

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**„Bildgebende Beurteilung des
Knochenwachstums nach Applikation von rhBMP-2 versus
Nukleinsäuretransfer am Rattenunterkiefer“**

Marc Oliver Bissinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Dr. A. Kolk
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 02.11.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 06.04.2011 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Knochenheilung	3
2.1.1	Knochenregeneration und Defektheilung	3
2.1.2	Wachstumsfaktoren in der Knochenheilung	6
2.1.3	Bone morphogenetic Protein – BMP-2	8
2.2	Gentransfer	9
2.2.1	Methoden des Gentransfers	11
2.2.2	Viral	11
2.2.3	non-viral	12
2.3	Biodegradierbare Beschichtung	15
2.3.1	PDLLA als biodegradierbare Trägersubstanz	16
3	Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
4	Material und Methode	19
4.1	Tiermodell	19
4.1.1	Tierhaltung und Ernährung	21
4.1.2	Operationstechnik	21
4.1.3	Postoperative Nachsorge	22
4.1.4	Opferung und Präparation	24
4.2	Auswertungsverfahren	25
4.2.1	Fotodokumentation	25
4.2.2	Konventionelles Röntgen/Zahnfilm	25
4.2.3	Mehrschicht-CT	28
4.2.4	μCT	29
4.2.5	Histologie/Histometrie	37
4.2.6	Mikroradiographie	41
4.2.7	Polychrome Sequenzmarkierung	41
4.2.8	Statistische Auswertung	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Makroskopische Darstellung	43
5.2	Konventionell radiologische Darstellung	45

5.3	μCT und MSCT	46
5.3.1	Volumen	46
5.3.2	Dichte	54
5.3.3	Masse	60
5.4	Korrelation des μCT mit dem MSCT	60
5.5	Korrelation des μCT mit der Histometrie	62
5.6	Einzelfeldanalyse	64
5.7	Abhängigkeit der Knochenregeneration von der Lage des critical-size-Defektes	66
6	Diskussion	69
7	Zusammenfassung	78
8	Literaturverzeichnis	80
9	Danksagung	97
10	Curriculum vitae	98

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
BHA	Beam Hardening Artifacts
BMC	Bone Mineral Content
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BS	Bone Surface
BV	Bone Volume
bzw.	Beziehungsweise
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxylapatit
CCD	Charge-coupled Device
ccm	Kubikzentimeter
COPROG	Copolymer Protected Gene Vector
CT	Computertomographie
d	Tage
D	Dorsal
DA	Degree of Anisotropy
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
e-PTFE	Polytetrafluorethylen
Fa	Firma
FOV	Field of View
Gal	Galaktosidase
GBR	Guided Bone Regeneration
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin Eosin
HR	High Resolution
IGF	Insulin like Growth Factor
IPL	Image Processing Language
IT	Integration Time
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
KZBV	Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung
LL	Levai-Laczko
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
Luc	Luciferase

mA	Milliampere
mAs	Milliamperesekunde
MIL	Mean Intercept Length
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMA	Methylmetacrylat
mg	Milligramm
mgf.	Möglich
ms	Millisekunde
MSCT	Mehrschicht-CT
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
OV	Objektvolumen
P	Plasmid
PA	Parodontal
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PDLLA	Poly(D,L)-Laktid
PEI	Polyethilenimin
PV	Partialvolumeneffekt
rhBMP	Rekombinantes humanes BMP
ROI	Region of Interest
SD	Standard Deviation
sec	Sekunden
Sig.	Signifikanz
SMI	Structure Model Index
Tb. Th.	Trabecular Thickness
TGF	Transforming Growth factor
TMD	Tissue Mineral Density
TU	Technische Universität
TV	Totalvolumen
V	Ventral
vgl.	Vergleiche
VOI	Volume of Interest
WF	Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
µA	Mikro Ampere
µCT	Mikrocomputertomographie
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1	Vergleich der Freisetzungskinetik von rekombinantem Protein und Plasmid beim Gentransfer in der Geweberegeneration und Wundheilung	10
Abb. 4-1	REM-Ansicht der Übergangszone PDLLA – Beschichtung Titanoberfläche	20
Abb. 4-2	Ablauf der Operation	23
Abb. 4-3	Probenpräparation	24
Abb. 4-4	makroskopisches Bild nach 14 Tagen	25
Abb. 4-5	Coronare Ansicht mit ektopter Knochenbildung	25
Abb. 4-6	Radiologische Untersuchung	26
Abb. 4-7	Säulendiagramm	27
Abb. 4-8	Feldeinteilung des Defektes zur radiologischen Auswertung	27
Abb. 4-9	μ CT, 2D, kein Kontakt zum PA-Spalt	27
Abb. 4-10	μ CT, 2D, Kontakt zum PA-Spalt	27
Abb. 4-11	MSCT, 2D sagittal, ROI	28
Abb. 4-12	Scanco μ Ct 40	29
Abb. 4-13	Unterkiefer, getrimmt	29
Abb. 4-14	Halteapparatur zur horizontalen Fixation von 5 Knochenproben im Messröhrchen	30
Abb. 4-15	Scout View-Einstellung	30
Abb. 4-16	μ CT, 2D, ROI einer Schicht	31
Abb. 4-17	μ CT, 3D coronar mit VOI	31
Abb. 4-18	Hydroxylapatitprüfkörper	33
Abb. 4-19	Bestimmung der lokalen Trabekeldicke	34
Abb. 4-20	μ CT, 3D, farbcodierte Dichtedarstellung	35
Abb. 4-21	Einbettgläschen	37
Abb. 4-22	Innenlochsäge Leica® SP1600	37
Abb. 4-23	Schema der histologischen und mikroradiographischen Schnittebene	38
Abb. 4-24	Schemazeichnung zur Erläuterung der histometrischen Auswertung	40
Abb. 5-1	Makroskopische Darstellung der Knochenregeneration	44
Abb. 5-2	Konventionell radiologische Darstellung der Knochenregeneration	45
Abb. 5-3	μ CT, 3D-Rekonstruktion der ortsständigen Knochenbildung im VOI	47

Abb. 5-4	Therapien im zeitlichen Verlauf	51
Abb. 5-5	BMP-2 Plasmid 2,5 µg im zeitlichen Verlauf	51
Abb. 5-6	links: MSCT, rechts: µCT: rh-BMP in coronarer Ansicht	52
Abb. 5-7	µCT, 3D-Rekonstruktion der ortsständigen Knochenbildung	53
Abb. 5-8	links: µ CT, rechts: MSCT: 2D, coronar, farbkodierte Dichtedarstellung	55
Abb. 5-9	Dichte (µCT) rhBMP-2 Protein ektooper Knochen (rot) gegen medialen Defektbereich (blau) im zeitlichen Verlauf	57
Abb. 5-10	Dichte (µCT) rhBMP-2 Protein medialer Defektbereich (rot) gegen BMP-2 Plasmid 2,5µg (blau) im zeitlichen Verlauf	57
Abb. 5-11	BV von BMP-2 Plasmid µCT vs MSCT im zeitlichen Verlauf	60
Abb. 5-12	TMD von BMP-2 Plasmid µCT vs MSCT im zeitlichen Verlauf	61
Abb. 5-13	BMC von BMP-2 Plasmid µCt vs MSCT im zeitlichen Verlauf	62
Abb. 5-14	Punktediagramm mit Regressionsgerade von BMC µCT vs MSCT	62
Abb. 5-15	Punktediagramm mit Regressionsgerade von BV µ CT vs Histometrie	63
Abb. 5-16	Vergleich der Modalitäten Radiologie und Histologie	64
Abb. 5-17	Einzelfeldanalyse mit 3d-Säulendiagramm	65
Abb. 5-18	Abhängigkeit der Knochenregeneration von der Lage des critical-size-Defektes	66
Abb. 5-19	Abhängigkeit der Dichte von der Lage des critical-size-Defektes (Plasmid)	67
Abb. 5-20	Abhängigkeit der Dichte von der Lage des critical-size-Defektes (BMP)	68
Abb. 6-1	Partialvolumeneffekt	77

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1	Vor- und Nachteile von Protein und Gentransfer	10
Tab. 2-2	Häufig verwendete virale und nicht-virale Vektorsysteme	11
Tab. 4-1	Übersicht der verschiedenen therapeutischen Gruppen	20
Tab. 4-2	Technische Unterschiede zwischen μ CT 20 und 40	30
Tab. 4-3	MMA-Einbettverfahren der Anatomischen Anstalt München	37
Tab. 4-4	Protokoll <i>Laczko - Levai</i> -Färbung	39
Tab. 5-1	μ Ct, Volumen der einzelnen Therapien gegeneinander	48
Tab. 5-2	MSCT, Volumen der einzelnen Therapien gegeneinander	49
Tab. 5-3	μ CT, Volumen der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf	50
Tab. 5-4	MSCT, Volumen der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf	50
Tab. 5-5	μ CT, Dichte der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf	56
Tab. 5-6	MSCT, Dichte der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf	56
Tab. 5-7	μ Ct, Dichte der einzelnen Therapien gegeneinander	58
Tab. 5-8	MSCT, Dichte der einzelnen Therapien gegeneinander	59
Tab. 5-9	Übersicht der Prozentwerte der radiologischen Auswertung in Bezug auf den ventralen und dorsalen Defektbereich	65

1 Einleitung

In der rekonstruktiven Chirurgie des Gesichtsschädels [Horch 2006, Meyer 2006], die auch die Spalt- [Chiu 2008, Deppe 2004a, Pautke 2010, Wolff 2008] und zahnärztliche Chirurgie [Horch 2006] umfasst, besteht die Notwendigkeit, Knochenregeneration innerhalb eines Defektes zu fördern oder einen Bereich vollständig zu ersetzen. Die aufwendige Rekonstruktion mit einem autologen Transplantat ist teils mit hohem Risiko für den Patienten verbunden und demnach oft nicht als Therapie der ersten Wahl anzusehen [Meyer 2006]. Oft sind Patienten betroffen, die auf Grund ihrer Medikation [Pautke 2010], oder Vorerkrankungen, wie chronisch entzündliche oder degenerative Knochenerkrankungen, Rezidivoperationen, aber auch bedingt durch vorangegangene Strahlentherapie einen pathologisch reduzierten Knochenstoffwechsel aufweisen. Bei diesen ist somit das bestmögliche Einheilen eines freien autologen oder alloplastischen (z. B. dentales Implantat) Transplantates stark gefährdet oder unmöglich. Aus diesem Grund stellt die Verbesserung der Osseointegration allogener und alloplastischer Implantate unverändert eine große Herausforderung und Ziel der Forschung dar.

Dentale Implantate, welche ständig den Keimen der kontaminierten Mundhöhle ausgesetzt sind, da sie die Schleimhaut perforieren, gehören in der zahnärztlichen Chirurgie heutzutage zur Therapie der Wahl. Sie werden im Bereich der Schleimhaut-Periost-Decke bzw. des Kieferknochens eingebracht. Im Gegensatz dazu stehen in der Orthopädie Endoprothesen, die nach Einheilung vollständig von körpereigenem Gewebe umgeben sind. Da in der aktuellen Zahnheilkunde die Indikation für enossale Implantate ständig erweitert wird, nimmt die Therapie eines Zahnverlustes mit Hilfe dentaler Implantate einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Auch Patienten in hohem Lebensalter, bei denen bedingt durch Allgemeinerkrankungen (z.B. Osteoporose) die Gefahr eines vorzeitigen Implantatverlustes aufgrund ungünstiger Knochenverhältnisse erhöht ist, wünschen optimale dentale Rehabilitation. Andererseits ist eine erfolgreiche dentale Implantation in Folge jahrelanger Zahnlosigkeit und der damit verbundenen Knochenatrophie ohne invasive augmentative Verfahren oftmals gar nicht möglich.

Analog der entzündlichen Zahnbetterkrankung (Parodontitis) tritt das Problem der Periimplantitis immer häufiger auf, da Implantate zunehmende Verbreitung finden. Durch den Kontakt dentaler Implantate zur Keim belasteten Mundhöhle kommt es hierbei zur mikrobiellen Plaquebesiedelung des Implantates und des umliegenden

Gewebes mit konsekutiver chronischer Entzündung. Diese führt letztendlich durch fortschreitenden Knochenabbau zum Verlust des Implantates, woraus eine Störung von Ästhetik und Phonetik und der Verlust der Kaufunktion resultieren. Karoussis [Karoussis 2007] beschreibt eine enge Korrelation zwischen einer chronischen Parodontitis und einer periimplantären Entzündung dentaler Implantate. Da die Anzahl der inserierten Implantate in Deutschland von 200.000 Implantaten im Jahr 2001 auf über 1.000.000 im Jahr 2009 (KZBV Jahrbuch 2009) stieg, ist unter Berücksichtigung der ansteigenden Lebenserwartung auch mit einer steigenden Zahl behandlungsbedürftiger Implantate zu rechnen.

Die zwei Säulen in der Therapie periimplantärer Entzündung des Knochens sind die vollständige Dekontamination der Implantatoberfläche von Plaque und Endotoxinen und die möglichst vollständige Knochenregeneration im periimplantären Defektbereich. Ersteres ist wichtig, da nur an keimfreien Oberflächen eine Wiederanlagerung von Knochen möglich ist [Deppe 2002], Letzteres, da es wegen der Kaubewegungen zu hohen Belastungen an der Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat kommt.

Die gesteuerte Geweberegeneration (GBR = Guided Bone Regeneration) führt oft nicht zum Erfolg, weil die hierbei verwendeten Polytetrafluorethylen-Membranen (e-PTFE) in der Mundhöhle bakteriell kontaminiert werden und somit eine zusätzliche Gefahrenquelle darstellen können [Grunder 1993, Hurzeler 1997]. Nach neueren Erkenntnissen gehen etwa 15% der enossalen Implantate innerhalb von 10 Jahren durch Verlust des stabilen Implantatinterfaces verloren und etwa 40% der Implantate weisen nach 10 Jahren Komplikationen auf [Pjetursson 2004]. Aus diesen Gründen ist eine Optimierung der körpereigenen Knochen-Implantatverbindung durch zusätzliche exogene Stimulation notwendig [Deppe 2003].

2 Theoretischer Teil

2.1 Knochenheilung

2.1.1 Knochenregeneration und Defektheilung

Knochengewebe setzt sich zu 65% aus anorganischen Mineralstoffen, 25% aus organischer Matrix und 10% aus Wasser zusammen, wobei Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) den Hauptbestandteil an Mineralstoffen des Knochens darstellt. Der mineral- und wasserfreie organische Anteil der Knochenmatrix besteht zu 95% aus Kollagen und zu 5% aus nicht kollagener Matrix. Dazu zählen Proteoglycane, Glycoproteine, Serumproteine und Zytokine (z.B. BMP-Familie). Seine Härte erhält der Knochen durch die spezielle Anordnung von Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit. Dabei vermitteln der Mineralanteil die Druckstabilität und die organischen Anteile die Biege- und Zugfestigkeit. Knochen besitzt im Gegensatz zu anderen Geweben die Fähigkeit zur Restitutio ad integrum, d.h. Defekte werden nicht durch minderwertiges Narbengewebe, sondern durch neu gebildeten Knochen ersetzt [McKibbin 1978]. Gesteuert wird die Frakturheilung durch zahlreiche komplexe, lokal und systemisch wirkende Vorgänge. Mehrfach beschrieben worden sind die vielen zeitlich und räumlich begrenzten Interaktionen zwischen Osteoblasten und extrazellulärer Matrix, aber auch Wachstumsfaktoren, Hormonen und Cytokinen [Abe 2000, Abiraman 2002, Akizuki 1997, Alden 1999].

Der Einfluss einer Reihe von mechanisch einwirkenden Kräften wie Zug-, Druck-, Torsions- und Scherspannungen, die zu hohen Belastungen am Knochen führen, setzt voraus, dass der Knochen in seiner Beschaffenheit sowohl stabile als auch elastische Eigenschaften aufweist. Die Trias aus Defektgröße, mechanischer Stabilität und der Qualität der umliegenden Weichteile sind von maßgeblicher Bedeutung für das therapeutische Vorgehen und den Heilungserfolg eines Knochendefektes. Ist das umgebende Weichgewebe durch Narben, Infektionen oder Bestrahlung vorgeschädigt, so kommt es z.B. trotz vorhandener Stabilität zu keiner ausreichenden Knochenregeneration.

Die Knochenbildung (Ossifikation) kann desmal (direkt) und chondral (indirekt) erfolgen. Bei Ersterer formiert sich der Knochen aus mesenchymalem Gewebe, bei der wesentlich häufigeren letzteren Form unter Vermittlung eines Knorpelmodells. Die primäre Ossifikation unter Bildung von unstrukturiertem Faser- oder Geflechtknochen

geht immer der sekundären Ossifikation mit reifer Lamellenknochenbildung voraus, welche sich unter funktioneller Belastung vollzieht.

Bei der Knochenheilung wird eine primäre von einer sekundären abgegrenzt, wobei die primäre nur bei totalem Kontakt der Bruchstücke unter vollständiger Ruhigstellung und ausreichender Perfusion möglich ist. Dabei wird der Frakturspalt wie beim physiologischen Knochenumbau ohne Kallusbildung von Osteonen in Längsrichtung ausgefüllt [McKibbin 1978].

Wesentlich häufiger kommt die sekundäre Frakturheilung vor. Dabei wird der Frakturspalt zuerst durch ein Hämatom aufgefüllt, wobei Entzündungszellen, Blutplättchen und Makrophagen einwandern [Barnes 1999]. Anschließend wird das Hämatom organisiert und umgebaut, indem Fibroblasten, Granulozyten und Mesenchymzellen aus dem umliegenden Weichgewebe einsprossen. Wochen später bildet sich der die Fraktur umgebende bindegewebige Kallus, der sich nach und nach in mineralisierte Knochenmatrix umwandelt. Dieser Geflechtknochen wird anschließend durch gerichtete An- und Abbauvorgänge (Remodelling) in Form und Funktion an Lamellenknochen angepasst. Bei fehlender Ruhigstellung ist die Mineralisation gestört, so dass der Frakturspalt nur bindegewebig überbrückt wird, und eine Pseudarthrose entsteht. Die Implantatintegration wird nach Albrektsson [Albrektsson 2001] in drei Phasen, die eng miteinander verbunden sind, eingeteilt: 1. die Osteoinduktion als Teil der physiologischen Knochenheilung, 2. die Osteokonduktion als kurzwirkende Gewebeantwort auf ein Implantat und 3. die Osseointegration, die einen langen Halt des Implantates ermöglicht.

