

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

**PRÄFABRIKATION VON VASKULARISIERTEN
TRANSPLANTATEN
MITTELS RHBMP-2 UND VEGF₁₆₅
IM OMENTUM MAJUS DES KANINCHENS**

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

vorgelegt von
Chiara Catharina Völschow
geb. Büchert
aus **Flensburg**

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. Falk Birkenfeld

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christian Graetz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.08.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. Versuchstiere	9
2.2. Narkose, Schmerzkontrolle, Antibiose	9
2.3. Operationsprozedere	10
2.4. Intravitale polychrome Sequenzmarkierung	13
2.5. Computertomographische Untersuchungen, Messung der Knochendichte	14
2.6. Opferung und Gewinnung der Transplantate	17
2.7. Präparatherstellung Hartschnitt	17
2.8. Präparatherstellung Weichschnitt	19
2.9. Statistische Auswertung der Computertomographien	19
3. ERGEBNISSE	20
3.1. Klinik	20
3.2. Computertomographien	20
3.3. Fluoreszenzmikroskopien	29
3.4. Toluidinblau	33
3.5. Hämatoxylin-Eosin	35
4. DISKUSSION	37
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. LITERATURVERZEICHNIS	45
7. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	51
8. DANKSAGUNG.....	53
9. LEBENS LAUF.....	54
10. PUBLIKATIONEN	55

1. Einleitung

Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten nach Teilresektionen durch Tumorchirurgie, Traumata, angeborenen Fehlbildungen und nach Infektionen ist bis heute in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eine Herausforderung. Zusätzlich sind nur unzureichende Ergebnisse nach Radiochemotherapie aufgrund von schlechter Wundheilung bei der Rekonstruktion zu erreichen. Im kraniofazialen Bereich ist es besonders notwendig, das Sprechen, Kauen und Schlucken durch eine exakte Wiederherstellung zu gewährleisten. Gleichzeitig sollte sowohl auf die Funktion als auch auf die Ästhetik ein großes Augenmerk gelegt werden. Eine angestrebte Geweberegeneration ist bis heute nicht erreichbar, stattdessen sind die operativen Verfahren als Reparaturen anzusehen.

Die Mandibula ist ein spangenartiger Knochen, durch den im gesamten Verlauf der begleitende Nerv und die begleitende Arterie führen. Durch Kaudruck muss die Mandibula großen Belastungen standhalten. Diese Umstände machen die Rekonstruktion selbiger zu einem komplexen Unterfangen. Die etablierte Methode zur Rekonstruktion der Knochendefekte ist bis heute die Versorgung mittels autologem freiem anastomosiertem Knochentransplantat. Dieses Vorgehen ist der „Goldene Standard“ in der operativen Rekonstruktion, da das Transplantat die Vorteile der Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion in sich vereinigt. Das Transplantat ist mechanisch stabil und das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion ist ausgeschlossen (Schlegel et al., 2003; Laurencin et al., 2006). Die Patientenakzeptanz der Methode ist hoch, da die Möglichkeit einer Infektion mit z.B. Viren nicht gegeben ist, eine ästhetische Versorgung vorgenommen werden kann und nicht zuletzt die positive psychologische Komponente eines körpereigenen Transplantats eine Rolle spielt (Artico et al., 2003). Spenderstellen des Transplantats können Fibula, Scapula, Beckenkamm oder eine Rippe sein (Warnke et al., 2004). Die Risiken der autologen Transplantation bestehen in einer erhöhten Morbidität in der Spenderregion nach Operation und der Schaffung eines weiteren Knochendefekts (Summers und Eisenstein, 1989; Giannoudis et al., 2005). Vor allem Schmerzen, Schwellungen, postoperative Infektionen und Bewegungseinschränkungen stellen ein Problem dar (Nkenke et al., 2002; Clavero und Lundgren, 2003). Zukünftig sollte es daher möglich werden, eine Versorgung der

knöchernen Defekte zu erreichen, ohne dass ein weiterer Knochendefekt in der Spenderregion geschaffen wird (Warnke et al., 2006a; Warnke et al., 2006b).

Um diesen Bedürfnissen gerecht zu werden, ist die Erforschung der Knochengewebszüchtung sowohl in-vivo als auch in-vitro ein wichtiges Aufgabengebiet. Die Ziele dieser regenerativen Medizin sind die Wiederherstellung der biologischen Funktion, das Vermeiden einer Transplantatentnahme im knöchernen Bereich und von immunologischen Abstoßungsreaktionen. Das Transplantat sollte biokompatibel sein und die volle biologische Funktion aufnehmen können. Die erfolgreiche klinische Anwendung des Transplantatmaterials kann nur erreicht werden, wenn dieses osseointegriert wird. Es muss eine knöcherne Verbindung des Transplantatmaterials mit dem Knochen in der Empfängerregion stattfinden (Moore et al., 2001). Die Knochenbildung findet nach einer komplexen Abfolge von Ereignissen statt. Bei dieser entstehen aus unreifen Vorläuferzellen Osteoblasten. Diese Zellen sezernieren Extrazellulärmatrix, die wiederum mineralisiert. Durch diese Abfolge entsteht Knochengewebe (vgl. Abb. 1).

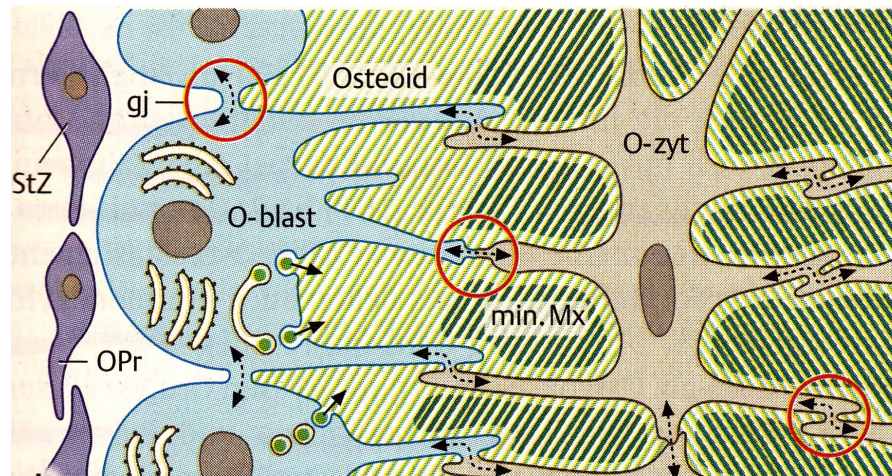


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Knochenbildung:

Stammzellen (StZ) und Osteoprogenitorzellen (OPr) werden zu Osteoblasten (O-blast) umgewandelt. Diese sezernieren Osteoid, das wiederum mineralisierte Extrazellulärmatrix (min. Mx) wird. Zwischen der mineralisierten Extrazellulärmatrix (min. Mx) liegen Osteozyten (O-zyt), die über Gap junctions (rote Kreise) mit den Osteoblasten (O-blast) kommunizieren und den Knochenauf- und -umbauprozess koordinieren (Grafik aus: Taschenlehrbuch Histologie, Renate Lüllmann-Rauch, 5., vollst. überarb. Auflage, 2015).

Damit die Osteogenese erfolgreich ist, bedarf es mehrerer Voraussetzungen: Die vorhandenen Vorläuferzellen müssen sich zu Osteoblasten differenzieren, die Leitstruktur muss osteokonduktiv für die Zellen sein und es sollte es eine Kontrollmöglichkeit für die Differenzierung der Zellen und das fortschreitende Knochenwachstum geben (Reddi, 2000; Service, 2000).

Das Entwickeln von synthetischen Knochenersatzmaterialien, welche die o.g. Probleme des autologen Transplantats umgehen sollen, ist bereits seit einiger Zeit Gegenstand der medizinischen Forschung. Zu den Knochenersatzmaterialien zählen u.a. Keramiken wie Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat (TCP), bioaktive Gläser, Polymere und Komposite (Van Heest und Swiontkowski, 1999; Giannoudis et al., 2005). Die Hauptanforderung an jedes dieser Knochenersatzmaterialien ist die Anregung der Neoosteogenese. Sowohl die Orientierung von Blutgefäßen durch das Material als auch die Etablierung von Havers-Kanälen wird als „Osteokonduktion“ verstanden (Cypher und Grossman, 1996). Zudem kann auch die Oberflächenmorphologie des Ersatzmaterials die Knochenneubildung ermöglichen (Giannoudis et al., 2005). „Osteoinduktion“ kann nur erzielt werden, wenn das Material mesenchymale Stammzellen aktiviert und diese sich zu Osteoblasten weiterentwickeln. Das einzige Material, das sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv wirkt, ist der autologe Spenderknochen. Alle synthetischen Knochenersatzmaterialien können ausschließlich osteokonduktiv wirken (Bishop und Einhorn, 2007).

Ein sehr gut erforschtes Material stellt das xenogene bovine Hydroxylapatit (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wollhusen, Schweiz) dar. Der bovine Knochen wird thermisch und chemisch aufbereitet, so dass eine antigenfreie, anorganische Matrix zurückbleibt. Diese ist dem menschlichen Knochen sehr ähnlich. Das Hydroxylapatit erfüllt die Aufgaben der Osteokonduktion sehr gut. Die poröse Matrix ihrerseits vereinfacht eine Durchbauung mit neuem Knochen, zudem stellt sie eine gute Leitstruktur für Gefäßneubildungen dar (Janssen et al., 2006). Die gute Biokompatibilität von Hydroxylapatitblöcken wurde sowohl in-vitro (Acil et al., 2000) als auch anschließend in-vivo (Warnke et al., 2004) bestätigt. Zusätzlich wies der auf Basis von Hydroxylapatit gebildete Knochen eine ähnliche Kompressionsstabilität zum natürlichen Knochen auf (Warnke et al., 2004).

Da synthetische Knochenersatzmaterialien keine Osteoinduktion bewirken können, werden Produkte benötigt, die diese Wirkung anregen. Im Jahr 1967 konnte bereits in einem tierexperimentellen Versuch ektope Knochenbildung im Weichgewebe detektiert werden. Es wurde hierbei demineralisierte Knochenmatrix in Muskeltaschen von Kaninchen eingebracht. Dies war der erstmalige Zeitpunkt, an dem das Vorhandensein von knochenbildenden Zellen im Muskelgewebe bewiesen werden konnte (Urist, 1965; Buring und Urist, 1967). Im Jahr 1988 gelang der Nachweis der verantwortlichen knochenbildenden Proteine, der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (Wang et al., 1988; Wozney et al., 1988). BMPs sind in der Lage, unreife Vorläuferzellen in Osteoblasten umzuwandeln, die ihrerseits Knochen bilden können (Katagiri et al., 1990; Yamaguchi et al., 1996; Kirker-Head, 2000). Nach Implantation eines Knochenersatzmaterials entstehen Entzündungsvorgänge, die Neoangiogenese bedingen (Inoda et al., 2007). Durch diese Neoangiogenese werden vermehrt multipotente Zellen exprimiert. Nach Gabe von BMPs können diese Zellen zur Differenzierung zu knochenbildenden Zellen angeregt werden (Katagiri et al., 1990; Katagiri et al., 1994; Yamaguchi et al., 1996). Die gewünschte Osteoinduktion kann also mithilfe der BMPs erreicht werden. Die BMPs gehören zur großen Familie der Transforming-Growth-Factor- β -Proteine (TGF- β). Diese kodieren für Entwicklungsvorgänge und für die Knochenbildung (Hogan, 1996). BMPs können durch Signaltransduktion das individuelle biologische Signal zur Osteogenese initiieren. Ausgelöst durch dieses Signal beginnt eine Kaskade von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen in den Zellen (Sampath et al., 1992; Yamashita et al., 1996). Die Signaltransduktion wird induziert durch die Interaktion mit dem heterodimeren Komplex zweier membranständiger Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Yamashita et al., 1996; Gautschi et al., 2007) Es existieren zwei Rezeptoren, Typ I und Typ II. Der Typ-II-Rezeptor phosphoryliert den Typ-I-Rezeptor. Dieser wiederum phosphoryliert nun ein intrazelluläres Protein der Smad-Protein-Familie. Smads sind in der Lage, molekulare Transkriptionsfaktoren zu regulieren, indem sie Komplexe ihrerseits bilden (Graff et al., 1996; Padgett et al., 1998; Groeneveld und Burger, 2000). Es konnte beobachtet werden, dass BMPs intramuskulär bei geringerer Konzentration eine höhere Osteoinduktion bewirken als bei höherer Gabe im subkutanen Gewebe (Katagiri et al., 1997; Yoshida et al., 1998). Die höhere Osteoinduktion im Muskelgewebe ist bedingt durch das

Vorhandensein unreifer Vorläuferzellen, der Myoblasten. Im in-vitro-Versuch konnten Myoblasten mittels BMP aktiviert werden, sich in Osteoblasten umzuwandeln (Bosch et al., 2000; Levy et al., 2001). Im subkutanen Bindegewebe liegen jedoch keine unreifen Vorläuferzellen vor. Hier sind nur reife Zellen, die Fibroblasten, zu finden. Bei einem in-vitro-Versuch konnte nach Gabe von BMP keine Differenzierung von reifen Fibroblasten in Osteoblasten festgestellt werden (Katagiri et al., 1994). Auch hämatopoetischen Zellen konnten nach Gabe von BMPs bereits eine osteogene Differenzierung nachgewiesen werden (Doherty et al., 1998). Das Stadium der Zelldifferenzierung hat also bei der Wirkung der BMPs einen hohen Stellenwert.

Ein besonders interessantes BMP stellt das rekombinante humane BMP-2 (rhBMP-2) dar (Gautschi et al., 2007). BMP konnte erstmals im Jahr 1988 geklont werden (Wang et al., 1988). Die Gewinnung von rhBMP-2 gelingt durch das Klonen von humaner DNA, die für BMP kodiert, in Vektoren. Die Expressierung erfolgt in Bakterien, wodurch große Mengen an BMP gewonnen werden können (Granjeiro et al., 2005). Diese Methode ist deutlich einfacher und kostengünstiger als die Gewinnung von BMP aus Knochen. Das rhBMP-2 konnte als das BMP mit der höchsten Osteoinduktionsrate identifiziert werden (Cheng et al., 2003). Dieses konnte bereits erfolgreich sowohl im Tiermodell als auch in humanen Modellen angewendet werden (Groeneveld und Burger, 2000; Terheyden et al., 2001b; Warnke et al., 2004; Warnke et al., 2006b; Axelrad und Einhorn, 2009).

Im Jahr 2002 konnten in-vitro-Studien zeigen, dass die Wirkung von BMP in Kombination mit einem gefäßwachstumsfördernden Faktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) verstärkt wurde. Zusätzlich war BMP selbst in der Lage, Gefäßneubildung zu bewirken (Deckers et al., 2002). 2014 konnten Liu et al. im in vivo-Versuch an Göttinger Minischweinen eine Steigerung der Knochenbildungsrate bei simultaner Gabe von BMP und VEGF verzeichnen (Liu et al., 2014). VEGF ist ein Signalmolekül, das Vaskulogenese und Angiogenese in der embryonalen Entwicklung, in Wunden und Verletzungen, in hypertrophierender Muskulatur, in Tumoren und in verschlossenen Gefäßen zum Zwecke des Kollateralkreislaufs anregt (Lenze et al., 2014). Im Jahr 1983 wurde das Protein VEGF erstmals identifiziert (Senger et al., 1983). Das Klonen und damit die Bereitstellung in größeren Mengen gelang erstmals im Jahr 1989 (Leung et al., 1989). Zur VEGF-

Familie gehört auch der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). In der Familie der VEGFs existieren die Untertypen VEGF-A bis F. Das VEGF-A besteht wiederum aus diversen Isoformen, hierunter fällt auch das VEGF₁₆₅, das als eines der potentesten Wachstumsfaktoren der Reihe gilt. Die Gewinnung von VEGF₁₆₅ gelingt über alternatives Splicen der mRNA des VEGFA-8-Exon-Gens. Dies geschieht an einer proximalen Splicesite des Exons 6. Das proximale Splicen gewährleistet im Gegenteil zum distalen Splicen einen proangiogenen Effekt des VEGF₁₆₅ (Robinson und Stringer, 2001). Die Signaltransduktion wird induziert durch die Interaktion von VEGF₁₆₅ mit dem homodimeren Komplex des zellwandständigen Tyrosinkinase-Rezeptors. Es findet eine Autophosphorylierung des Rezeptors statt. Diese startet eine intrazelluläre Signalkaskade. VEGF-A bindet an zwei verschiedene VEGF-spezifische Rezeptoren, den VEGFR-1 und VEGFR-2-Rezeptor (Takahashi et al., 1999). Die Signaltransduktion bewirkt letztendlich die Angiogenese. Diese ist für einen klinischen Erfolg eines Transplantates unabdingbar. In Tiermodellen konnte bereits mehrfach unter Beweis gestellt werden, dass der M. latissimus dorsi eine geeignete Stelle für die Herstellung und Gewinnung von Transplantaten darstellt (Okubo et al., 2000; Terheyden et al., 2001a; Terheyden et al., 2001b). Im Jahr 2004 gelang es Warnke et al., die endomuskuläre Präfabrikation von Knochen auf ein humanes Projekt zu übertragen. Hierbei wurde ein zuvor im M. latissimus dorsi mithilfe von Hydroxylapatit, rhBMP-7 und eines Titankäfigs präfabriziertes Transplantat in einen Mandibulardefekt erfolgreich eingesetzt (Warnke et al., 2004; Warnke et al., 2006a; Warnke et al., 2006b). Die Umgebungsbedingungen sind optimal, damit können alle Nachteile einer in-vivo Züchtung im künstlichen Bioreaktor umgangen werden. Zu diesen zählen u.a. eine eventuelle Fremdkörperreaktion und die schwierige vaskuläre Versorgung des Transplantats (Warnke et al., 2004). Im weiteren Vorgehen erwies sich jedoch sowohl die große Muskelmanschette als auch die geringe Zellzahl als hinderlich bei der Kultivierung und Transplantation. Zusätzlich stellt die Entnahme des Muskels immer noch eine belastende Operation für den Patienten dar. Der verbliebene M. latissimus dorsi kann funktionsunfähig werden, da es bei Transplantatentnahme teilweise zur unvermeidlichen Schädigung des N. thoracodorsalis kommen kann. Dieser Funktionsverlust kann die Lebensqualität der Patienten einschränken. Daher wurde nach Stellen für das Bone Engineering gesucht, die nach Transplantatentnahme möglichst keine bis nur geringe Einschränkungen bei Patienten bewirken.

