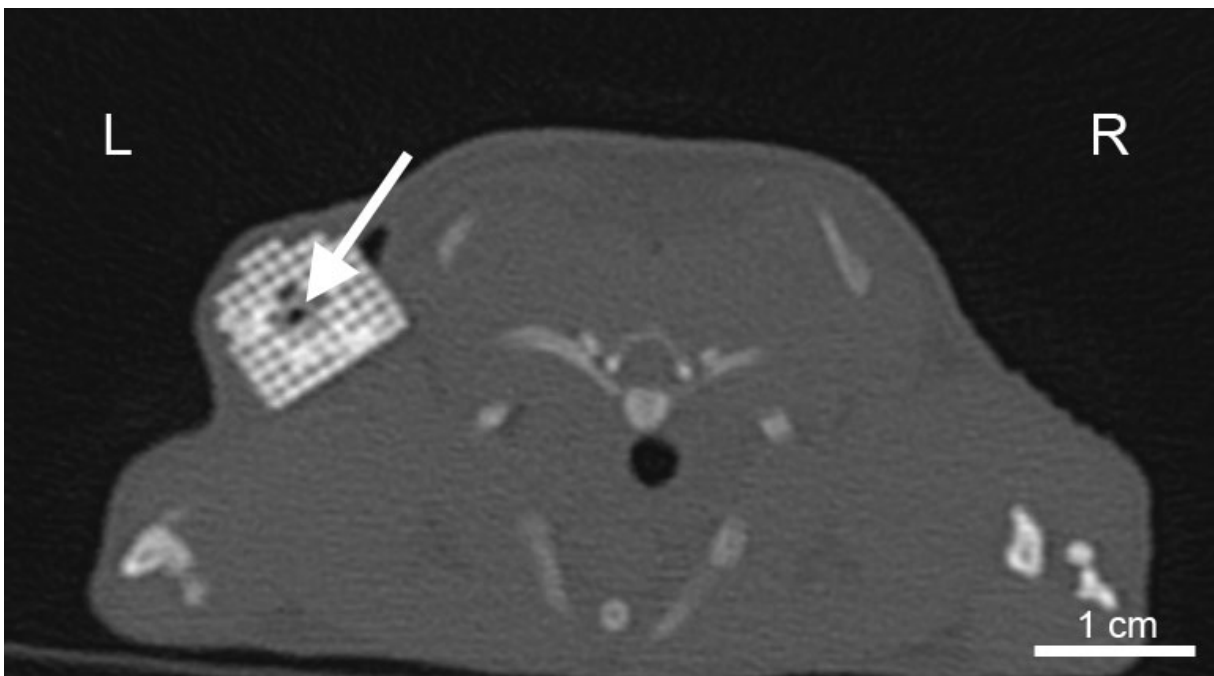


Abbildung 11: *Computertomografische Darstellung des Scaffolds, koronare Schichtung.* Der Pfeil zeigt auf zwei Einstichkanäle der pH- oder Sauerstoff-Sonden. Zirkulär um diese Aufhellungen sind röntgendichte Strukturen zu erkennen, im Sinne einer Knochenneubildung.

3.6 Korrelation von Wirbelstrommessung mit dem pH-Wert

Die Korrelation von Δf_{res} und ΔQ mit dem pH-Wert zeigen die Diagramme 6 und 7. Hierbei konnte mittels linearer Regressionsanalyse ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und Δf_{res} ($R^2=0,77$ und $p=0,004$) gezeigt werden. Über den gesamten Versuchsablauf zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen diesen Parametern bei allen Ratten. Auch zur Kreisgüte ΔQ scheint ein Zusammenhang zu bestehen, der jedoch mit einem Wert von $R^2=0,47$ und $p=0,06$ nicht signifikant nachzuweisen ist.

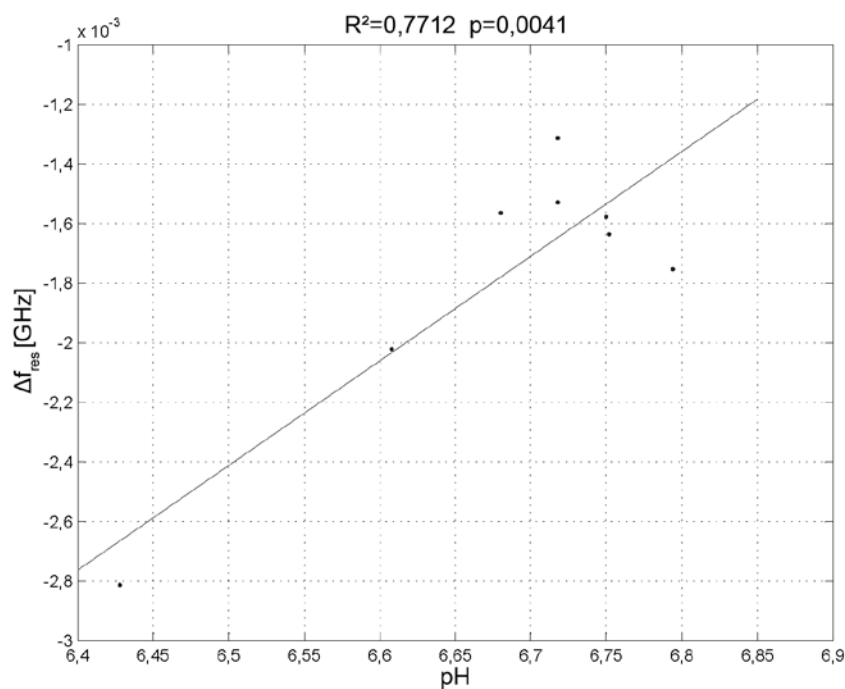


Diagramm 6: Zeigt die Korrelation zwischen den jeweils gemittelten Werten der Resonanzfrequenz [Δf_{res}] und dem pH-Wert. Berücksichtigt wurden die Messwerte im Zeitraum von der 3. Untersuchungswoche bis zum Ende des Versuchs. Hierbei zeigte sich ein signifikant linearer Zusammenhang ($R^2=0,7713/p=0,0041$) zwischen der gemessenen Resonanzfrequenz [Δf_{res}] und dem pH-Wert.

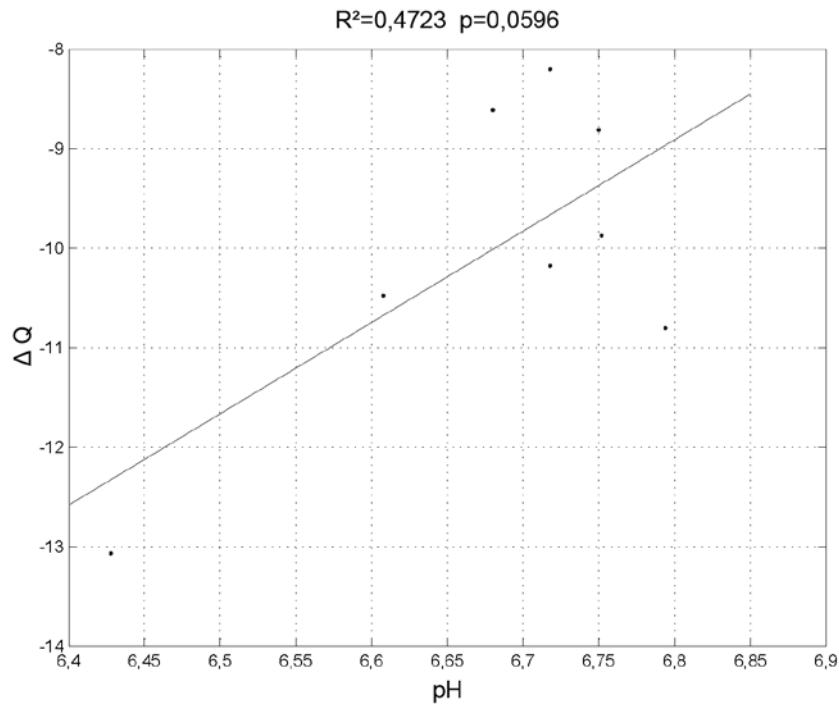


Diagramm 7: Korrelation zwischen den jeweils gemittelten Werten von Kreisgüte $[\Delta Q]$ und dem pH-Wert. Es wurden hierbei alle Werte der 3. bis 10. Untersuchungswoche berücksichtigt. Die durchgeführte lineare Regressionsanalyse konnte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen herstellen ($R^2=0,4724/p=0,0596$).

3.7 Korrelation von Wirbelstrommessung mit der Knochendichte

Für diese Korrelation wurden Δf_{res} und ΔQ mit den computertomografischen Untersuchungen der 3. und der 10. Untersuchungswoche mittels linearer Regressionsanalyse verglichen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen Parametern konnte nicht gezeigt werden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 und der Signifikanzwert p betrug für Δf_{res} $R^2=0,08$ und $p=0,44$. Für ΔQ betrug $R^2=0,002$ und $p=0,91$ (siehe hierzu Diagramme 8 und 9).

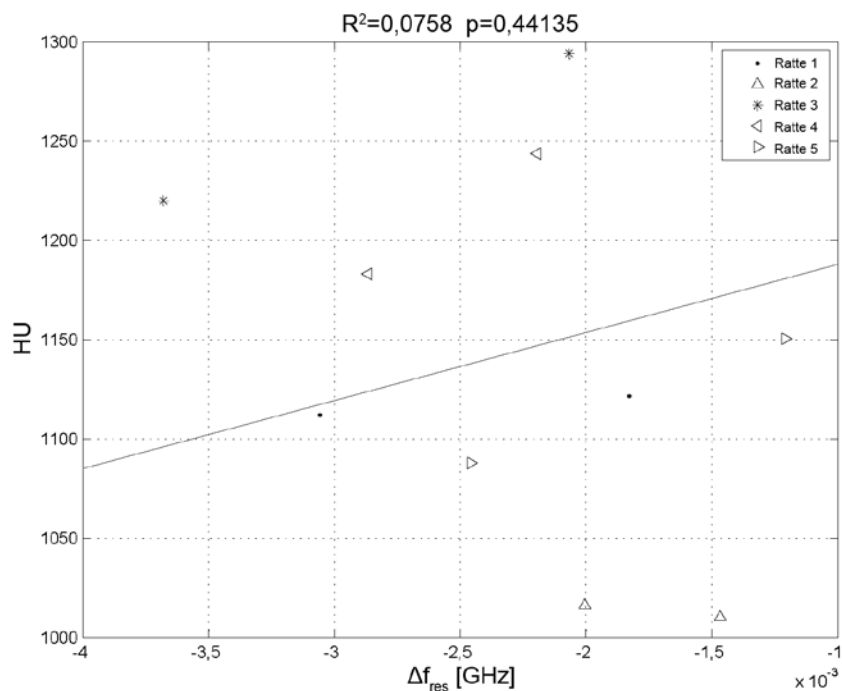


Diagramm 8: Zeigt die Korrelation zwischen den Knochendichtemessungen mittels CT [HU] und den Resonanzfrequenzen $[\Delta f_{res}]$ der jeweiligen Untersuchungstage. Ein linearer Zusammenhang zwischen CT und Resonanzfrequenz konnte nicht nachgewiesen werden ($R^2=0,0758/p=0,4414$).