Die Osteoinduktion ist „ein Prozess, bei dem die Osteogenese induziert wird“ [Albrektsson 2001]. Blut ist – bedingt durch den operativen Eingriff – der erste Stoff, mit dem die Implantatoberfläche in Kontakt kommt [Davies 1996]. Aus diesem und dem verletzten Knochen werden extrazelluläre Flüssigkeit, nicht kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die die Regeneration und Reparatur des Knochens aktivieren [Schenk 1998]. Fibrin lagert sich an die Implantatoberfläche an und ermöglicht die Zellwanderung zum Implantat hin. Über Chemotaxis werden Osteoprogenitorzellen angelockt, die proliferieren, sich zu Osteoblastenvorläuferzellen und schließlich zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Sobald Zellen ausdifferenziert sind, stellen sie die Migration ein [Davies 1998]. Bei diesem Prozess spielen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die als Antwort auf ein Trauma oder beim Remodel-

ling freigesetzt werden und osteoinduzierende Eigenschaften besitzen, eine wichtige Rolle [Albrektsson 2001].

Osteokonduktion beschreibt die Zellverteilung und das Knochenwachstum auf der Implantatoberfläche [Albrektsson 2001, Marx 1998]. Letztere ist fähig, die Knochenbildung zu führen. Dabei kommt es zu einem Heranwachsen von Kapillaren, Osteoprogenitorzellen und Gewebe auf das Implantat [Masuda 1998]. Die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II, TGF- β und PDGF unterstützen die Blutgefäßbildung [Albrektsson 2001].

Für die Osteokonduktion ist eine vorangegangene erfolgreiche Osteoinduktion eine *conditio sine qua non*. Für die osteokonduktive Migration der Zellen ist eine ausreichende Blutzufuhr notwendig. Das vorher gebildete Blutgerinnsel kontrahiert durch die Einwanderung der Zellen. Es muss allerdings auf der Implantatoberfläche haften bleiben, damit die Zellen das Implantat erreichen, bevor sie ausdifferenzieren. Je nach Osteokonduktivität der Implantatoberfläche kann sich das Gerinnsel von dieser lösen [Davies 1998], so dass die Zellen vorher ausdifferenzieren und keine Knochenneubildung direkt an der Implantatoberfläche mehr möglich ist. Daher sind je nach Ort der Ausdifferenzierung der Zellen zwei verschiedene Arten der Osteogenese möglich: die Distanz- und die Kontaktosteogenese. Bei Ersterer findet somit keine Zellapposition an der Implantatoberfläche statt, sondern extrazelluläre Matrix stellt den Kontakt zur Implantatoberfläche her. Bei der Kontaktosteogenese jedoch wird das Implantat vor der Ausdifferenzierung der Zellen erreicht, und die Knochenformation erfolgt direkt an der Implantatoberfläche [Davies 1998, Furlong 1991]. Sobald diese ausdifferenziert sind, wird Osteoid gebildet. Kalziumphosphat heftet sich an die Bindungsstellen nicht kollagener Proteine (Osteopontin und Sialoprotein) und bildet eine fächerförmige Kristallstruktur. Diese Schicht aus amorphem Gewebe ist zwischen 20 bis 5000 nm dick [Albrektsson 2001, Boss 1999, Davies 1996]. Davis und Mitarbeiter markierten die Grenzschicht zwischen Implantat und neuem Knochen in gleicher Weise wie Kittlinien im physiologischen Umbauzyklus Abschnitte zwischen unterschiedlich altem Knochen markieren [Davies 1996]. An diese lagern sich sezernierte Kollagenfasern, die kalzifizieren, an und bilden den initialen Geflechtknochen. Diese Fasern sind folglich durch die erste kollagenfreie kristalloide Schicht vom Implantat getrennt. Die Fähigkeit zur Knochenregeneration und die Eigenschaften des Implantatmaterials beeinflussen maßgeblich die Osteokonduktion [Albrektsson 2001].

Osseointegration bedeutet eine stabile und langjährig anhaltende Fixation des Implantates im Knochen [Albrektsson 2001], wobei für diese beiden vorangegangenen Schritte – Osteoinduktion und Osseokonduktion – Voraussetzung sind. Trotzdem muss Osseointegration als Vorgang und nicht als Ergebnis aufgefasst werden. Der Geflechtknochen wird nun durch Remodelling in Lamellenknochen umgebaut und bewirkt somit eine Stabilisierung des Implantates im mechanisch belastbaren Knochen [Schenk 1998]. Ziel ist eine möglichst umfangreiche Integration und Umwachsung des Implantates im Knochen, obwohl aber auch nach vielen Jahren keine komplette Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat beobachtet werden kann [Albrektsson 2001, Schenk 1998]. Die Stabilität des so genannten Interfaces, d.h. der Erfolg der Osseointegration, hängt von verschiedenen Faktoren ab: als Basis muss der Knochen ausreichend vaskularisiert sein, damit die Regeneration von gesundem neuen Knochengewebe erfolgen kann [Kim 2006]. Zudem sind die Eigenschaften der Implantate bedeutend. Weitere wichtige Punkte für eine suffiziente Osseointegration sind von verschiedenen Autoren benannt worden: Branemark schreibt [Branemark 1983], dass es während der Operation zur Entwicklung einer unerwünschten, bindegewebigen Schicht führen kann, wenn es ein großes Präparationstrauma gibt. Weitere Untersucher [Linder 1989] kamen zu demselben Ergebnis. Da eine ausbleibende Fixation die Entwicklung einer fibrösen Zwischenschicht begünstigt und somit die Osseointegration stören kann, sollte auf Anhieb eine Stabilisierung des Implantates erreicht werden. [Cameron 1973, Soballe 1990]. Auch nach der Operation sollte für eine adäquate Bewegungseinschränkung gesorgt werden [Boss 1999, Brunski 1999, Goldberg 1999, Henry 1999, Martens 1980, Schenk 1998], sowie die Belastung des Operationsbereiches maximal reduziert werden, da bei Belastung oder gar Überlastung (selbst wenn diese erst nach einiger Zeit auftritt) die Osseointegration vermindert bzw. unmöglich gemacht werden kann [Branemark 1983, Brunski 1999, Fritz 1999, Gondolph-Zink 1998, Huja 1999, Schenk 1998].

2.1.2 Wachstumsfaktoren in der Knochenheilung

Schon 1920 wurde von Bier die Vermutung geäußert, dass an den Fraktarenden ein den Knochenheilungsprozess positiv beeinflussender Stoff freigesetzt wird [Bier 1918]. Urist entdeckte 1965, dass demineralisierter Knochen nach intramuskulärer Implantation zur Knochenneubildung führt und veröffentlichte diese Ergebnisse 1965 in Science: „Bone: Formation by Autoinduction“ [Urist 1965].

Diese Ergebnisse waren ein Meilenstein in der Knochenforschung und stellen den Beginn der Suche nach osteoinduktiven Matrixproteinen dar.

Solche Wachstumsfaktoren (WF), die seit vielen Jahren eine zentrale Rolle in der Knochenforschung spielen, stellen eine Erfolg versprechende Möglichkeit der Förderung der Wundheilung allgemein und im Besonderen der Knochenheilung dar [Baylink 1993, Reddi 2001]. Es konnte in vielen in vitro- und in vivo-Studien nachgewiesen werden, dass WF fähig sind, das Knochenwachstum signifikant zu beschleunigen und aktivierend auf die Heilung des angrenzenden Gewebes zu wirken [Lind 1998, Zellin 1997a]. Dies sind vor allem TGF- β (transforming growth factor), IGF (insulin-like growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) oder die Gruppe der BMPs (bone morphogenetic proteins). WF sind Zytokine und gehören zur Gruppe der Polypeptide mit einer Größe von 6-45 kDa, die an der Zellproliferation, -differenzierung und Morphogenese von Gewebe und Organen während der Embryogenese, in der Adoleszenz und im Erwachsenenalter beteiligt sind [Schliephake 2002]. Die Funktionen und Interaktionen der zahlreichen WF während der Knochenheilung sind bislang nur unzureichend bekannt. Trotzdem konnte in vivo für verschiedene Faktoren eine Förderung der Knochenbildung bzw. eine ektope Knochenbildung, d.h. eine Knochenbildung außerhalb des ursprünglichen Knochengewebes, als Nachweis ihres osteoinduktiven Potentials belegt werden [Huang 2002, Nakamura 2003, Schmidmaier 2003a]. WF sind wichtige Steuerungsbestandteile des Knochenzellstoffwechsels [Tayalia 2009]. Trotz des geringen Anteils der WF an der nicht kollagenen Matrix von unter 0,1% [Baylink 1993, Habal 1994], üben sie eine wichtige Kontrollfunktion auf den Knochenstoffwechsel aus.

Bei der Knochenregeneration kommt es zur Ausschüttung von zahlreichen WF, anderen Zytokinen und Botenstoffen, die lokal oder systemisch, endokrin, parakrin oder autokrin wirksam werden [Barnes 1999, Einhorn 1998, Klaushofer 1994, Zheng 1992]. Zahlreiche Studien zeigen, dass einige dieser Faktoren sowohl in vitro als auch in vivo einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen besitzen [Isgaard 1986, Linkhart 1996, Nielsen 1994, Nilsson 1987] und somit den Knochenmetabolismus stimulieren [Aspenberg 1989, Joyce 1990, Wildemann 2003, Yasko 1992]. Für verschiedene WF [Arosarena 2003, Bolander 1992, Bostrom 1995, Solheim 1998] gelang in zahlreichen Studien der Nachweis einer osteoinduktiven und den Knochenstoffwechsel günstig beeinflussenden Wirkung [Barnes 1999, Bax 1999, Baylink 1993, Fujimoto 1999, Zheng 1992]. Zusätzlich zeigten Deppe et al.,

dass die Kombination der WF TGF- β 1 und IGF-I in einer tierexperimentellen Studie synergistisch wirkt und damit einen verbesserten Effekt auf den Knochenstoffwechsel und die Defektheilung am Beispiel des Rattenunterkiefers hat [Deppe 2003].

2.1.3 Bone morphogenetic Protein – BMP-2

Die zur TGF- β -Superfamilie [Rosen 1992, Thies 1992] gehörenden und erstmals 1965 von Urist entdeckten WF im Knochen wurden als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnet [Smeets 2009, Urist 1965, Wozney 1988] und werden als die wichtigste Gruppe der WF für die Knochenbruchheilung angesehen. Sie fungieren außerdem als chemotaktische Botenstoffe für mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum [Abe 2000], die zu Osteoblasten differenzieren [Suzawa 1999] und spielen eine zentrale Rolle im Verlauf der enchondralen Osteogenese. Der in vivo-Einsatz der BMPs zeigte bei unterschiedlichen Tierversuchsmodellen eine beschleunigte Kallusbildung und -reifung im Rahmen der Knochenregeneration [Kandziora 2002a, Schmidmaier 2002, Zellin 1997b]. Aktuell sind in der BMP-Subfamilie mehr als 15 verschiedene Proteine bekannt [Celeste 1990, Yasko 1992], wobei BMP-2 und BMP-4 sowie BMP-5/6/7/8 fähig sind, Knochen- und Knorpelgewebe in vivo zu induzieren. Die Menge an Bone morphogenetic Protein wird auf $1\mu\text{g}/\text{kg}$ Knochengewebe geschätzt [Kubler 1997].

Die Wissenschaft hat sich zuletzt verstärkt auf das BMP-2 konzentriert, denn es konnte in in vivo-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass BMP-2 im Vergleich zu anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ein größeres Potential zur Förderung der Knochenheilung besitzt [Kandziora 2002b].

Das reife, biologisch aktive BMP-2 ist ein Homodimer, welches sich aus zwei Untereinheiten mit jeweils 114 Aminosäuren zusammensetzt [Scheufler 1999]. BMP-2 ist ein osteoinduktives Protein, welches eine entscheidende Rolle während des Wachstums und der Regeneration von Knochen spielt. Die Wirkung des osteoinduktiven BMP-2 beruht v.a. auf dem Differenzierungseinfluss osteoblastärer Zellen sowie der Förderung der Reifung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix [Kandziora 2002a], so dass es eine entscheidende Rolle während des Knochenwachstums und der -regeneration spielt. Klinische Studien konnten nachweisen, dass BMP-2 in der Lage ist, die Knochendefektheilung an der Mandibula zu verbessern [Chen 2007a], so dass dieser neu entstandene Knochen auch nach enossaler Implantation den Kaubelastungen gewachsen ist [Seto 2001, Seto 2002].

2.2 Gentransfer

Unter dem Begriff „Gentherapie“ versteht man das Einbringen von Genen in Zellen, um die genetische Information durch Nukleinsäuren zu vermitteln und einen therapeutischen Nutzen zu erzielen [Avery 1944, Fischer 2010].

Der klinische Einsatz von rekombinanten WF ist durch die kurze Halbwertszeit [Tayalia 2009], die oft eine mehrmalige Gabe notwendig macht, sowie durch die Schwierigkeit der Applikation direkt am Wirkort erheblich eingeschränkt [Bonadio 1999]. Teilweise konnten diese Probleme durch die Einbindung von WF in biodegradierbare Schwämme gelöst werden [Kolambkar 2010]. Da diesen Schwämmen die mechanische Stabilität fehlt, und sie somit im klinischen Einsatz nicht stabil mit dem Implantat verbunden sind, [Marukawa 2002, Weber 2002] sind sie nur bedingt als medizinische Trägermaterialien z.B. auf metallischen Implantaten geeignet. Außerdem ist die Eigenstabilität dieser Schwämme zu gering, um sie als belastungsfähige Knochenersatzmaterialien einzusetzen. Weiterer Nachteil der Einführung der rekombinanten WF in den klinischen Alltag stellt der hohe Preis dar, wobei hier der aufwendigen Produktion Rechnung getragen werden muss. Dieses hat für alle rekombinant produzierten Proteine und WF Gültigkeit, im Speziellen aber für BMP-2 [Kawai 2003, Schmidmaier 2002]. Unter Berücksichtigung dieser Limitationen und der potentiellen systemischen Toxizität erscheint es deshalb mittelfristig noch nicht möglich, größere Knochendefekte mit Hilfe von WF zur Ausheilung zu bringen [Tayalia 2009].

Eine Möglichkeit, die beschriebenen Probleme des rekombinanten Proteins zu umgehen, ist, die Produktion der WF durch Gentherapie gezielt vom Körper selbst am Ort des Defektes übernehmen zu lassen [Hannallah 2003]. Diese „natürliche“ Herstellung von WF wird durch die Übertragung der genetischen Information in die an der Gewebereaktion beteiligten Zielzellen bewirkt. Das Einbringen genetischen Fremdmaterials (DNS) in eukaryontische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Da die Gensequenzen vieler WF bekannt sind, können Zellen mit Hilfe von Vektoren als Transportvehikel („Genfähre“) therapeutischer Gensequenzen nach erfolgter Transfektion am Zielort die gewünschten Faktoren produzieren. Dazu werden die Zellen nach erfolgreicher Transfektion implantiert [Partridge 2002], oder die genetische Information mittels Trägermaterialien an den Wirkort gebracht [Aviles 2009]. Biomaterialien wie Kollagenschwämme werden als carrier (Trägermaterial) der DNS oder der Genvektoren eingesetzt [Bonadio 2000]. Wenn Zellen in diese Matrix einwachsen,

werden diese transfiziert. Eine solche Applikationsart würde die in vitro-Kultivierung und Transfektion von Knochenzellen entbehrlich machen [Bonadio 1999].

Als Klonierungsvektoren werden meist Plasmide verwendet, um die Bildung von Proteinen in bestimmten Zellen und Geweben spezifisch anzuregen. Beim Gentransfer können z.B. Mediatorsubstanzen wie WF exprimiert – d.h. die genetischen Information wird in Proteine umgesetzt – und stetig freigesetzt werden, um Prozesse auf zellulärer Ebene zu initiieren oder zu beschleunigen. Die Expression dieser Proteine ist durch die nur transiente Integration der Plasmide ins Genom zeitlich limitiert und endet nach der gewünschten Wirkung.

Bonadio et. al. [Bonadio 1999] zeigte verschiedene Expressionsverläufe zwischen Protein- und Genfreisetzung. Während Proteine rasch freigesetzt werden, entfalten Gene ihre Wirkung langsamer und länger in konstanter Konzentration (Abb. 2-1 und Tab. 2-1)

Protein	Gentransfer
<ul style="list-style-type: none"> • Kurze Halbwertszeit • Systemische Toxizität • Kommerzielle Verfügbarkeit (Preis) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lokale Verfügbarkeit in „Self“-Form (posttransl. Modifikation) • Aktive Dosis nur lokal • Plasmid-DNS günstig

Tab. 2-1 Vor- und Nachteile von Protein und Gentransfer

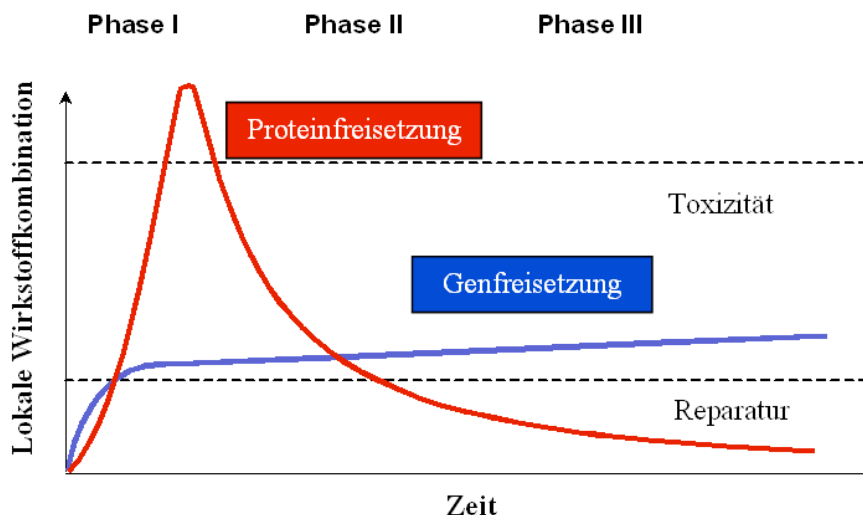


Abb. 2-1 Vergleich der Freisetzungskinetik von rekombinantem Protein und Plasmid beim Gentransfer in der Geweberegeneration und Wundheilung.

Einteilung der Wundheilung in 3 Phasen. Das Protein wird schnell freigesetzt und erreicht einen hohen, teils toxischen Spiegel, welcher jedoch rasch wieder unter den therapeutischen Spiegel abfällt. Dagegen entfalten Plasmide mit ihrer Expression einen über lange Zeit anhaltenden Wirkspiegel im therapeutischen Bereich. Abbildung nach Bonadio et. al. (1999, Seite 757)

Es konnte in etlichen in vitro- und in vivo-Studien festgestellt werden, dass entsprechende Zellen in der Lage sind, WF zu bilden [Okubo 2001] und somit den Knochenstoffwechsel zu stimulieren [Baltzer 2004, Musgrave 1999].