Das Omentum majus hat sich zur Herstellung von Weichgewebstransplantaten zur Deckung von Defekten im Kopf-Hals-Bereich in Studien als geeignet gezeigt (Bayles und Hayden, 2008). Kamei et al. konnten im Jahr 2010 im Omentum majus von Kaninchen erstmals Osteogenese hervorrufen. Sie umwickelten einen Teil des Omentums mit zuvor gewonnenem Periost der Schädeldecke. Es konnte Geflechtknochenbildung und Knochemarksreifung beobachtet werden (Kamei et al., 2010). Diese Studie zeigt, dass das Omentum majus ein vielversprechender Bioreaktor zur Präfabrikation von Knochen zu sein scheint. Durch die zusätzliche Implantation von Knochenersatzmaterial in das Omentum majus würde eine lokale Entzündungsreaktion entstehen. Diese bewirkt eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und der Neoangiogenese. Das Omentum majus ist vaskulär sehr gut versorgt, es verfügt über zwei Hauptarterien, die A. gastromentalis dextra (aus der A. gastroduodenalis der A. hepatica communis) und die A. gastromentalis sinistra (aus der A. splenica) (Schünke et al. 2015). Zusätzlich besteht das Omentum majus aus einem großen Anteil Fettgewebe. Adipozyten verfügen über eine hohe VEGF-Sekretionsrate und Fettgewebe insgesamt verfügt über ein hohes angiogenes Potential (Goldsmith et al., 1984; Zhang et al., 1997). Die Problematik der oftmals unzureichenden Gefäßversorgung und somit der teilweise Untergang eines Transplantats könnte mit dem Nutzen des Omentum majus behoben werden. Ebenso kann die postoperative Einschränkung der Patienten verringert werden, da das Omentum auch nach der Operation seine Funktion beibehält. In dieser Arbeit sollte erstmals die Anwendung von VEGF₁₆₅ und rhBMP-2 im Omentum majus im Tiermodell untersucht werden.

Das Ziel dieser Studie war es:

- (1) Das Omentum majus zur in-vivo Präfabrikation von vaskularisierten Transplantaten zu untersuchen.
- (2) Das Transplantat mit einer Zentralarterie zu versehen, um die natürliche Anatomie der Mandibula zu imitieren.
- (3) Den Einfluss von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ auf die Knochenneubildung zu untersuchen.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit können Aufschluss darüber geben, ob das Omentum majus ein geeigneter Bioreaktor für die Herstellung von präfabrizierten, vaskularisierten Transplantaten mittels Knochenersatzmaterial und Wachstumsfaktoren ist.

2. Material und Methoden

Diese Studie wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein 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), genehmigt (Nr. V 312-72241.121-14 (73-6/11)).

2.1. Versuchstiere

Es wurden zwölf ausgewachsene Kaninchen (New Zealand White Rabbits, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 3,5 bis 4,0 kg und einem durchschnittlichen Alter von acht Monaten verwendet. Diese waren in zwei Gruppen zu je sechs Tieren aufgeteilt entsprechend des verwendeten Wachstumsfaktors (VEGF₁₆₅, rhBMP-2). Die Kaninchen wurden bei einer Raumtemperatur von 20° Celsius und einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von 50 – 70 % in Laufgehegen von ausgebildeten Tierpflegern des UKSHs artgerecht versorgt. Die Tiere erhielten uneingeschränkt Pelletfutter, Heu und Trinkwasser.

2.2. Narkose, Schmerzkontrolle, Antibiose

Die Operation zum Zwecke der Implantation des Knochenersatzmaterialies erfolgte unter Allgemeinanästhesie. Die Narkose wurde mittels einer Gemischtspritze 0,5 ml Ketamin (Ketamin 10 %, Bremer Pharma GmbH, Warburg, Deutschland) und 0,25 ml Xylazin pro kg Körpergewicht (Rompun[®] 2 %, KVP Pharma+ Veterinärprodukte GmbH, Kiel, Deutschland) intraperitoneal eingeleitet.

Bei Bedarf erfolgte perioperativ die Applikation einer Erhaltungsdosis von 1/3 der Ursprungsdosis. Der Augenschutz während der Operation erfolgte mittels Bepanthen[®]-Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland). Um die Körpertemperatur aufrecht zu halten, wurden während der Operation Wärmflaschen verwendet, auf denen die Kaninchen lagerten.

Die Lokalanästhesie der Schnittstelle erfolgte mittels 1,2 ml Citocartin (Sopira Citocartin, 40 mg/ml Articainhydrochlorid, 10 mg/ml Epinephrin, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland).

Zur Analgesie wurde für fünf Tage postoperativ 0,3 ml Carprofen (Rimadyl, 4 mg/kg Körpergewicht, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland), zur postoperativen Antibiose 0,5 ml Penicillin G (40.000 E/24 Std., Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) subcutan verabreicht.

2.3. Operationsprozedere

Es galt, je zwei Hydroxylapatit-Blöcke (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wollhusen, Schweiz), die jeweils mit rhBMP-2 (200 µg in 1 ml NaCl-Lösung, Wyeth Pharma GmbH, Münster, Deutschland) oder VEGF₁₆₅ (250 µg in 1 ml NaCl-Lösung) benetzt waren, in das Omentum majus zu implantieren. Um Platz für das Zentralgefäß im Knochenersatzmaterial zu schaffen, wurde mittels einer Fräse ein Zentralkanal geschaffen, der den Mandibularkanal des Unterkiefers imitieren sollte. Dafür wurden die Tiere in oben beschriebener Form in Allgemeinanästhesie gesetzt. Anschließend folgte die Rasur des Bauchfells vom Xiphoid bis ca. 15 cm nach kaudal. Die Hautdesinfektion wurde mit Sterilium® (BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, danach folgte die sterile Abdeckung des Operationsbereichs. Ein ca. 10 cm langer Hautschnitt erfolgte mittels eines 20er Skalpells, mit einer Präparierschere wurde bis auf die Abdominalfaszie präpariert. Nachdem diese eröffnet war, wurde das Omentum majus freigelegt (Abb. 2). Es wurden 2 Zentralgefäße freipräpariert. Ein Hydroxylapatitblock wurde mit der A. gastroepiploica als Zentralgefäß eingebracht, der zweite Block wurde mit dem kleineren Zentralgefäß, der A. gastrica brevis, implantiert (Abb. 3). Die Blöcke wurde komplett mit Omentum umwickelt, die Fixierung erfolgte mit resorbierbarer Naht Vicryl 3-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) (Abb. 4). Der Verschluss der Wunde erfolgte schichtweise, die Fasziennaht mit Vicryl 1-0, die Hautnaht mit Vicryl 3-0. Die Wundsäuberung erfolgte mit Natriumchlorid, ab Tier 5 der BMP-Gruppe mit Wasserstoffperoxid. Zur besseren postoperativen Regeneration wurden jedem Tier 4 ml handwarmes NaCl als Flüssigkeitdepot subcutan injiziert.

Sechs Tieren der Versuchsgruppe wurden zwei Knochenersatzmaterialblöcke (1 x 1 x 2 cm) eingesetzt. Bevor dies geschah, wurden die Blöcke gründlich mit NaCl gespült, sodann erfolgte die Benetzung mit in 1 ml NaCl gelöstem rhBMP-2 (200 µg). Den weiteren sechs Tieren wurden Blöcke (1 x 1 x 2 cm) implantiert, die mit in 1 ml NaCl gelöstem rhBMP-2 (200 µg) und in 1 ml NaCl gelöstem VEGF₁₆₅ (250 µg) benetzt waren.

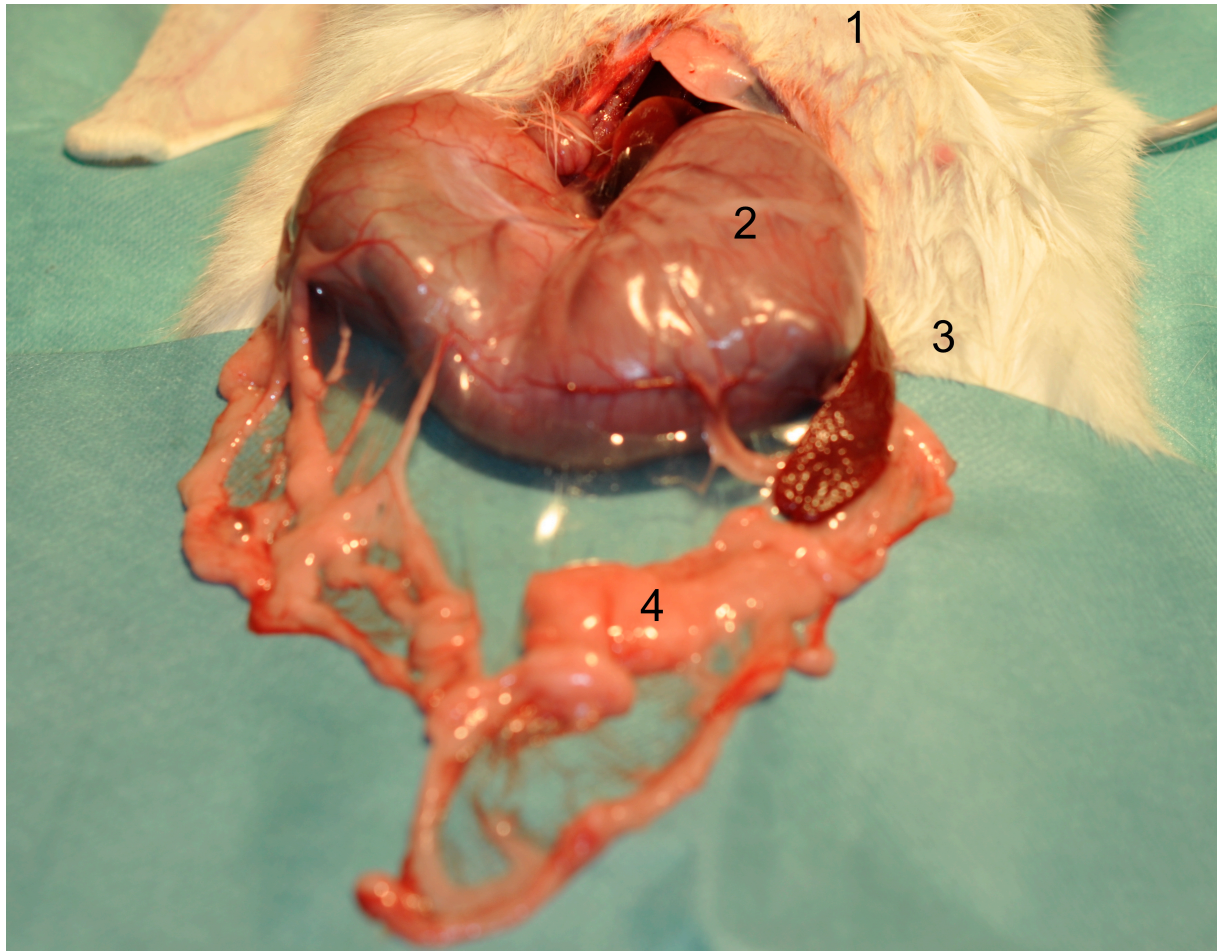


Abbildung 2: Intraoperativer Befund

**Nach Eröffnung der Abdominalfaszie des Tieres wurde das Omentum majus freigelegt;
1 cranial, 2 Magen, 3 kaudal, 4 Omentum.**

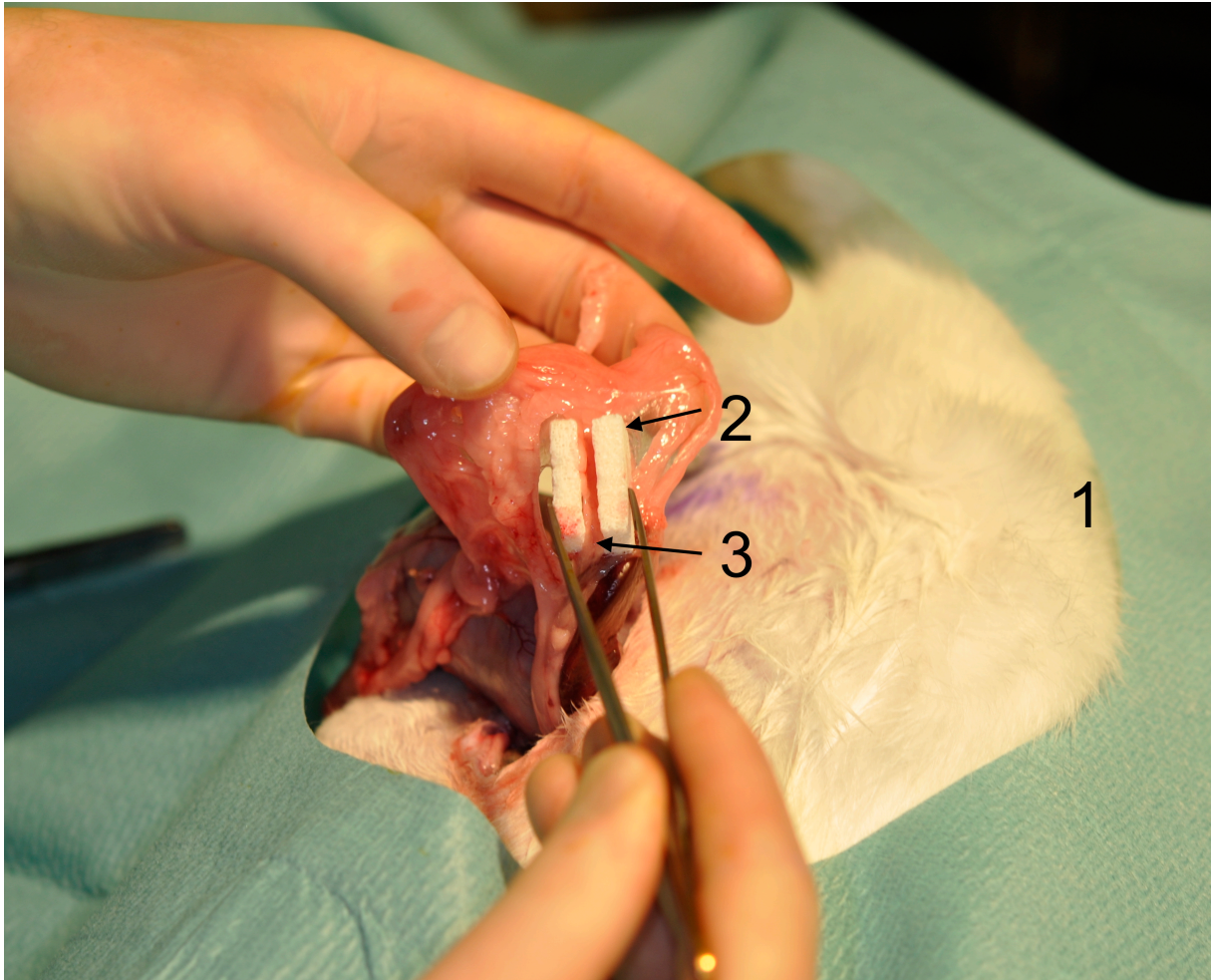


Abbildung 3: Implantation der Blöcke

Hydroxylapatitblock (2) mit präpariertem Zentralkanal, in den die Zentralarterie (3) eingelegt wurde. Hierauf folgte das Umwickeln des Blocks mit Omentum. 1 cranial, 2 HA-Block, 3 Arterie.