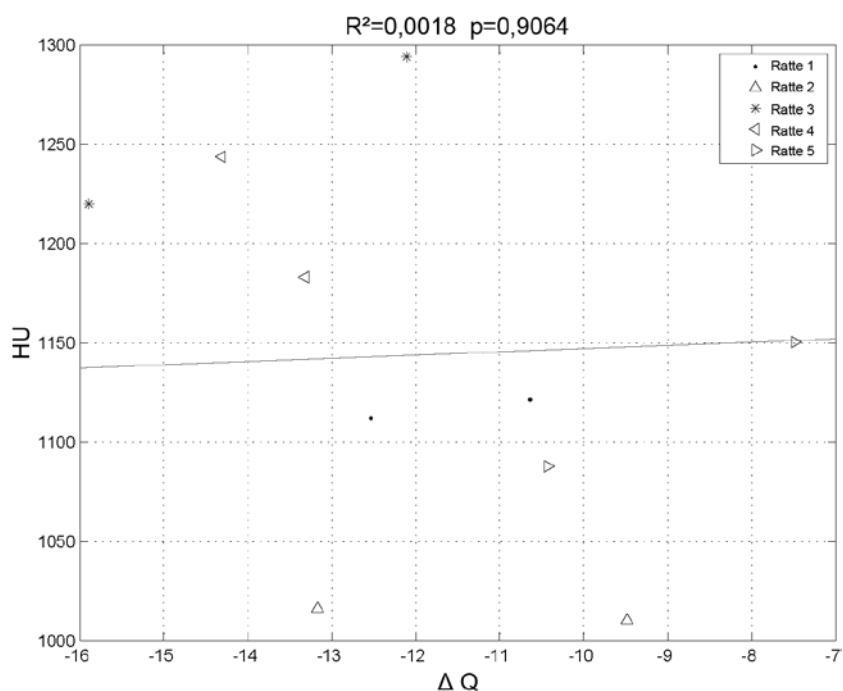


Diagramm 9: Zeigt die Korrelation zwischen den Knochendichtemessungen mittels CT [HU] und der Kreisgüte $[\Delta Q]$ der jeweiligen Untersuchungstage. Auch hier konnte kein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nachgewiesen werden ($R^2=0,0018/p=0,9064$).

3.8 Mikroradiographie

Nach Herstellung der Dünnschliffproben wurden diese röntgenologisch untersucht und zu einer Kollage zusammengestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Proben eine Knochenneubildung eintrat. Diese verteilte sich gleichmäßig über das gesamte Scaffold und war qualitativ und quantitativ in allen Präparaten ähnlich. Im Zentralkanal zeigten sich Spuren der Sondeneinstiche (siehe Abbildungen 12 und 13). In allen Präparaten ließen sich trabekelähnlichen Strukturen darstellen. Diese befanden sich sowohl direkt assoziiert zum Knochenersatzmaterial als auch zwischen den Hydroxylapatit-Abschnitten. Die Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 13 in 12-facher Vergrößerung zeigt strukturelle Details der Knochenneubildung insbesondere um den Zentralkanal. Das Osteoid zeigte allseits Kontakt zum Scaffold. Eine ektope Knochenneubildung konnte nicht gezeigt werden.

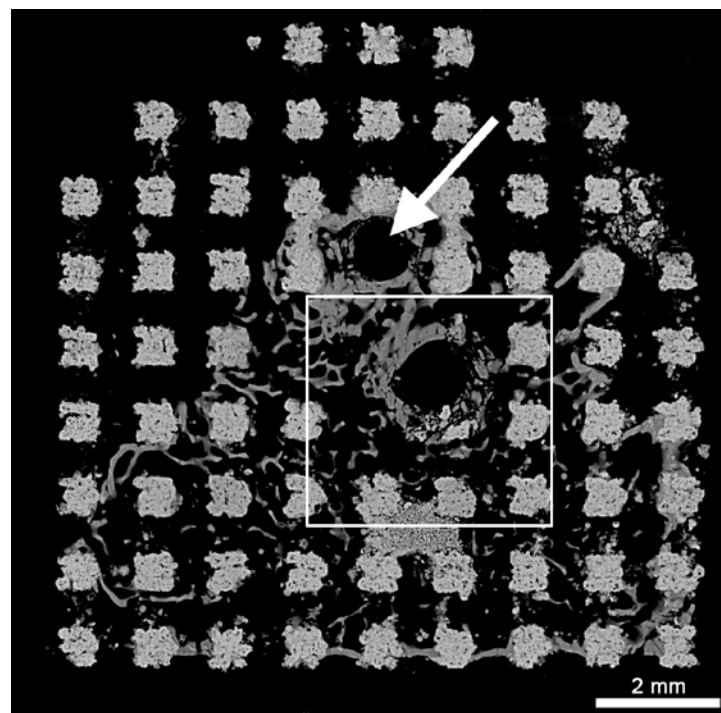


Abbildung 12: *Übersichtsdarstellung der Mikroradiografie. 6-fache Vergrößerung.* Nahezu das gesamte Implantat ist mit Knochen durchsetzt. Der Pfeil weist auf einen im Zentralkanal gelegenen kreisrunden Defekt, der durch die Messsonde verursacht worden sein könnte, hin. Ein zweiter Defekt befindet sich circa 1 mm unter dem ersten. Dieser wird in der nächsten Abbildung in Vergrößerung dargestellt.

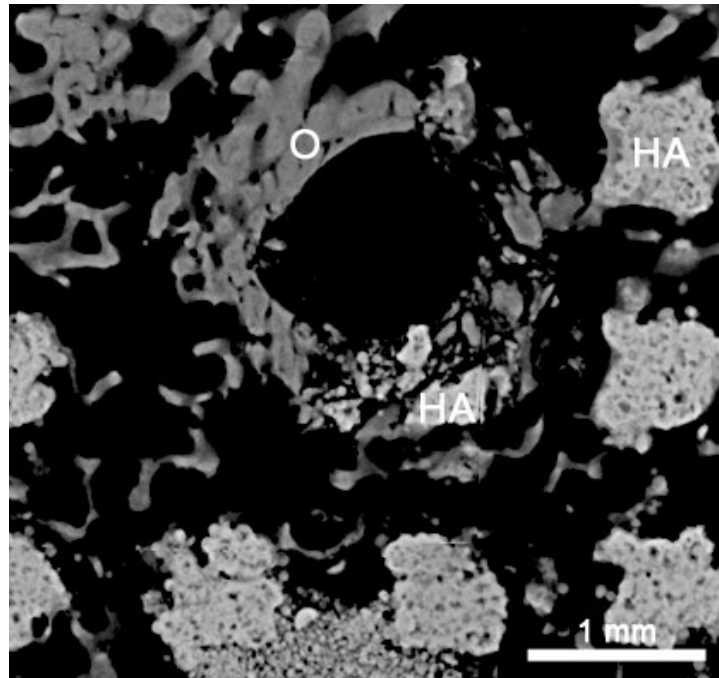


Abbildung 13: 12-fache Vergrößerung, Ausschnitt aus Abbildung 12. Diese Abbildung zeigt eine der Einstichstellen der Meßsonden im Zentralkanal. Um den Einstichkanal ist Osteoid nachweisbar (O). Im rechten Anteil stellt sich ein zerstörter Scaffoldanteil dar (HA unten), im Gegensatz dazu ein intakter HA-Anteil (HA oben). Der gesamte Zentralkanal ist gleichmäßig von Knochen durchsetzt.

3.9 Toluidinblaufärbung

Nach der durchgeführten Mikroradiographie folgte eine Färbung mit Toluidinblau. Vom Hydroxylapatit ausgehend wiesen alle Präparate Anzeichen von Knochenneubildungen auf. Auch hier konnte jeweils eine gleichmäßige Durchbauung mit unreifem Knochen dargestellt werden. Die meiste Neubildung fand zylindrisch um den Zentralkanal statt. In den Detailaufnahmen sind Korrelate der Knochenbildung sichtbar. Um Havers-Kanäle zentral, im Osteon gelegen, zeigte sich lamellenförmig angeordneter Knochen mit einer durchschnittlichen Dicke von 5-20 μm . Zwischen den konzentrisch angeordneten Knochenlamellen waren Kittlinien und Osteozyten zu identifizieren. In enger Nachbarschaft zu HA-Anteilen und Knochen war das ganze Präparat von Gefäßen durchzogen (siehe hierzu auch Kapitel 3.12). Die nicht mit Knochengewebe durchbauten Areale des Scaffolds waren mit bindegewebiger Substanz aufgefüllt. Auch hier bestand eine gleichmäßige Kapillarisation.

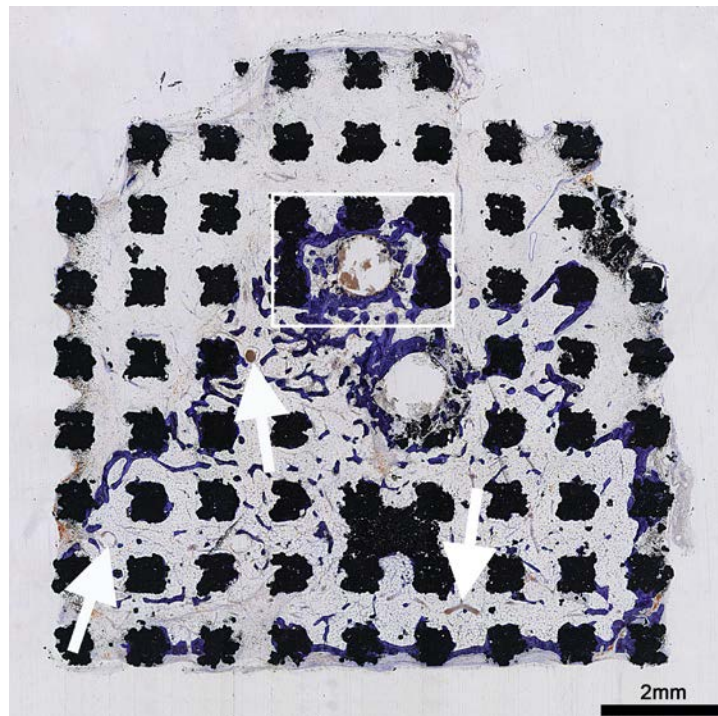


Abbildung 14: Übersichtsaufnahme eines HA-Scaffolds, Semidünnschnitt, Toluidinblau, 6-fache Vergrößerung. Gut zu erkennen ist das Hydroxylapatit (schwarz) und die Knochenneubildung (blau), welche das gesamte Scaffold durchzieht. Die Übersichtsdarstellung zeigt das gleiche Implantat wie die Abbildung 12 der Mikroradiografie. Auch hier sind die vermeintlichen Einstiche im Zentralkanal gut erkennbar. Die Pfeile weisen auf Gefäßkorrelate an verschiedenen Stellen im gesamten Scaffold hin.

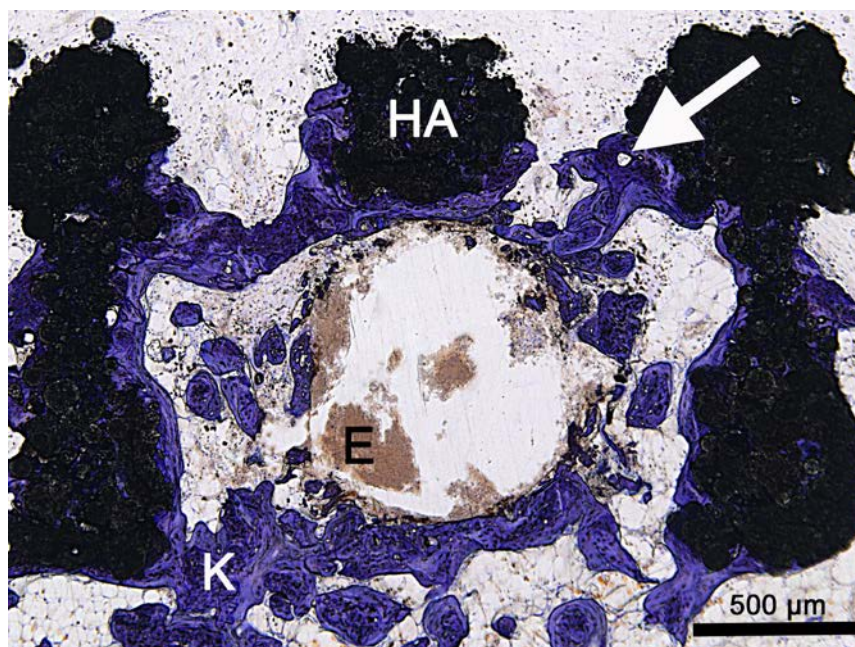


Abbildung 15: Semidünnschnitt, Toluidinblau, 12-fache Vergrößerung. Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 14. Erkennbar sind Blutkorrelate (E) im Sondeneinstich zentral. Gut zu unterscheiden ist der schwarz gefärbte Scaffold (HA), vom unreifen Knochen (K). Im oberen rechten Bereich ist ein Havers-Kanal mit konzentrisch angeordnetem Lamellenknochen sichtbar (Pfeil).