2.2.1 Methoden des Gentransfers

„Ideale Gentransfersysteme sollten biologisch abbaubar und nicht toxisch sein, keine Immunantwort hervorrufen und in der Lage sein, in die Zielzellen zu gelangen und dort effiziente Genexpression zu erzielen“ [Nishikawa 2002]. Weiterhin ist für Gentransfersysteme „ein hohes Maß an Stabilität im jeweiligen biologischen Umfeld“ des Zielgewebes zu fordern [Kircheis 2001]. Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Gentherapie ist die Effizienz der Transfektion [Mehier-Humbert 2005b]. Man unterscheidet bei den häufig eingesetzten gentherapeutischen Verfahren zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren, wobei virale Vektoren von natürlichen Viren abgeleitet werden und nicht-virale Vektoren synthetische Konstrukte darstellen (Tab. 2-2).

Virale Vektoren	Nicht-virale Vektorsysteme		
Adenoviren Adenoassoziierte Viren Herpesviren Retroviren	<u>Biochemische Methoden:</u> Liposomen Rezeptortargeting Polymere	<u>Chemische Methoden:</u> Kalziumphosphat DEAE-Dextran	<u>Physikalische Methoden:</u> Elektroporation „Gene Gun“ (=Partikelbeschuss) Jet Injection Direkte Injektion

Tab. 2-2 Häufig verwendete virale und nicht-virale Vektorsysteme

2.2.2 Viral

Man macht sich beim viralen Gentransfer die evolutionär erworbenen Eigenschaften von Viren zu Nutze, Erbinformationen in die Zelle einzuschleusen. Ziel ist es dabei, diese stabil in das Genom einzubauen. Um ihre genetische Information in die Zellen zu bringen, nutzen virale Vektoren ihre jeweils eigenen Penetrationsmechanismen, wobei sie jedoch teils ihre virusspezifischen Eigenschaften und somit auch deren Gefahrenpotentiale beibehalten [Knoell 1998]. Man hat es allerdings geschafft, virale Vektoren zu entwickeln, denen die Möglichkeit zur Replikation fehlt [Tabin 1982, Wei 1981]. Bei der Erbkrankheit SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disorder) wurde 2002 die erste erfolgreiche Gentherapie unter Verwendung eines retroviralen Vektors durchgeführt [Fischer 2002]. Der Einsatz viraler Genvektorsysteme ist trotz hoher Effizienz für den Einsatz am Menschen stark limitiert. Einerseits können virale Gensequenzen in das Genom der Wirtszelle eingebaut und unkontrolliert verbreitet werden, unter Umständen sogar maligne Transformationen induzieren oder direkt

zum Tode führen [Knoell 1998]. Andererseits können immunologische Reaktionen ausgelöst werden [Brown 2002, Simon 1993, Worgall 1997], die alle Schweregrade der anaphylaktischen Reaktion bis hin zum anaphylaktischen Schock beinhalten [Alden 1999]. Trotzdem besteht das Risiko, dass Viren ihre Replikationsfähigkeit wiedererlangen, zu ungewollten Infektionen beim Menschen führen und sich weiterverbreiten. Der eigentliche Vorteil des viralen Gentransfers, mit Hilfe bestimmter Viren Erbinformationen in das menschliche Genom stabil einbauen zu können, erwies sich bezüglich möglicher Mutagenese durch unkontrollierten Einbau als Risiko [Cooke 2001, Mitani 2002]. Keine reale Alternative stellt die virale Transfektion ex vivo im Sinne des Tissue Engineering mit anschließender Replantation der transfizierten Zellen dar, weil die Risiken des viralen Gentransfers bestehen bleiben [Dragoo 2003]. Die Produktion viraler Vektoren ist zudem aufwendig und kostspielig, weil hierfür ein biologisches System erforderlich ist [Kawai 2003]. Viele in vivo-Studien mit viralem BMP-2 Gentransfer zeigten bereits verheißende Ergebnisse und führten im Tierversuch zu einer beschleunigten Knochenregeneration bzw. einer ektopten Knochenbildung [Alden 1999, Dragoo 2003, Musgrave 1999, Varady 2002], jedoch mit den damit verbundenen Einschränkungen und Gefahren, die den Einsatz beim Menschen bisher verbieten.

2.2.3 Non-viral

Bei nicht-viralen Vektoren hingegen besteht die Möglichkeit, diese nach umfassender Untersuchung am Menschen anzuwenden. Sie sind nicht mit den Nachteilen viraler Vektoren behaftet, allerdings ist deren Effektivität deutlich geringer als die der viralen Vektoren, weshalb hohe Applikationsmengen erforderlich sind, um entsprechende Effekte zu erzielen. Sie zeichnen sich im Gegensatz zu den viralen Vektoren durch ein nahezu fehlendes immunogenes Potential aus, sind günstig und können schnell produziert werden. Der nicht-virale Gentransfer lässt sich nach biochemischen, chemischen und physikalischen Vektorsystemen unterscheiden (Tab. 2-2).

Erprobte physikalische Verfahren des nicht-viralen Gentransfers sind z.B. der Einsatz einer „gene gun“ (Genpistole) und die Mikroinjektion, des Weiteren die Elektroporation und der Ultraschall [Mehier-Humbert 2005a, Mehier-Humbert 2005b]. Bei der Methode der Mikroinjektion werden die Vektoren und Nukleinsäuren mit einer feinen Kapillare in das Zytoplasma oder den Zellkern der Zelle injiziert. Sie kann ex vivo und in vitro durchgeführt werden und findet in der Grundlagenforschung Anwendung [Choleris 2007]. Als großer Vorteil ist zu sehen, dass eine Transfektion von fast

100% der Zellen möglich ist. Nachteilig dagegen sind der hohe Aufwand und die komplexe Technik, sowie die geringe Anzahl an Zellen, die injiziert werden können. Elektroporation oder Elektrotransfektion bezeichnet das Einbringen von DNS in Zellen unter Anwendung kurzer elektrischer Impulse [Chu 1987, Neumann 1982]. Durch das elektrische Feld im Zielgewebe wird eine kurzfristige Porenbildung in der Plasmamembran erreicht. Die Effizienz der Elektroporation beruht auf folgenden Faktoren: der Stärke des elektrischen Feldes, der Temperatur vor und nach dem Impuls, der Impulsdauer, der verwendeten DNS-Konzentration und dem verwendeten Medium. Alle diese Punkte müssen bestmöglich auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmt sein, damit eine maximale Wirkung der Elektroporation erzielt werden kann [Wolf 1994]. Diese Gentransfermethode ist ebenfalls nur ex vivo und in vitro anwendbar und zeigt in vitro eine hohe Toxizität. Bei der Methode der Sonoporation wird ebenfalls eine vorübergehende Porenbildung in der Membran bewirkt, wobei das Zielgewebe einem Ultraschall ausgesetzt wird [Deng 2004]. Diese findet in vivo im Muskel- und Tumorgewebe und im kardiovaskulären System Einsatz.

Die kationischen Liposomen und Polymere sind die bisher erfolgreichsten nicht-viralen Gentransfersysteme. Diese Vektoren sind im physiologischen Umfeld positiv geladen und können so über elektrostatische Anziehungskräfte an die negativ geladene DNS binden. Über selbstständige Spontanaggregation von Vektor und DNS entsteht der Gen-Vektor-Komplex. Dieser Vorgang wird als DNS-Kondensation bezeichnet. Dabei sind unterschiedliche unspezifische Mechanismen relevant, insbesondere elektrostatische Kräfte, hydrophobe Anziehungskräfte und van der Waals Kräfte [De Laporte 2007].

Zahlreiche kationische Lipide kamen zur Entwicklung [Felgner 1987] und einige davon in klinischen Tests zur therapeutischen Anwendung [Alton 1999, Caplen 1995, Gill 1997].

Ebenfalls wurden zahlreiche kationische Polymere im Rahmen der Entwicklung von Methoden zur nicht-viralen Gentherapie bereits entwickelt. Meist handelt es sich dabei um Polylysine [Wagner 1990], PAMAM Dendrimere [Haensler 1993] und Polyethylenimin (PEI) [Boussif 1995]. Als sehr effektiv für die DNS-Kondensation erwiesen sich Polykationen mit hohem Molekulargewicht. In der Gruppe der polykationischen Polymere weist Polyethylenimin die höchste Transfektionseffizienz auf und gilt aktuell als eines der effektivsten Transfektions-Reagenzien des nicht-viralen Gentransfers. Somit konnte sich PEI in den letzten Jahren als Nukleinsäureträgersubstanz etablie-

ren. PEI verfügt über eine hohe positive Ladungsdichte, die mit der negativen DNS die Polyplexe (Polykationen-DNS-Komplexe) bildet. PEI bewirkt aufgrund seiner hohen Pufferkapazität eine Freisetzung der Polyplexe aus dem Endosomen/Lysosomen-Kompartiment und blockiert deshalb den DNS-Abbau durch Enzyme der Lysosomen. Zusätzlich wird die DNS durch das Polymer direkt in den Zellkern transportiert.

Polylysin besitzt zwar gute Eigenschaften, DNS zu kondensieren, allerdings besitzen auf Polylysin aufbauende Polyplexe keinen Mechanismus zur Endosomolyse, weshalb z.B. Chloroquin als endosomolytische Substanz zugegeben werden muss, um hohe Transfektionseffizienzen zu erreichen [Cotten 1990, Zauner 1996]. Dendrimere und PEI haben im Gegensatz dazu wegen ihrer hohen Pufferkapazität inhärente endosomolytische Eigenschaften. Wegen seines niedrigen pK_b -Wertes im Bereich der endosomalen pH-Werte besitzt v.a. PEI die Fähigkeit, als Puffer zu wirken [Kircheis 2001]. Mit dieser hohen Pufferkapazität fungiert PEI als eine Art „Protonenschwamm“ und hat bei pH-Abfall im Endolysosom ein osmotisches Anschwellen und schließlich Platzen des Endolysosoms zur Folge [Boussif 1995]. PEI bindet nach Kondensation unspezifisch an negativ geladene Proteoglykane der Zelloberfläche [Kopatz 2004]. Darauf führt die Endozytose zur Zellaufnahme [Tang 1997]. Die Pufferkapazität von PEI verhindert trotz endosomaler Ansäuerung durch Protonen einen Abfall des pH-Wertes und bietet auf diese Weise Schutz vor lysosomalem Abbau. Durch passive Diffusion von Chlorid-Ionen steigt der osmotische Druck in den Endosomen an, woraufhin der Vektor platzt („proton-sponge-effect“). Die beschriebene endosomale Freisetzung der nicht-viralen Genvektoren führt letztlich zur Aufnahme in das Zytoplasma [Akinc 2005]. Der darauf folgende Transport in den Kern ermöglicht die Transkription. Die Effizienz des PEI ist auf dessen hohe positive Ladungsdichte zurückzuführen, auf der anderen Seite führt diese jedoch auch zu seiner bedeutenden Zytotoxizität. PEI löst Membranen auf, vermutlich komplexiert es sogar zelleigene DNS. Das war der Grund, nicht-virale Copolymer Protected Gene Vectors („COPROGs“) zu entwickeln. Dabei werden positiv geladene PEI-Polyplexe von einem negativ geladenen Hüllpolymer (Co-Polymer „P6YE5C“) umgeben [Finsinger 2000, Scherer 2002]. Dieses setzt sich aus einer negativ geladenen Peptidgruppe (YE5C) sowie einer PEG-Einheit (P6) zusammen. Entsprechende Linker-Moleküle verbinden diese miteinander. Daher sind die so „geschützten“ DNS-Polykation-Komplexe den reinen Polyplexen in den Punkten Freisetzungverhalten, Vektorstabilität und Genexpression in

vitro und in vivo überlegen [Scherer 2002]. Durch die Entwicklung von sog. „protective Copolymers (PROCOPs)“ wurde es möglich, Polyplexe vor inaktivierenden in vivo-Wechselbeziehungen zu schützen. Sie zeigten keine Serumalbumin- bzw. Salzinduzierte Aggregation [Finsinger 2000]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation dieser copolymer protected gene vectors („COPROGs“) mittels Kollagenschwämmen als Träger einer Applikation der nackten DNS oder Kollagenschwämmen, die mit ungeschützten PEI-Polyplexen beladen sind, hinsichtlich protrazierter Freisetzung, Vektorstabilität, Genexpression und Vermeidung der Inaktivierung durch das Komplementsystem in vitro und in vivo überlegen waren [Honig 2010, Scherer 2002]. Die Methode des geschützten, nicht-viralen Gentransfers wurde mit diesen Vorarbeiten etabliert und in vivo eine hinreichende Transfektionsrate erzielt.

2.3 Biodegradierbare Beschichtung

Biomaterialien als Wirkstoffträger bzw. Applikationssysteme halten in den Fachbereichen der Orthopädie, Unfallchirurgie und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie immer größeren Einzug. Besonderes Augenmerk gilt hierbei den biodegradierbaren Polymeren Polylaktide, Polyglycolsäuren und ihren Co-Polymeren, insbesondere den polymeren Verbindungen vom Typ der Milch- und Glycolsäure [Salvay 2010, Thoma 1991]. Anwendung finden diese Verbindungen inzwischen als resorbierbares Naht- und Osteosynthesematerial oder als parenteral zu applizierende Wirkstoffträger [Middleton 2000, Thoma 1991].

Der Körper verstoffwechselt diese biokompatiblen oder biodegradierbaren Polymere durch chemische oder biologische Prozesse zu ausscheidbaren Substanzen wie z.B. Milch- und Glycolsäure [Thoma 1991].

Milchsäure ist ein Monomer und kommt in zwei unterschiedlichen Isomeren vor – der D- und der L-Form. Da diese Isomere verschieden verknüpft werden können, gibt es für die Entstehung des Laktids drei differierende Möglichkeiten: das Meso-Laktid, das D-Laktid und das L-Laktid. Für den Abbau der Polymere sind verschiedenartige Mechanismen wie enzymatische Vorgänge, Hitze und Oxidation verantwortlich [Schmidmaier 2001b]. Die Hydrolyse ist wegen der instabilen Polymerbindungen der Biomaterialien der häufigste Abbauweg [Middleton 2000, Wildemann 2004a]. Nach Hydrolisierung der Polylaktide zu Milchsäure werden diese in den Zitratzyklus eingebracht und enzymatisch zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt [Middleton 2000].

2.3.1 PDLLA als biodegradierbare Trägersubstanz

Das Poly(D,L)-Laktid Resomer R 203[®] der Fa. Boehringer Ingelheim, ein inertes, amorphes PLA-Stereo-Co-Polymer, ist aufgrund seiner Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität, verbunden mit seinem spezifischen Gewicht von 29500 Dalton, besonders zur stabilen Beschichtung metallischer Implantatoberflächen geeignet. Die chemische Struktur dieses Polylaktids wird durch $-(C_6H_8O_4)_n-$ beschrieben. Dieses Polymer kann mittels Kaltbeschichtungstechnologie auf Biomaterialien aufgetragen werden, wobei verschiedene Substanzen wie WF oder Antibiotika hinzugefügt werden können. Diese werden ununterbrochen an die Umgebung freigesetzt, während die Beschichtung resorbiert wird. Somit liegen am Wirkort selbst Substanzen mit kurzer Halbwertszeit über eine längere Zeitspanne in hohen Konzentrationen vor [Herrmann 1999, Stemberger 1997]. Diese Beschichtung kann auf alle verschiedenen Knochenersatzmaterialien und Implantate aufgetragen werden, um auch bei hohen Belastungen durch die große mechanische Stabilität eine feste Verbindung zur Trägermatrix zu erzielen. [Gollwitzer 2005]. Der Verlust der Polylaktidbeschichtung nach Implantatinsertion in den Knochen und anschließender Entnahme beträgt weniger als 10% [Schmidmaier 2001b]. Somit ist es möglich geworden, auf geeignete Trägermaterialien WF, Plasmide oder andere Pharmazeutika wie z.B. Antibiotika aufzutragen, wobei diese Materialien zugleich den mechanischen Bedingungen eines Knochenersatzes gerecht werden und belastbar sind. Deppe und Stemberger zeigten beispielsweise, dass die Antibiotikaintegration in die Polylaktidbeschichtung die Knochenregeneration nicht beeinträchtigt [Deppe 2004c, Deppe 2003, Stemberger 1997]. Damit erreicht man gerade in der Integrationsphase von Implantaten und Knochenersatzmaterialien einen besseren Infektionsschutz. Polylaktidbeschichtungen verbunden mit Antibiotika, welche aus dieser Entwicklungsarbeit hervorgegangen sind, werden bereits erfolgreich auf Osteosynthesematerialien in der humanen klinischen Medizin angewendet [Schmidmaier 2006b]. Analog zu Antibiotika ist es möglich, WF bzw. deren genetische Information in Plasmidform trotz ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit in hoher und permanent gleich bleibender Konzentration über einen längeren Zeitraum direkt am Wirkort im Knochen-Implantat-Interface freizusetzen [Kandziora 2002a, Schmidmaier 2006a, Wildemann 2004c].

Deppe und Stemberger zeigten in vivo, dass mit einer Kombination aus den WF TGF- β I und IGF-I beschichtete Implantate im Vergleich zu Implantaten ohne WF in der Beschichtung nach vier Wochen eine schnellere Defektauffüllung als wichtige

Vorstufe der Knochenheilung bewirken. IGF-I bewirkt dabei wohl eine Synthesesteigerung von Knochenmatrixproteinen, während TGF- β I eine Rekrutierung und Proliferation osteoblastärer Vorläuferzellen hervorruft [Deppe 2004c, Deppe 2003, Schmidmaier 2001a, Schmidmaier 2003b].

Hierbei ist die kombinierte Gabe beider WF der Gabe nur eines WF in Bezug auf die Osteoinduktion überlegen [Schmidmaier 2003b]. BMP-2 besitzt allerdings ein noch größeres Potential als TGF- β I und IGF-I zusammen, die Knochenregeneration zu fördern [Kandziora 2002b]. Sowohl diese Ergebnisse als auch die des viralen BMP-2-Gentransfers zur Verbesserung der Knochenregeneration haben zur Entwicklung von Verfahren für nicht-virale BMP-2 Plasmide geführt. Diese scheinen nach eingehenden Voruntersuchungen mittelfristig zum Einsatz in der humanen klinischen Medizin geeignet, da ihnen das Gefahrenpotential des viralen Gentransfers fehlt.