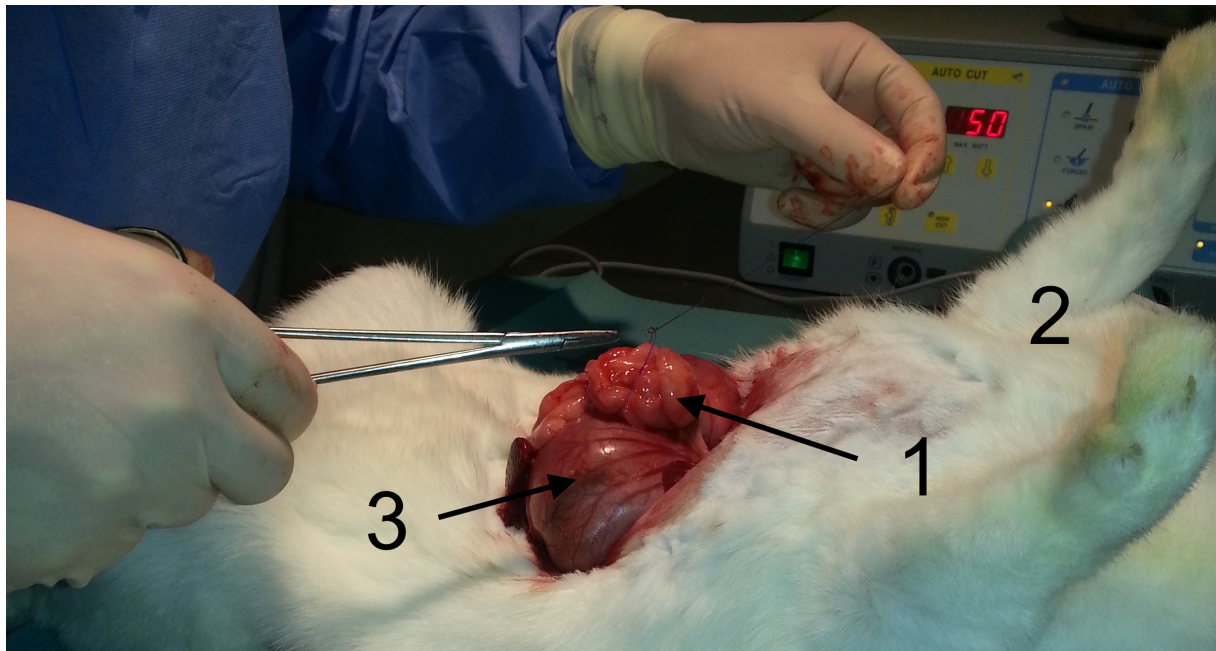


Abbildung 4: Umwicklung und Fixierung der Blöcke

Mit Omentum umwickelter Hydroxylapatit-Block (1), der mit resorbierbarer Naht fixiert wird;
1 HA-Block 2 cranial, 3 Magen.

2.4. Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

In den folgenden 10 Wochen wurde ab Woche 2 einmal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion von Fluorochromen vorgenommen.

Zwei Wochen nach der Implantation des Knochenersatzmaterials (Bio-Oss®) wurde mit der Injektion der in untenstehender Tabelle aufgelisteten Fluorochromen begonnen (Tab. 1). Mittels eines peripheren Venenkatheters (Braunüle®, grün: 1,3 x 45 mm, G 18, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden diese intraperitoneal verabreicht.

Tabelle 1: Reihenfolge der intravitralen polychromen Sequenzmarkierung

Fluorochrome	Dosierung	Injektionszeitpunkte
Xylenol-Orange	6 % in 2 % NaHCO ₃ -Lsg., 1,5 ml/ kg KG (Sigma- Aldrich, Steinheim, D)	2. und 6. Woche post-OP
Calcein-Grün	1 % in 2 % NaHCO ₃ - Lsg., 0,5 ml/ kg KG (Sigma- Aldrich, Steinheim, D)	3. und 7. Woche post-OP
Alizarinkomplex	3 % in 2 % NaHCO ₃ - Lsg., 0,5 ml/ kg KG (Sigma- Aldrich, Steinheim, D)	4. und 8. Woche post-OP
Calcein-Blau	0,04 % in 2 % NaHCO ₃ - Lsg., 1 ml/ kg KG (Sigma- Aldrich, Steinheim, D)	5. und 9. Woche post-OP

2.5. Computertomographische Untersuchungen, Messung der Knochendichte

Zur computertomographischen Untersuchung (CT) wurden die Tiere in Woche 2, 5, 8 und 10 in Allgemeinanästhesie versetzt. Die Untersuchung fand im CT (SOMATOM Sensation⁶⁴, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) statt (120 kV, 20 mm). Die Dichtemessung des Knochens erfolgte mittels der Software Impax 6 (Agfa HealthCare GmbH, Bonn, Deutschland). In Abb. 5 ist die Lage der Blöcke im Kaninchen dargestellt. Die Anschnitte der Hydroxylapatitblöcke unterscheiden sich, im linken Block ist der Zentralkanal zu erkennen. Die zu messenden Areale in den einzelnen Blöcken wurden manuell aufgefunden und jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zentralgefäß (Messstelle „center“) und oben ca. 2 mm über diesem Bereich (Messstelle „top“) mit einem Volumen von jeweils 2 mm³ markiert (Abb. 6). Die Dichte dieser Volumen wurden daraufhin in Hounsfield Units (HU) berechnet.

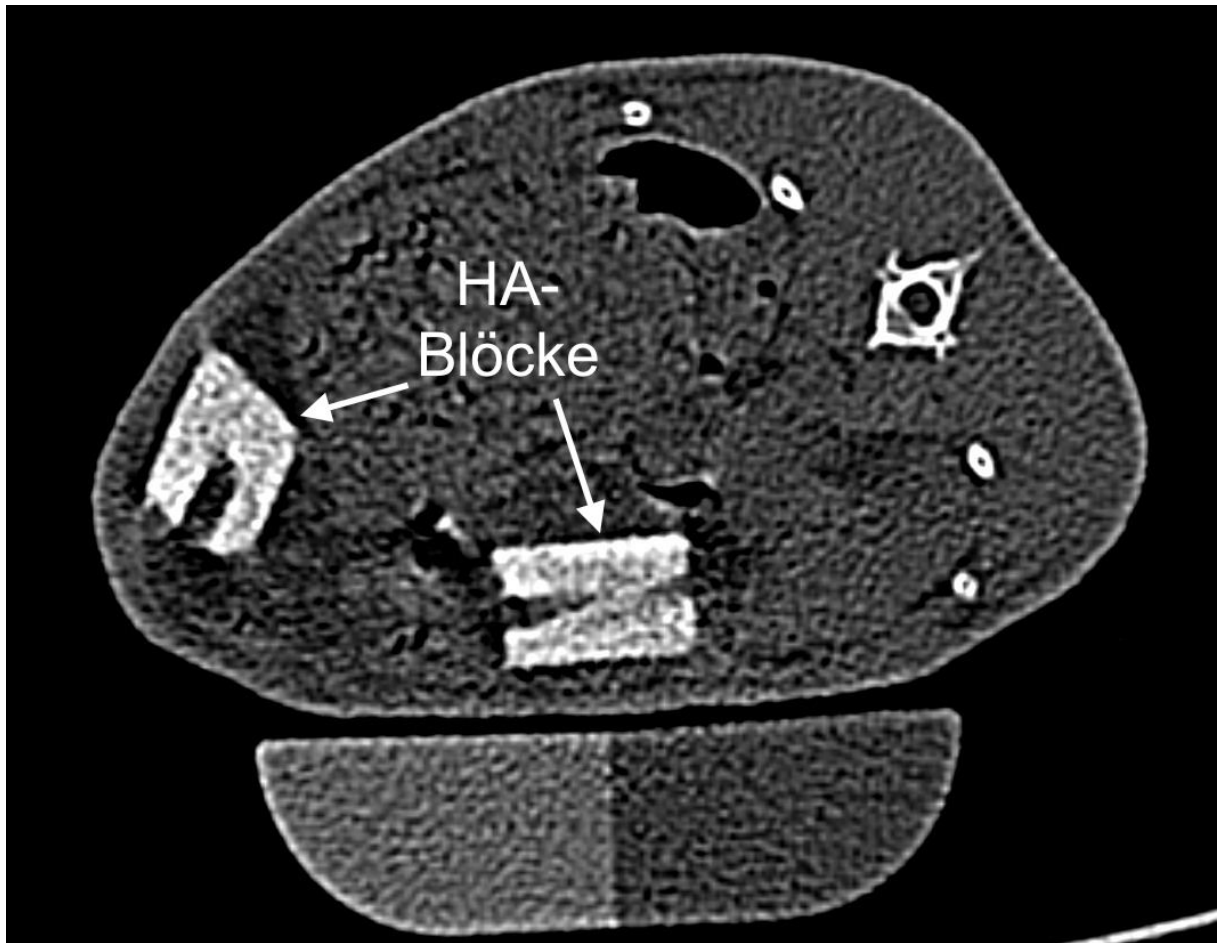


Abbildung 5: CT in coronarer Schichtung

Lage der Blöcke im Tier, CT-Aufnahme; die Blöcke sind in verschiedenen Ebenen getroffen, der Zentralkanal kann hier nur im linken Block betrachtet werden.



Abbildung 6: Hydroxylapatitblock im histologischen Schnitt
Übersichtsaufnahme, Toluidinblau-Färbung; Bereiche der Dichtemesspunkte „center“ und „top“ weiß markiert. Der „center“-Bereich liegt in unmittelbarer Nähe zum Zentralkanal mit dem dazugehörigem Zentralgefäß. Die „top“-Messstelle liegt ca. 2 mm oberhalb der „center“-Messstelle.

2.6. Opferung und Gewinnung der Transplantate

Nach zehn Wochen wurde die Tiere geopfert. Dies fand in Allgemeinanästhesie in tiefer Narkose statt. Hierzu diente eine Gemischtspritze mit 0,5 ml Ketamin (Ketamin 10 %, Bremer Pharma GmbH, Warburg) und 0,25 ml Xylazin (Rompun® 2 %, KVP Pharma+ Veterinärprodukte GmbH, Kiel) pro kg Körpergewicht, die intraperitoneal gesetzt wurde. Daraufhin erfolgte die eigentliche Tötung per intrakardialer Injektion von 5 ml Kaliumchlorid.

2.7. Präparatherstellung Hartschnitt

Nach der Gewinnung der Hydroxylapatitblöcke wurden diese für 14 Tage in 10 % Formalinlösung fixiert. Hierauf folgend wurden die Präparate im PSI-Einbettautomaten (Pool of Scientific Instruments, Grünwald GmbH & Co KG, Laudenbach, Deutschland) in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert (Tab. 2). Daraufhin wurden sie im Kühlschrank bei 6° Celsius im Einbettmedium getränkt (Tab. 3). Die Präparate wurden dann einzeln in verschraubbare Gläser eingebracht, die mit Einbettmedium aufgefüllt und bei 37° Celsius ausgehärtet wurden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Einbettmediums

Menge	Material
500 g	Methacrylsäuremethylester 99% (Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Buchs, Schweiz)
3 g	Azoisobuyronitril (Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Buchs, Schweiz)
100 ml	Nonylphenol-polyethylenglycolacetate (Fluka, Sigma Aldrich Chemie, Buchs, Schweiz)
5 ml	Phthalsäuredibutylester (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 3: Einbettprotokoll zur Herstellung der histologischen Schnitte

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

Nachdem das Aushärten der Präparate abgeschlossen war, wurden die Gläser zerschlagen und die Präparate mit Hilfe einer Tischbandsäge (Metabo® GmbH, Bochum, Deutschland) grob zurechtgesägt. Im Anschluss wurden die entstandenen Schnittflächen mittels Silikonkarbidpapier absteigender Körnunggröße (500 bis 4000) sowie einem DP-U4 Schleifgerät (Struers® GmbH, Erkrath, Deutschland) hochglanzpoliert, um die polierten Flächen auf Objektträger, die mit Klebefolie (Technovit®, Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) beschichtet waren, zu kleben und in Schnitte von 120 µm zu sägen. Die durch das Sägen entstandenen Rauigkeiten wurden beseitigt, indem die Weiterbehandlung der Schnitte sowohl elektronisch gesteuert mit einem Mikroschleifgerät (Exakt Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) als auch manuell mit einem Schleifgerät (Struers®, Erkrath, Deutschland) erfolgte. Das anschließende Mikroskopieren, Fotografieren und die qualitative Analyse der circa 40 µm dicken Schnitte erfolgte sodann mit dem Fotomikroskop unter Fluoreszenzlicht (Axio Scan.Z1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Für die weitere histologische Auswertung wurden die Schliffe drei Minuten in 0,1 %ige Ameisensäure getaucht, mit destilliertem Wasser gespült und für 90 Minuten in 20 %iges Methanol getaucht. Nachdem die Schliffe ein weiteres Mal mit destilliertem Wasser gespült worden waren, wurden sie für zwei Minuten in einer filtrierten Toluidinblaulösung gefärbt und

danach wiederum gespült. Die Differenzierung wurde mit HCl-Ethanol und die anschließende Optimierung mit Toluidinblau durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte unter Zuhilfenahme des Lichtmikroskops (SM-Lux, Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Fotografien wurden in 25-facher Vergrößerung durchgeführt.

2.8. Präparatherstellung Weichschnitt

Um eine Schneidbarkeit der Präparate für die spätere Paraffinhistologie zu gewährleisten, wurden die mittig geteilten Präparate zunächst für vier Wochen mit einer 12,5 %igen Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA, pH 7,4) entkalkt (Ultraschall-Entkalker USE 33, Medite, Burgdorf, Deutschland). Nach einer schrittweisen Dehydratation in aufsteigenden Alkoholreihen wurden die Präparate über das Intermedium Methylbenzoat in Paraffin (TES 99, Medite, Burgdorf, Deutschland) eingebettet. Im Anschluss wurden die Präparate mit Hilfe des Mikrotom HM 430 (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) in ca. 5 µm dicke Schnitte geschnitten, im Wasserbad gestreckt und anschließend getrocknet. Die entstandenen Paraffinpräparate wurden sowohl mit Xylol entparaffiniert als auch nach Rehydrierung zur Kernfärbung für 3 Minuten in Hämalaun nach Mayer inkubiert. Anschließend wurden die Kerne für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Noch bevor die Proben nach Dehydrierung mit Mountex (Medite, Burgdorf, Deutschland) eingedeckelt wurden, erfolgte die Plasmafärbung für 30 Sekunden in alkoholischer Eosin-Lösung. Die abschließenden Fotografien der Präparate wurden in 25-facher Vergrößerung angefertigt.

2.9. Statistische Auswertung der Computertomographien

Als erstes erfolgte der Test auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Die statistische Analyse der Dichtemessungen erfolgte mittels des ANOVA-Post-hoc-Tukey-Test. Als Referenzwerte dienten die Mittelwerte aus allen Messungen. Es wurden verschiedene Grafiken angefertigt (GraphPad Prism 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Um eine statistische Signifikanz sichtbar zu machen, wurde der P-Wert während der Tests errechnet. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers bei der statistischen Analyse an; Signifikanz lag bei ($p > 0.05$) vor.

3. Ergebnisse

3.1. Klinik

Nach der Operation wurden die Kaninchen noch für ca. fünf Tage in Einzelkäfigen gehalten, um die gegenseitige Verletzungsgefahr zu reduzieren. Ein Tier entwickelte eine Wundheilungsstörung an der Bauchnaht, diese wurde daraufhin täglich desinfizierend gesäubert und verheilte problemlos. Ein Tier verstarb wenige Tage nach der Operation vermutlich durch ein akutes Abdomen, dieses ist durch ein weiteres Tier ersetzt worden, welches alle Maßnahmen problemlos tolerierte.

3.2. Computertomographien

Die ermittelten Mittelwerten (MW) \pm der Standardabweichungen (SD) der Blöcke sind in den folgenden Grafiken in HU dargestellt. Es ist die Entwicklung ausgehend von Woche 2 über die Wochen 5, 8, und 10 post Implantationem zu sehen. Sowohl die Messpunkte zentral am Hydroxylapatitblock ("center") als auch an der Basis ("top") werden jeweils von Block 1 und Block 2 unterschieden. Die Abb. 7 a + b, Abb. 8 a + b und Abb. 9 a + b zeigen die Blöcke, die ausschließlich mit BMP behandelt wurden. In Abb. 7 ist die Entwicklung zentral im Block (gefäßstielnah) zu sehen: Ein signifikanter Unterschied der HU zeigt sich zwischen Woche 2 und 10 in Block 2, in Block 2 zwischen Woche 2 und 5 sowie zwischen Woche 2 und 8. Die Dichte steigt bei beiden auf ca. 1000 HU an.