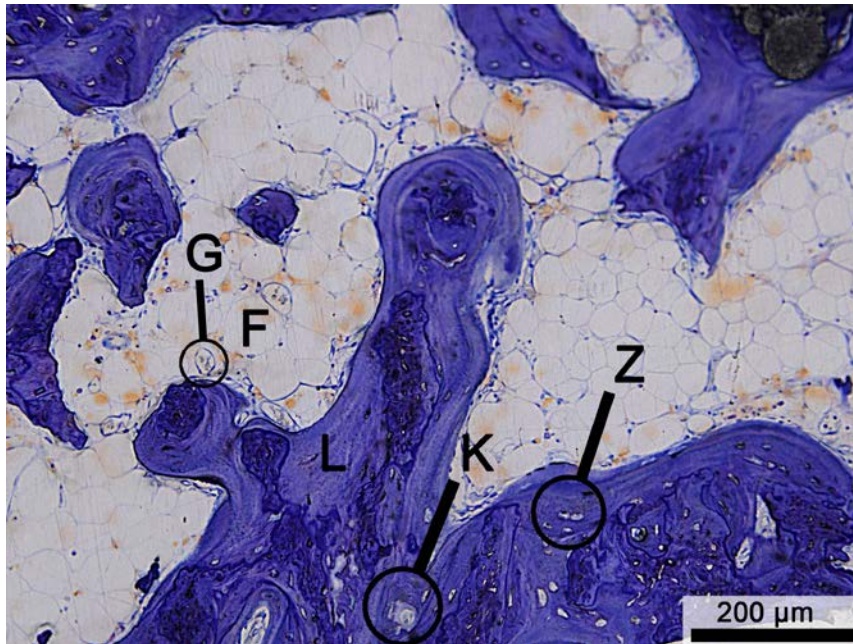


Abbildung 16: *Semidünnschnitt, Toluidinblau, 30-fache Vergrößerung.* In dieser Vergrößerung ist der lamellenhafte Aufbau des unreifen Knochens gut erkennbar (L). In ihm eingelagert finden sich sowohl Osteozyten (Z), als auch Osteoklasten (K). In enger Nachbarschaft zum Knochen befinden sich im ganzen Präparat Gefäße (G) und Fett (F).

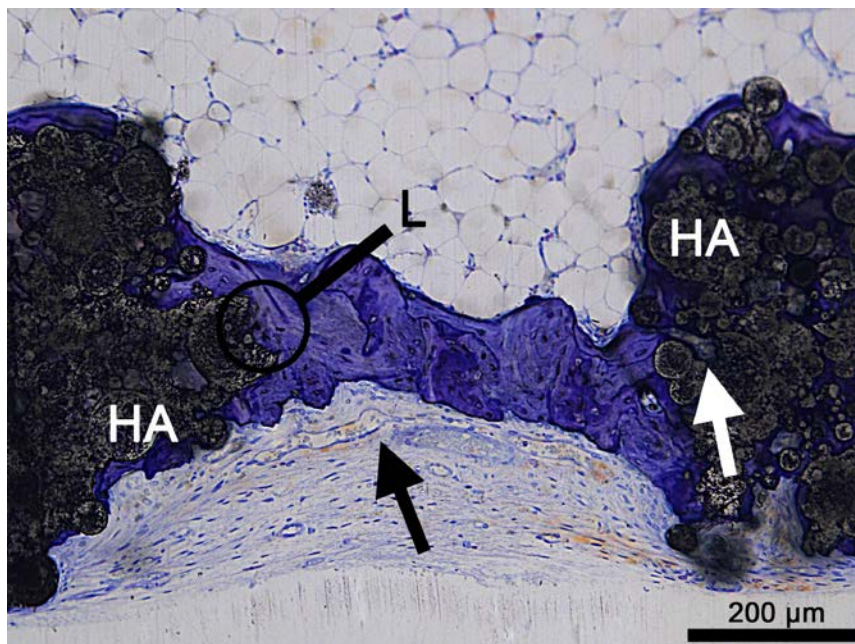


Abbildung 17: *Semidünnschnitt, Toluidinblau, 30-fache Vergrößerung.* Knochenbrücke zwischen zwei HA-Anteilen (HA). Das Scaffold wurde in diesem Bereich komplett in den Knochen integriert. Auch hier zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen unreifem Knochen und Gefäßen (*schwarzer Pfeil*). Sowohl rechts (*weißer Pfeil*) als auch links (L) sind Veränderungen im Sinne von Remodelling-Vorgängen zu beobachten.

3.10 Masson-Goldner-Färbung

Abbildung 18 zeigt eine Übersichtskollage der Paraffinschnitte in Masson-Goldner. Alle Scaffolds wiesen eine komplett knöcherner, beziehungsweise bindegewebige Durchbauung auf und wurden gut in die Tasche auf dem M. latissimus dorsi integriert. Die Peripherie der Implantate zeichnete sich durch eine faser- und gefäßreiche bindegewebige Kapsel aus. Im Randbereich einiger Präparate waren Anteile des M. latissimus dorsi erkennbar. Im Sinne eines beginnenden Remodellings waren Resorptionslakunen, Kittlinien und Havers-Kanäle nachweisbar (vgl. Abbildung 19). Auch in den Paraffinschnitten ließen sich zahlreiche Gefäßanschnitte in direkter Nachbarschaft zu Knochenneubildungen (siehe Abbildungen 20 und 23), sowie vereinzelt in Zentralkanälen von Knochenformationen, als auch in den von Bindegewebe durchsetzten Anteilen der Matrize, nachweisen. Zirkulär um die Gefäßneubildungen konnte eine bindegewebige Umhüllung dargestellt werden (Abbildung 20). In den Bereichen des Scaffolds, in denen sich kein Knochen gebildet hatte, fand man vorwiegend Binde- und Fettgewebe vor. Der Bereich zwischen den neu gebildeten Knochentrabekeln bestand hauptsächlich aus Fettgewebe (vgl. Abbildungen 20 und 22).

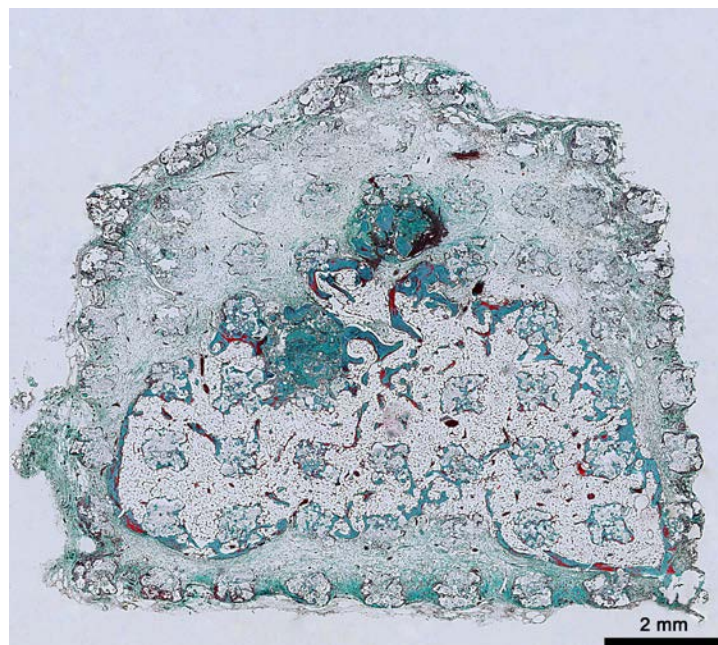


Abbildung 18: *Dünnschnitt, Paraffin, Masson-Goldner, 6-fache Vergrößerung, Übersichtskollage.* Zeigt einen Scaffold mit kompletter knöcherner und bindegewebiger Durchbauung.

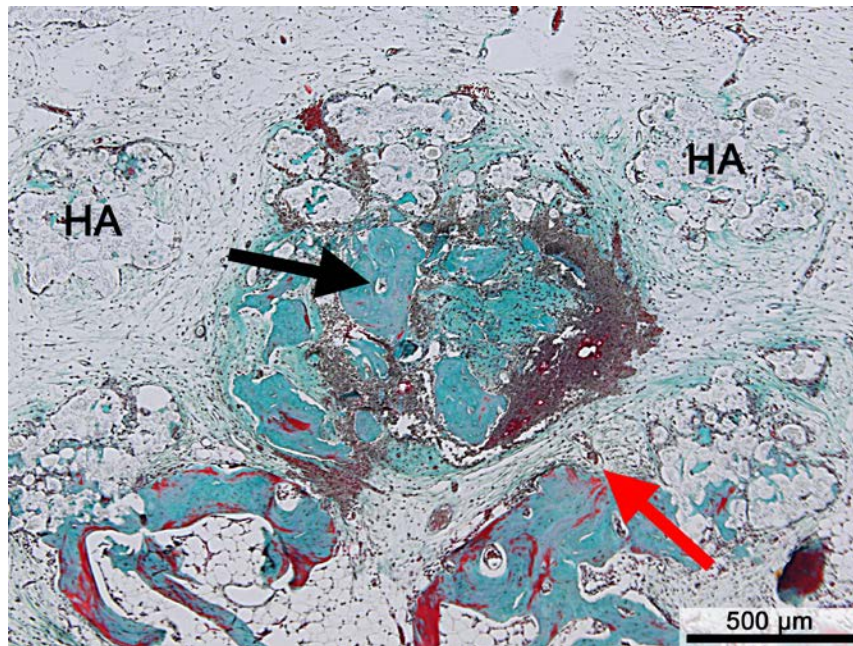


Abbildung 19: *Dünnschnitt, Paraffin, Masson-Goldner, 12-fache Vergrößerung.* Im Zentralkanal zeigt sich neben Hydroxylapatitanteilen (HA) zentral neuer unreifer Knochen mit ersten frühen Havers-Kanälen (schwarzer Pfeil). Im ganzen Präparat sind Gefäßanschnitte nachzuweisen (roter Pfeil).