3 Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit

Implantatlockerungen bzw. das komplette Einheilen alloplastischer, wie z.B. dentaler Implantate stellen in der rekonstruktiven zahnärztlichen Chirurgie trotz verbesserter Implantatoberflächen häufig ein großes Problem dar. Gerade Patienten mit onkologischen, chronisch entzündlichen und degenerativen Knochenerkrankungen sind dafür durch ihre erhöhte Morbidität anfällig und damit zusätzlichen Risiken durch Folgeoperationen ausgesetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, inwieweit sich der bereits durch Plank und Mitarbeiter im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung der TUM entwickelte und in vitro bereits etablierte nicht-virale, geschützte Genvektor *COPROG* auf den Tierversuch übertragen lässt, und welchen Effekt das beschichtete Titanimplantat auf die Knochenregeneration hat. Nun sollte der therapeutische Effekt in einem etablierten Knochendefektmodell im Kieferwinkel der Ratte gleichermaßen durch Anwendung unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse beurteilt werden. Dazu wird das Plasmid des WF BMP-2 in Form des geschützten Genvektors *CO-PROG* in Poly(D,L)-Laktid resuspendiert, und auf Titanfolien als Beschichtung aufgetragen, um eine BMP-2-Expression in vivo zu erzielen. Zielgrößen sind der qualitative und quantitative Zuwachs an Knochen im Defektbereich, welcher durch verschiedene radiologische, histologische und histomorphometrische Verfahren im zeitlichen Verlauf objektiviert werden sollte. Insbesondere sollen die Mikrocomputertomographie (μ CT) und die Mehrschicht-Computertomographie (MSCT), welche miteinander korreliert werden, den Unterschied zwischen neu gebildetem und ortständigem Knochen zeigen. Zusätzlich dienen die Histologie anhand verschiedener Färbungen und die Mikroradiographie dazu, die Struktur und Qualität des neu gebildeten Knochens zu beurteilen und mit den Ergebnissen der mikrocomputertomographischen Untersuchung zu korrelieren. Zusammengefasst soll diese tierexperimentelle Studie die Frage beantworten, inwieweit dieser nicht-virale Gentransfer zur lokalen Förderung der Knochenregeneration einen neuen Behandlungsansatz darstellt, und ob diese Methode als Alternative im klinischen Alltag am Menschen als vorteilhaftes Verfahren zur Beschleunigung der Implantateinheilung vorstellbar ist.

4 Material und Methode

4.1 Tiermodell

Es wurde ein orthotopes Tiermodell gewählt, um die knochenwachstumsfördernde Wirkung der unterschiedlich beschichteten Titanimplantate darzustellen. Dabei wurde ein knöcherner Defekt kritischer Größe angefertigt („critical size defect“) [Hedner 1995, Schmitz 1986]. Per definitionem handelt es sich hierbei um den kleinstmöglichen Defekt in einem Knochen einer Tierart, bei dem ohne Außeneinwirkung kein selbstständiger Heilungsprozess in Gang gesetzt wird. Durch dieses Vorgehen wird eine objektive Evaluation verschieden beschichteter Implantate im Hinblick auf Knochenneubildung im Defektbereich sowohl zu einem Zeitpunkt als auch im zeitlichen Verlauf ermöglicht.

Für den Tierversuch standen insgesamt vier verschiedene Gruppen zur Verfügung (Tab. 4-1). Für die Mikro-CT-Untersuchungen zogen wir eine fünfte Gruppe bestehend aus n=6 Kieferhälften als unbehandelte Nativtiere hinzu. In der ersten Gruppe wurden Titanimplantate mit in PDLLA resuspendierter COPROGs-DNS, dem so genannten BMP-2 Plasmid, in den Konzentrationen 2,5µg/12,5µg/25µg/50µg und 100µg beschichtet (Abb. 4-1). Dagegen stand die Gruppe, in der die mit PDLLA beschichtete Titanfolie mit rekombinatem rhBMP-2 Protein in einer Konzentration von 62,5µg versetzt wurde. Da zu den ersten Untersuchungszeitpunkten von 7,14 und teils auch 28 Tagen aus der 2,5µg Plasmidgruppe wenig sichtbare Veränderungen nachzuweisen waren, wurden diese Messzeitpunkte zugunsten der zeitlich folgenden Gruppen und anderer Gruppen verlassen. Die dritte Gruppe bestand aus 2x4 Tieren, welche mit Implantaten behandelt wurden, die nur mit PDLLA beschichtet waren. Die letzte Gruppe setzte sich aus 2x8 Tieren zusammen, bei denen die Folie mit PDLLA/COPROGs_{Luciferase} bzw. COPROGs_{β-Galaktosidase} beschichtet wurde. Als Folge der geringen Regeneration zu den frühen Zeitpunkten bei den therapeutischen Gruppen wurde bei diesen Kontrollgruppen bewusst bereits im Vorfeld der Opfernungszeitpunkt von 56 und 112 Tagen postoperativ als ausreichend empfunden. Außerdem konnte auf den Einsatz von völlig unbeschichteten Implantaten verzichtet werden, da der fehlende Effekt auf den Knochen schon in einer vorausgegangenen Studie am selben Modell [Deppe 2003] gezeigt werden konnte. Die Kleintiere wurden am 7., 14., 28., 56. und 112. Tag geopfert, um die Wirkung der verschieden beschichteten Implantate auf den „critical size defect“ im zeitlichen Verlauf zu untersu-

chen. Die maximale Knochenneubildung kann durch die Wirkung der WF und deren Plasmide auf die Zellen der umliegenden Weichteilstrukturen und das umgebende Knochen- und Dentalgewebe beeinflusst werden.

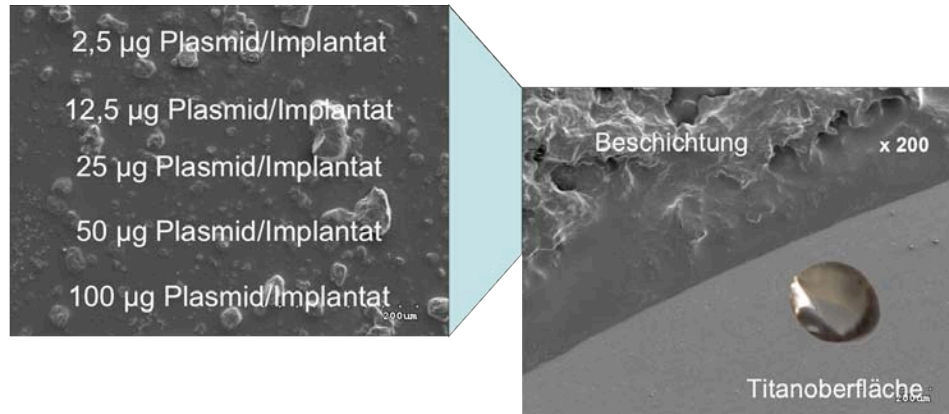


Abb. 4-1 REM-Ansicht der Übergangszone PDLLA – Beschichtung Titanoberfläche; verschiedene Plasmidkonzentrationen (Vergrößerung x 200)

Um qualitative und quantitative Aussagen über den neu gebildeten Knochen treffen zu können, wurden alle Gruppen konventionell radiologisch, mikrocomputertomographisch, histologisch, histomorphometrisch und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Tab. 4-1 zeigt die Einteilung der verschiedenen Gruppen, deren Probenanzahl, d.h. die verwendeten Kieferhälften und die unterschiedlichen Tötungszeitpunkte.

Gruppe	Tag 7	Tag 14	Tag 28	Tag 56	Tag 112
BMP-2 Plasmid 2,5µg	8x	8x	8x	8x	8x
BMP-2 Plasmid 12,5µg				4x	4x
BMP-2 Plasmid 25µg				4x	4x
BMP-2 Plasmid 50µg			2x	7x	4x
BMP-2 Plasmid 100µg			2x	7x	4x
rhBMP-2 Protein		6x	7x	7x	4x
PDLLA				8x	8x
COPROGs Luc/βGal				12x	6x

Tab. 4-1 Übersicht der verschiedenen therapeutischen Gruppen Anzahl der verwendeten Kiefer zu den unterschiedlichen Opferungszeitpunkten, Gesamtkieferzahl n=140

4.1.1 Tierhaltung und Ernährung

Die männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurden im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München operiert und während der gesamten Versuchsphase betreut. Sie waren 6 Monate alt und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 500g. Es kamen nur männliche Tiere zum Einsatz, da der hormonelle Einfluss von Östrogen auf den Calcium-Stoffwechsel bei weiblichen Tieren die Knochenregeneration beeinflusst. Je 3 Tiere wurden zusammen in Makrolonkäfigen gehalten, die mit ausreichend Holzgranulatstreu, Zellstoff und anderen Nestbaumaterialien wie Pappröhrchen ausgestattet waren. Des Weiteren stand den Tieren während des gesamten Versuchszeitraums ausreichend frisches Wasser und Altramin-Trockenfutter (Pellets) zur Verfügung. In den Räumlichkeiten des Tierstalls herrschte eine konstante Raumtemperatur von 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden.

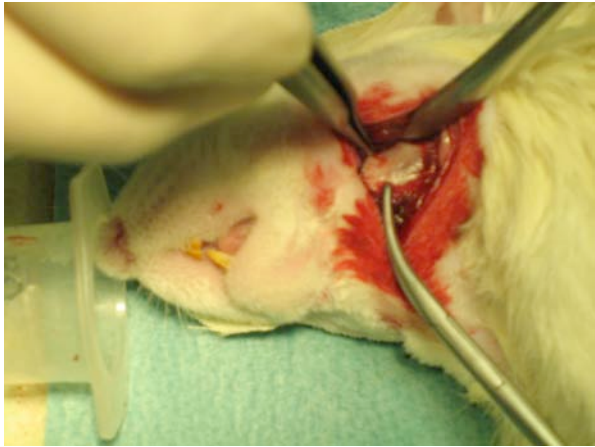
4.1.2 Operationstechnik

Da die Tiere einen hohen Stoffwechselgrundumsatz besitzen, wurde auf eine präoperative Nahrungskarenz verzichtet. Die gesamte Operation hatte eine Dauer von 30-45 Minuten, wobei die Narkose durch intramuskuläre Injektion von Medetomin (150µg/kgKG), Midazolam (2µg/kgKG) und Fentanyl (5µg/kgKG) eingeleitet wurde. Anschließend wurde das Tier seitlich liegend auf dem OP-Tisch positioniert, mit Sauerstoff (1l/min) versorgt und zur Überwachung mit Hilfe einer Sonde an der Hinterpfote an ein Pulsoxymeter angeschlossen. Das Fell wurde im Bereich des Unterkiefers rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde das OP-Feld durch eine submandibuläre Inzision eröffnet (Abb. 4-2a). Nun wurde die Masseter-Pterygoid-Schlinge am unteren Rand des Unterkiefers dargestellt, im knöchernen Anteil abgelöst und im Basalbogensansatzbereich durchtrennt. Mit einem scharfen Spatel wurde dann das freigelegte Periost vom Knochen getrennt und der Kieferwinkel dargestellt. Anschließend wurde der Defekt etwa 2mm kranial des Basalbogens und 2mm ventral des aufsteigenden Unterkieferastes im Kieferwinkel gesetzt. Zum Einsatz kam hierbei ein Trepanbohrer, der mit geringer Drehzahl und unter ständiger Kühlung den 5mm großen Defekt in den Kieferwinkel bohrte (Abb. 4-2b). Anschließend wurde der trepanierte Knochen vorsichtig mit einem Skalpell entfernt (Abb. 4-2c,d), das Operationsfeld gespült und etwaige Blutungen aus der A. und V. alveolaris inferior durch Elektrokoagulation gestillt. Der Defektbereich wurde gesäubert und getrocknet, um die im Durchmesser 8mm große beschichtete Titanfolie zentral auf dem Defekt zu platzieren (Abb. 4-2e).

Dann wurde die Masseter-Pterygoid-Schlinge zurückverlagert und mit einem 4-0 Vicryl-Faden refixiert. Um eine Nahtentfernung und die damit verbundene Stressbelastung der Ratten zu vermeiden, wurde zuletzt die Haut mittels 3-0 Vicryl-Faden verschlossen und mit Nobecutan Sprühverband abgedeckt (Abb. 4-2f). Am Ende der Operation wurde den Ratten zur Antagonisierung der Narkose Atipamizol (0,75mg/kgKG), Flumazenil (200µg/kgKG) und Naloxon (120µg/kgKG) verabreicht. Insgesamt wurden jedem Tier beide Kieferhälften operiert und mit Implantaten versehen. Auf Grund der beschränkten Anzahl von Tieren wurden unterschiedliche Konzentrationen bei ein und demselben Tier verwendet, um auf eine gewisse Anzahl von verwertbaren Proben zu kommen.

4.1.3 Postoperative Nachsorge

Zur Stimulation des Stoffwechsels wurde den Tieren noch vor der Aufwachphase 5ml Ringerlösung subkutan injiziert und zur Schmerzbekämpfung 50mg/6h Metamizol und 0,2mg/KG/24h Meloxicam verabreicht. Post Operationem wurden die Tiere mit wärmenden OP-Tüchern vor Abkühlung geschützt. Zusätzlich kamen für die ersten 24 Stunden Wärmelampen zum Einsatz. In allen Käfigen lag Zellstoff zum mechanischen Schutz der Wunden durch Schmutz aus. Täglich wurde die Wundheilung der Tiere überprüft und dokumentiert. Den Tieren stand ausreichend Flüssigkeit zur Verfügung, wobei am Anfang das Trockenfutter zusätzlich eingeweicht wurde. Als orales Analgetikum wurde 0,06ml Meloxicam verabreicht.



a) Eröffnung und Darstellung des Kieferwinkels



b) Trepanation des 5 mm critical-size-Defektes



c) Abhebeln des Knochenspanes mit Hilfe eines Skalpells



d) eröffneter critical-size-Defekt



e) Implantat in situ



f) Fixation der Muskelschlinge und anschließende Hautnaht

Abb. 4-2 Ablauf der Operation

4.1.4 Opferung und Präparation

Bevor die Ratten mittels einer Überdosis Narcoren (Pentobarbital-Natrium 80mg/kgKG) am 7., 14., 28., 56. und 112. Tag getötet wurden, wurden sie in einer Plastikbox durch Inhalation von Isofluran narkotisiert. Die verschiedenen Zeitpunkte wurden gewählt, um die Wirkung des Titanimplantates auf den Knochendefekt im Laufe der Zeit feststellen zu können, wobei der lange Zeitraum von 112 Tagen gewählt wurde, um eventuelle überschießende Knochenbildung, sowie Entartung innerhalb und außerhalb des Defektbereiches zu erfassen. Zu Beginn der Präparation wurden die auf dem Rücken liegenden Tiere durch eine mediane submandibuläre Inzision von den Canini bis etwa auf Höhe des Thymus eröffnet. Ausgehend vom margo inferior des Unterkiefers erfolgte nun die Freilegung des Unterkiefers von medial und lateral. Vor allem im lateralen Bereich musste wegen des auf dem Defekt platzierten Titanimplantates vorsichtig präpariert werden. Daher wurde der Masseter-Muskel initial teilweise belassen, um später nach vollständiger Explantation bei besserer Übersicht die restlichen Muskel- und Sehnenreste zu entfernen. Rechter und linker Unterkiefer zuzüglich dazugehöriger Implantate wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben, wobei jeweils der linke Kiefer bei -80°C eingefroren wurde (flüssiger Stickstoff), während der rechte Kiefer in 100%igem Methanol bei $2-4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank dunkel gelagert wurde. Nach Fotodokumentation und radiologischer Untersuchung (konventionelles Röntgen und Mehrschicht-Spiral-CT = MSCT), die im Folgenden beschrieben werden, wurden die Kieferhälften mit einer oszillierenden Diamantsäge unter Kühlung für die Mikro-CT (μCT) und Histologie so zugetrimmt, dass ein etwa Centstück großes Präparat mit einer planparallelen ventralen Schnittfläche entstand (Abb. 4-3).

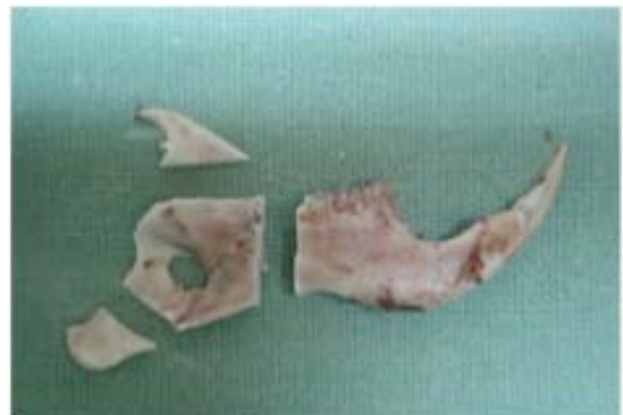


Abb. 4-3 Probenpräparation
Links: Critical-size-Defekt, Titanplättchen
Rechts: Unterkiefer, getrimmt

4.2 Auswertungsverfahren

4.2.1 Fotodokumentation

Alle Präparate wurden unter Verwendung einer 4,5 Megapixel Digitalkamera (Fa. Nikon, Cool Pix) standardisiert mit Stativ, d.h. gleiche Einstellung bei gleichem Abstand, von medial und lateral abfotografiert. Da eine Unterscheidung zwischen Knochen und Weichgewebe mit dieser Modalität meist nicht möglich ist, ist eine Aussage bezüglich der Knochenneubildung im Defektbereich bei den makroskopischen Aufnahmen nur sehr eingeschränkt möglich, so dass hierzu die deutlich exakteren und besser zu beurteilenden radiologischen Verfahren herangezogen wurden. Die makroskopischen Fotos kamen letztendlich als zusätzliches Bildmaterial zum Einsatz und wurden bei unklaren Verhältnissen bezüglich der anderen Methoden vergleichend bzw. ergänzend hinzugezogen (Abb. 4-4 und Abb. 4-5).