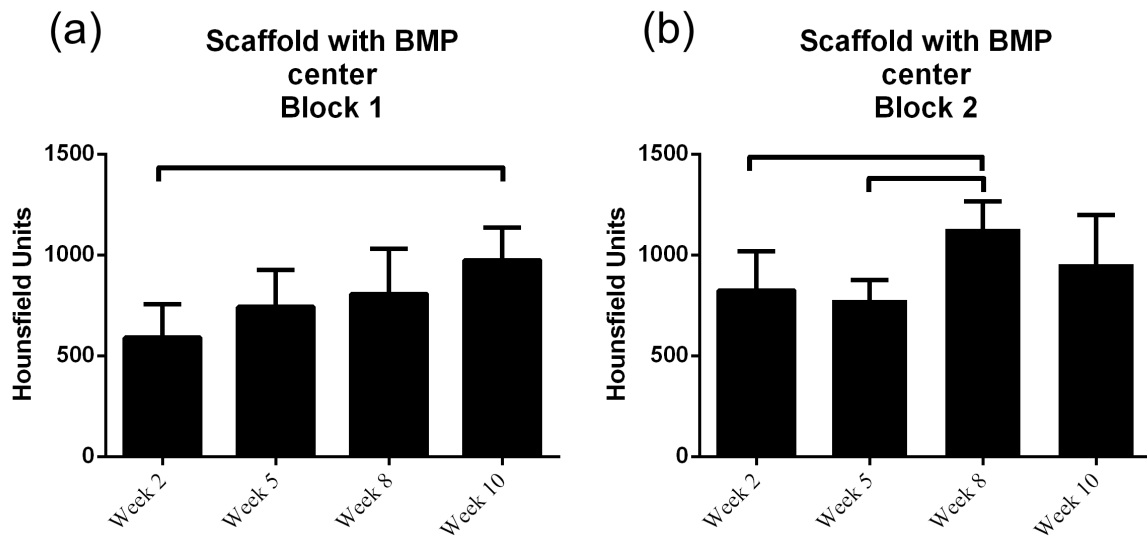


Abbildung 7: (a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 "center" mit BMP. (b) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 2 "center" mit BMP.

Die waagerechten Balken zeigen signifikante Unterschiede an. In Block 1 sind signifikante Unterschiede der HU zwischen Woche 2 und Woche 10 zu sehen. In Block 2 zeigen sich signifikante Unterschiede der HU zwischen Woche 2 und 5 sowie zwischen Woche 2 und 8.

In Abb. 8 a + b ist ein Anstieg der HU zu zeigen, jedoch nur in Block 1 mit einer Signifikanz zwischen Woche 2 und 8 sowie zwischen Woche 5 und 8. Von Woche 2 zu 5 und Woche 5 zu 8 steigen die Werte auf ca. 800 HU von ausgehend ca. 550 HU. Zu beobachten ist ein leichter Rückgang der HU in beiden Blöcken von Woche 8 zu 10.

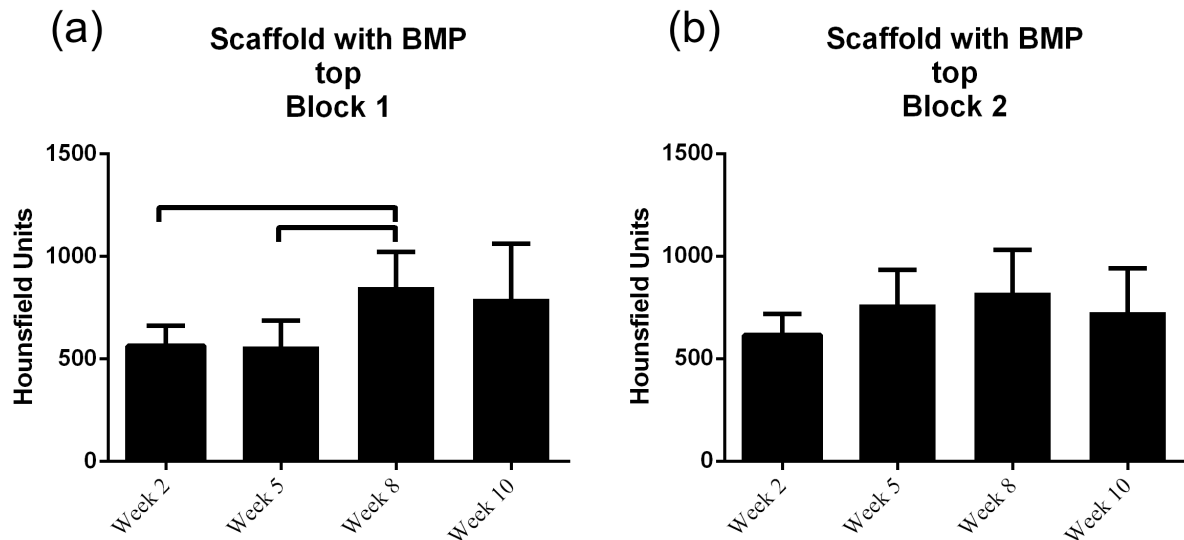


Abbildung 8: (a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 "top" mit BMP. (b) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 2 "top" mit BMP.

Die waagerechten Balken in Block 1 zeigen signifikante Unterschiede an; diese bestehen zwischen Woche 2 und 5 sowie zwischen Woche 5 und 8. In Block 2 sind keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Die Abb. 9 zeigt einen Vergleich zwischen den Messungen zentral ("center") und an der Basis ("top") in Woche 5 und 10. In Block 1 und in Block 2 sind die Ausgangswerte auf vergleichbarem Niveau zentral ("center") und an der Basis ("top"). Eine Signifikanz liegt lediglich für Woche 5 und 10 an der Basis ("top") in Block 1 vor.

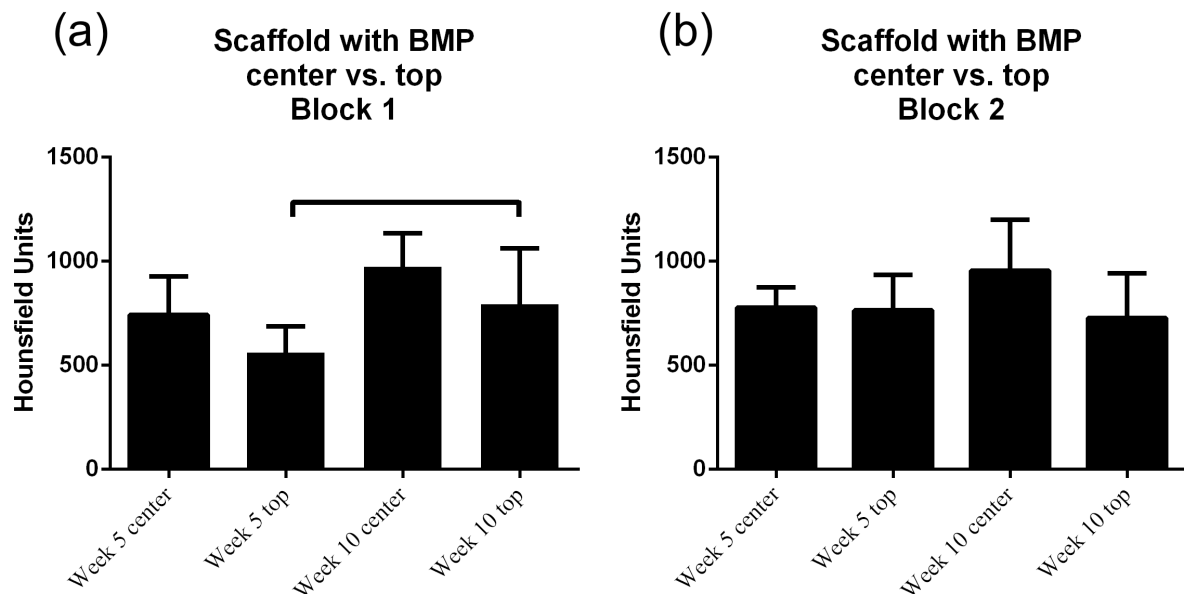


Abbildung 9:(a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 „center vs. top“ mit BMP.

(b) Darstellung der HU (MS±SD) des Blockes 2 „center vs. top“ mit BMP.

Der waagerechte Balken in Block 1 zeigt einen signifikanten Unterschied an; dieser besteht zwischen Woche 5 und 10 an der Basis ("top"). Im Block 2 kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Abb.10 a + b, Abb. 11 a + b und Abb. 12 a + b zeigen die Blöcke, die sowohl mit BMP als auch mit VEGF vorbehandelt wurden.

Die HU-Werte in Abb. 10 steigen von Woche 2 bis 10 in beiden Blöcken an, jedoch zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Der Ausgangswert von durchschnittlich ca. 750 HU erhöht sich bis Woche 8 auf ca. 950 HU. In Block 1 fällt der Wert in Woche 10 wieder minimal ab, in Block 2 bleibt er konstant.

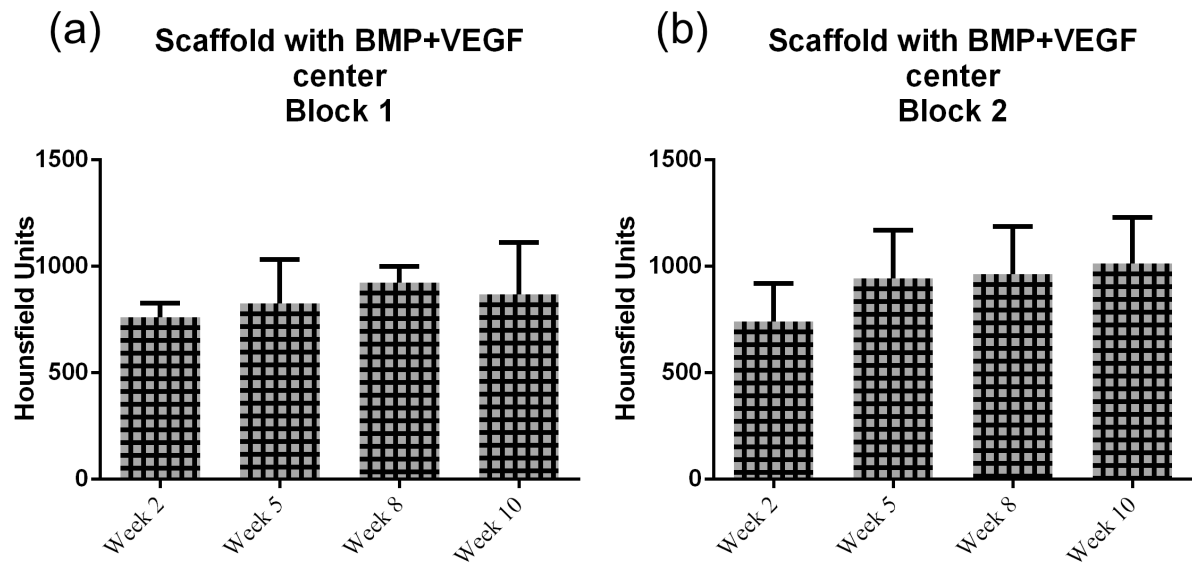


Abbildung 10: (a) Darstellung der HU (MW \pm SD) des Blockes 1 „center“ mit BMP+VEGF.

(b) Darstellung der HU (MW \pm SD) des Blockes 2 „center“ mit BMP+VEGF.

Weder in Block 1 noch in Block 2 ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Die HU in Abb. 11 zeigen sowohl in Block 1 als auch in Block 2 einen signifikanten Anstieg von Woche 2 zu 10. Die Zunahme liegt bei ca. 250 HU in Block 1 und 300 HU in Block 2.

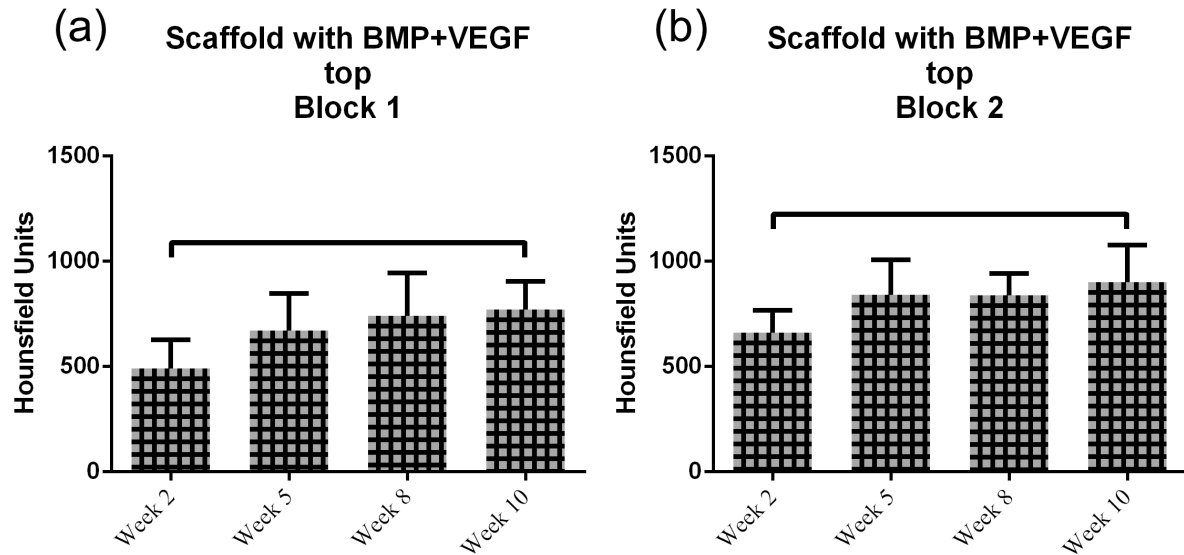


Abbildung 11: (a) Darstellung der HU (MW \pm SD) des Blockes 1 „top“ mit BMP+VEGF.

(b) Darstellung der HU (MW \pm SD) des Blockes 2 „top“ mit BMP+VEGF.

Die waagerechten Balken zeigen signifikante Unterschiede an. In Block 1 sind signifikante Unterschiede der HU zwischen Woche 2 und Woche 10 zu sehen. In Block 2 zeigen sich signifikante Unterschiede der HU ebenso zwischen Woche 2 und Woche 10.

Die HU bei Woche 5 und 10 sind in Block 1 und 2 nahezu gleichwertig. Es ist kein signifikanter Anstieg zu zeigen.

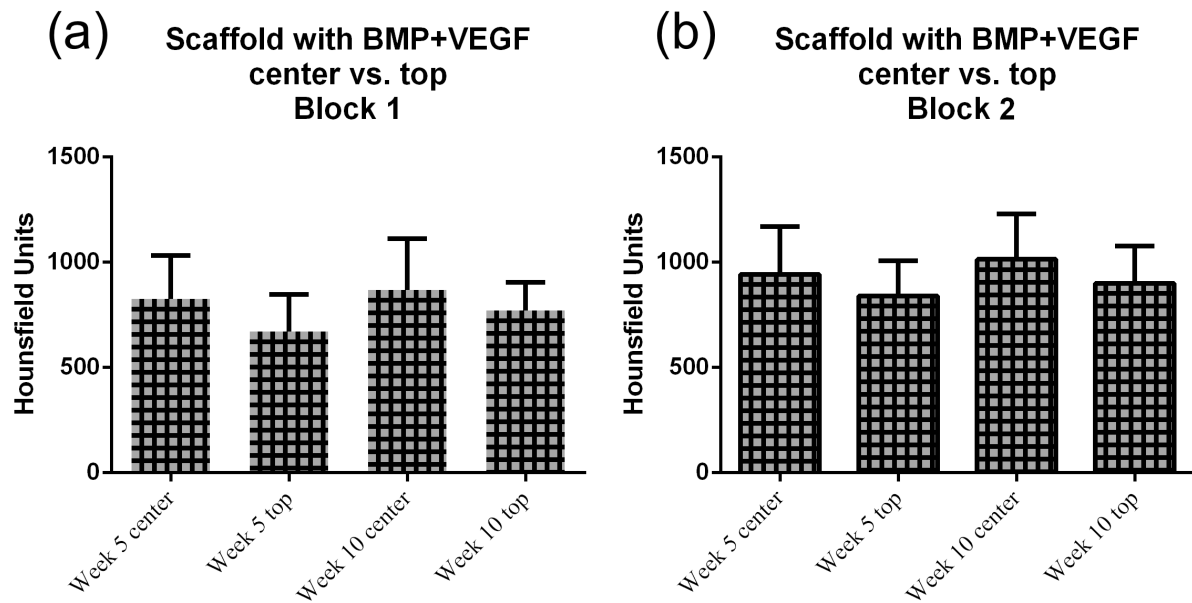


Abbildung 12: (a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 „center vs. top“ mit BMP+VEGF. (b) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 2 „center vs. top“ mit BMP+VEGF. Weder in Block 1 noch in Block 2 sind signifikante Unterschiede zu sehen.

In Abb. 13 zeigt sich in der BMP-Gruppe im Vergleich zur BMP+VEGF-Gruppe ein stärkerer Anstieg der HU von Woche 5 zu Woche 10. Dieser Effekt lässt sich in beiden Blöcken darstellen. Signifikante Unterschiede lassen sich nicht zeigen.