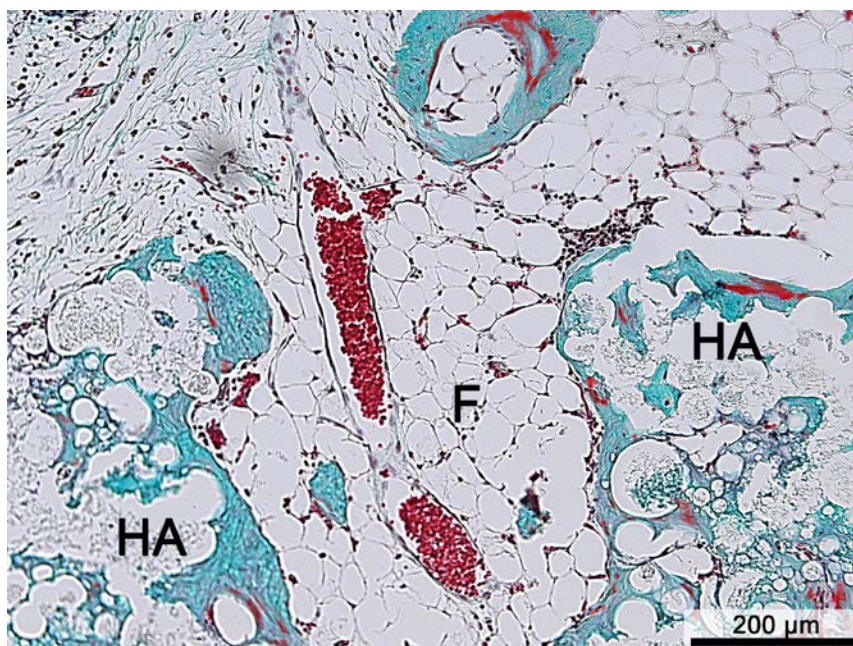


Abbildung 20: *Dünnschnitt, Paraffin, Masson-Goldner, 30-fache Vergrößerung, Gefäßanschnitt längs.* Zwischen zwei Implantatanteilen (HA) liegt eine Sammelvenole mit einem ungefähren Durchmesser von 50 µm. Umschlossen wird dieses Gefäß von Fettgewebe (F).

3.11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 21 zeigt eine Übersichtskollage der Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Wie auch klinisch zeigten sich bei dieser Färbung keine Anzeichen einer vorrangegangenen größeren Infektion. Das umgebene Gewebe bestand aus Muskel-, Binde- und Fettgewebe, sowie zahlreichen Gefäßen. Das Implantat wurde komplikationslos von Bindegewebe und Kapillaren durchsetzt (siehe unten). Geringe Entzündungszeichen ließen sich in zwei Präparaten nachweisen. Diese beschränkten sich auf das Gebiet um die Einstichstellen der Sonden im Zentralkanal. Die Knochenbildung fand nicht nur zwischen den Hydroxylapatitanteilen statt. Es zeigte sich auch eine Neubildung um und in Scaffoldanteilen (siehe Abbildung 22). Lamellen aus übereinander gelagerter mineralisierter Matrix mit einer unreifen oberen Schicht konnte in verschiedenen Schnitten gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Schichten zeigen sich regelmäßig sowohl Osteozyten als auch Osteoblasten.



Abbildung 21: *Dünnschnitt, Paraffin, Hämatoxylin-Eosin, 6-fache Vergrößerung, Übersichtskollage.* Sichtbar ist eine komplikationslose Durchsetzung des Scaffolds mit Bindegewebe und Knochen. Lediglich um eine vermeintliche Einstichstelle sind geringe Entzündungszeichen sichtbar.

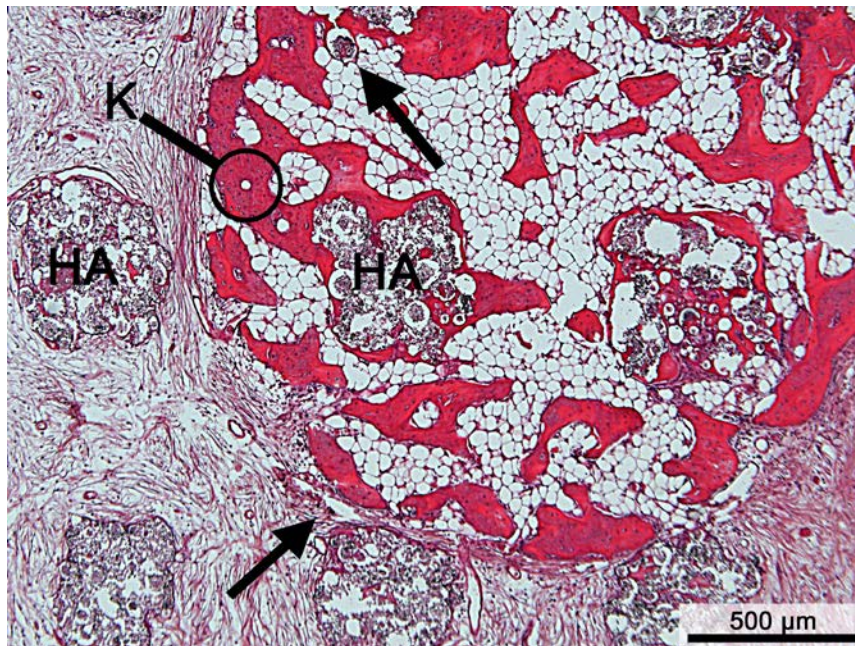


Abbildung 22: *Dünnschnitt, Paraffin, Hämatoxylin-Eosin, 12-fache Vergrößerung.* Grenzbereich zwischen Knochen und Bindegewebe im Scaffold (HA). Die Knochenneubildung ist allumfassend von Bindegewebe bedeckt. Zwischen den Knochen trabekeln ist Fettgewebe zu erkennen. In den Knochenformationen sind Havers-Kanäle sichtbar (K). Die Ernährung des Bindegewebes und des Knochens erfolgt über direkt angrenzende Gefäße (Pfeile).

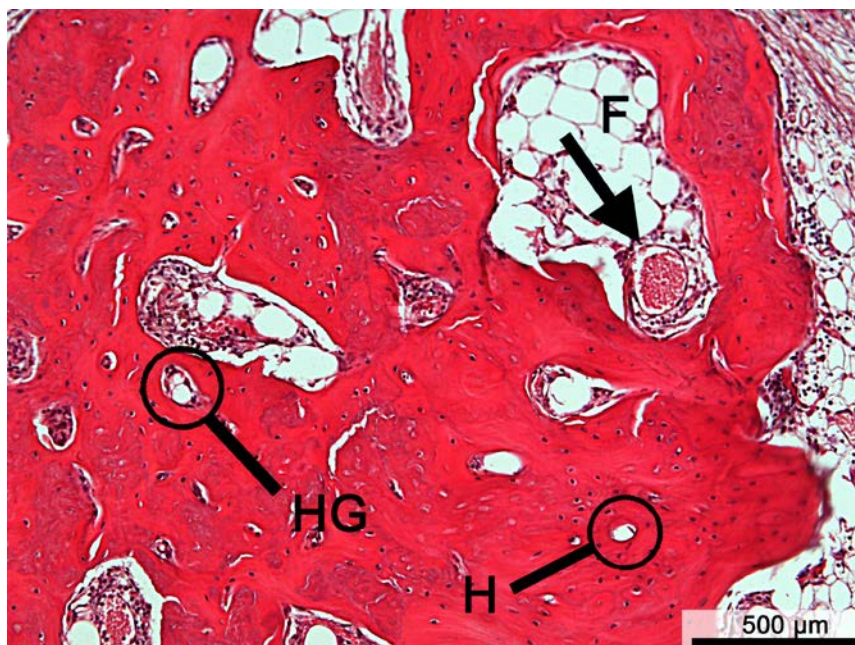


Abbildung 23: *Dünnschnitt, Paraffin, Hämatoxylin-Eosin, 30-fache Vergrößerung.* Knochenformation im Zentralkanal. Gut sichtbar ist der physiologische Aufbau des Knochens mit Havers-Kanälen mit (HG) und ohne Zentralgefäß (H). Der Pfeil markiert eine quer geschnittene Sammelvene, die in direkter Nachbarschaft zum Knochen und Fett (F) liegt.

3.12 Immunhistochemische Färbung PECAM-1

Durch die Immunhistochemie mit PECAM-1 konnte in allen Präparaten eine gleichmäßige Durchbauung mit zahlreichen Gefäßen nachgewiesen werden. Die Gefäße waren ähnlich häufig mit Binde- oder Fettgewebe umgeben. Sowohl in Bereichen mit knöcherner Durchbauung als auch in den Bereichen des Scaffolds, die mit Bindegewebe aufgefüllt waren, konnten Gefäße nachgewiesen werden. In der Färbung stellten sich kleinste Kapillaren bis hin zu Sammelvenolen mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm dar. In mehreren Proben konnte mit Hilfe dieser Färbung ein Zentralgefäß in Havers-Kanälen nachgewiesen werden. Eine dominierende Lokalisation der Gefäße auf bestimmte Anteile des Scaffolds konnte nicht gezeigt werden.

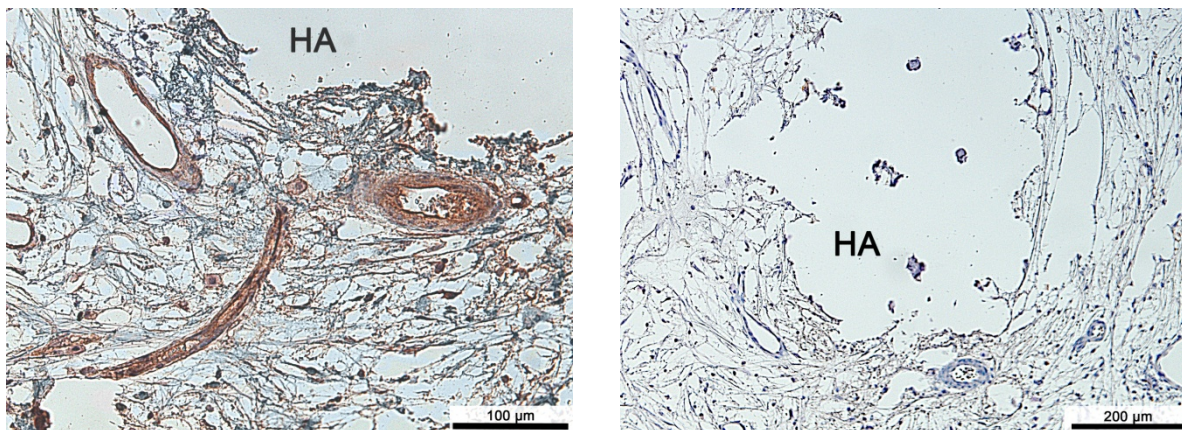


Abbildung 24: links: *Dünnschnitt, Paraffin, immunhistochemische Färbung mit PECAM-1, 30-fache Vergrößerung*; rechts: *Dünnschnitt, Paraffin, Negativ-Kontrolle der immunhistochemischen Färbung mit PECAM-1, 12-fache Vergrößerung*. Gegenüberstellung der Immunhistochemie gegen PECAM-1 und der dazugehörigen Negativ-Kontrolle des gleichen Bildausschnitts. Eine deutliche braune Färbung der Endothelzellen im linken Bild ist sichtbar. Diese befinden sich in direkter Nachbarschaft zu Scaffoldanteilen (HA). Hydroxylapatit und Knochen wurden durch das nötige Andauen unter Hitze im Drucktopf ausgewaschen.