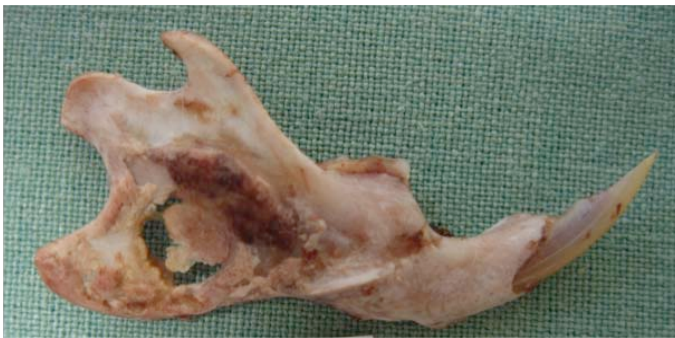


Abb. 4-4 makroskopisches Bild nach 14 Tagen

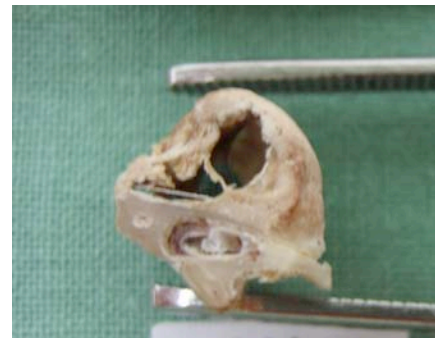


Abb. 4-5 Coronare Ansicht mit ektopter Knochenbildung

4.2.2 Konventionelles Röntgen/Zahnfilm

Mittels eines herkömmlichen Zahnröntgengerätes (Fa. Gendex Corporation, Des Plaines, IL, USA) wurden alle Kiefer sowohl von medial als auch von lateral radiologisch untersucht. Die Aufnahmen wurden mit einem Kodak Ultra-speed Zahnröntgenfilm Nr. 2 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) bei 70KV und 7mA für 0,08sec durchgeführt und anschließend entwickelt. Für die standardisierte Auswertung wurden nur die Aufnahmen von lateral verwendet. Die Fotos wurden auf einem Röntgenbetrachtungsschirm aufgehängt und in gleichem Abstand fotografiert (Abb. 4-6a). Anschließend wurden die Fotos auf einen Computer übertragen, und alle Defekte mit einer selbst angefertigten maßstabsgetreuen Rasterschablone (Abb. 4-6b) versehen und so in neun Felder unterteilt. Dabei wurde sowohl für vollständig knöchern konsolidierte, als auch teilweise konsolidierte Felder ab einem Zuwachs von

mehr als 50% der Wert 1 vergeben, während freie Felder ohne Knochenzuwachs den Wert 0 bekamen. So war es möglich, alle Felder mit neu gebildetem Knochen zu zählen und zu jenen ohne Knochen ins Verhältnis zu setzen. Damit waren nun differenzierte Aussagen bezüglich der genauen Lokalisation des neu gebildeten Knochens im Defekt, d.h. im ventralen, mittleren und dorsalen Bereich, möglich. Hierbei bildeten wir der Übersicht halber zwei Gruppen, wobei die blaue Lokalisation ($v1+v2+v3 +m1$) der ventralen und die rote Lokalisation ($m2+m3+d1+d2+d3$) der dorsalen Zuordnung entspricht (Abb. 4-8). Die errechneten Prozentwerte wurden in einem dreidimensionalen Säulendiagramm graphisch dargestellt. Dies soll am Beispiel der $2,5\mu\text{g}$ BMP-2 Plasmidgruppe veranschaulicht werden (Abb. 4-7). Die Untersuchung, insbesondere das Setzen der vorgefertigten Schablone auf den Defektbereich (Abb. 4-6b), wurde aus technischen Gründen von zwei Untersuchern durchgeführt, da in unklaren Fällen mit Hilfe der zwei- und dreidimensionalen μCT -Bilder und zusätzlich der makroskopischen Fotos die zu bestimmende ROI genau festgelegt wurde. Dies führte zu einer erheblichen Verbesserung der Genauigkeit aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit und zu einem enormen Zeitgewinn.

a)



b)



Abb. 4-6 Radiologische Untersuchung
a) Verfahren zum Fotografieren der radiologischen Bilder auf dem Röntgenbe-
trachtungsschirm
b) Rasterschablone im Defektbereich

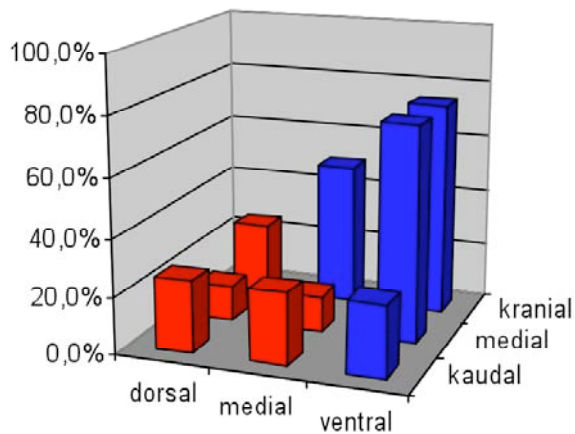


Abb. 4-7 Säulendiagramm

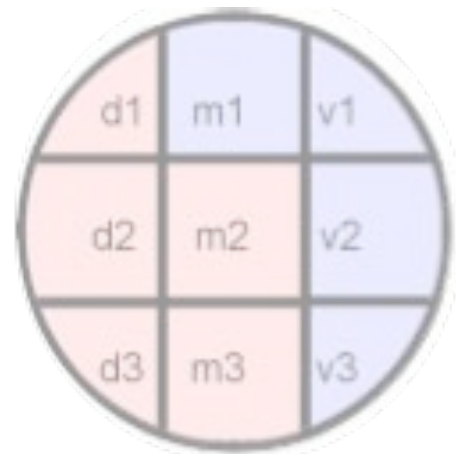


Abb. 4-8 Feldeinteilung des Defektes zur radiologischen Auswertung

Darüber hinaus wurden von allen Präparaten zwei homogene Gruppen gebildet: Eine ventrale mit Kontakt des Defektes zum Parodontalspalt (PA-Spalt) und eine dorsale mit definiertem Abstand zum Parodont, so dass es möglich war, Aussagen über die Knochenregeneration in Abhängigkeit von der Lokalisation des Defektes zu machen (Abb. 4-9 und Abb. 4-10).

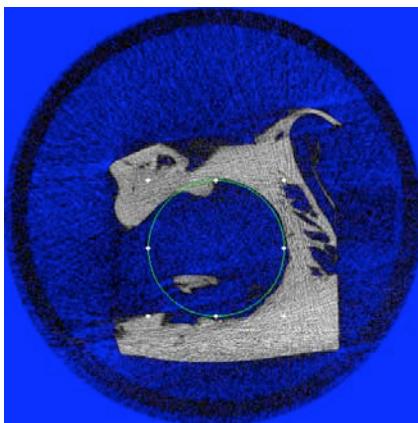


Abb. 4-9 μCT, 2D, kein Kontakt zum PA-Spalt

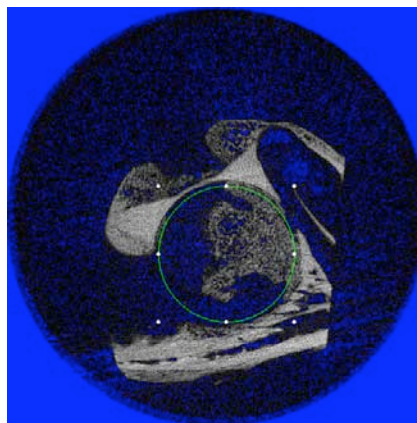


Abb. 4-10 μCT, 2D, Kontakt zum PA-Spalt

4.2.3 Mehrschicht-CT

Sämtliche Knochenproben wurden vor dem Zurechttrimmen mit einem 16-Zeilen-Multislice-CT (Somatom Volume Zoom Scanner, Sensation 16, Fa. Siemens Medical Solutions®, Erlangen, Deutschland) in einer Ortsauflösung von 210x210x500 μm (Pixelgröße: 100x100x100 μm) gescannt (Abb. 4-11).

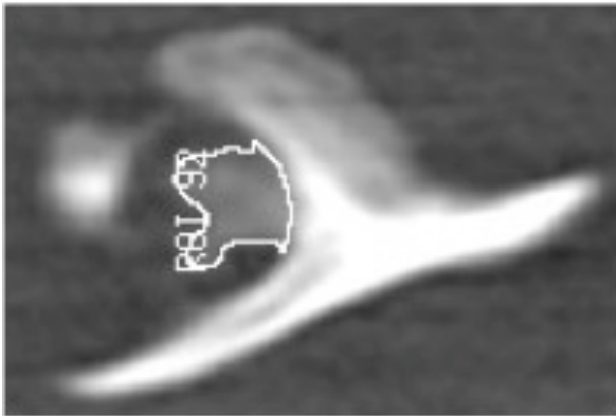


Abb. 4-11 MSCT, 2D sagittal, ROI

Dazu nutzten wir ein hochauflösendes Scan Protokoll mit 120 kV, 300 mAS eff., einem Field of view (FOV) von 50 mm und einer Kollimation und einem Tischvorschub von 0,5 mm. Diese Datensätze wurden mit den beiden hochauflösenden Faltungskernen „U80 u very sharp“ und „U90 u ultra sharp“ und einer Schichtdicke von 0,5 mm rekonstruiert. Diese Faltungskerne sind in der klinischen Routine für hochauflösende Innenohraufnahmen mit eingeschränktem FOV vorgesehen [Bauer 2004, Bauer 2006a, Bauer 2006b]. Um Dichtewerte generieren zu können, wurde bei den Untersuchungen ein Festkörperkalibrierungsphantom mitgescannt. Die axialen Bilder wurden zu einer Leonardo Workstation (Siemens Medical Solutions®) transferiert, und sagittale Reformationen in gleicher Schichtdicke wie die axialen Bilder generiert. Alle Bilder wurden im DICOM-Format an eine Offline-Workstation zur weiteren Auswertung transferiert. Mit in IDL (Creaso, Gilching) selbst programmierter Software wurde der neu gebildete Knochen innerhalb des Defektes automatisch mit einem Schwellenwertverfahren segmentiert. Anschließend konnten so Fläche, Dichte und Masse des neu gebildeten Knochens berechnet werden. Die Ergebnisse dienen der vergleichenden Beurteilung des Regenerationsgrades und der erweiterten Darstellung der Critical-size-Region. Zusätzlich bot sich hierdurch eine Qualitätskontrolle der korrekten μCT -Einstellung zur Erfassung der ehemaligen Defektregion.

4.2.4 μ CT

Zur detaillierten, dreidimensionalen Darstellung und Bestimmung verschiedener morphometrischer Parameter des neu gebildeten Knochens dienen in dieser Arbeit die Mikrocomputertomographiesysteme μ CT 20 und 40 der Fa. Scanco Medical® AG, (Brüttisellen, Schweiz, Abb. 4-12). Die μ CT-Analyse ist ein invasives, nicht destruktives Verfahren, das eine Untersuchung des Hartgewebes bis auf eine Pixelgröße von 0,5 μ m (μ CT 50) zulässt, ohne dass die Proben speziell vorbereitet werden müssen. Die zerstörungsfreie Untersuchung erhält die Proben für zusätzliche ergänzende Untersuchungen, wie biomechanische Tests oder auch histologische Untersuchungen, was einen wesentlich größeren Datensatz und Erkenntnisgewinn pro Probe sicherstellt. Unterkiefer unserer Größe (Abb. 4-13) konnten mit einer isotropen Auflösung von 15 μ m bzw. 8 μ m (μ CT 20 bzw. μ CT 40) gemessen werden (Tab. 4-2).



Abb. 4-12 Scanco μ CT 40

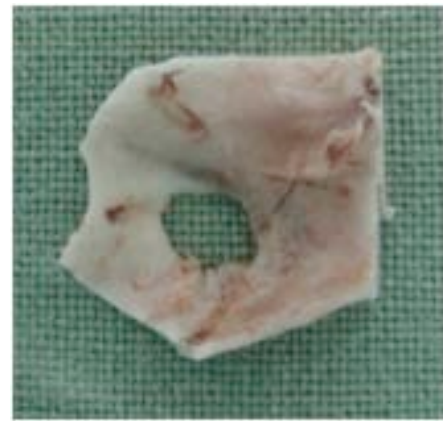


Abb. 4-13 Unterkiefer, getrimmt

Dank der isotropen Auflösung entspricht die Schichtdicke immer der Pixelgröße innerhalb einer Schicht. Die technische Basisentwicklung der μ CT geht auf die Vorarbeiten von Rügsegger und Mitarbeitern zurück [Rügsegger 1996]. Bei dem μ CT 20/40 handelt es sich um eine Fächerstrahl-/Kegelstrahl-Mikrofokusröhre mit einer Fokusgröße von 7/5 μ m als Quelle und einem CCD-Sensor als Detektor, womit eine maximale Auflösung von 8/6 μ m nominal (Pixelgröße) bzw. 20/9 μ m (10 % MTF) generiert werden kann. Das μ CT 40 stellt das Nachfolgemodell des μ CT 20 dar. Die beiden Scanco μ CT 20 und 40 unterscheiden sich in der Leistung und v.a. in der daraus resultierenden Messzeit pro Schicht (Tab. 4-2).

Scanco μ CT	Messdauer/ 1 Schicht	Schichtdicke/ 1 min	Auflösung	Probenhalter- durchmesser	Integrations- zeit	Röhren- stromstärke
20	2,096 min	0,477	15 μ m	15,4 mm	200 ms	160 μ A
40	0,087- 0,144 min	6,965-11,474	8 μ m (\varnothing 16,4) 15 μ m (\varnothing 30,4)	16,4 mm 30,4 mm	200 ms	145 μ A

Tab. 4-2 Technische Unterschiede zwischen μ CT 20 und 40

Das μ CT 40 stand uns erst in der zweiten Hälfte des tierexperimentellen Teiles zur Verfügung. Um die hierdurch gegebenen Erweiterungsmöglichkeiten nutzen zu können, wurden zuerst 10 Mandibulae mit beiden μ Ct gemessen, um auch etwaige kleinste Unterschiede auszuschließen [Eloot 2010]. Erst dann folgte die ausschließliche Nutzung des μ CT 40. Zur Vorbereitung der Messungen der Mandibula-Knochenexplantate mittels Scanco μ CT 20 und 40 wurden diese zunächst auf einen maximalen Durchmesser von 14 mm bzw. in Ausnahmefällen zusätzlich bei ektoper Knochenneubildung 29 mm (nur mit μ CT 40 mgl.) um den ehemaligen Defektbereich herum mit einer Mikrosäge verkleinert. Die entsprechend angepassten Präparate wurden innerhalb des transparenten Messröhrchens in 5 „Etagen“ fest und in paralleler Anordnung in einer speziell konstruierten Halterung platziert (Abb. 4-14). Zur Fixierung dieser Proben und zur Vermeidung des Austrocknens durch Temperaturerhöhungen während der durchschnittlich 10,59/0,54 Stunden dauernden Messung wurde der Probenhalter mit 100 % Methanol gefüllt. Als Vorbereitung jeder μ CT-Aufnahme muss zunächst in der SCOUT VIEW-Darstellung, die etwa einem herkömmlichen Röntgenbild entspricht, die Messregion durch sorgfältige Bestimmung des zu scannenden Bereichs der Probe festgelegt werden (Abb. 4-15).

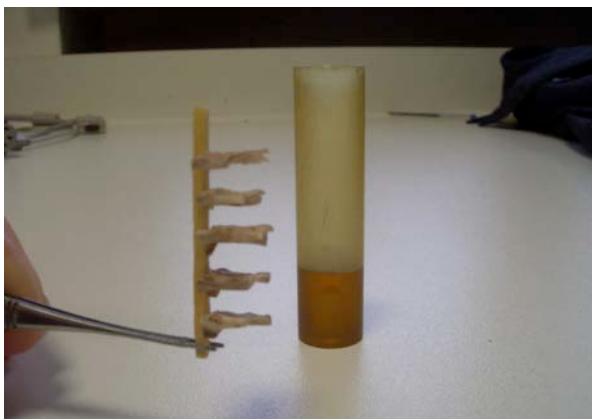


Abb. 4-14 Halteapparatur zur horizontalen Fixation von 5 Knochenproben im Messröhrchen

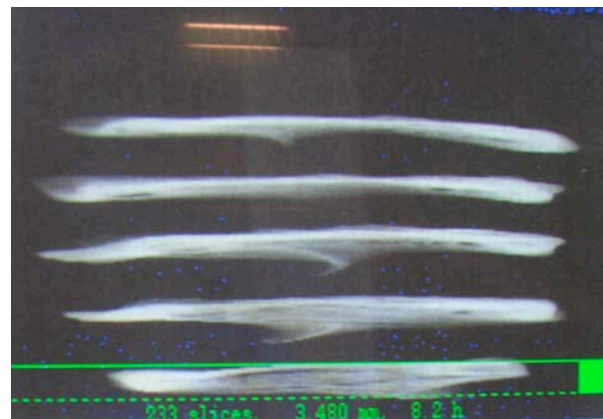


Abb. 4-15 Scout View-Einstellung

Gescannt wurden im Durchschnitt jeweils 302 Schichten in der Mitte der Knochenprobe, entsprechend einem zylindrischen Volumen von 5 mm Durchmesser mit durchschnittlich 4,53 mm Höhe. Die Scans mit einer Schichtdicke von 0,015 mm respektive 0,008 mm erfolgten mit „High resolution Scan Mode“ und einer Integrationszeit von 200 ms, entsprechend 600 (1000) Projektionen pro Schicht mit jeweils 1024 (2048) Messpunkten pro Schicht über einen Winkel von 216° (180°) [Nazarian 2008]. Die Integrationszeit bezieht sich hier auf die Zeit, die der Detektor der eintreffenden Röntgenstrahlung pro Projektion ausgesetzt ist. Um den Einfluss der Probengeometrie auf die rekonstruierten linearen Abschwächungskoeffizienten zu minimieren (beam hardening-Effekte = Strahlauhfärtungsartefakte = BHA), wurde ein spannungs- und scannerspezifischer Korrekturalgorithmus basierend auf einem 1200 mg HA/ccm Phantom (HA-Kunststoffmischung) angewendet, welcher dem früher angewandten 200-er Phantom bei Knochen höherer Dichte überlegen sein soll [Fajardo 2009, Kazakia 2008]. Nach Rekonstruktion der Daten erfolgte die Analyse der mikrostrukturellen Parameter innerhalb des ehemaligen Mandibular- Defektbereiches an einer VOI von 5 mm Durchmesser und beliebiger Dicke, entsprechend der Ausdehnung der Knochenregeneration in der bucco-lingualen Ebene, um die 3D-Auswertung zu erhalten (Abb. 4-16 und Abb. 4-17). Dies erfolgte mit der speziellen Software IPL (Image processing language) (Scanco Medical AG, Brüttisellen).