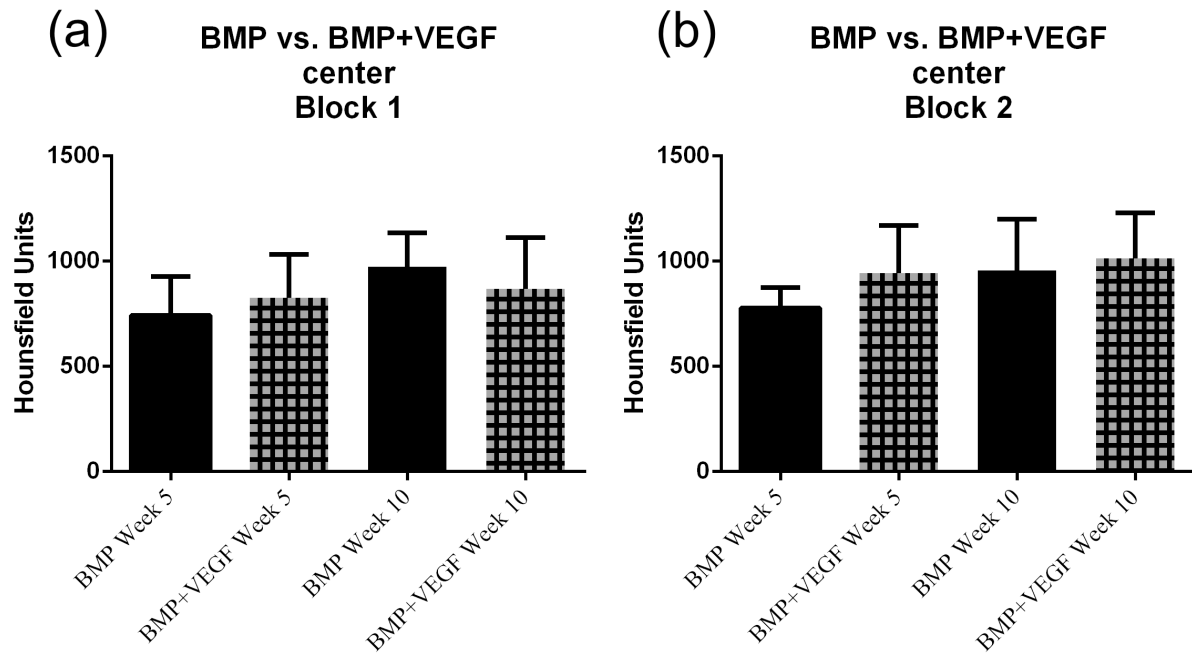


Abbildung 13: (a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 „center“ mit BMP vs. mit BMP+VEGF. (b) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 2 „center“ mit BMP vs. mit BMP+VEGF.

Weder in Block 1 noch in Block 2 sind signifikante Unterschiede zu erkennen.

Auch in Abb. 14 ist kein signifikanter Anstieg der HU-Werte im Vergleich der beiden Gruppen BMP und BMP + VEGF zu sehen. Beide Gruppen sind nur wenig gestiegen (Block 1) bzw. sogar fast gleich geblieben (Block 2).

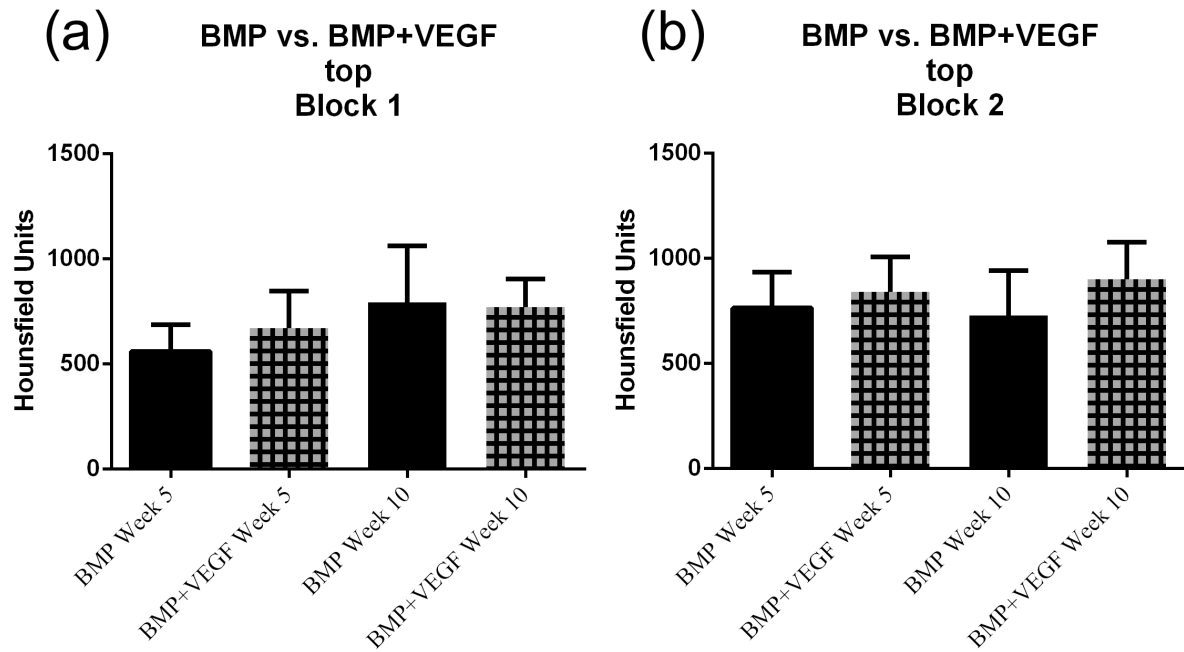


Abbildung 14: (a) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 1 „top“ mit BMP vs. mit BMP+VEGF. (b) Darstellung der HU (MW±SD) des Blockes 2 „top“ mit BMP vs. mit BMP+VEGF. Weder in Block 1 noch in Block 2 zeigen sich signifikante Unterschiede.

3.3. Fluoreszenzmikroskopien

In der Fluoreszenzmikroskopie kann die Knochenapposition im zeitlichen Rahmen dargestellt werden. In allen Präparaten sind vereinzelt gelbe (Woche 2 und 6) und grüne (Woche 3 und 7) kurzstreckige Farbbanden auszumachen. Es sind keine Unterschiede zwischen den ausschließlich mit BMP behandelten und den sowohl mit BMP als auch mit VEGF-behandelten Präparaten zu erkennen. Das Fluorochrom Xylenolorange bedingt die gelben Banden (Woche 2 und 6), während Calceingrün die grünen Banden kennzeichnet (Woche 3 und 7) (Abb. 15). Ausgeprägte Farbbanden und Hinweise auf die beiden anderen Fluorochrome Alizarin (Woche 4 und 8) und Calceinblau (Woche 5 und 9) fehlen. Die vorhandenen Banden liegen ausschließlich am Präparaterand, in der Tiefe der Trabekel ist keine Knochenapposition vorhanden.

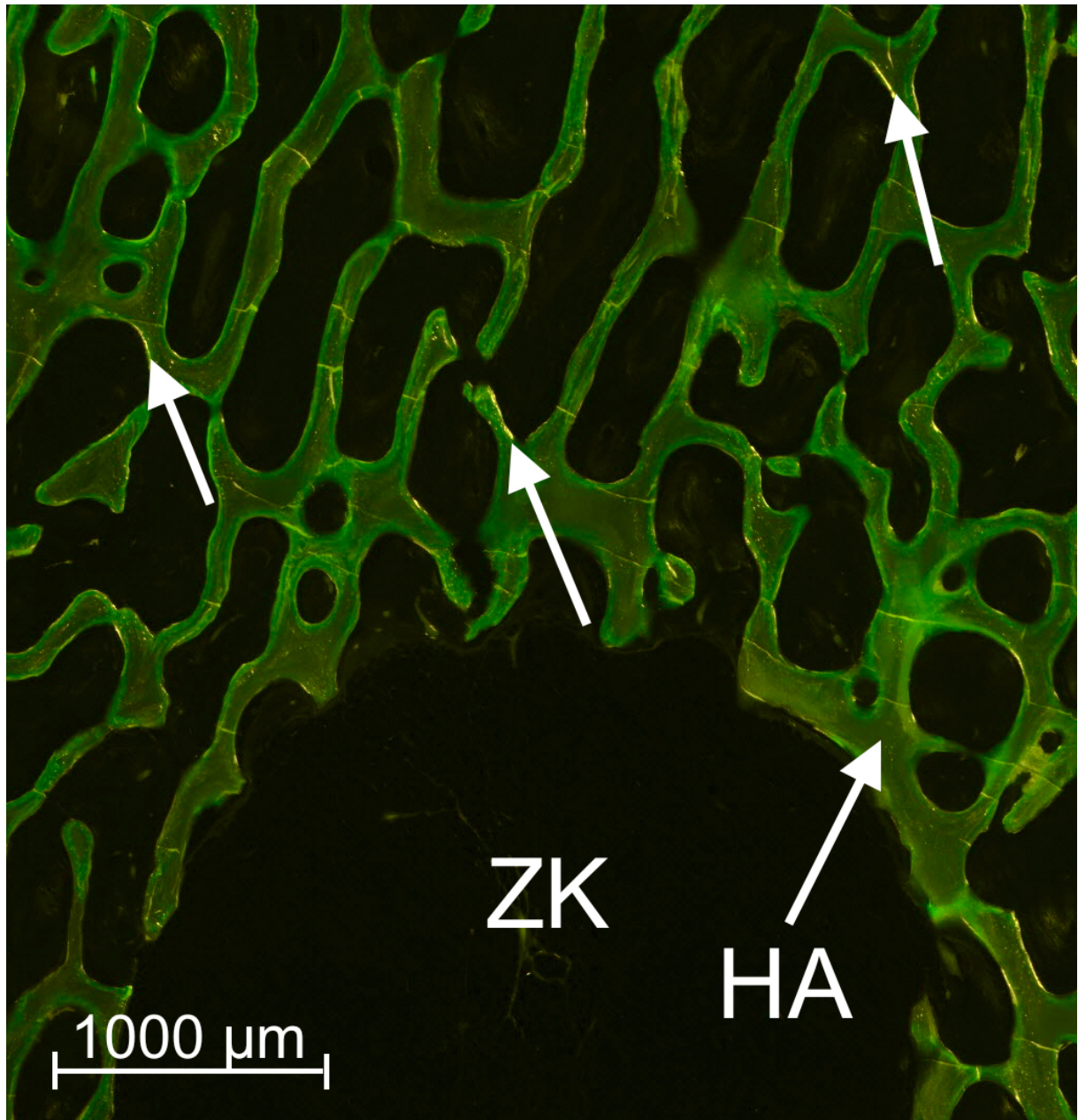


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie.

Im unteren Bilddrittel liegt der Zentralkanal (ZK), in dem das Gefäßbündel liegt. Diesen umgebend liegt der Hydroxylapatitblock (HA). Dieser verfügt über eine schwach grüne Eigenfluoreszenz. An dessen Rändern sind vereinzelt grüne und gelbe Farbbanden zu erkennen (Pfeile). Diese sprechen für eine geringe Knochenapposition in Woche 2, 3, 6 und 7.

In den Detailaufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie zeigen sich kurzstreckige grüne und gelbe Farbbanden, die für eine geringe Knochenapposition in Woche 2 und Woche 6 (gelbe Banden) und Woche 3 und Woche 7 (grüne Banden) sprechen. Farbbanden der Fluorochrome Alizarin und Blau sind nicht zu finden (Abb. 16, 17).

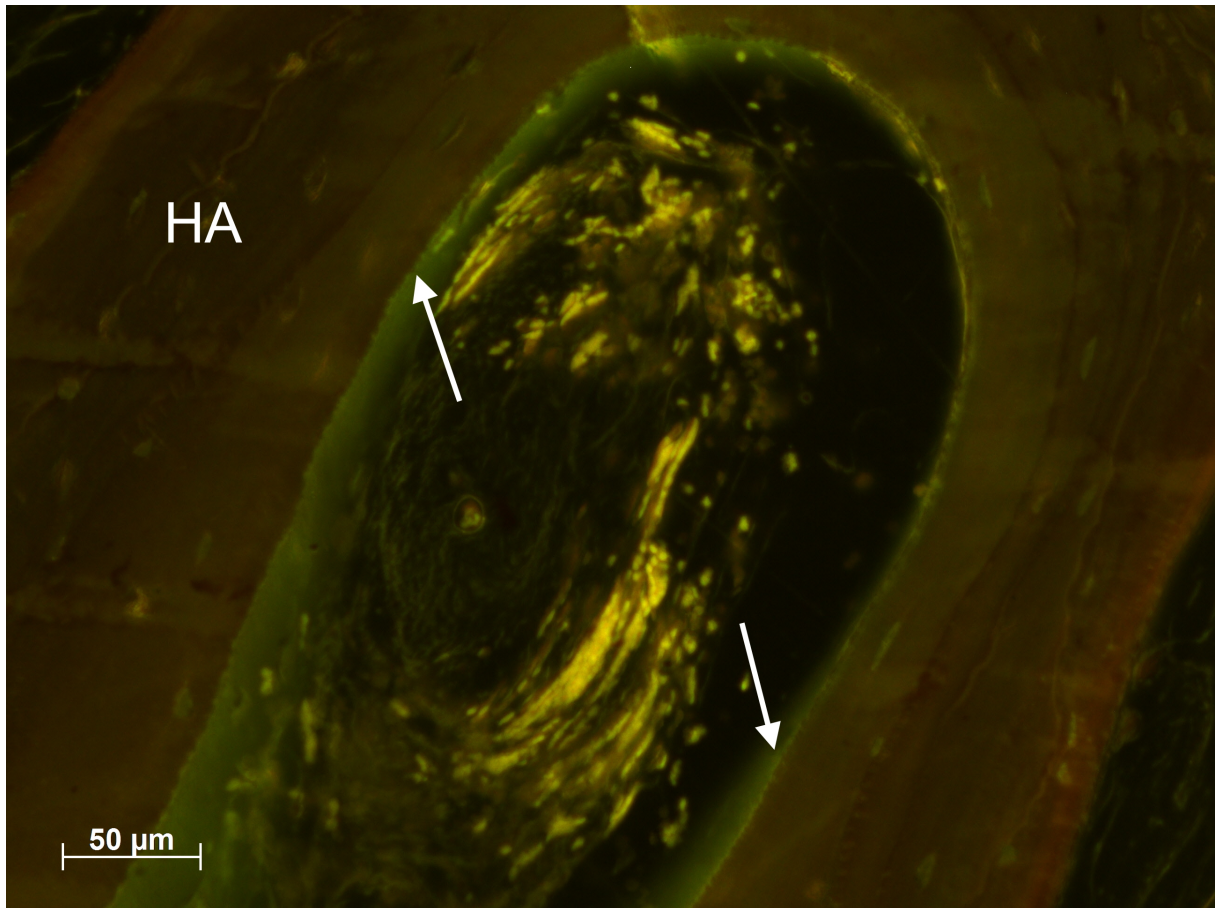


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie, Detailaufnahme. Selbes Präparat wie in Abb. 15. An den Rändern des Hydroxylapatitblocks (HA) befinden sich grüne Farbbanden (Pfeile); diese sprechen für eine geringe Knochenapposition in Woche 3 und 7.