4 Diskussion

In der rekonstruktiven Chirurgie ist die Verfügbarkeit von Knochenersatz aus Autografts für die Behandlung großer Knochendefekte begrenzt. Das Tissue Engineering ist auf dem Weg, die Möglichkeit zu bieten, biologisch funktionsfähigen Knochen zu züchten. Diese Methode macht die Notwendigkeit eines zweiten Eingriffs zur Transplantatentnahme unnötig und verhindert so zusätzliche Defekte und Komplikationen im Entnahmegebiet (BECKER et al. 2011). Aus diesem Grund werden Alternativen wie dreidimensionale Scaffolds immer relevanter für die Therapie (JONITZ et al. 2011). Maßgeschneiderte gedruckte poröse Gerüste aus Hydroxylapatit sollen die individuelle Versorgung von Knochendefekten des jeweiligen Patienten ermöglichen (WARNKE et al. 2010b). Da die postoperative Lebensqualität bei onkologischen Patienten zu einem wichtigen Therapiebestandteil geworden ist (BJORDAL et al. 2000), bietet das Tissue Engineering in Zukunft eine hervorragende Versorgungsmöglichkeit dieses Patientenkollektivs (HELIOTIS et al. 2006, WARNKE et al. 2006). Durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren, wie dem schon vor 30 Jahren entdeckten BMP (URIST et al. 1979) lassen sich theoretisch Transplantate auch an heterotopen Stellen des Körpers z.B. im M. latissimus dorsi züchten (OKUBO et al. 2000, TERHEYDEN et al. 2001b, HELIOTIS et al. 2009). In vorangegangenen Studien wurde im Tiermodell Hydroxylapatit als geeignetes Scaffoldmaterial ermittelt (BECKER et al. 2009) und der beste Applikationszeitpunkt für die Wachstumsfaktoren untersucht (WARNKE et al. 2010a). Eine verzögerte Gabe nach 7 und 14 Tagen post implantationem erwies sich als optimaler Zeitpunkt für den Wachstumsfaktor rhBMP-2 (BECKER et al. 2010).

Bisher fehlt die breite klinische Anwendung des Tissue Engineerings, da teilweise selbst einfache Grundlagen unbekannt sind. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert in einem HA-Scaffold *in vivo* über den Versuchszeitraum zu untersuchen, um hierüber Erkenntnisse über die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff im zeitlichen Verlauf zu gewinnen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt liegen zu den Vorgängen im Scaffold während der Knocheninduktion lediglich *in vitro*-Daten vor. Diese beschränken sich zusätzlich lediglich auf die ersten acht Tage post implantationem (JONITZ et al. 2011). *In vivo*-

Daten, die die metabolischen Parameter während der Knocheninduktion untersuchen, liegen zum derzeitigen Zeitpunkt nicht vor.

Mit Hilfe der Sauerstoff- und pH-Messungen war es möglich, ein Versorgungsprofil des Gewebes im Scaffold über die gesamte Versuchszeit zu erstellen. Nach dem Verbrauch der lokal verfügbaren Nährstoffe kam es zu einem starken Abfall vom pH-Wert und der Sauerstoffsättigung. Dies geschah vermutlich aufgrund des anaeroben Metabolismus und der Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten. Des Weiteren induziert eine Kolonisation in der Peripherie eine zusätzliche Verringerung des verfügbaren Sauerstoffs und der Nährstoffe in zentralen Bereichen des Implantats (VUNJAK-NOVAKOVIC & FREED 1998). Darüber hinaus gehen wir davon aus, dass eine Abnahme der Sauerstoff-Sättigung sowie des pH-Wertes mit einer wachsenden Zellpopulation korreliert, so dass diese Werte als indirekte Parameter für zelluläre Einsprossung in die Matrize zu sehen sind.

Andere *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die Hypoxie eine Proliferation von Osteoblasten und eine Neoangiogenese induziert (TUNCAY et al. 1994, STEINBRECH et al. 1999, STEINBRECH et al. 2000), die Differenzierung allerdings unterdrückt wird (UTTING et al. 2006). Bei Sauerstoffüberschuss kommt es wiederum zu einer verstärkten Differenzierung der Osteoblasten (ARNETT et al. 2003). So könnte die anfänglich gemessene Hypoxie dazu beitragen, dass es in den ersten Wochen zu einer verbesserten zellulären Besiedelung des Scaffolds und einer größeren Neovaskularisation durch Kapillareinsprossung kam. Dies würde den ab der 3. Woche beginnenden Anstieg der Sauerstoffkonzentration erklären. In der folgenden Zeit schien es zu einem sinusförmigen Verlauf des Sauerstoffangebots gekommen zu sein, der einer stufenweisen Kolonisation der Matrix entsprechen könnte. Diese Schwankungen könnten für ein jeweils größeres Angebot an Sauerstoff, also der ausreichenden Neovaskularisation und in den Wochen mit niedrigerem Sauerstoff-Gehalt für eine Zunahme der Zelldichte mit erhöhtem Bedarf an Sauerstoff stehen (siehe hierzu Kapitel 3.3). Daten zur optimalen Sauerstoffkonzentration für Knochenwachstum liegen nicht vor; die mittlere Sauerstoffkonzentration im Gewebe beträgt jedoch 1-9 % (LEE et al. 2007). Diese Werte wurden in keiner Phase des Versuchs unterschritten.

Nach der Implantation kommt es zu einem Einwachsen von Weichgewebe und einer zellulären Besiedlung der Oberfläche des Gerüsts aus der Peripherie (MUSCHLER et al. 2004), während sich im Inneren des Scaffolds ein Hämatom bildet. Begrenzend für die Größe der Matrizen aus solchen alternativen Knochenersatzmaterialien ist die ungleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff (VOLKMER et al. 2008). Der Abstand zwischen Zellschicht und Kapillaren sollte nicht mehr als 200-500 μm betragen, um die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie die Beseitigung von zellulären Abfällen zu gewährleisten (VUNJAK-NOVAKOVIC & FREED 1998, CHOW et al. 2001b, a). Gerade bei größeren Implantaten ist die Sauerstoffversorgung der limitierende Faktor für die Entstehung neuen Knochens. Sauerstoff besitzt einen geringen Löslichkeitskoeffizienten und die Diffusionskapazität in wässrigen Lösungen ist niedrig (MALDA et al. 2007). Dieses Problem besteht sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (JONITZ et al. 2011).

Im Versuchszeitraum kam es nach 3 und nach 6 Wochen zu starken Azidosen, analog zur gemessenen Hypoxie. Dies deutet ebenfalls auf eine unzureichende Versorgung hin. Ab der 7. Woche stellte sich ein pH-Wert wie zu Beginn der Untersuchung ein; dies könnte ein Hinweis auf ein Gleichgewicht zwischen Proliferation von Zellen und Einsprossung von Gefäßen sein. Ab einem pH-Wert von 6,9 konnte *in vitro* keine Knochenneubildung mehr nachgewiesen werden (ARNETT 2010). Diese Ergebnisse lassen sich *in vivo* nicht bestätigen. In der vorliegenden Untersuchung wurden über den gesamten Verlauf der Studie pH-Werte unterhalb dieses Wertes gemessen. Allerdings gibt diese Messung nur den pH-Wert im Zentralkanal wieder. Periphere Anteile des Scaffolds mögen höhere pH-Werte aufgewiesen haben, doch auch gerade im zentralen Anteil kam es zu Knochenneubildung. Der niedrige pH-Wert könnte als Stimulus für die Einsprossung neuer Gefäße dienen und somit zur beschleunigten zellulären Besiedlung beitragen.

Zellen reagieren sehr empfindlich auf die Änderung der H^+ -Konzentration, daher ist ein stabiler pH-Wert lebenswichtig. Hierfür sorgen in erster Linie der $\text{CO}_2 / \text{HCO}_3^-$ Puffer und die Histidin-Reste des Hämoglobins. Neben den typischen Auslösern einer Azidose durch Nieren- oder Lungeninsuffizienz gibt es auch lokale Faktoren, die zu einer Azidose führen können. Hierzu gehören unter anderem Knochenbrüche (SPECTOR et al. 2001), vor allem jedoch eine Ischämie in Verbindung mit einer

Hypoxie (RAGHUNAND et al. 2003, KINGSLEY et al. 2007). Zellkultur-Experimente an Rattenosteoklasten zeigten, dass Protonen eine direkt stimulierende Wirkung auf Osteoklasten aufweisen (ARNETT & DEMPSTER 1986) und diese durch den niedrigen pH-Wert länger überleben (Pereverzev et al. 2008). Osteoblasten reagieren auf pH-Wert-Veränderungen mit einer geringeren Mineralisation. Die Kollagensynthese und die Osteoblastenproliferation sind nicht durch eine einsetzende Azidifikation betroffen (BRANDAO-BURCH et al. 2005).

Faseroptische Messgeräte sind ein häufig eingesetztes Verfahren *in vitro* (JONITZ et al. 2011). Ihr Hauptvorteil ist die geringe Größe der Messeinheit aufgrund der getrennten Anordnung von Sonde und Messgerät. Zudem zeichnen sie sich durch ihre hohe Messgenauigkeit aus ($\text{pH} \pm 0,01$; Sauerstoffsättigung $\pm 0,2\%$). Diese Arbeit stellt den ersten Versuch dar, den Sauerstoffgehalt und den pH-Wert bei Knocheninduktion im lebenden Körper zu messen. Anders als bei *in vitro*-Versuchen, bei denen die Messeinheit in der Probe verbleiben kann, musste in der vorliegenden Arbeit die Sonde jeweils neu in die Mitte der Matrizie eingeführt werden. Dies führte dazu, dass die Sonde nicht immer genau an der gleichen Stelle gemessen hat. Jede Injektion barg das Risiko einer Verschleppung von Keimen mit konsekutiver Entzündung. Die Histologie ergab in zwei Proben Anzeichen einer lokalen Entzündung zirkulär um vermeintliche Einstichstellen. Trotzdem war in direkter Nachbarschaft Knochen nachzuweisen. Durch die exakte Positionierung der Sonde und den erweiterten Messbereich um die Sonde (KLIMANT et al. 2001), bedingt durch die DLR-Messmethode, konnten reproduzierbare Werte in allen Tieren gemessen werden. Trotzdem konnte so nur ein sehr kleiner Bereich des Scaffolds untersucht werden. Diese Studie beschränkte sich auf das Zentrum des Blocks. In weiterführenden Untersuchungen sollten verschiedene Messpunkte sowohl im Zentrum, als auch in der Peripherie untersucht werden.

Durch dieses Verfahren konnte ohne Histologien der verschiedenen Zeitpunkte ein Profil des Knochenwachstums erstellt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Jonitz et. al., die in einem dreidimensionalen Titan-Scaffold (JONITZ et al. 2011) mit den gleichen Messmethoden Untersuchungen *in vitro* durchgeführt haben.

Neben den metabolischen Parametern pH-Wert und Sauerstoffsättigung wurde mittels Wirbelstrominduktion das Knochenwachstum untersucht. Hierbei handelt es

sich um ein neues experimentelles strahlungsfreies Verfahren zur Messung der Knochendichte (WANG et al. 2010), welches in dieser Untersuchung zum ersten Mal *in vivo* zum Einsatz kam. Es ist keine Studie bekannt, die das Verfahren der Wirbelstrominduktion zum Monitoring der Knocheninduktion nutzt.

Die Wirbelstrominduktion bietet als erstes diagnostisches Verfahren die Möglichkeit, ohne Strahlung non-invasiv Einblick in die Heilungs- und Verknöcherungsprozesse beim Patienten zu nehmen. Somit könnte eine lückenlose und genauere Überwachung frisch transplanteder Matrizen erfolgen. Der diagnostische und zeitliche Aufwand beschränkt sich auf ein Minimum und die Untersuchung kann Bedside durchgeführt werden.

Die Wirbelstromprüfung ist als elektrisches Verfahren zur zerstörungsfreien Werkstoffprüfung etabliert. Hauptanwendungsgebiet ist die Gefüge-, Schichtdicken- und Rissprüfung von metallischen Werkstoffen. Diese Arbeit stellt den ersten Versuch dar, die Vorzüge der Wirbelstrommessung auf die Medizin zu übertragen. Bei diesem Verfahren wird durch eine Spule ein wechselndes Magnetfeld erzeugt, das im zu untersuchenden Material Wirbelströme induziert. Mittels eines Sensors wird die Wirbelstromdichte durch das vom Wirbelstrom erzeugte Magnetfeld detektiert.