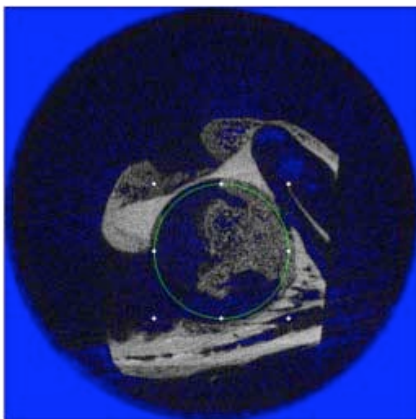


Abb. 4-16 μ CT, 2D, ROI einer Schicht

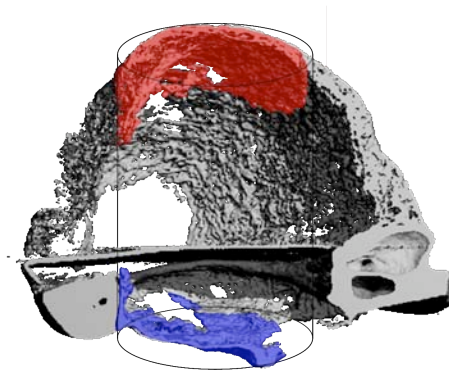


Abb. 4-17 μ CT, 3D coronar mit VOI (5mm Durchmesser), blau neu gebildeter Knochen innerhalb des Defektes, rot ektooper Knochen (vgl. Abb. 4-5)

Dieses Verfahren benötigt zur Berechnung von Messungen Schwellenwerte und spezielle Filter (Sigma und Gauß – spezielle programmspezifische Rechenfunktionen zur Rauschunterdrückung), die vom Benutzer definiert werden müssen. Die Einstellung des Schwellenwertes erfolgte mit Hilfe eines Histogrammes. Der Schwellenwert gibt die Grenze innerhalb einer Grauskala an, unterhalb derer die Voxel als Mark definiert werden und oberhalb derer die Voxel dem Knochen zugeordnet werden. Für diese Studie wurde ein einheitlicher Schwellenwert genutzt, obwohl Feldkamp et al. [Feldkamp 1989] die Nutzung von individuellen Schwellenwerten empfahl. Da es sich jedoch um einen einheitlichen Knochentyp handelt und die Werte verglichen werden sollten, wurde wie heute üblich dem Vorgehen von Rügsegger et al. [Rügsegger 1996], Ding et al. [Ding 1999] und Muller et al. [Muller 1998] mit einem einheitlichen Schwellenwert der Vorzug gegeben. Unser Schwellenwert für den Kallus lag bei 230 (pro Mille vom maximalen Grauwert), der Gauß Sigma bei 1,2 und der Gauß Support bei 2. Dies erlaubt uns, folgende nicht volumenabhängigen Parameter direkt dreidimensional zu bestimmen:

Bone volume (BV); tissue mineral density (TMD)=material density=bone tissue density=degree of mineralisation; bone mineral content (BMC); trabecular thickness (Tb. Th.); degree of anisotropy (DA); bone surface (BS); structure model index (SMI); Strukturparameter dienen der einheitlichen Beschreibung und Quantifizierung der Mikroarchitektur untersuchter Objekte [Underwood 1969, Parfitt 1987].

Traditionell wurden zur exakten Analyse der Histomorphometrie des Knochens zweidimensionale histologische Schnitte herangezogen. Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen von Singh [Singh 1978], ist es zur Definition eines Stab- [Parfitt 1987] und eines Plattenmodells [Parfitt 1983] gekommen, um von zweidimensionalen histologischen Schnitten auf die dreidimensionale Mikroarchitektur des Knochens schließen zu können. Die alleinige Annahme eines Platten- oder eines Stabmodells führt jedoch zu unterschiedlichen Werten des gleichen Parameters, zudem berücksichtigt es keine altersbedingten Änderungen in der Architektur des Knochens (Umwandlung von einem plattenähnlichen in ein mehr stabähnliches Netzwerk) [Engelke 1999], darüber hinaus besteht das Geflecht üblicherweise aus Übergangsformen beider Modelle. Da sich die Knochenstruktur im Rahmen von Remodellingprozessen von einer Platten- zu einer Stabstruktur verändert, ist es z. B. nicht möglich, die Trabekeldicke zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander zu vergleichen, wenn das Plattenmodell zu Grunde gelegt wird [Kinney 1995, Day 2000].

Auf der Grundlage der Mikro-CT ist es jedoch möglich, dieses Problem zu lösen und modellunabhängige 3D-Strukturparameter zur Strukturquantifizierung zu ermitteln:

Bone Volume Fraction (BV/TV):

BV=bone volume in [mm³] abhängig vom Schwellenwert (Helligkeit der Voxel);
BV/TV=Verhältnis des Volumens des Knochens (BV) zum gesamten Volumen (TV) innerhalb der untersuchten Probe= Knochenvolumenanteil in % (Goulet et al. 1994).
Von der American Society of Bone and Mineral Research anerkannte Definition [Parfitt 1987, Amling 1996].

Tissue Mineral Density (TMD):

Grauwert nur von dem Segmentierten (Schwellenwert), also nur vom Material (Knochen), nicht von TV abhängig. Die Knochendichtemessung wurde mittels eines 5-stufigen Hydroxylapatit-Phantoms in aufsteigender Konzentration (0,0 / 99,4 / 199,3 / 399,9 / 802,0 mg HA/cm³) kalibriert (Abb. 4-18), wobei die Umrechnung in den Knochendichtewert (g HA/cm³) anhand des jeweiligen Hounsfield-Unit-Wertes erfolgte. Das Ziel war hierbei die Bestimmung der Knochendichte. Die Nachteile der TMD im Vergleich zur volumenabhängigen bone mineral density (BMD) bestehen in der Abhängigkeit vom Schwellenwert und den Partialvolumeneffekten (PV), welche ausgeglichen werden sollen, indem zwei Pixel von jeder Seite der Oberfläche abgezogen werden. Daher muss das Objekt mindestens fünf Pixel umfassen, was bei allen unseren Proben der Fall war [Kazakia 2008, Burghardt 2008, Morgan 2009].

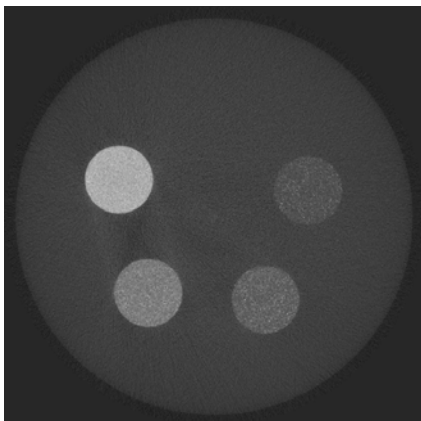


Abb. 4-18 Hydroxylapatitprüfkörper

Bone Mineral Content (BMC):

Wird definiert als BV x TMD in mg, wobei für die von jeder Oberfläche ausgeschlossenen zwei Pixel die gleiche Dichte angenommen wird [Morgan 2009].

Trabecular Thickness (Tb. Th.):

Messung der durchschnittlichen Trabekeldicke, bzw. der Voxel innerhalb der Probe, welche dem Knochen zugeordnet werden. Hierbei wird für jeden Punkt der Durchmesser eines maximalen Kreises, der noch innerhalb der Struktur liegt und den Punkt einschließt, ermittelt (Abb. 4-19) [Tamada 2005]. Der Durchmesser stellt die lokale Dicke an diesem Punkt dar. Dieser nicht volumenabhängige Parameter wird in mm angegeben [Goulet 1994].

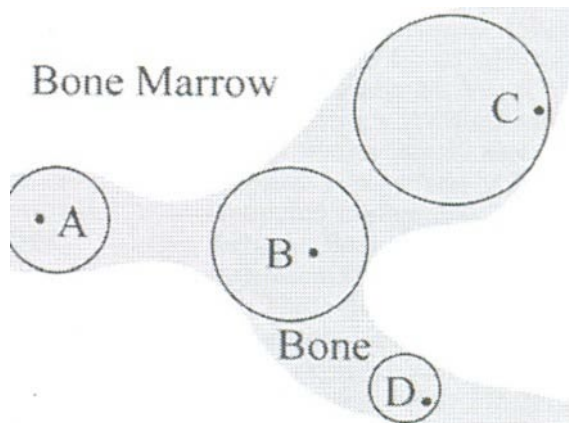


Abb. 4-19 Bestimmung der lokalen Trabekeldicke

Degree Of Anisotropy (DA):

Der nicht volumenabhängige, rein dreidimensionale Parameter Anisotropie beschreibt die vorherrschende räumliche Ausrichtung der Trabekel innerhalb des Knochens dimensionslos. Der Grad der Anisotropie ist umso höher, je stärker die Ausrichtung der Trabekel in eine bestimmte Richtung ist. 1=isotrop, d.h., es liegt keine Vorzugsrichtung vor. Je höher der Wert, desto mehr liegt eine Orientierung in eine bestimmte Richtung vor. Quantifiziert wird dieser Parameter mit Hilfe der Mean Intercept Length für trabekulären Knochen (MIL-Methode) nach Whitehouse [Whitehouse 1974] und Odgaard [Odgaard 1997].

Bone Surface to Volume Ratio of Bone (BS/BV):

Der Parameter BS/BV gibt das Verhältnis der Oberfläche des Knochens (BS) zum Volumen des Knochens (BV) mit der Einheit mm^{-1} wieder [Goulet 1994]. Als Bone surface (BS) in mm^2 stellt er die unabhängige/nicht volumenabhängige Knochenoberfläche dar.

Structure Model Index (SMI):

Der SMI ist dimensionslos, nicht volumenabhängig und wurde von Hildebrand und Rüegsegger 1997 vorgestellt. Er besagt, ob in einer Probe die stabförmigen oder die plattenförmigen Trabekel überwiegen. Dieser Parameter liegt bei 0 für eine ideale Plattenstruktur, für eine ideale Stabstruktur beträgt der Wert 3 und bei einem realen Trabekelnetzwerk mit Übergangsformen befindet er sich inmitten beider Werte. Bei Proben gleicher Knochendichte kann demnach trotzdem eine unterschiedliche Trabekelstruktur vorherrschen, was durch den SMI dargestellt werden kann. Er ist unabhängig von der Dicke der Trabekel [Hildebrand 1997], wobei eine plättchenförmige Struktur stabiler als die stäbchenförmige gilt [Bevill 2006], so dass man hier auch auf die Belastungssituation rückschließen kann. Er kann auch negative Werte bis -1 annehmen, was für eine extrem dichte, konkave plattenförmige Struktur spricht. Zudem korreliert er mit BV/TV (Platte=hohes BV/TV, Stab=niedriges BV/TV).

Diese 3D stereologischen Indizes entsprechen den Definitionen der Standardhistomorphometrie, wobei die Validität und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu anderen histomorphometrischen Methoden zur Bewertung der Knochenarchitektur in verschiedenen Arbeiten belegt wurde [Kuhn 1990, Uchiyama 1997, Engelke 1999, Ito 1998, Muller 1998, Barbier 1999, David 2003, Thomsen 2005]. In der anschließenden optischen Wiedergabe der Messungen wurde zur Differenzierung des Kallus vom ortsständigen Knochen eine farbkodierte Dichtedarstellung gewählt, welche auf der Helligkeitsverteilung der Voxel basiert. Dabei stellt sich ortsständiger, höher mineralisierter Knochen hell/weiß dar, während sich neu gebildeter, wenig mineralisierter Kallus mit erhöhter Transluzenz blau darstellt (Abb. 4-20).

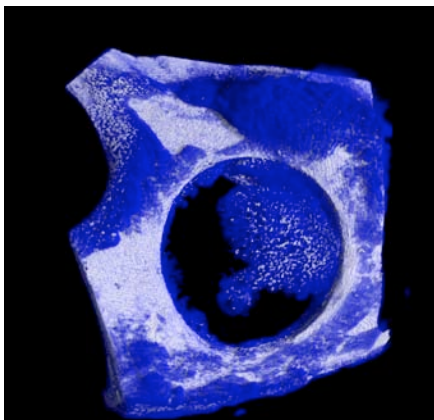


Abb. 4-20 μ CT, 3D, farbcodierte Dichtedarstellung

Abschließend wurden die digitalen VOI-Daten auf Harddisk/Magnetband gespeichert und können mit den Messdaten erneut geladen werden.

In der hier vorgestellten Anwendung in der präklinischen Forschung dient der μ CT-Einsatz der post mortem Kontrolle, der Überprüfung anderer zur Anwendung gekommener Analysemethoden wie der Histomorphometrie, konventionellen Radiologie und Mikroradiographie und der dreidimensionalen Quantifizierung der in diesem Tiermodell stattfindenden Umbauprozesse.

4.2.5 Histologie/Histometrie

Zum Anfertigen der histologischen Schnitte wurde das Einbettverfahren mit Methylmethacrylat (MMA) verwendet, wobei wir ein standardisiertes Protokoll der Anatomischen Anstalt der LMU München (PD Dr. Milz) nutzten (Tab. 4-3).

Tag	Medien
1-2.	100% Methanol.
3.	70% ETOH, abends 80% ETOH
4.	90% ETOH
5+6.	100% ETOH
7/-8.	Aceton (reinst)
9-12.	Einlegen in MMA (Vakuum)
12-15.	Wechsel des MMA (Vakuum)
15-22.	Einbettgemisch (Vakuum): 100 ml MMA, 25 ml Plastoid, 3,5 g Benzoylperoxid
22.	Erneuerung des Einbettgemisches (Vakuum) Wasserbad
ab 23/24 .	Polymerisation im Wärmeschrank
25.	Aushärten im Brutschrank (37 Grad)
ab 27.	Anfertigung der Schliffpräparate
Tab. 4-3	MMA-Einbettverfahren der Anatomischen Anstalt München

Alle aus den Tierversuchen entnommenen Proben wurden nach Reduktion des umgebenden Weichteilmantels in 100% Methanol bei 4 Grad fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Münchener Einbettgemisch eingebettet. Nach Aushärtung wurden die MMA-Blöcke aus dem Glas genommen und nachfolgend mit einer Standstichsäge auf Zylinder (Abb. 4-21) zugeschnitten, wobei durch selbst aufgezeichnete Linien darauf geachtet wurde, parallel zum Schaft zu schneiden. Darauf wurden die Zylinder mit Cyanolit-Kleber auf die für die Leica® SP 1600 Innenlochsäge (Abb. 4-22) bestimmten Messingblöcke geklebt.

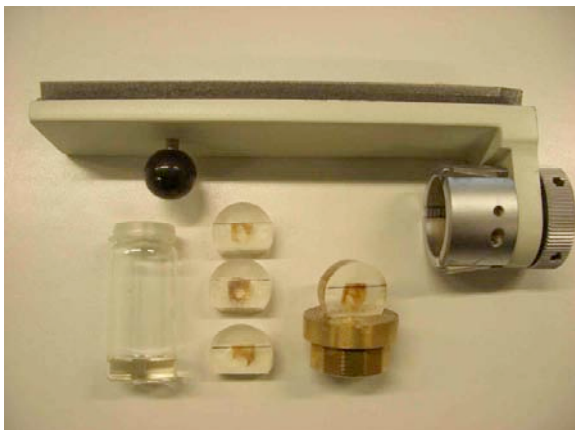


Abb. 4-21 Einbettgläser, zugeschnittene Zylinder, aufgeklebte Probe und Halterung der Innenlochsäge



Abb. 4-22 Innenlochsäge Leica® SP1600

Mit Hilfe eines speziellen Mikrotoms wurden nach Aushärtung der Einbettmasse $100\pm 10\mu\text{m}$ dicke coronare Schnitte der unentkalkten Knochen gemäß der Sägeschlifftechnik nach Donath and Breuner [Donath 1982] angefertigt, so dass der 5 mm durchmessende Kieferwinkeldefekt durch 13 – 14 Schnitte vollständig durchgeschichtet wurde (Abb. 4-23).

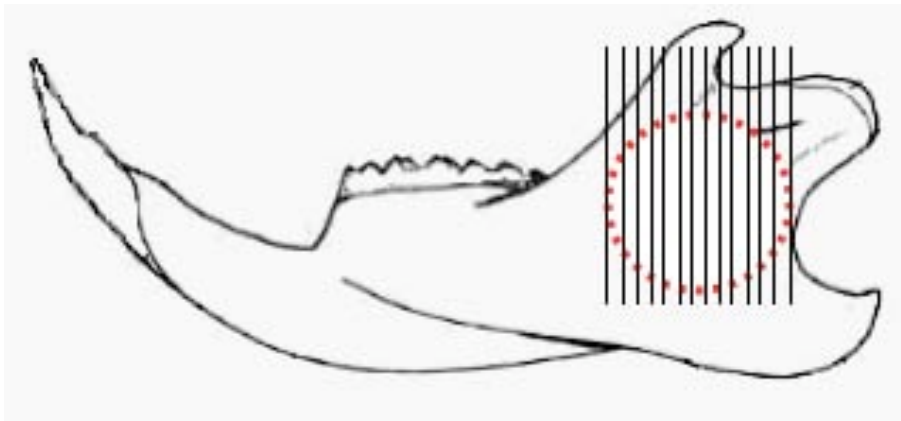


Abb. 4-23 Schema der histologischen und mikroradiographischen Schnittebene

Zur Orientierung wurden diese Schnitte mit einer histologischen Standardfärbung (Hämatoxylin & Eosin Färbung) gefärbt, zur besseren Differenzierung des neu gebildeten Kallus vom ortsständigen Knochen zusätzlich mit der Färbung nach Levai-Lazcko, welche es erlaubt, verschiedene Mineralisationsgrade des Knochens voneinander zu trennen. Einige ausgewählte Schnitte wurden abschließend mit Hilfe einer Präzisionsmikroschleifmaschine (Fa. Exakt, Norderstedt, Germany) auf ca. $50\text{--}70\mu\text{m}$ geschliffen und anschließend glatt poliert.

Die gewonnenen Proben wurden mit den folgenden Substanzen zur Darstellung verschiedener Aspekte innerhalb der Knochenneubildung, aber auch der Darstellung der Weichgewebe, angefärbt.

Zur Anwendung kamen in dieser Arbeit die Färbungen nach

1. Laczko Levai (alle Schnitte)
2. Hämatoxylin Eosin-Färbung
3. Trichrom Masson Goldner
4. Von Kossa – mit Gegenfärbung: Giemsa-/ Säurefuchsin-/ Hämatoxylin Eosin-Färbung

Die Färbung nach Laczko-Levai [Fritsch 1989, Jenö 1975] (Tab. 4-4) wurde für alle Schnitte insbesondere zur Differenzierung zwischen ortsständigem (vorbestehen-

dem) und neu gebildetem Knochen zur histometrischen Auswertung der Schnitte verwendet. Hämatoxylin Eosin-, Trichrom Masson Goldner- und von Kossa-Färbungen (mit/ohne Gegenfärbung) wurden für ausgewählte Schnitte, v.a. zur vergleichenden Darstellung des Mineralisationsprozesses gewählt.