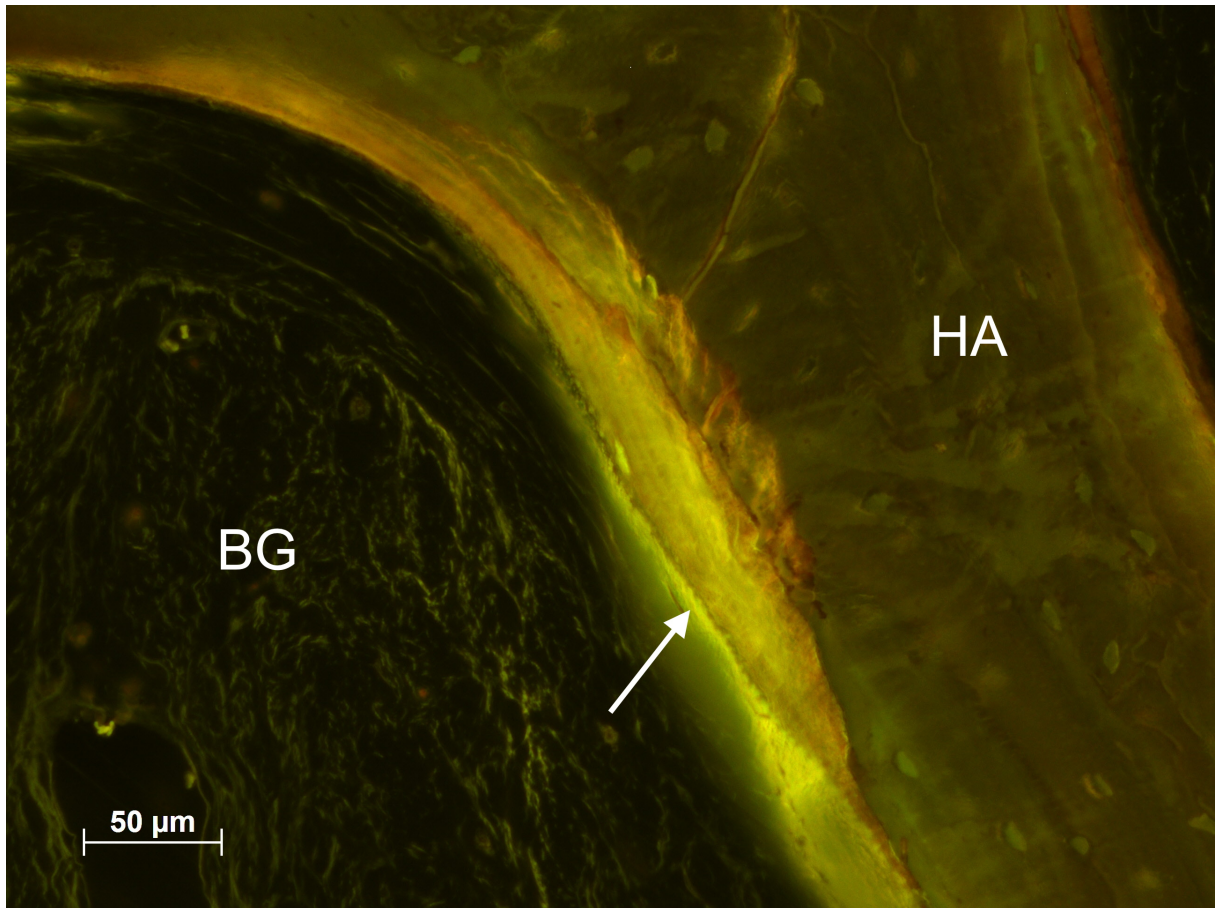


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie, Detailaufnahme. Selbes Präparat wie Abb. 15. Am linken Rand des Hydroxylapatitblocks (HA) sind gelb-grüne Farbbanden zu erkennen; diese lassen auf eine geringe Knochenapposition in Woche 2, 3, 6 und 7 schließen.

3.4. Toluidinblau

In den Präparaten (Abb. 18) stellt sich das Knochenersatzmaterial dunkellila dar, das ausfüllende Bindegewebe ist blasslila auszumachen. Der Bereich des Zentralkanal ist mit gut vaskularisiertem Binde- und Fettgewebe durchzogen. Das gesamte Implantat ist jeweils von Bindegewebe und Fettgewebe mit guter Vaskularisierung ummantelt.

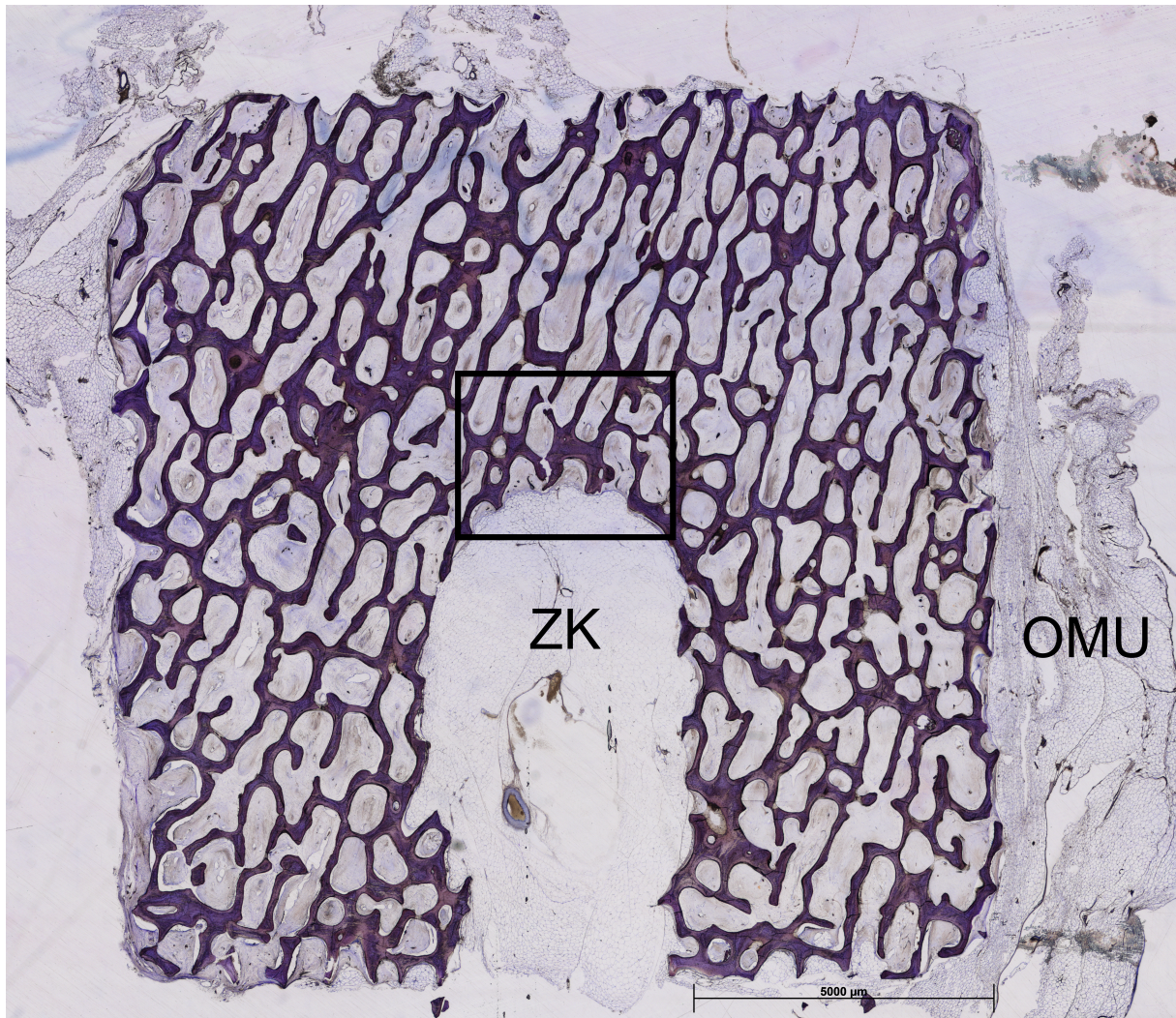


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung Toluidinblau, Übersichtsaufnahme.

Selbes Präparat wie in Abb. 9. Dieses ist von Omentum majus ummantelt. Im Zentralkanal (ZK) ist ebenso faserreiches Bindegewebe aus dem Omentum majus inklusive vieler Gefäßanschnitte auszumachen. Die Region von Interesse ist schwarz markiert (s. Abb. 19).

Knochenneubildung ist nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden, vereinzelt sind Havers-Kanälen zu erkennen (Abb. 19). Die Hohlräume des Hydroxylapatitblocks sind mit faserreichem Bindegewebe durchsetzt, auch hier sind zahlreiche Gefäßanschnitte vorhanden. Diese belegen eine gute Vaskularisierung der Präparate.

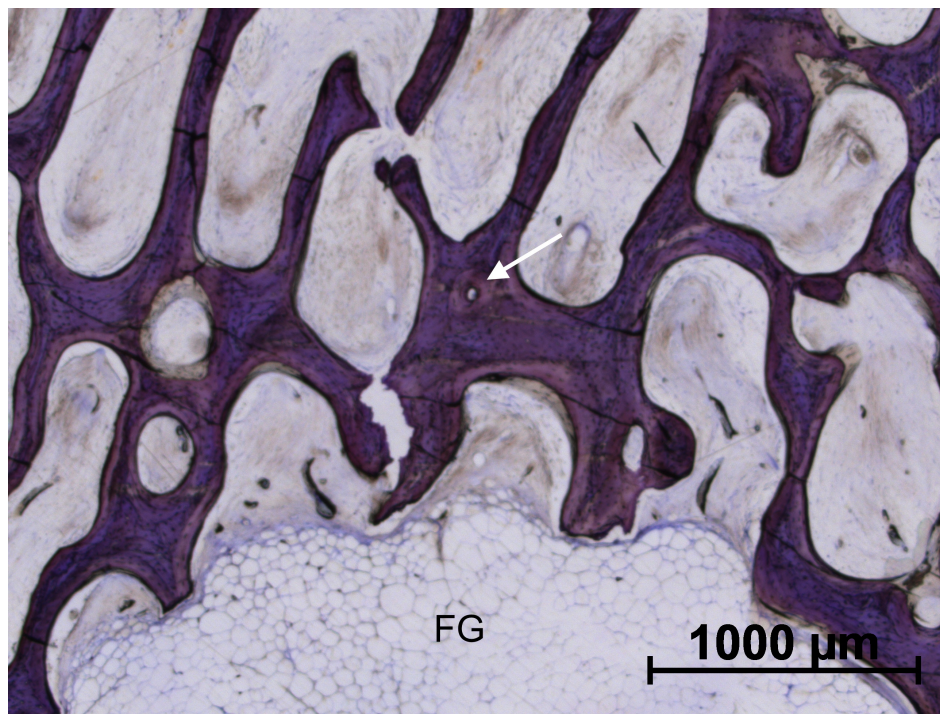


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung Toluidinblau, Detailaufnahme.

Region von Interesse, selber Ausschnitt wie Abb. 15. Im unteren Bild Drittel ist der Zentralkanal zu erkennen, der mit Fettgewebe (FG) gefüllt ist. Der Pfeil zeigt auf ein Osteon mit Havers-Kanälen.

3.5. Hämatoxylin-Eosin

Die Hohlräume des Hydroxylapatitblocks sind in den Präparaten komplett mit Binde- und Fettgewebe aufgefüllt, die sehr gute Vaskularisierung ist belegt durch Anschnitte von zahlreichen Blutgefäßen. Knochenneubildung kann jedoch weder an den Rändern der Präparate noch in der Tiefe detektiert werden (Abb. 20, 21).

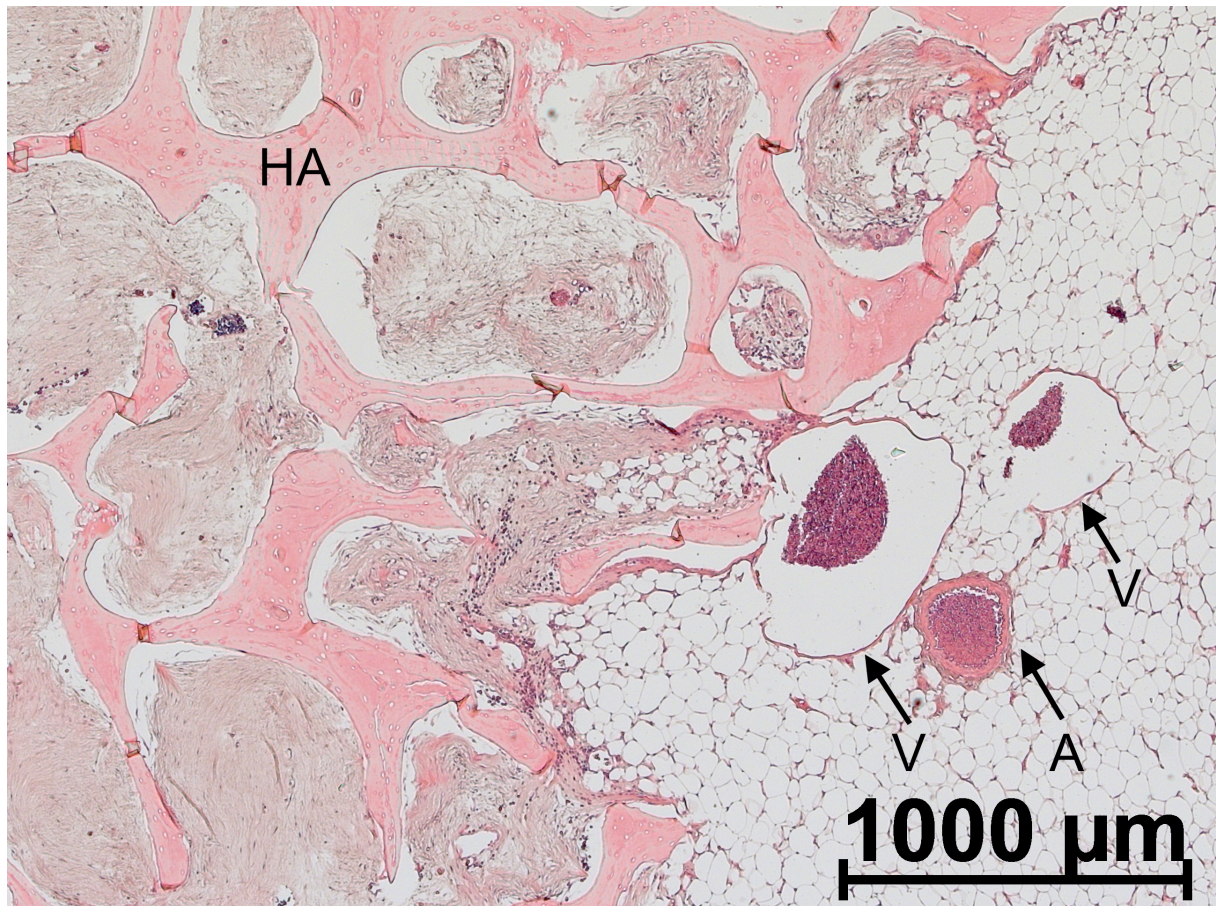


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung Hämatoxylin-Eosin (HE), Paraffin. Detailaufnahme „center“. Rechts im Bild ist ein Teil des Zentralkanals (ZK) zu erkennen, der mit Fettgewebe ausgefüllt ist. Zudem sind Anschnitte der Zentralarterie (A) und ihrer begleitenden venösen Gefäße zu sehen (V). Zahlreiche weitere Gefäßanschnitte sind in den bindegewebig ausgefüllten Hohlräumen des HA-Blocks (HA) zu finden.

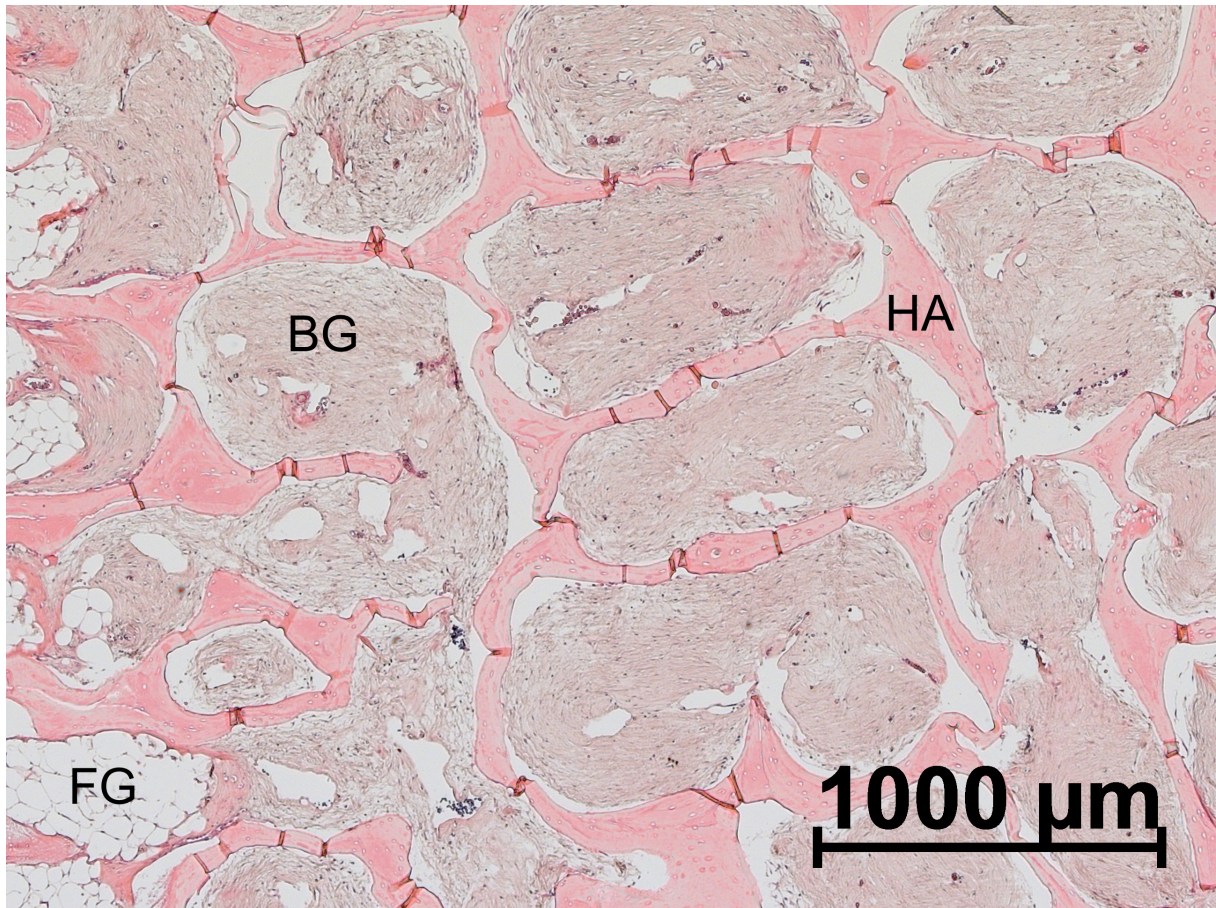


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung HE, Paraffin, Detailaufnahme „top“.