Die gemittelten und um den Drift korrigierten Messwerte der Resonanzfrequenz Δf_{res} ergaben einen ähnlichen zeitlichen Verlauf im Vergleich zu den zeitgleich stattgefundenen pH-Messungen. Der pH-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität an. Bei dem Wasserstoffion handelt es sich um ein geladenes Teil, ein so genanntes Proton (H^+). Da die Wirbelstrominduktion auf Ladungsänderungen reagiert, muss auch ein Zusammenhang zur pH-Messung bestehen. Dieser Zusammenhang konnte mittels linearer Regressionsanalyse statistisch signifikant ($p=0,004$) nachgewiesen werden. Zu jedem Zeitpunkt des Versuchs bestand ein direkter Zusammenhang zwischen Wirbelstrommessung und pH-Wert. Somit war es erstmals möglich non-invasiv Einblick in das Stoffwechselverhalten einer heterotopen Knocheninduktion zu gewinnen. Dies ermöglicht den Einheilungsverlauf von Implantaten am Patienten strahlungsfrei und mit geringem technischem Aufwand zu überwachen. Interindividuelle Vergleiche der Wirbelstrommessungen waren nur bedingt möglich;

dies erklärt sich vor allem durch die hohe Empfindlichkeit des Wirbelstromes. So war bei jedem Versuchstier eine unterschiedliche Lage des Scaffolds zu erwarten, was eine Vergleichbarkeit erschwerte. Individuelle Veränderungen der Resonanzfrequenz konnten sicher verfolgt werden.

Aufgrund der stufigen Form war das Platzieren der Meßsonde erschwert. Ein weiteres Problem stellte das im Vergleich zum Implantat große Messfeld des Wirbelstromsensors, bedingt durch die Bauart, dar. Diese beiden Faktoren führten zu einer schweren Reproduzierbarkeit des Messbereichs. In zukünftigen Studien sollte Wert auf die Miniaturisierung der Wirbelstromsonde gelegt werden. Hiermit wäre eine gezieltere Untersuchung des Scaffolds möglich.

Bei der Knochenbildung kommt es zu einer Veränderung des Mineralgehalts und somit auch der Permittivität und Leitfähigkeit des Scaffolds. Diese Veränderung kann theoretisch mittels Wirbelstrom dargestellt werden. Somit könnte eine Korrelation zwischen den gemessenen Wirbelströmen und den Knochendichtemessungen aus dem Computertomogramm hergestellt werden. Dies gelang jedoch im vorliegenden Versuch nicht. Grund hierfür könnte sowohl die niedrige Auflösung der computertomografischen Daten, als auch die geringe Anzahl an Untersuchungen gewesen sein. In späteren Studien sollte zu jeder Wirbelstrommessung eine computertomografische Untersuchung erfolgen, um eine genauere zeitliche Korrelation zu ermöglichen. Hierfür bietet sich das Verfahren des Micro-Computertomogramms an, das eine um den Faktor 500-fach bessere Auflösung des gebildeten Hartgewebes zulässt (SWAIN & XUE 2009). Zu beachten ist hierbei jedoch sowohl die erhöhte Strahlendosis, die auch Einfluss auf die Knochenbildung haben könnte, als auch das Narkoserisiko der längeren Inhalationsnarkosen. Um die Messungen in Korrelation zur gebildeten Knochendichte zu setzen sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Die Messung der drei Parameter über mehrere Wochen hinweg soll dazu beitragen, den Ablauf der heterotopen Knocheninduktion besser zu verstehen und neue Ansätze zur Optimierung der Knochenqualität und -quantität zu liefern.

Wie in vorangegangenen Untersuchungen wurden auch in dieser Studie Wistar-Ratten als Bioreaktor genutzt. Unterschiede zum Menschen zeigen sich vor allem in der Knochenneubildungsrate und dem Remodeling. Beide Vorgänge laufen im

Rattenorganismus bedeutend schneller ab (JOHNSON et al. 1989). Dieser Umstand ist in der vorliegenden Arbeit jedoch positiv zu bewerten, da so größere Unterschiede in der Knochendichte zu erwarten waren und diese leichter zu detektieren waren. Das optimierte Matrizendesign mit Zentralkanal und stufigen Aufbau wurde aus zurückliegenden Studien unverändert übernommen (BECKER et al. 2009). Der gestufte Aufbau soll die Belastung auf die Wundränder verringern. Die Knocheninduktion wurde durch zweimalige Gabe von rhBMP-2 jeweils nach 7 und nach 14 Tagen gestartet. Diese verzögerte Gabe der Wachstumshormone wurde in vorangegangenen Studien untersucht und ergab die größte Menge an Knochenneubildung (WARNKE et al. 2010a).

Hydroxylapatit ist eine synthetische hochreine Keramik mit einer sehr guten Biokompatibilität; Abstoßungsreaktionen oder Toxizitäten sind nicht bekannt (XIN et al. 2005). Dieser Umstand bestätigte sich in diesem Versuch - keines der Tiere zeigte Anzeichen einer stattgehabten Entzündung. Auch histologisch gab es keine Hinweise auf entzündliche Reaktionen. Somit war eine postoperative antibiotische Abschirmung unnötig. Hydroxylapatit wird nur sehr langsam resorbiert und ist die unlöslichste und somit stabilste der Calciumphosphat-Keramiken. Der Abbau solcher Scaffolds erfolgt physikochemisch und ist von ihrer Geometrie und Oberflächenstruktur abhängig (RUEGER 1998). Resorptions- und Umbauprozesse konnten in der Hartschliff-Histologie gezeigt werden (siehe 3.9).

Die durchgeführten computertomografischen Untersuchungen zeigten in 4 Proben einen deutlichen Anstieg der Knochendichte, in einer Probe stagnierte sie (siehe 3.5). Nach Beendigung des Observations-Zeitraumes konnten Zellen, Weichgewebe und Kapillaren in allen Kompartimenten des Scaffolds beobachtet werden. Histologisch war eine deutliche Verknöcherung in allen Proben erkennbar. Wie gewünscht kam es zu einer gleichmäßigen Durchbauung aller Scaffolds (siehe hierzu Kapitel 3.8). Ausgang aller Wachstumsprozesse war der Zentralkanal, in den das rhBMP-2 appliziert wurde (siehe Abbildung 12).

Im histologischen Bild war ein physiologischer Knochenaufbau mit vitalen Osteoblasten, appositionelles Knochenwachstum in Form dünner Bänder, frisch abgelagertem Osteoid, sowie Osteozyten erkennbar. Erste physiologische Umbauprozesse zeigten sich in Form von sichtbaren Resorptionslakunen an der

Knochenoberfläche, die auf eine Osteoklastentätigkeit hinwies. All diese histologischen Hinweise beweisen, dass durch die fraktionierte Gabe von rhBMP-2 auf die HA-Scaffolds eine heterotope Knocheninduktion ausgelöst worden ist. In den verschiedenen Färbungen gut erkennbar waren zahlenreiche Gefäßanschnitte, die für die nötige Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen gesorgt haben. Besonders deutlich wurde dieser Umstand in der Immunhistochemie (siehe 3.12). Die Versorgung mit Gefäßen verteilte sich gleichmäßig über alle Bereiche des Scaffolds, so dass von einer gleichmäßigen Versorgung ausgegangen werden kann.

Die Optimierung der Interaktion von Zellen, Matrizen und lokal- sowie systemisch aktiven Faktoren ist ein komplexer Prozess, da diese in hohem Maße voneinander abhängig sind. Diese Variablen bieten eine fast unendliche Vielfalt der möglichen Kombinationen. Nur durch Sammeln von Erfahrungen aus grundlegendem biologischem Wissen, durchgeführten Studien, klinischer Erfahrung und nicht zuletzt der kommerziellen Durchführbarkeit kann das Tissue Engineering zu einem erfolgreichen Instrument der modernen Medizin avancieren. Hierbei bietet die faseroptische Messtechnik die Möglichkeit direkten Einblick in die Stoffwechselforgänge bei der heterotopen Knocheninduktion zu nehmen und somit zur Optimierung der Besiedelung von synthetischen Knochenersatzmaterialien beizutragen.

5 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von ossären Defekten im Bereich des Gesichtsschädels, die nach Trauma, angeborenen Defekten oder bösartigen Neubildungen der Mundhöhle verbleiben, stellt die operative Medizin vor die große Herausforderung, sowohl Funktion als auch Ästhetik wiederherzustellen. Die Endokultivierung könnte zukünftig eine wichtige Behandlungsoption dieser Defekte bieten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Stoffwechsellvorgänge während der Besiedelung einer Matrize in einem etablierten Tiermodell für Endokultivierung zu überwachen. Hierzu dienten die metabolischen Parameter Sauerstoffsättigung und pH-Wert. Zusätzlich sollte mit dieser Studie das Verfahren der Wirbelstrominduktion untersucht werden, welches zum ersten Mal *in vivo* getestet wurde. Mit Hilfe der Wirbelstrommessung sollte ein non-invasives strahlungsfreies Monitoring des Knochenwachstums etabliert werden. Hierzu wurde 6 Wistar-Ratten jeweils ein Hydroxylapatit-Scaffold in eine präparierte Tasche auf dem M. latissimus implantiert. Zur Osteoinduktion wurde nach 7 und 14 Tagen rhBMP-2 in den Zentralkanal des Scaffolds appliziert. Nach Implantation folgten wöchentliche Messungen der oben genannten Parameter. Um eine mögliche Korrelation zwischen Wirbelstrom und Knochendichte herzustellen wurden nach 2 Wochen und nach Abschluss der Untersuchung Computertomogramme angefertigt. Im Anschluss erfolgte eine histologische Auswertung von Hartschliffpräparaten und entkalkten Parafinschnitten.

Zwei Wochen post implantationem zeigten die Sauerstoffsättigung und der pH-Wert einen signifikanten Abfall. In den folgenden Wochen stiegen beide Parameter wieder an und stabilisierten sich nach mehreren Wochen auf physiologischen Werten. Dies ist die erste Studie, in der eine Methode zur reproduzierbaren Überwachung der Stoffwechsellvorgänge während der heterotopen Knocheninduktion *in vivo* beschrieben wurde.

Bei der Untersuchung der Wirbelstrominduktion konnte ein signifikanter Zusammenhang zum pH-Wert hergestellt werden. Eine Korrelation zur Knochendichte konnte nicht nachgewiesen werden. In weiterführenden Studien sollte ein genaueres Verfahren zur Knochendichtemessung eingesetzt werden.

6 Anhang

6.1 Dielektrische Eigenschaften von Geweben

Frequenz(Hz)	1,00E+ 06	1,00E+ 07	1,00E+ 08	1,00E+ 09	1,00E+ 10
Luft	0	0	0	0	0
Blut	0,8221	1,0967	1,233	1,5829	13,131
Körperflüssigkeit	1,5007	1,502	1,5042	1,6673	15,126
Spongiosa	0,0904	0,1228	0,1725	0,364	3,8591
Kortikaler Knochen	0,0244	0,0428	0,0643	0,1557	2,1359
Knochenmark	0,0042	0,0109	0,0227	0,0428	0,5779
Knorpel	0,2328	0,3689	0,4746	0,8289	9,0229
Lymph	0,6027	0,7195	0,7943	1,0788	12,132
Muskel	0,5027	0,6168	0,7076	0,9782	10,626
Trockene Haut	0,0132	0,1973	0,4912	0,8998	8,0138

Tabelle 5: Leitfähigkeit verschiedener Gewebe in Abhängigkeit von der Frequenz, angegeben in S/m.