1.	Schliff abwischen mit Aceton-Alkohol (1:1)
2.	15 Minuten einlegen in 10% H ₂ O ₂
3.	Abspülen mit H ₂ O
4.	Lösung "A" (doppelt filtrieren) 3-5 Minuten
5.	Abspülen mit H ₂ O
6.	Pararosanilin 2-5 Minuten
7.	Abspülen mit H ₂ O
8.	Schliff trocknen und differenzieren mit 96%igem Alkohol. Kurz abwischen!
9.	Deckglaseindeckung
Tab. 4-4 Protokoll Laczko - Levai -Färbung	

Bei der Hämatoxylin Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) handelt es sich um die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, wobei Hämatoxylin ein positiv geladener Farbstoff ist, der negativ geladene ("basophile") Strukturen wie z.B. die DNS des Kernchromatins blau färbt, wobei Eosin als negativ geladener Farbstoff zur Gegenfärbung aller restlichen Strukturen in verschiedene Rot-Töne ("Azidophilie") dient.

Die 1937 von Goldners etablierte Trichrom Methode gilt heute als Standardknochenfärbung für nicht entkalkte Knochenschnitte [Gruber 1992], wobei der mineralisierte Knochen sich hierbei leuchtend grün färbt, das Osteoid in kräftigem Rot erscheint und das Zytoplasma und Bindegewebe einen orangefarbenen Ton hat. Es ergibt sich hierbei eine klare Differenzierung von Kollagen und Weichteilen wie Muskeln und Gefäßen, aber auch mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix wird farblich klar unterschieden.

Die *von Kossa*-Farbreaktion dient dem Nachweis von Kalziumsalzen und bewirkt eine eindrucksvolle Schwärzung aller mineralisierten Gewebeanteile, hierbei wurde zur Darstellung der zellulären und nicht mineralisierten Anteile mit Giemsa gegengefärbt [Piattelli 1994].

Im Folgenden wird auf die Methodik der histomorphometrischen Auswertung und Interpretation eingegangen, wobei diese Schwerpunkt einer anderen Promotion darstellt. Diese Daten sollten mit denen des μ Ct korreliert werden. Zur histomorphometrischen Auswertung der Präparate kam das computerunterstützte Bildanalyse-System KS 400 (Firma Carl Zeiss, Jena, Deutschland) zur Anwendung.

Dabei wurden die Präparate zur Übersicht mit einem Wild® Makroskop M 420 bzw. zur Detailbeurteilung mit einem Stereomikroskop Zeiss Axiophot (Fa. Carl Zeiss®, Jena, Deutschland) und einer CCD-Videokamera XC-007P (Fa. Sony®, Japan) aufgenommen und in die Computereinheit mit dem Bildanalyseprogramm übertragen. Knochenneubildung wurde im Defektbereich (Abb. 4-24a), außerhalb des Defektbereiches, z.B. im Massetermuskel (ektoper Knochenneubildung) (Abb. 4-24b), gemessen, zudem der vor der Trepanation in diesem Defektareal bestehende ortsständige Knochen (Abb. 4-24a), sowie ein eventuell noch vorhandener Restdefekt (Abb. 4-24a). Vom Programm erfolgten die Berechnungen sämtlicher Flächen in mm^2 .

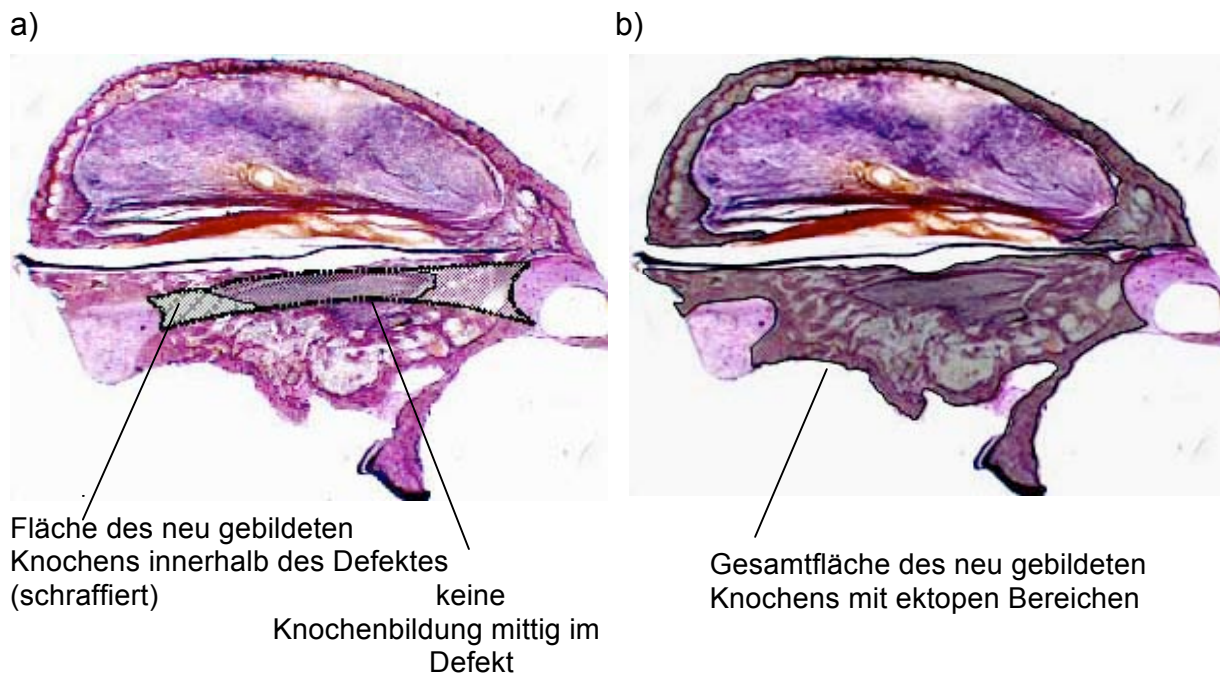


Abb. 4-24 Schemazeichnung zur Erläuterung der histometrischen Auswertung
 a) ursprünglicher Knochen vor Defektsetzung (dunkelgrau unschraffiert) und neu gebildeter Knochen innerhalb des ursprünglichen Knochens (hellgrau schraffiert)
 b) gesamter neu gebildeter Knochen einschließlich ektopen Bereich (dunkelgrau)

Neben der Beurteilung des auf einzelne Untersuchungsgruppen bezogenen Knochenzuwachses pro Schnitt zu einem bestimmten Opferungszeitpunkt wurden bei der statistischen Auswertung zusätzlich unterschiedliche Knochenneubildungen innerhalb eines Defektes analog der μCT beurteilt. Dabei wurden Randschnitte mit zentralen Schnitten verglichen, um festzustellen, ob die unterschiedliche Verteilung der Zielzellen einen Einfluss auf das Volumen der gentherapeutisch induzierten Knochenneubildung hat.

4.2.6 Mikroradiographie

Zur vergleichenden Darstellung mit dem μ CT, sowie zur Objektivierung der histometrischen Daten wurden Mikroradiographien angefertigt. Dafür wurden je 36 Schnitte auf einer 10 x 10 cm großen Mikroradiographieplatte befestigt und mit einem Faxitron X-Ray Systems 43855A (Hewlett Packard, McMinnville Division, Oregon 97128) bei 2,5mA und 30 kV für 2 x 50 min belichtet. Entsprechend den Histologien wurden Übersichts- und Detailaufnahmen erstellt und mit der Software AxioVision Rel. 4.6 digitalisiert. Mit niedriger Röntgenintensität und verlängerter Belichtungszeit konnten feinste knöcherne Strukturen dargestellt werden und durch den direkten Kontakt des Schnittes mit dem Film (Kodak X-OMAT MA) erfolgte eine dimensionstreue Abbildung.

4.2.7 Polychrome Sequenzmarkierung

Es wurden den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten insgesamt sechs unterschiedliche Farbstoffe subkutan steril injiziert, um die Knochenneubildung im Bereich des critical-size-Defektes an den ungefärbten MMA-Schnitten mittels Fluorochromen zu detektieren und im Fluoreszenzmikroskop farblich zu visualisieren. Dazu wählten wir Calzein blau, Xylenolorange, Calzein grün, Alizarin, Rolitetracyclin und BAPTA, die als 3%ige Lösungen in 2%iger NaHCl_3 den Tieren unter Zugabe eines Lokalanästhetikums gefiltert appliziert wurden. Für die Evaluation stand das LSM 510 Meta NLO Fluoreszenzmikroskop in Verbindung mit der digitalen Mikroskopkamera AxioCam (Fa. Carl Zeiss MicroImaging GmbH) zur Verfügung. Das spezielle konfokale Laserscan Mikroskop mit Metadetektor und Biphotonenlaser erfasst das von einer einzigen Ebene der Probe reflektierte Licht, verrechnet es und setzt es zu einem Bild zusammen. Dieses Gesamtbild setzt sich aus der Anzahl von Einzelbildern zusammen, welche den Fluorochromen im zu untersuchenden Defektbereich entsprechen. Diese Einzelbilder wurden dann vermessen und die neu gebildete Knochenfläche anhand der verschiedenen Fluorochrome den jeweiligen Zeitpunkten zugeordnet. Diese Methodik ist Schwerpunkt einer anderen Promotion.

4.2.8 Statistische Auswertung

Es wurde sowohl zwischen den einzelnen Therapie- und Kontrollgruppen, als auch zwischen den einzelnen Messzeitpunkten einer jeweiligen Auswertungsgruppe ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, um differenzierte quantitative Aussagen über die radiologischen und histomorphometrischen Daten dieser orientierenden Vergleichsstudie mit mehrdimensionalen Messparametern machen zu können.

Weiterhin wurde zur radiologischen Auswertung der ventralen Gruppe mit Kontakt zum Parodontalspalt gegenüber der dorsalen Gruppe ohne Kontakt zum Parodontalspalt ein T-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Bei den radiologisch erhobenen Werten der Einzelfeldanalyse mit den prozentualen Anteilen des neu gebildeten Knochens abhängig von der Lokalisation wurde der Fisher Exact Test angewendet. Der Korrelationsvergleich der Proben des μ CT's gegen das MSCT bzw. die histomorphometrische Auswertung wurde mit Hilfe der Spearman Correlation bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einem Konfidenzintervall von 95% angenommen, wobei jegliche Werte als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben wurden. Für die statistische Auswertung stand einerseits das Programm SPSS (Version 14.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) und andererseits das Programm Origin (Version 5.0, OriginLab Cooperation, Northampton, USA) – insbesondere für die graphischen Darstellungen – zur Verfügung.

5 Ergebnisse

5.1 Makroskopische Darstellung

Klinisch fällt in der rhBMP-2 Gruppe die überschießende (heterotope) Knochenneubildung im Bereich der Masseter- und Digastricusmuskelschlinge und die Abnahme des ektop gebildeten Knochens vom 14.-112. Tag auf (Abb. 5-1 rechte Spalte). In der 2,5µg Plasmid Gruppe erfolgt die Regeneration vom anterioren Defektrand nahe der Schneidezahnwurzel aus (Abb. 5-1 linke Spalte).

Korrespondierende konventionell radiologische Aufnahmen (Zahnfilm) bestätigen dieses (Abb. 5-2).



14 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



14 Tage rhBMP-2 Protein



28 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



28 Tage rhBMP-2 Protein



56 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



56 Tage rhBMP-2 Protein



112 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



112 Tage rhBMP-2 Protein

Abb. 5-1 Makroskopische Darstellung der Knochenregeneration

5.2 Konventionell radiologische Darstellung



14 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



14 Tage rhBMP-2 Protein



28 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



28 Tage rhBMP-2 Protein



56 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



56 Tage rhBMP-2 Protein



112 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



112 Tage rhBMP-2 Protein

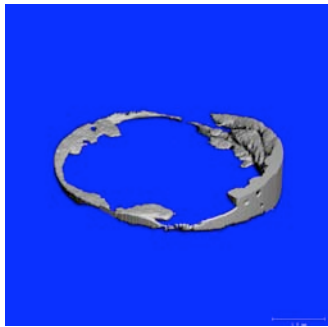
Abb. 5-2 Konventionell radiologische Darstellung der Knochenregeneration

5.3 μ CT und MSCT

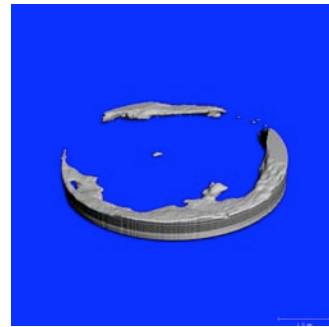
5.3.1 Volumen

Die Bestimmung von Objekt- (OV) bzw. Knochenvolumen (BV) stellt die initiale Basisuntersuchung jeder μ CT-Untersuchung dar. BV ist der objektivste Parameter zur Bestimmung des tatsächlichen, d.h. absoluten Knochenzuwachses abzüglich umliegender Luft und Weichgewebe und ermöglicht damit den objektiven Vergleich zwischen den einzelnen Therapie- und Kontrollgruppen.

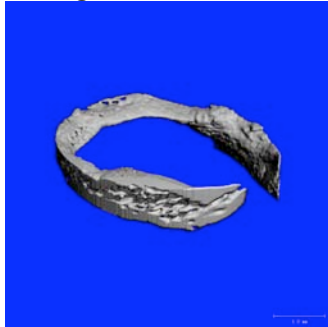
Da für den Nukleinsäuetransfer in vivo keine Dosis-, Wirkungsbeziehungen bekannt waren, wurden unterschiedliche Dosen für die Beschichtung des Titanplättchens eingesetzt. Diese reichten von 2,5 μ g bis 100 μ g DNS. In der 3D- μ CT-Darstellung (Abb. 5-3) des innerhalb des Defektes neu gebildeten Knochens nach 56 bzw. 112 Tagen sieht man in den Gruppen mit der Konzentration von 50 bzw. 100 μ g Plasmid eine nahezu ausgebliebene Knochenregeneration (nur randständig), während man bei abnehmender Konzentration ein zunehmendes Volumen beobachtet, welches bei einer Konzentration von 2,5 μ g zu einer vollständigen Konsolidierung führt (Abb. 5-3, Tab. 5-3 und Tab. 5-4).



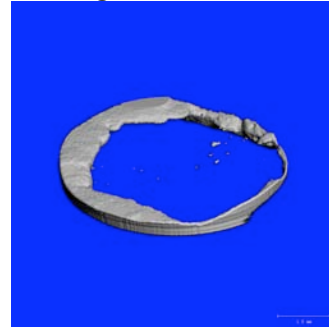
56 Tage BMP-2 Plasmid 100µg



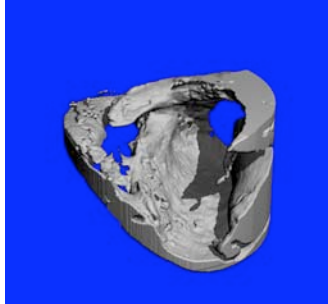
112 Tage BMP-2 Plasmid 100µg



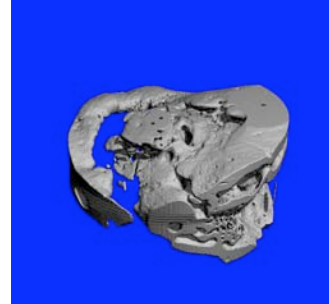
56 Tage BMP-2 Plasmid 50µg



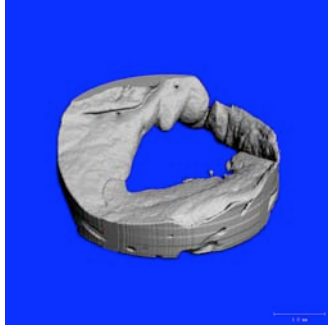
112 Tage BMP-2 Plasmid 50µg



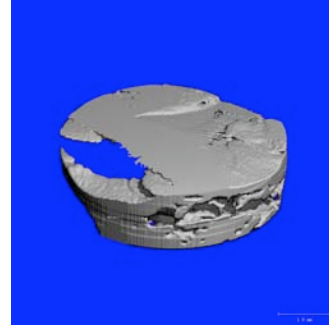
56 Tage BMP-2 Plasmid 25µg



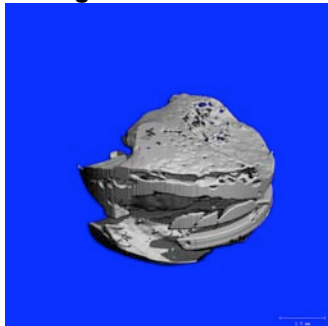
112 Tage BMP-2 Plasmid 25µg



56 Tage BMP-2 Plasmid 12,5µg



112 Tage BMP-2 Plasmid 12,5µg



56 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



112 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg

Abb. 5-3 µCT, 3D-Rekonstruktion der ortsständigen Knochenbildung im VOI bei verschiedenen Plasmidkonzentrationen nach 56 (links) bzw. 112d (rechts)

14d	2,5	BMP	BMP ektop	Nativ						
BV	4,21 ± 4,82	7,08 ± 7,33	5,72 ± 42,74	8,95 ± 1,40						
Sig.BV	BMP*	2,5*	Nativ**	2,5***						
	Nativ***		BMP ektop**							
28d	2,5	50	100	Nativ						
BV	7,07 ± 3,95	1,63 ± 1,62	1,24 ± 0,84	8,51 ± 4,83						
Sig.BV	BMP ektop*	BMP ektop*	50*	8,95 ± 1,40						
	Nativ***	Nativ***	100*	50***						
			Nativ**	100***						
			BMP ektop**	BMP ektop**						
56d	2,5	12,5	25	50	100	BMP	BMP ektop	PDLLA	β-Gal/Luc	Nativ
BV	6,99 ± 4,19	5,10 ± 2,48	8,08 ± 5,59	2,64 ± 1,82	2,51 ± 1,90	10,69 ± 3,81	8,95 ± 1,40	8,69 ± 2,69	4,48 ± 2,22	8,95 ± 1,40
Sig.BV	50*	Nativ*	50*	2,5*	2,5*	12,5*	50***	50***	BMP***	12,5*
	100*	BMP*	100*	25*	25*	50***	100***	100***	BMP ektop**	50***
				PDLLA***	PDLLA***	100***	β-Gal/Luc**	β-Gal/Luc**	PDLLA**	100***
				BMP***	BMP***	β-Gal/Luc***			Nativ***	β-Gal/Luc***
				BMP ektop***	BMP ektop***					
				Nativ***	Nativ***					
112d	2,5	12,5	25	50	100	BMP	BMP ektop	PDLLA	Nativ	
BV	12,57 ± 4,67	5,85 ± 2,92	10,33 ± 4,45	1,88 ± 1,07	3,67 ± 3,13	13,30 ± 8,65	15,37 ± 2,32	5,64 ± 4,97	8,95 ± 1,40	
Sig.BV	12,5*	2,5*	50*	2,5**	2,5**	50*	12,5**	2,5*	50***	
	50**	50*	100*	25*	25*	50***	50***	BMP ektop**	100**	
	100**	BMP ektop**		25*	BMP ektop***		100***		BMP ektop***	
	PDLLA*			BMP*	Nativ**		PDLLA**			
				BMP ektop***			Nativ***			
				Nativ***						

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

Tab. 5-1 µCt, Volumen der einzelnen Therapien gegeneinander

Mittels T-Test für unverbundene Stichproben zeigten sich signifikante Unterschiede des BV (entsprechend den in den Tab. 5-1 und Tab. 5-2 gekennzeichneten, unterschiedlichen Signifikanzniveaus) zwischen den Gruppen 2,5/25 μ g vs. 50/100 μ g BMP-2 Plasmid sowie teilweise zwischen diesen Gruppen und dem rhBMP-2-Vergleichskollektiv. Beim Vergleich dieser Werte fiel weiterhin auf, dass der durch rhBMP-2 initial und im Verlauf deutlich erhöhte Knochenmatrixzuwachs am 112. Untersuchungstag keinen signifikanten Unterschied mehr zu den Vergleichsgruppen (mit Ausnahme von 50 + 100 μ g Plasmid) ergab (Tab. 5-1 und Tab. 5-2). \leq 25 μ g Plasmiddosis lag eine direkte Dosiswirkungsbeziehung vor, höhere Plasmidwerte führten zu einer inversen Dosiswirkungsbeziehung. Die Beurteilung des BV im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer Gruppe ergab, dass bei nahezu allen Gruppen eine teils signifikante kontinuierliche Zunahme des Knochenvolumens ohne einen Peak stattfand (Tab. 5-3, Tab. 5-4 und Abb. 5-4). Auffällig war darüber hinaus, dass das BV des durch PDLLA induzierten Knochens zwischen dem 56. und 112. zurückging.