Selbes Präparat wie Abb. 20. Links am Präparaterand ist ein Anteil des Zentralkanals mit fettgewebiger (FG) Auskleidung zu erkennen, faserreiches Bindegewebe füllt die Hohlräume des HA-Blocks (HA) fast komplett aus.

4. Diskussion

Die Versorgung von großen Knochendefekten z.B. nach Tumoroperationen ist bis heute nur begrenzt möglich. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von autologen Transplantaten sowie der Notwendigkeit eines belastenden zweiten chirurgischen Eingriffs wird nach Methoden gesucht, dies zu umgehen. Das Tissue Engineering hat das Ziel, biologisch voll funktionsfähige Transplantate zu erschaffen. Im Rahmen der Endokultivierung dient der Patient selbst als Bioreaktor, indem heterotop Knochenneubildung versucht wird. Diese endokultivierten Transplantate erfüllen die an Knochenersatzmaterial gestellten Kriterien komplett. Sie sind biokompatibel, osteokonduktiv, osteoinduktiv, stabil und ästhetisch ansprechend. Hydroxylapatit hat sich in mehreren Studien als Gerüstmaterial für die Endokultivierung im M. latissimus dorsi bewährt (Warnke et al., 2004; Becker et al., 2012; Liu et al., 2014; Beck-Broichsitter et al., 2015). Durch Zugabe von rhBMP-2 in Kombination mit VEGF₁₆₅ konnte in vorherigen Studien eine verstärkte Knochenapposition im Tiermodell - im Gegenteil zu rhBMP-2 allein - festgestellt werden (Liu et al., 2014). Nicht zuletzt spielt auch die Ästhetik und Funktion des Transplantats im Rahmen der postoperativen Rehabilitation von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine große Rolle (Bjordal et al., 2000).

Um die postoperative Morbidität zu senken, sollte nach Methoden gesucht werden, welche die Funktion des Endokultivierungsbereichs postoperativ erhalten und somit auch zu geringeren Beschwerden im Heilungsverlauf führen. Im Jahr 2010 konnten Kamei et al. erstmalig das Omentum majus des Kaninchens in Verbindung mit gewonnenem Periost zur Knochenbildung nutzen (Kamei et al., 2010). Die osteogene Potenz im Omentum majus ist hoch, da sowohl die Blutversorgung sehr gut ist als auch eine hohe Anzahl an Stammzellen vermutet wird. Diese Vorteile sollten in der vorliegenden Studie genutzt werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob das Omentum majus zur in-vivo-Präfabrikation von endokultivierten vaskularisierten Transplantaten geeignet ist. Es sollte evaluiert werden, ob die simultane Applikation von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ in den Zentralkanal der Matrize einen Vorteil gegenüber der alleinigen Gabe von rhBMP-2 in der Knochenneubildung darstellt. Das Einbringen einer Arterie in den präparierten Zentralkanal sollte ebenso auf seine Vorteile im Hinblick auf

stärkere de-novo-Osteogenese untersucht werden. Bisher sind keine Arbeiten bekannt, in denen in vivo im Omentum majus Osteogenese mittels Wachstumsfaktoren und Scaffolds erzeugt werden konnte.

Bei der Analyse der Knochendichtewerte in den CTs zeigte sich teilweise ein signifikanter Anstieg der HU. Die ausschließlich mit rhBMP-2 behandelten Blöcke wiesen von Woche 2 zu 5, Woche 2 zu 8 und Woche 5 zu 8 statistisch signifikante Anstiege der HU auf. Zwischen den Messpunkten gefäßstielnah und an der Basis konnte kein typischer Unterschied ausgemacht werden. Die HU stiegen nicht stärker an der gefäßstielnahen Stelle an. Es wurde postuliert, dass gefäßstielnah es zu stärkerem Knochendichteanstieg kommen sollte, da das versorgende Gefäß und das rhBMP-2 hier in verstärktem Maße vorliegen. Dies schien in der vorliegenden Studie keinen positiven Einfluss auf die Osteogenese genommen zu haben. In den Blöcken, die sowohl mit VEGF₁₆₅ als auch rhBMP-2 behandelt wurden, konnte von Woche 2 zu 10 in der Basismessstelle ein signifikanter Anstieg der HU festgestellt werden. Ansonsten war der Anstieg der HU im Verlauf der Messungen nur gering. Der Vergleich zwischen den Messungen in Woche 5 und Woche 10 sowohl an der Top- als auch an der Basis-Messstelle ließen kaum einen Anstieg der Knochendichte erkennen. Der abschließende Vergleich zwischen der BMP-Gruppe und der BMP & VEGF-Gruppe zeigt, dass insgesamt kein signifikanter Unterschied im Anstieg der HU zwischen Woche 5 und 10 vorliegt. Anstiege in der Knochendichte waren jedoch messbar, dies war in der BMP-Gruppe verstärkter zu erkennen. Die Kombination der Wachstumsfaktoren erzeugte in dieser Studie keinen Vorteil gegenüber der Einzelapplikation von BMP. Zum kombinierten Einsatz von BMP und VEGF gibt es bisher keine einheitlichen Ergebnisse in Bezug auf die osteogene Potenz. In einer Studie an Rattencalvarien gelang es Young et al. nicht, einen stärkeren Knochendichteanstieg durch die kombinierte Abgabe von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ zu beweisen (Young et al., 2009). Im Jahr 2014 konnten Liu et al. jedoch durch die kombinierte Gabe von rhBMP-7 und VEGF₁₆₅ im Minischwein einen stärkeren Knochendichtenstieg verzeichnen als durch rhBMP-7-Gabe allein (Liu et al., 2014). Die Wirkung von BMP kann durch modulierende Umgebungsfaktoren beeinflusst werden (Groeneveld und Burger, 2000). In welcher Weise dies genau geschehen kann, ist noch Gegenstand der Forschung. Warum es im vorliegenden Versuch zu keiner Verstärkung der Knochendichtebildung kam, gilt es zu analysieren. In vielen

Arbeiten konnte bereits bestätigt werden, dass BMP die Knochenbildung in Kombination mit Hydroxylapatit anregt (Warnke et al., 2004; Becker et al., 2012; Liu et al., 2014; Beck-Broichsitter et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine geringe Knochendichtezunahme gezeigt werden. Jedoch ist das Kaninchenmodell für diese Zwecke bisher nur selten genutzt worden. Im Jahr 1994 konnten Cook et al. beweisen, dass bereits 6,25 µg rhBMP-7 ausreichen, um eine Fusion eines 1,5 cm breiten Defekts in der Ulna des Kaninchens zu erreichen (Cook et al., 1994). Es ist bekannt, dass im Rattenmodell bereits geringere Mengen BMP ausreichen, um Knocheninduktion zu erreichen (Becker et al., 2012). Es lässt sich schlussfolgern, dass in größeren Tiermodellen auch höhere Mengen BMP benötigt werden, um Osteoinduktion zu erreichen. Im Minischweinmodell wurden 2014 durch Liu et al. eine Menge von 660 µg rhBMP-7 und 4 µg VEGF₁₆₅ verwendet. Es konnte eine gute Osteoinduktion erreicht werden. Alle diese Versuche fanden im Muskelgewebe statt. Es ist bekannt, dass im Muskelgewebe deutlich weniger Wachstumsfaktoren benötigt werden, um Osteoinduktion zu bedingen, als es subkutan der Fall ist (Groeneveld und Burger, 2000; Okubo et al., 2000). Welche Menge genau, ob in linearen oder exponentiellen Anstiegen, im Omentum majus des Kaninchens nötig ist, wurde bisher nicht in vivo evaluiert. Es ist anzunehmen, dass die Menge an Wachstumsfaktoren im vorliegenden Modell trotz des Gefäßstiels im Zentralkanal des Hydroxylapatitblocks nicht ausreichte, um Osteoinduktion in größerem Maße zu gewährleisten. Die Stammzellen aus dem Omentum und aus dem Zentralgefäß konnten nicht in ausreichendem Maße aktiviert werden. Hydroxylapatit besitzt die Fähigkeit, rhBMP-2 zu speichern (Uludag et al., 2000). Es fungiert auf diese Weise als Depot für rhBMP-2. Die Abgabekinetik von Hydroxylapatit wurde bereits mehrfach untersucht (Meikle et al., 1993; Liu et al., 2014). Es konnte festgestellt werden, dass in den ersten 24 Stunden bereits ca. 50 % der Gesamtmenge abgegeben werden. Die restliche Menge rhBMP-2 wurde in den folgenden 27 Tagen stetig abgegeben. Es existierte also ein Peakwert am Anfang des Versuchs. Diese Kinetik wird in ähnlicher Weise für VEGF₁₆₅ angenommen (Liu et al., 2014). Die initiale hohe Abgabe der Wachstumsfaktoren könnte der Grund dafür gewesen sein, dass die Osteoinduktion in den folgenden Wochen zum Erliegen kam. Die geringe Osteogenese in der vorliegenden Studie könnte hieraus resultiert haben. Jedoch widerlegen andere Studien diese Annahmen. Trotz initialer Peakabgabe der Wachstumsfaktoren fand in diesen Osteogenese statt (Becker et

al., 2012; Liu et al., 2014). Es ist daher anzunehmen, dass die Abgabekinetik der Wachstumsfaktoren nicht ausschlaggebend für die sehr geringe Osteogenese in der vorliegenden Studie war.

In den Histologien war zu erkennen, dass die Hydroxylapatitblöcke mit Binde- und Fettgewebe durchbaut waren. Im Zentralkanal und auch in den Poren der Blöcke waren zahlreiche Gefäßanschnitte zu finden. Zeichen von entzündlichen Reaktionen konnten nicht detektiert werden. Im Toluidinblau-Präparat war nur eine sehr geringe Knochenneubildung vereinzelt an den Rändern des Präparats im Bereich der Center-Messstelle auszumachen. Es waren keine Osteoidschichten zu erkennen und im Präparatinneren war keine Knochenneubildung zu sehen. Die HE-Präparate waren gut bindegewebig umschichtet, auch die Poren und der Zentralkanal waren aufgefüllt mit Binde- und Fettgewebe. Diese Bereiche enthielten viele Gefäßanschnitte. Jedoch fehlte die heterotope Osteogenese gänzlich. Die Problematik der überschießenden ektopen Knochenneubildung, wie sie aus früheren Studien bekannt war (Ripamonti, 1996; Terheyden et al., 2001b), konnte hier nicht bestätigt werden. Das Design der Matrizen könnte dies verhindert haben. Der Zentralkanal, in den die Wachstumsfaktoren platziert eingebracht werden konnten, als auch die Ummantelung der Blöcke mit Omentum schienen vorteilhaft zu sein. Die Wachstumsfaktoren waren hierdurch nicht mehr in der Lage, in die Umgebung zu entweichen und dort die unerwünschte ektopen Knochenbildung zu bewirken. Ähnliches konnte schon in der Endokultivierung im M. latissimus dorsi im Rattenmodell beobachtet werden (Becker et al., 2012). Es kann angenommen werden, dass das Einwachsen des Binde- und Fettgewebes in den Hydroxylapatitblock nachteilig für die Neoosteogenese war. Weichgewebe ist in der Lage schneller zu proliferieren und in den Hydroxylapatitblock einzuwachsen als Knochen mithilfe von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ generiert werden kann. Dies führte in der vorliegenden Studie vermutlich dazu, dass keine Knochenneubildung mehr möglich war. Um dieses Problem zu beheben, könnte es nützlich sein, Membranen zu verwenden, die in der Phase der Neoosteogenese das Weichgewebe vom Einwachsen in das Hydroxylapatit abhalten. Kollagenmembranen werden bereits vielen Bereichen der Chirurgie eingesetzt (Ferreira et al., 2012). Je nach Hersteller werden diese nach ausreichend langer Zeit für die Osteogenese erst resorbiert. Die Guided Tissue Regeneration (GTR) macht sich heutzutage genau diese Vorteile zu

nutzen (Ferreira et al., 2012). Wenn sich der Knochen gebildet hat, würde sich die Membran auflösen und das osteogene Potential des Omentum majus könnte genutzt werden. Dieses könnte daraufhin direkt auf den gebildeten Knochen wirken. Die Versorgung des Transplantats wäre in der Zwischenzeit, in der die Knochenbildung stattfindet, durch das Zentralgefäß sichergestellt. Diese theoretische Ausführung sollte durch weitere Studien untersucht werden.

Die Fluoreszenzmikroskopie konnte die Ergebnisse der CT-Untersuchungen und der Histologien bestätigen. Lediglich die in den Wochen 2 und 6 sowie in den Wochen 3 und 7 applizierten Fluorochrome konnten in den Präparaten detektiert werden. Die Knochenneubildung fand in geringem Maße in diesen Wochen statt. Als methodische Schwäche ist anzumerken, dass die vier Fluorochrome jeweils zu zwei Zeitpunkten injiziert wurden. Diese Tatsache schränkte die genaue Analyse des Knochenappositionszeitpunkt in der vorliegenden Studie stark ein, zumal im vorliegenden Fall sich keine gleichmäßige bandenförmige Knochenapposition zeigte. Es war kein Unterschied in der Knochenbildungsrate zwischen der rhBMP-2-Gruppe und der rhBMP-2 + VEGF₁₆₅-Gruppe vorhanden. In beiden Gruppen kam es nur zu einer geringen lokalisierten Knochenneubildung in der Umgebung des sich im Zentralkanal befindenden Gefäßstiels.

Das Kaninchen diente in der vorliegenden Arbeit erstmals als Bioreaktor in Verbindung mit Bio-Oss, rhBMP-2 und VEGF₁₆₅. Der histologische Knochenaufbau von Kaninchen ist dem von Menschen sehr ähnlich (Stoker und Epker, 1971). Die Knochenneubildungsrate und das Remodeling des Knochens laufen im Kaninchen jedoch deutlich schneller als im menschlichen Organismus ab (Castaneda et al., 2006). Das gesamte Remodeling ist nach sechs Wochen abgeschlossen, wohingegen im humanem Organismus 13 Wochen benötigt werden. Dies erschwert die Übertragbarkeit von Ergebnissen.