Frequenz(Hz)	1,00E+06	1,00E+07	1,00E+08	1,00E+09	1,00E+10
Luft	1	1	1	1	1
Blut	3026	280	77	61	45
Körperflüssigkeit	84	70	69	69	58
Spongiosa	249	71	28	21	13
Kortikaler Knochen	145	37	15	12	8
Knochenmark	40	19	6	5	5
Knorpel	1391	179	56	42	26
Lymph	1433	163	69	59	45
Muskel	1836	171	66	55	43
Trockene Haut	991	362	73	41	31

Tabelle 6: Relative Permittivität verschiedener Gewebe in Abhängigkeit von der Frequenz.

6.2 Beispieldatei einer Wirbelstrommessung

Messdatum: 07-Apr

Kommentar: ---

Freq[MHz]	Ref[dB]	Meas1[dB]	Meas2[dB]	Meas3[dB]	Meas4[dB]	Meas5[dB]
850.000	-2.093	-2.389	-2.368	-2.368	-2.368	-2.368
850.250	-2.082	-2.389	-2.379	-2.368	-2.379	-2.379
850.500	-2.093	-2.400	-2.389	-2.379	-2.379	-2.389
850.750	-2.093	-2.400	-2.389	-2.368	-2.379	-2.389
851.000	-2.093	-2.400	-2.389	-2.379	-2.389	-2.389
851.250	-2.093	-2.400	-2.389	-2.379	-2.389	-2.389
851.500	-2.082	-2.400	-2.389	-2.379	-2.379	-2.389
851.750	-2.093	-2.411	-2.389	-2.379	-2.389	-2.400
852.000	-2.082	-2.400	-2.389	-2.379	-2.389	-2.400
852.250	-2.082	-2.411	-2.389	-2.379	-2.389	-2.400
852.500	-2.082	-2.411	-2.400	-2.379	-2.400	-2.400
852.750	-2.082	-2.411	-2.389	-2.379	-2.389	-2.400
853.000	-2.082	-2.411	-2.389	-2.379	-2.389	-2.389

Tabelle 7: *Beispieldatei einer Wirbelstrommessung*: Freq.[MHz] gibt die jeweilige Frequenz an, Ref[dB] die Referenzmessung in Luft und Meas1-5[dB] den jeweiligen gemessenen Wert bei der Messung.

6.3 Beispieldatei pH-Sonde/Sauerstoff-Sonde

```

***** SOFTWARE INFO *****;
Hview - v5.25b 09/2003;
© by PreSens GmbH;
05/05/11;
08:51:14;

*****MEASURE MODE SETTINGS**;
Dynamic Averaging; 4;|
measure mode; 1 sec ;

start time; 08:43:48;
date(DD/MM/YY); time/hh:mm:ss; logtime/min; pH; phase/°; amp; temp/°C; ErrorMessage;
05/05/11; 08:51:14; 0.000; 6.780; 30.26; 9988; 37.20; E0;
05/05/11; 08:51:15; 0.017; 6.783; 30.23; 9976; 37.20; E0;
05/05/11; 08:51:16; 0.034; 6.783; 30.25; 9948; 37.20; E0;
05/05/11; 08:51:17; 0.051; 6.788; 30.19; 9953; 37.20; E0;
05/05/11; 08:51:18; 0.068; 6.788; 30.19; 9963; 37.20; E0;

```

Abbildung 25: Zeigt eine Beispieldatei der Aufzeichnung einer durchgeführten pH-Messung. Aufgeführt sind: Zeit der durchgeführten Messung, vergangene Zeit seit Messungsbeginn, pH-Wert, Phase, Amplitude, Temperatur und ggf. Fehlermeldungen.

```

***** SOFTWARE INFO *****;
OxyView - TX3-V6.02 09/2007;
© by PreSens GmbH;
05/05/11;
08:53:44;

*****MEASURE MODE SETTINGS**;
Dynamic Averaging; 4;
measure mode; 1 sec ;

start time; 08:53:44;
date(DD/MM/YY); time/hh:mm:ss; logtime/min; oxygen/% airsatur.; phase/'; amp; temp/°C;
05/05/11; 08:53:44; 0.000; 36.014; 38.00; 10639; 37.20; E0;
05/05/11; 08:53:45; 0.016; 35.486; 38.17; 11076; 37.20; E0;
05/05/11; 08:53:46; 0.033; 34.358; 38.53; 11392; 37.20; E0;
05/05/11; 08:53:47; 0.050; 32.656; 39.10; 11699; 37.20; E0;
05/05/11; 08:53:48; 0.067; 30.514; 39.86; 11886; 37.20; E0;

```

Abbildung 26: Zeigt eine Beispieldatei der Aufzeichnung einer durchgeführten Sauerstoff-Messung. Aufgeführt sind: Datum und Uhrzeit der durchgeführten Messung, vergangene Zeit seit Messungsbeginn, Sauerstoffsättigung, Phase, Amplitude und Temperatur (hier manuell festgelegt)

6.4 Bildnachweis

Abbildung 1: *EM-Bild Scaffold*. Mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Philipps-Universität zu Marburg

7 Literaturverzeichnis

- ADACHI T, TAKANAGA H, KUNIMOTO M, ASOU H: Influence of LIF and BMP-2 on differentiation and development of glial cells in primary cultures of embryonic rat cerebral hemisphere. *J Neurosci Res* 79: 608-15 (2005)
- ARNETT T R, DEMPSTER D W: Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 119: 119-24 (1986)
- ARNETT T R, GIBBONS D C, UTTING J C, ORRISS I R, HOEBERTZ A, ROSENDAAL M, MEGHJI S: Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol* 196: 2-8 (2003)
- ARNETT T R: Acidosis, hypoxia and bone. *Arch Biochem Biophys* 503: 103-9 (2010)
- BANWART J C, ASHER M A, HASSANEIN R S: Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 20: 1055-60 (1995)
- BAUER T W, MUSCHLER G F: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*: 10-27 (2000)
- BECKER S T, BOLTE H, KRAPP O, SEITZ H, DOUGLAS T, SIVANANTHAN S, WILTFANG J, SHERRY E, WARNKE P H: Endocultivation: 3D printed customized porous scaffolds for heterotopic bone induction. *Oral Oncol* 45: e181-8 (2009)
- BECKER S T, BECK-BROICHSITTER B, BOLTE H, WILTFANG, J. W, P. H.: Improving The Effects Of Bmp By Repeated Application In A Rat Model. XXth Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial-Surgery: 212 (2010)
- BECKER S T, WARNKE P H, BEHRENS E, WILTFANG J: Morbidity after iliac crest bone graft harvesting over an anterior versus posterior approach. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 48-53 (2011)
- BISHOP G B, EINHORN T A: Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 31: 721-7 (2007)
- BJORDAL K, DE GRAEFF A, FAYERS P M, HAMMERLID E, VAN POTTELSBERGHE C, CURRAN D, AHLNER-ELMQVIST M, MAHER E J, MEYZA J W, BREDART A, SODERHOLM A L, ARRARAS J J, FEINE J S, ABENDSTEIN H, MORTON R P, PIGNON T, HUGUENIN P, BOTTOMLY A, KAASA S: A 12 country field study of the EORTC QLQ-C30 (version 3.0) and the head and neck cancer specific module (EORTC QLQ-H&N35) in head and neck patients. EORTC Quality of Life Group. *Eur J Cancer* 36: 1796-807 (2000)
- BRANDAO-BURCH A, UTTING J C, ORRISS I R, ARNETT T R: Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int* 77: 167-74 (2005)
- CHEIFETZ S: BMP receptors in limb and tooth formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 182-98 (1999)
- CHENG H, JIANG W, PHILLIPS F M, HAYDON R C, PENG Y, ZHOU L, LUU H H, AN N, BREYER B, VANICHAKARN P, SZATKOWSKI J P, PARK J Y, HE T C: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 1544-52 (2003)
- CHOW D C, WENNING L A, MILLER W M, PAPOUTSAKIS E T: Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 81: 675-84 (2001a)

- CHOW D C, WENNING L A, MILLER W M, PAPOUTSAKIS E T: Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 81: 685-96 (2001b)
- DE MOULIN D: Treatment of facial fractures in Hippocrates' time. *Arch Chir Neerl* 26: 283-8 (1974)
- DEMTRÖDER W: *Experimentalphysik Bd. 2. Elektrizität und Optik*. Springer Berlin; Heidelberg; New York(2009)
- DUCY P, KARSENTY G: The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57: 2207-14 (2000)
- EL-GHANNAM A: Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 2: 87-101 (2005)
- FEDERSPIL P, BULL H G, FEDERSPIL P A: Epithetische Wiederherstellung im Gesicht. *Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A* 95: 206-212 (1998)
- GABRIEL S, LAU R W, GABRIEL C: The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Phys Med Biol* 41: 2251-69 (1996)
- GAUTSCHI O P, FREY S P, ZELLWEGER R: Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77: 626-31 (2007)
- GIANNOUDIS P V, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E: Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3: S20-7 (2005)
- HELIOTIS M, LAVERY K M, RIPAMONTI U, TSIRIDIS E, DI SILVIO L: Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35: 265-9 (2006)
- HELIOTIS M, RIPAMONTI U, FERRETTI C, KERAWALA C, MANTALARIS A, TSIRIDIS E: The basic science of bone induction. *Br J Oral Maxillofac Surg* 47: 511-4 (2009)
- HELMS E M: Ein Modell zur Messung der Körpertemperatur bei Ratten. (1996)
- HERFORD A S, DEAN J S: Complications in Bone Grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*: (2011)
- JOHNSON T F, MORRIS D C, ANDERSON H C: Matrix vesicles and calcification of rachitic rat osteoid. *J Exp Pathol* 4: 123-32 (1989)
- JONITZ A, LOCHNER K, LINDNER T, HANSMANN D, MARROT A, BADER R: Oxygen consumption, acidification and migration capacity of human primary osteoblasts within a three-dimensional tantalum scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 22: 2089-95 (2011)
- KANG Q, SUN M H, CHENG H, PENG Y, MONTAG A G, DEYRUP A T, JIANG W, LUU H H, LUO J, SZATKOWSKI J P, VANICHAKARN P, PARK J Y, LI Y, HAYDON R C, HE T C: Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 11: 1312-20 (2004)
- KASIK I, MATEJEC V, CHOMAT M, HAYER M, BERKOVA D: Optical Fibres for optical sensing In: Baldini F, Chester A N, Homola J, Martellucci S, (Eds): *Optical Chemical Sensors*. Springer Netherlands, pp 59-76 (2006)
- KINGSLEY L A, FOURNIER P G, CHIRGWIN J M, GUISE T A: Molecular biology of bone metastasis. *Molecular cancer therapeutics* 6: 2609-17 (2007)
- KLIMANT I: Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen. Deutschland (1999)
- KLIMANT I, HUBER C, LIEBSCH G N, G. STANGELMAYER A, O.S. W: Dual Lifetime Referencing (DLR) - a New Scheme for Converting Fluorescence Intensity into a Frequency-Domain or Time-Domain Information. In: Valeur B, Brochon J-C,

- (Eds): New trends in fluorescence spectroscopy. Applications to chemical and life sciences Springer, Berlin [u.a.], pp 257-75 (2001)
- KOSCH U, KLIMANT I, WERNER T, WOLFBEIS O S: Strategies To Design pH Optodes with Luminescence Decay Times in the Microsecond Time Regime. *Analytical Chemistry* 70: 3892-3897 (1998)
- KÜBLER N: Knochenbildung durch Osteoinduktion: vom demineralisierten Knochen zu rekombinanten Bone Morphogenetic Proteins; experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Kiefer-, Gesichtschirurgie.: Quintessenz:* (1998)
- KÜBLER N R: Osteoinduction and -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1: 2-25 (1997)
- LANGER R, VACANTI J P: Tissue engineering. *Science* 260: 920-6 (1993)
- LEE C M, GENETOS D C, YOU Z, YELLOWLEY C E: Hypoxia regulates PGE(2) release and EP1 receptor expression in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 212: 182-8 (2007)
- LINDL T, GSTRANTHALER G: Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag (2008)
- MALDA J, KLEIN T J, UPTON Z: The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng* 13: 2153-62 (2007)
- MONT M A, RAGLAND P S, BIGGINS B, FRIEDLAENDER G, PATEL T, COOK S, ETIENNE G, SHIMMIN A, KILDEY R, RUEGER D C, EINHORN T A: Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. *J Bone Joint Surg Am* 86-A Suppl 2: 41-55 (2004)
- MÜSCHEN U: Registrierung des Bewegungsverhaltens und der Körpertemperatur von Ratten. Tierärztliche Hochschule (1978)
- MUSCHLER G F, NAKAMOTO C, GRIFFITH L G: Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 1541-58 (2004)
- NEWMAN P J, BERNDT M C, GORSKI J, WHITE G C, 2ND, LYMAN S, PADDOCK C, MULLER W A: PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219-22 (1990)
- OKUBO Y, BESSHO K, FUJIMURA K, KONISHI Y, KUSUMOTO K, OGAWA Y, IIZUKA T: Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29: 62-6 (2000)
- PARUMS D V, CORDELL J L, MICKLEM K, HERYET A R, GATTER K C, MASON D Y: JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 43: 752-7 (1990)
- PEREVERZEV A, KOMAROVA S V, KORCOK J, ARMSTRONG S, TREMBLAY G B, DIXON S J, SIMS S M: Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. *Bone* 42: 150-61 (2008)
- POU A M: Update on new biomaterials and their use in reconstructive surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 240-4 (2003)
- RAGHUNAND N, GATENBY R A, GILLIES R J: Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *The British journal of radiology* 76 Spec No 1: S11-22 (2003)
- RODAN G A: Introduction to bone biology. *Bone* 13: S3-S6 (1992)
- RUEGER J: Bone replacement materials—state of the art and the way ahead. *Der Orthopäde* 27: 72-79 (1998)

- SALGADO A J, COUTINHO O P, REIS R L: Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience* 4: 743-765 (2004)
- SPECTOR J A, MEHRARA B J, GREENWALD J A, SAADEH P B, STEINBRECH D S, BOULETREAU P J, SMITH L P, LONGAKER M T: Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *American journal of physiology. Cell physiology* 280: C72-80 (2001)
- SPRINGER I N, TERHEYDEN H, GEISS S, HARLE F, HEDDERICH J, ACIL Y: Particulated bone grafts--effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 15: 205-12 (2004)
- STEINBRECH D S, MEHRARA B J, SAADEH P B, CHIN G, DUDZIAK M E, GERRETS R P, GITTES G K, LONGAKER M T: Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* 104: 738-47 (1999)
- STEINBRECH D S, MEHRARA B J, SAADEH P B, GREENWALD J A, SPECTOR J A, GITTES G K, LONGAKER M T: Hypoxia increases insulinlike growth factor gene expression in rat osteoblasts. *Ann Plast Surg* 44: 529-34; discussion 534-5 (2000)
- SWAIN M V, XUE J: State of the art of Micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci* 1: 177-88 (2009)
- TERHEYDEN H, KNAK C, JEPSEN S, PALMIE S, RUEGER D R: 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: 373-9 (2001a)
- TERHEYDEN H, WARNKE P, DUNSCHKE A, JEPSEN S, BRENNER W, PALMIE S, TOTH C, RUEGER D R: 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: 469-78 (2001b)
- TUNCAY O C, HO D, BARKER M K: Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105: 457-63 (1994)
- TURHANI D, WEISSENBOCK M, STEIN E, WANSCHITZ F, EWERS R: Exogenous recombinant human BMP-2 has little initial effects on human osteoblastic cells cultured on collagen type I coated/noncoated hydroxyapatite ceramic granules. *J Oral Maxillofac Surg* 65: 485-93 (2007)
- ULUDAG H, D'AUGUSTA D, GOLDEN J, LI J, TIMONY G, RIEDEL R, WOZNEY J M: Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 50: 227-38 (2000)
- URIST M R: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-9 (1965)
- URIST M R, MIKULSKI A, LIETZE A: Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1828-32 (1979)
- UTTING J C, ROBINS S P, BRANDAO-BURCH A, ORRISS I R, BEHAR J, ARNETT T R: Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* 312: 1693-702 (2006)
- VAN HEEST A, SWIONTKOWSKI M: Bone-graft substitutes. *Lancet* 353 Suppl 1: S128-9 (1999)
- VICKERY L E, LATCHFORD G, HEWISON J, BELLEW M, FEBER T: The impact of head and neck cancer and facial disfigurement on the quality of life of patients and their partners. *Head Neck* 25: 289-96 (2003)

- VILLARRUEL S M, BOEHM C A, PENNINGTON M, BRYAN J A, POWELL K A, MUSCHLER G F: The effect of oxygen tension on the in vitro assay of human osteoblastic connective tissue progenitor cells. *J Orthop Res* 26: 1390-7 (2008)
- VOLKMER E, DROSSE I, OTTO S, STANGELMAYER A, STENGELE M, KALLUKALAM B C, MUTSCHLER W, SCHIEKER M: Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Eng Part A* 14: 1331-40 (2008)
- VUNJAK-NOVAKOVIC G, FREED L E: Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliv Rev* 33: 15-30 (1998)
- WANG E A, ROSEN V, CORDES P, HEWICK R M, KRIZ M J, LUXENBERG D P, SIBLEY B S, WOZNEY J M: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9484-8 (1988)
- WANG S, KNOECHEL R, DASCHNER F: Hochfrequenzsensoren zur Beobachtung heterotopen Knocheninduktion Technischen Fakultät der Christian-Albrecht Universität zu Kiel Kiel: Christian-Albrechts Universität zu Kiel 2010.
- WARNKE P H, SPRINGER I N, WILTFANG J, ACIL Y, EUFINGER H, WEHMOLLER M, RUSSO P A, BOLTE H, SHERRY E, BEHRENS E, TERHEYDEN H: Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364: 766-70 (2004)
- WARNKE P H, WILTFANG J, SPRINGER I, ACIL Y, BOLTE H, KOSMAHL M, RUSSO P A, SHERRY E, LUTZEN U, WOLFART S, TERHEYDEN H: Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27: 3163-7 (2006)
- WARNKE P H, BOLTE H, SCHUNEMANN K, NITSCHKE T, SIVANANTHAN S, SHERRY E, DOUGLAS T, WILTFANG J, BECKER S T: Endocultivation: does delayed application of BMP improve intramuscular heterotopic bone formation? *J Craniomaxillofac Surg* 38: 54-9 (2010a)
- WARNKE P H, SEITZ H, WARNKE F, BECKER S T, SIVANANTHAN S, SHERRY E, LIU Q, WILTFANG J, DOUGLAS T: Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: characterization and biocompatibility investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 93: 212-7 (2010b)
- WEI J, RUSS M B: Convection and diffusion in tissues and tissue cultures. *Journal of theoretical biology* 66: 775-87 (1977)
- WEISSGERBER W: Elektrotechnik für Ingenieure 2. Wechselstromtechnik, Ortskurven, Transformator, Mehrphasensysteme. Vieweg + Teubner Wiesbaden(2009)
- WOLFBEIS O S, LEINER M: Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Analytica Chimica Acta* 167: 203-215 (1985)
- XIN R, LENG Y, CHEN J, ZHANG Q: A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials* 26: 6477-86 (2005)

8 Tierversuchsgenehmigung

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Dr. Stephan T. Becker
Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 16
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 16.12.2010

Mein Zeichen: V 312-72241.121-14 (12-1/11)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

25. Januar 2011

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Becker,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Verbesserung der Vaskularisation von endokultivierten Knochentransplantaten
zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 6 Ratten verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Januar 2013 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 Dr. Dr. Stefan T. Becker

4. Sein Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang
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. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Postoperativ ist eine Schmerztherapie mittels Carprofen vorzusehen.

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

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

Rechtsbehelfsbelehrung

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

Mit freundlichen Grüßen


Dr. Sekulla

9 Danksagung

Herrn PD Dr. Dr. Stephan Becker danke ich herzlich für die Vergabe des interessanten Themas, sowie für die engagierte Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Jörg Wiltfang, der als Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie das Umfeld für diese wissenschaftliche Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Dr. Benedicta Beck-Broichsitter. Benedicta, vielen Dank für deine fachliche und freundschaftliche Unterstützung bei dieser Arbeit. Die Zusammenarbeit mit dir war wundervoll.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Frank Daschner und Herrn Wilhelm Stellmach, aus dem Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik, für die technische Begleitung des Projekts.

Frau Gabriele Neßenius spreche ich einen großen Dank für die kompetente und freundliche Betreuung bei der Herstellung der histologischen Präparate aus.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Anne Garling. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch in dieser Angelegenheit warst du für mich eine riesige Stütze und wie immer die letzte Instanz.

Mein großer Dank gilt meinem Vater für seine väterliche, emotionale und finanzielle Unterstützung.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und Kollegen für die zahlreichen kleinen, aber dennoch wichtigen Hinweise danken. Vielen Dank: Andres, Ansgar, Carolin, Christian, Holger, Jan, Jutta, Klaus, Romina und Ulrike.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: David Christofzik

Geburtsdatum: 23.03.1985

Familie: Vater: William Schierloh; Lehrer

Mutter: Claudia Christofzik; Sozialpädagogin

Schulbildung:

1991 – 1995 Carl-Schurz Grundschule, Bremen

1995 – 2004 Kippenberg-Gymnasium, Bremen

2004 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

2004 – 2005 Sonderpädagogische Einrichtung e.V., Bremen

Studium:

10/2005 – 12/2010 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

12/2010 Approbation

Anstellung:

seit 03/2011 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:

- seit 2007 prospektive Studie zur Auswirkung der Zahngesundheit auf den Verlauf chirurgisch behandelter Endokarditiden
- seit 2010 Promotionsarbeit an der Klinik für Mund-,Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen:

- 2011: FLÖRKE C, GARLING A, CHRISTOFZIK D, VOLLRATH O, HAGEMANN A, LUTTER G, DÖRFER C: Eine retrospektive Untersuchung zur leitliniengerechten Antibiotikaprophylaxe nach chirurgisch erfolgter Intervention bei akuter Endokarditis 18. GAA-Jahrestagung. Köln: Deutsches Netzwerk Versorgungsforschung e. V. Gesellschaft für Arzneimittelanwendungsforschung und Arzneimittel Epidemiologie e. V., 2011
- HAGEMANN A, GARLING A, CHRISTOFZIK D, MATZ C, VOLLRATH O, SCHÖTTLER J, CREMER J, LUTTER G: Surgical Treatment For Infective Endocarditis: A Contemporary Picture Of Patients Profile, Disease Characteristics And Outcome The Society for Heart Valve Disease. Barcelona, 2011
- 2012: BECK-BROICHSITTER B E, CHRISTOFZIK D, GARLING A, DASCHNER F, WARNKE P, WILTFANG J, BECKER S T: Endokultivierung: Non-invasives Monitoring des Metabolismus während der heterotopen Knocheninduktion in vivo, 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Freiburg, 2012.