Das Omentum majus ist prinzipiell als Donorstelle für die Endokultivierung von vaskularisierten Transplantaten geeignet. Jedoch konnte nur eine geringe Osteogenese erreicht werden. Der geschaffene Zentralkanal mit seinem begleitenden Gefäß war vorteilhaft in Hinblick auf die Prävention von ektopter Knochenbildung. Zudem fand eine gute Vaskulogenese statt. Jedoch ließ sich kein positiver Einfluss im Hinblick auf stärkere de-novo-Osteogenese feststellen. Dies

kann durch eine zu geringe Wachstumsfaktordosis bedingt sein. Es ließ sich kein Vorteil durch die kombinierte Gabe von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ gegenüber der alleinigen Gabe von rhBMP-2 erkennen. An der Regulation des Knochenstoffwechsels sind noch diverse weitere Faktoren bzw. Proteine beteiligt, die wiederum Einfluss auf die Osteogenese nehmen können. Das Protein Receptor Activator of NF- κ B-Ligand (RANKL) und sein Receptor Activator of NF- κ B (RANK) regulieren u.a. die Transformation von Makrophagen zu Osteoklasten. Der Knochenumbau geschieht durch Osteoklasten, diese wiederum aktivieren ihrerseits Osteoblasten zum folgenden Knochenaufbau. Dies gewährleistet eine stetige Erneuerung des Knochens (Boyce und Xing, 2007). In weiterführenden Studien könnte der kombinierte Einsatz von RANK/L mit den vorliegenden Wachstumsfaktoren den Knochenstoffwechsel verbessern. Außerdem spielen Proteinasen eine wichtige Rolle beim Gewebsremodeling. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs, Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinasen) sind hierbei insbesondere zu erwähnen. Die Hydrolyse der Extrazellulärmatrix geschieht durch MMPs, die TIMPs inaktivieren die MMPs und somit den Abbau der Extrazellulärmatrix. Außerdem ist speziell TIMP-1 in der Lage, eine Aktivierung des Zellwachstums zu bewirken (Visse und Nagase, 2003). Die Zugabe von TIMPs zu den vorhandenen Wachstumsfaktoren könnte in aufbauenden Versuchen ein stärkeres Zellwachstum und einen geringeren Abbau derer begünstigen. Darüber hinaus könnte die Osteogenese durch sofortiges Einwachsen von Weichgewebe unmöglich gewesen sein. Das Einbringen einer Membran, z.B. aus Kollagen, könnte möglicherweise die Osteogenese möglich machen, indem diese das Weichgewebe in der frühen Phase der Knochenneubildung vom Einwachsen in den Hydroxylapatitblock abhält. Zudem könnte in weiterführenden Studien die Versuchsdauer von 3 auf 6 Monate verlängert werden, um die Ossifikation von Weichgewebe im Block zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten z.B. nach Tumorchirurgie, Traumata, Infektionen sowie angeborenen Fehlbildungen nur inadäquat möglich. Besonders die Ästhetik als auch Funktion sind von großer Relevanz bei der Versorgung dieser Defekte. Die heutigen operativen Verfahren können nur als Reparaturen angesehen werden, sie sind bisher nicht in der Lage, eine Geweberegeneration zu bewirken. Im Rahmen der Endokultivierung von Knochen könnte zukünftig ein Verfahren etabliert werden, welches sowohl Funktion, Ästhetik als auch postoperative Morbidität berücksichtigt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, das Omentum majus auf seine Möglichkeit der in-vivo-Präfabrikation von vaskularisierten Transplantaten hin zu untersuchen. Um die natürliche Anatomie der Mandibula widerzuspiegeln, wurde das Hydroxylapatit-Transplantat mit einer Zentralarterie versehen. Zusätzlich sollte der Einfluss von rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ auf die Osteogenese analysiert werden. Es wurden zwölf New Zealand White Rabbits je zwei Hydroxylapatitblöcke in das Omentum majus implantiert. Diese Blöcke wurden in sechs Tieren ausschließlich mit rhBMP-2 benetzt, in sechs weiteren Tieren wurde rhBMP-2 und VEGF₁₆₅ verwendet. Es folgten zwei Wochen post implantationem Fluorchromapplikationen jeweils in einwöchigem Abstand. In Woche zwei, fünf, acht und zehn wurden CTs durchgeführt. Es erfolgte eine histologische Analyse sowohl von Hartschliff- als auch Paraffinpräparaten, die Knochendichte in den CTs wurde in HU berechnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der BMP und der BMP + VEGF-Gruppe im Hinblick auf die Knochendichte ausgemacht werden. Die stärksten Anstiege in HU wurden in der BMP-Gruppe vorgefunden. Die Histologien korrelierten mit diesen Ergebnissen. Es wurde hauptsächlich Weichgewebe in den porösen Blöcken identifiziert. Das Einwachsen von Weichgewebe könnte Osteogenese verhindert haben, ebenso schien die Menge der Wachstumsfaktoren zu gering zu sein für das Kaninchenmodell, um Knocheninduktion in größerem Maße zu bedingen. Zusätzlich ist es möglich, dass die Proteine nicht lange genug ortsständig geblieben sind auf Grund einer schnellen Freisetzungskinetik.

Das Omentum majus ist prinzipiell als Ort zur Endokultivierung von Knochen geeignet. Der Zentralkanal hat sich bewährt zur Versorgung des Transplantats. In weiterführenden Studien sollte sowohl die Menge an Wachstumsfaktoren überprüft

werden als auch über eine Verwendung von Membranen nachgedacht werden, um das schnelle Einwachsen von Weichgewebe zu verhindern. Diese könnten durch das Abhalten von Weichgewebe die Osteogenese möglich machen.

6. Literaturverzeichnis

- Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B., Jepsen, S. (2000): Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* 51, 703-710
- Artico, M., Ferrante, L., Pastore, F. S., Ramundo, E. O., Cantarelli, D., Scopelliti, D., Iannetti, G. (2003): Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: Historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature. *Surgical Neurology* 60, 71-79, doi,10.1016/S0090-3019(03)00031-4
- Axelrad, T. W., Einhorn, T. A. (2009): Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 481-488, doi,10.1016/j.cytogfr.2009.10.003
- Bayles, S. W., Hayden, R. E. (2008): Gastro-omental free flap reconstruction of the head and neck. *Arch Facial Plast Surg* 10, 255-259, doi,10.1001/archfaci.10.4.255
- Beck-Broichsitter, B. E., Becker, S. T., Seitz, H., Wiltfang, J., Warnke, P. H. (2015): Endocultivation: Histomorphological effects of repetitive rhBMP-2 application into prefabricated hydroxyapatite scaffolds at extraskelatal sites. *J Craniomaxillofac Surg* 43, 981-988, doi,10.1016/j.jcms.2015.03.038
- Becker, S. T., Bolte, H., Schunemann, K., Seitz, H., Bara, J. J., Beck-Broichsitter, B. E., Russo, P. A., Wiltfang, J., Warnke, P. H. (2012): Endocultivation: the influence of delayed vs. simultaneous application of BMP-2 onto individually formed hydroxyapatite matrices for heterotopic bone induction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41, 1153-1160, doi,10.1016/j.ijom.2012.03.031
- Bishop, G. B., Einhorn, T. A. (2007): Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 31, 721-727, doi,10.1007/s00264-007-0424-8
- 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. (2000): 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, 1796-1807
- Bosch, P., Musgrave, D. S., Lee, J. Y., Cummins, J., Shuler, T., Ghivizzani, T. C., Evans, T., Robbins, T. D., Huard (2000): Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18, 933-944, doi,10.1002/jor.1100180613
- Boyce, B. F., Xing, L. (2007): Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1, S1, doi,10.1186/ar2165
- Buring, K., Urist, M. R. (1967): Transfilter bone induction. *Clin Orthop Relat Res* 54, 235-242

- Castaneda, S., Largo, R., Calvo, E., Rodriguez-Salvanes, F., Marcos, M. E., Diaz-Curiel, M., Herrero-Beaumont, G. (2006): Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 35, 34-41, doi,10.1007/s00256-005-0022-z
- 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. (2003): Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 1544-1552
- Clavero, J., Lundgren, S. (2003): Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res* 5, 154-160
- Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C., Whitecloud, T. S., 3rd (1994): The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 76, 827-838
- Cypher, T. J., Grossman, J. P. (1996): Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35, 413-417
- Deckers, M. M., van Bezooijen, R. L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S. E., Lowik, C. W. (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545-1553, doi,10.1210/endo.143.4.8719
- Doherty, M. J., Ashton, B. A., Walsh, S., Beresford, J. N., Grant, M. E., Canfield, A. E. (1998): Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 13, 828-838, doi,10.1359/jbmr.1998.13.5.828
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G. (2012): Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 8, 3191-3200, doi,10.1016/j.actbio.2012.06.014
- Gautschi, O. P., Frey, S. P., Zellweger, R. (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77, 626-631, doi,10.1111/j.1445-2197.2007.04175.x
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. (2005): Bone substitutes: An update. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* 36, 20-27, doi,10.1016/j.injury.2005.07.029
- Goldsmith, H. S., Griffith, A. L., Kupferman, A., Catsimpoilas, N. (1984): Lipid angiogenic factor from omentum. *JAMA* 252, 2034-2036
- Graff, J. M., Bansal, A., Melton, D. A. (1996): Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* 85, 479-487
- Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C., Taga, R. (2005): Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 38, 1463-1473, doi,/S0100-879X2005001000003

- Groeneveld, E. H., Burger, E. H. (2000): Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142, 9-21
- Hogan, B. L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580-1594
- Inoda, H., Yamamoto, G., Hattori, T. (2007): rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36, 39-44, doi,10.1016/j.ijom.2006.07.011
- Janssen, F. W., Oostra, J., Oorschot, A., van Blitterswijk, C. A. (2006): A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27, 315-323, doi,10.1016/j.biomaterials.2005.07.044
- Kamei, Y., Toriyama, K., Takada, T., Yagi, S. (2010): Tissue-engineering bone from omentum. *Nagoya J Med Sci* 72, 111-117
- Katagiri, T., Akiyama, S., Namiki, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., Suda, T. (1997): Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and myogenin. *Exp Cell Res* 230, 342-351, doi,10.1006/excr.1996.3432
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J. M., Rosen, V., Wang, E. A., Tanaka, H., Omura, S., Suda, T. (1990): The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 295-299
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., Suda, T. (1994): Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127, 1755-1766
- Kirker-Head, C. A. (2000): Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 43, 65-92
- Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S. F. (2006): Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3, 49-57, doi,10.1586/17434440.3.1.49
- Lenze, U., Pohlig, F., Seitz, S., Ern, C., Milz, S., Docheva, D., Schieker, M. (2014): Influence of osteogenic stimulation and VEGF treatment on in vivo bone formation in hMSC-seeded cancellous bone scaffolds. *BMC Musculoskelet Disord* 15, 350, doi,10.1186/1471-2474-15-350
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., Ferrara, N. (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309
- Levy, M. M., Joyner, C. J., Viridi, A. S., Reed, A., Triffitt, J. T., Simpson, A. H., Kenwright, J., Stein, H., Francis, M. J. (2001): Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone* 29, 317-322

- Liu, Y., Moller, B., Wiltfang, J., Warnke, P. H., Terheyden, H. (2014): Tissue engineering of a vascularized bone graft of critical size with an osteogenic and angiogenic factor-based in vivo bioreactor. *Tissue Eng Part A* 20, 3189-3197, doi,10.1089/ten.TEA.2013.0653
- Meikle, M. C., Mak, W. Y., Papaioannou, S., Davies, E. H., Mordan, N., Reynolds, J. J. (1993): Bone-derived growth factor release from poly(alpha-hydroxy acid) implants in vitro. *Biomaterials* 14, 177-183
- Moore, W. R., Graves, S. E., Bain, G. I. (2001): Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71, 354-361
- Nkenke, E., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G., Neukam, F. W. (2002): Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 13, 514-521
- Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Iizuka, T. (2000): Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29, 62-66
- Padgett, R. W., Cho, S. H., Evangelista, C. (1998): Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling. *Pharmacol Ther* 78, 47-52
- Reddi, A. H. (2000): Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6, 351-359, doi,10.1089/107632700418074
- Ripamonti, U. (1996): Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 17, 31-35
- Robinson, C. J., Stringer, S. E. (2001): The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 114, 853-865
- Sampath, T. K., Maliakal, J. C., Hauschka, P. V., Jones, W. K., Sasak, H., Tucker, R. F., White, K. H., Coughlin, J. E., Tucker, M. M., Pang, R. H., et al. (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267, 20352-20362
- Schlegel, K. A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J. (2003): Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 53-58
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., Dvorak, H. F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985
- Service, R. F. (2000): Tissue engineers build new bone. *Science* 289, 1498-1500

- Stoker, N. G., Epker, B. N. (1971): Age changes in endosteal bone remodeling and balance in the rabbit. *J Dent Res* 50, 1570-1574
- Summers, B. N., Eisenstein, S. M. (1989): Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br* 71, 677-680
- Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M. (1999): VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18, 2221-2230, doi,10.1038/sj.onc.1202527
- Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., Rueger, D. R. (2001a): Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30, 373-379, doi,10.1054/ijom.2001.0032
- Terheyden, H., Warnke, P., Dunsche, A., Jepsen, S., Brenner, W., Palmie, S., Toth, C., Rueger, D. R. (2001b): Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30, 469-478, doi,10.1054/ijom.2000.0008
- Uludag, H., D'Augusta, D., Golden, J., Li, J., Timony, G., Riedel, R., Wozney, J. M. (2000): 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, 227-238
- Urist, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899
- Van Heest, A., Swiontkowski, M. (1999): Bone-graft substitutes. *Lancet* 353, S128-S129
- Visse, R., Nagase, H. (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839, doi,10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
- Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S., Wozney, J. M. (1988): Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9484-9488
- Warnke, P. H., Springer, I. N., Acil, Y., Julga, G., Wiltfang, J., Ludwig, K., Russo, P. A., Sherry, E., Sivananthan, S., Hedderich, J., Terheyden, H. (2006a): The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials* 27, 1081-1087, doi,10.1016/j.biomaterials.2005.07.042
- Warnke, P. H., Springer, I. N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M., Russo, P. A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., Terheyden, H. (2004): Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364, 766-770, doi,10.1016/S0140-6736(04)16935-3

- Warnke, P. H., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M., Russo, P. A., Sherry, E., Lutzen, U., Wolfart, S., Terheyden, H. (2006b): Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27, 3163-3167, doi,10.1016/j.biomaterials.2006.01.050
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A. (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
- Yamaguchi, A., Ishizuya, T., Kintou, N., Wada, Y., Katagiri, T., Wozney, J. M., Rosen, V., Yoshiki, S. (1996): Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 366-371, doi,10.1006/bbrc.1996.0411
- Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C. H., Miyazono, K. (1996): Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19, 569-574
- Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T. (1998): Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 26, 112-115
- Young, S., Patel, Z. S., Kretlow, J. D., Murphy, M. B., Mountziaris, P. M., Baggett, L. S., Ueda, H., Tabata, Y., Jansen, J. A., Wong, M., Mikos, A. G. (2009): Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A* 15, 2347-2362, doi,10.1089/ten.tea.2008.0510
- Zhang, Q. X., Magovern, C. J., Mack, C. A., Budenbender, K. T., Ko, W., Rosengart, T. K. (1997): Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 67, 147-154, doi,10.1006/jsre.1996.4983

7. Tierversuchsgenehmigung

EINGEGANGEN

11. OKT. 2011

523
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. Björn Möller
Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 16
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 21.06.2011
mit Ergänzung vom 19.09.2011

Mein Zeichen: V 312-72241.121-14 (73-6/11)

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

7. Oktober 2011

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Möller,

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

Unterkieferrekonstruktion durch präfabrizierte freie Knochentransplantate
mittels 3D printed Scaffold, rhBMP-2, VEGF und BMAC im Omentum majus

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 30 Kaninchen verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 30. September 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. B. Möller

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 | poststelle@mlur.landsh.de
www.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte Dokumente. Das Landeswappen ist gesetzlich geschützt.

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:
Keine.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

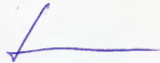
Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

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

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang und Herrn Prof. Dr. Ail danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und den Arbeitsplatz im wissenschaftlichen Labor.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Falk Birkenfeld für die Erhebung der Befunde, die Hilfe bei der Abfassung der Arbeit, die Anregungen diesbezüglich sowie die Korrektur.

Herrn Dr. Dr. B. Möller und Herrn Prof. Dr. J.-H. Egberts danke ich für die Unterstützung im operativen Teil der Studie.

Frau G. Nessenius danke ich für die Einführung in die Herstellung der Präparate, für die freundliche Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Schultheiß und den Tierpflegern des Tierhauses am UKSH, Campus Kiel, gebührt mein Dank für die Versorgung der Tiere.

Frau Dr. C. Gierloff danke ich für die Einführung in die Erstellung der Computertomographien.

Theresa Krause und vor allem Andre Sengebusch danke ich für die freundschaftliche, konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts.

Dr. Clemens Völschow gebührt mein außerordentlicher Dank. Seine fortwährende Motivation und Unterstützung haben diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Chiara Catharina Völschow, geb Büchert
Geburtsdatum: 09. Juli 1986
Geburtsort: Flensburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

SCHULBILDUNG:

15. Juni 2006 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM:

10/2006 – 06/2012 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Studium der Zahnheilkunde
22. Juni 2012 Staatsexamen

BERUFLICHER WERDEGANG:

06/2013 – 10/2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für
Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, UKSH Kiel
(Direktor: Prof. Dr. C. Dörfer)
seit 11/2016 Vorbereitungs- und Weiterbildungsassistentin in der Praxis
Dr. Kai Krüger, Hamburg

WISSENSCHAFT:

seit 10/2012 Promotion in der Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie, UKSH Kiel

10. Publikationen

- 2014 (Vortrag) 64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-,
Kiefer- und Gesichtschirurgie
Präfabrikation von vaskularisierten 3-D-
Knochen transplantaten mit verschiedenen
Wachstumsfaktoren im Omentum Majus des Kaninchens.
*B. Möller, Y. Acil, H. Terheyden, A. Sengebusch,
T. Krause, C. Büchert, J. Wiltfang*
- 2015 (Vortrag) 132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie.
Das Omentum majus als Präfabrikationsort für
Knochen transplantate: In vitro Untersuchungen im
Tiermodell.
*A. Sengebusch, F. Birkenfeld, J.-H. Egberts, Y. Açil,
H. Terheyden, T. Krause, C.C. Büchert, B. Möller,
J. Wiltfang*
- 2017 (Publikation) Endocultivation of Scaffolds with Recombinant Human
Bone Morphogenetic Protein-2 and VEGF₁₆₅ in the
Omentum Majus in a Rabbit Model
*Birkenfeld Falk, Sengebusch Andre, Völschow Chiara,
Naujokat Hendrik, Möller Björn, Wieker Henning, and
Wiltfang Jörg. Tissue Engineering Part C: Methods.
December 2017, 23(12): 842-849.*