	7d	14d	28d	56d	112d
2,5	2,24 \pm 2,85	4,21 \pm 2,18	7,07 \pm 3,95	6,99 \pm 4,19	12,57* \pm 6,09
12,5				5,10 \pm 2,47	5,85 \pm 2,92
25				8,08 \pm 5,58	10,33 \pm 4,45
50			1,63 \pm 1,62	2,64 \pm 1,82	1,88 \pm 1,07
100			1,24 \pm 0,84	2,51 \pm 1,90	3,67 \pm 3,13
BMP		7,08 \pm 2,66	8,51 \pm 4,83	10,69 \pm 3,81	13,30 \pm 8,65
BMP ektop		5,72 \pm 2,01	5,46 \pm 1,81	9,9* \pm 3,76	15,37* \pm 2,32
PDLLA				8,69 \pm 2,69	5,64 \pm 4,97

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Signifikanz bezieht sich auf den vorangegangenen Wert

Tab. 5-3 μ CT, Volumen der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf

	7d	14d	28d	56d	112d
2,5	4,90 \pm 5,40	7,85 \pm 4,82	11,30 \pm 8,49	12,99 \pm 7,13	16,62 \pm 8,52
12,5				11,83 \pm 5,43	11,01 \pm 4,22
25				14,43 \pm 9,31	19,27 \pm 8,65
50			2,90 \pm 3,30	5,73 \pm 3,21	4,00 \pm 1,62
100			0,81 \pm 0,89	5,21* \pm 2,36	6,14 \pm 4,78
BMP		14,53 \pm 7,33	21,75 \pm 17,93	26,67 \pm 9,60	26,03 \pm 18,35
BMP ektop		142,46 \pm 42,74	62,39** \pm 30,27	59,08 \pm 29,39	31,22 \pm 13,62
PDLLA				12,90 \pm 4,12	8,77 \pm 5,61

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Signifikanz bezieht sich auf den vorangegangenen Wert

Tab. 5-4 MSCT, Volumen der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf

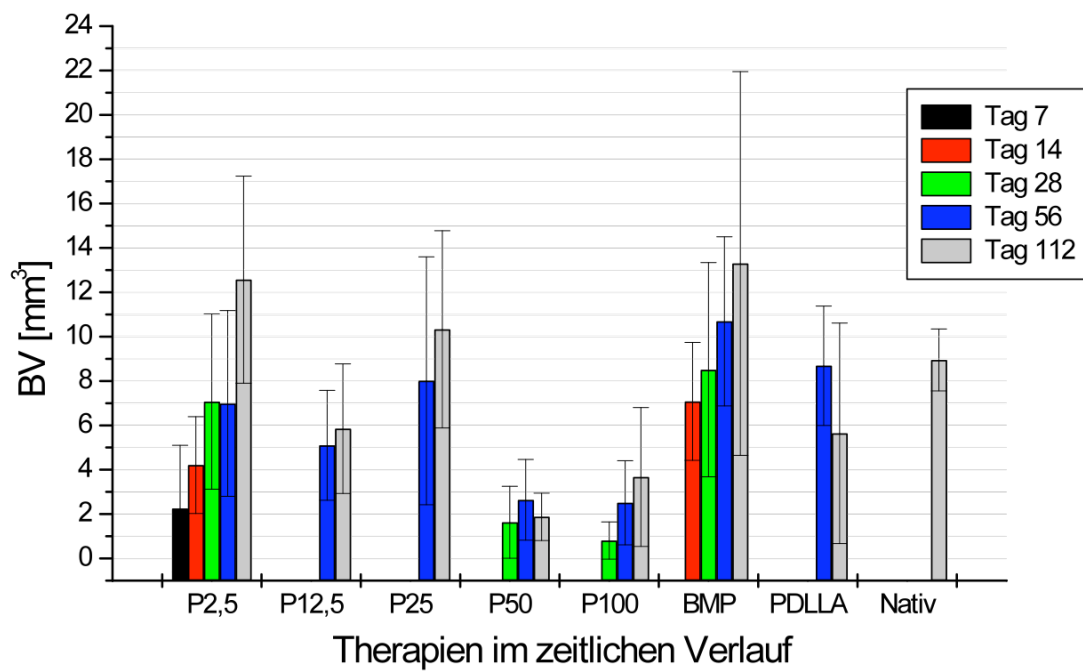


Abb. 5-4 Therapien im zeitlichen Verlauf

Dabei zeigte sich die 2,5 μ g BMP-2 Plasmidgruppe (Abb. 5-5) am erfolgreichsten, da sie visuell (Abb. 5-3) und im Vergleich zu den anderen Therapien (Abb. 5-4) dem Nativknochen am nächsten kommt.

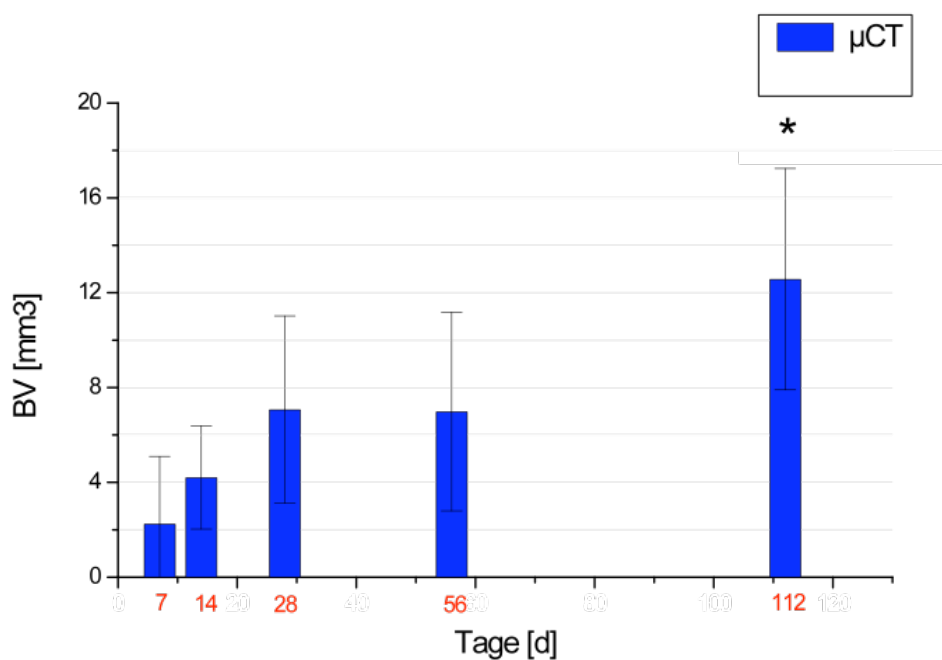


Abb. 5-5 BMP-2 Plasmid 2,5 μ g im zeitlichen Verlauf

In der rhBMP-2- Gruppe wurde zwischen dem innerhalb des Defektes gebildeten BV (=BMP Defekt) und dem ektopen, d.h. im Muskel gebildeten BV (=BMP ektop) unterschieden (Abb. 5-6, Abb. 4-5 und Abb. 4-17).

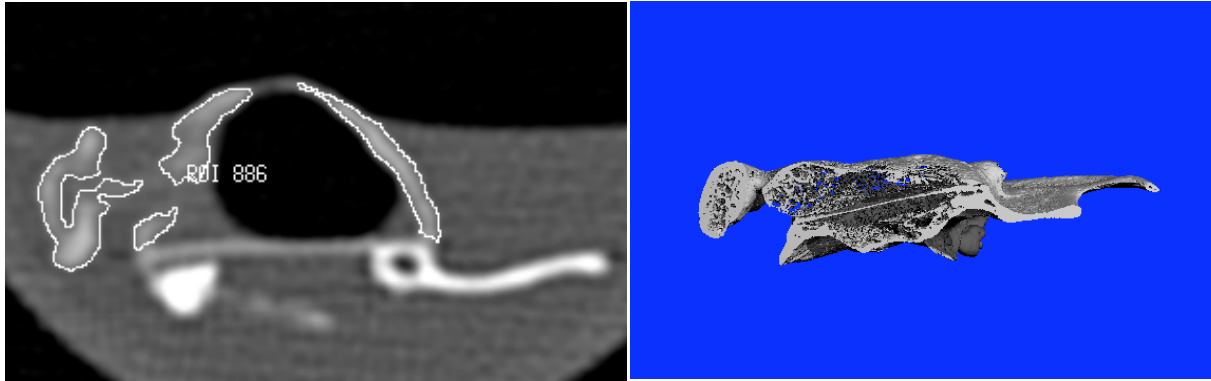


Abb. 5-6 links: MSCT, rechts: μ CT: rh-BMP in coronarer Ansicht
(Mitte: Plättchen, „oben“=lateral=ektoper Knochen, „unten“=medial=Defektknochen)

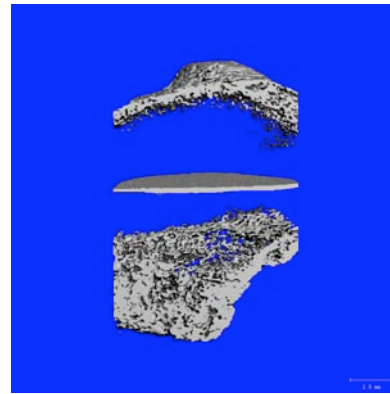
Mittels MSCT wurde der gesamte ektoper Bereich gemessen (wie in Abb. 5-6 oben links dargestellt), da dies hier wegen des größeren field of view (FOV) möglich war, während wir uns mittels μ CT auf das VOI des Defektes von 5 mm beschränkten (Abb. 4-17).

Dabei fiel beim MSCT BV ektop bis zum 112 Tage kontinuierlich (Tab. 5-4 und Abb. 5-8).

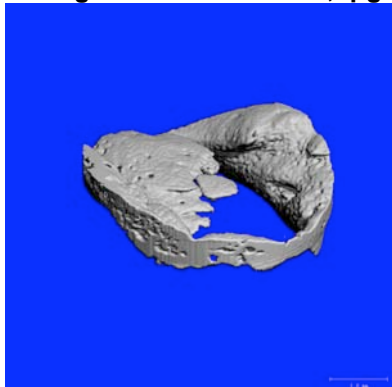
Bei Inspektion des TV-BMP ektop, welches der ektopen Knochenhöhle (siehe Abb. 4-17) entspricht, fällt auf, dass es nach initial schneller Bildung am 14. Tag im Verlauf bis zum 112. Tag signifikant auf weniger als die Hälfte abfällt (Abb. 5-7 Abb. 5-8). Dagegen steigt das ektoper BV des Defektes bis zum 112. Tag signifikant auf ein Niveau an, welches keine andere Therapiegruppe – einschließlich der nativen Gruppe – erreicht (Abb. 5-7 und Tab. 5-3).



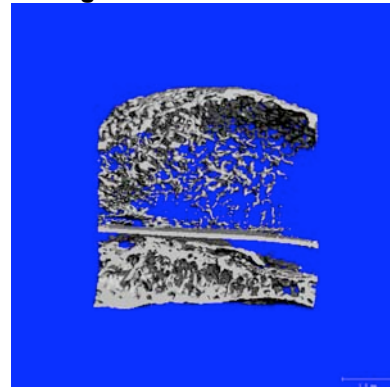
14 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



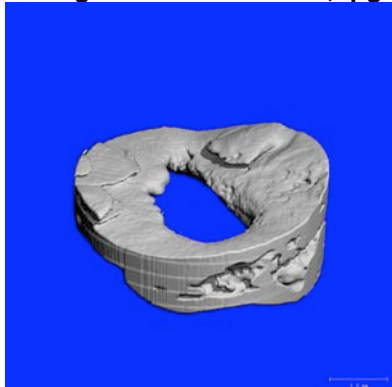
14 Tage rhBMP-2 Protein



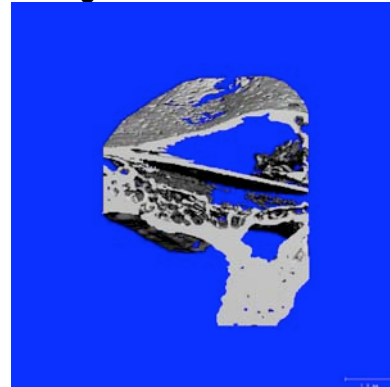
28 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



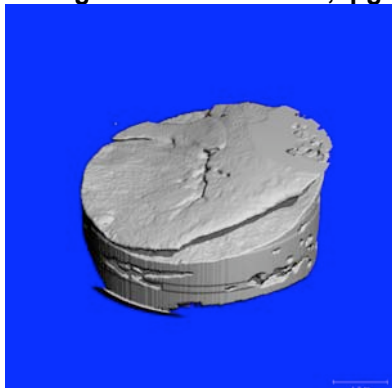
28 Tage rhBMP-2 Protein



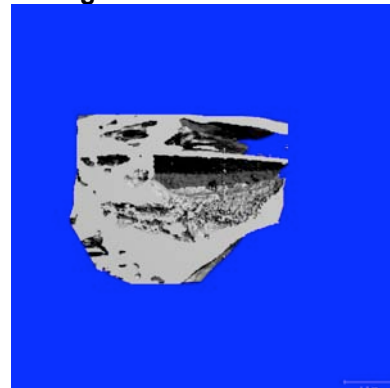
56 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



56 Tage rhBMP-2 Protein



112 Tage BMP-2 Plasmid 2,5µg



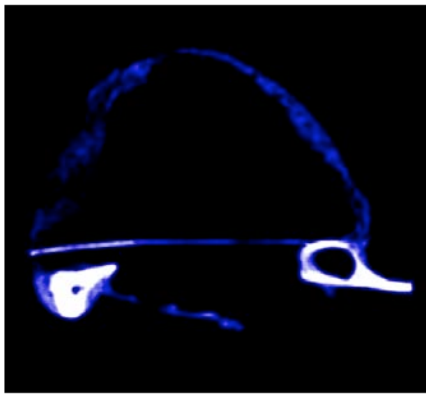
112 Tage rhBMP-2 Protein

Abb. 5-7 μ CT, 3D-Rekonstruktion der ortsständigen Knochenbildung
Darstellung des VOI im zeitlichen Verlauf; linke Seite: 2,5 μ g Plasmid in 30° gekippter Ansicht (Übersicht); rechte Seite: rh-BMP in coronarer Ansicht (Mitte: Plättchen, „oben“=lateral=ektoper Knochen, „unten“=medial=Defektknochen; auffällig ist, dass die ektoper Knochenhöhle (TV) immer mehr „zusammensinkt“, während BV ektop zunimmt

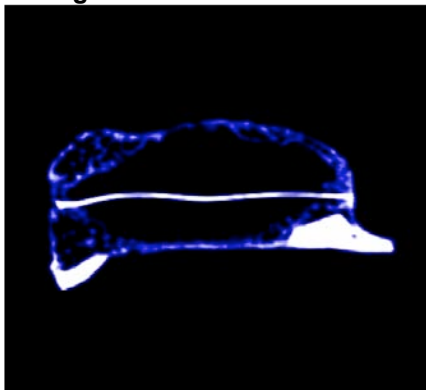
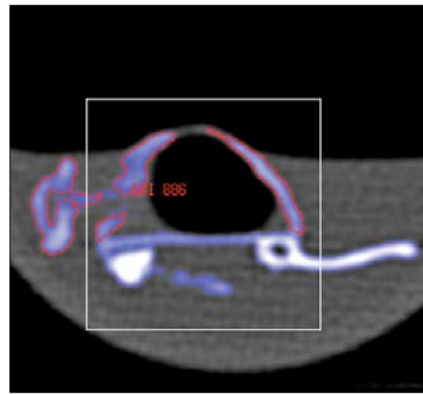
5.3.2 Dichte

Wir bestimmten zusätzlich die Knochendichte (TMD) als ein Kriterium für die Stabilität und somit Qualität des neu gebildeten Knochens. Dieser schwellenwertabhängige Parameter berücksichtigt weder umliegende Luft noch Weichgewebe.

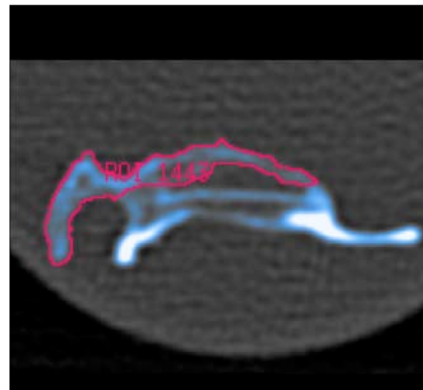
Visualisiert werden kann dies über die farbkodierte Dichtedarstellung, welche auf der Helligkeitsverteilung der Voxel basiert. Hierbei stellt sich neu gebildeter, wenig dichter Knochen dunkelblau dar, während sich alter ortsständiger, dichter Knochen hell darstellt. Die in Abb. 5-8 im zeitlichen Verlauf heller werdenden Blautöne sind Zeichen der Dichtezunahme im zeitlichen Verlauf. Diese ist sowohl für den Defektbereich als auch für den ektopen Knochen mittels μ CT (Tab. 5-5) und MSCT (Tab. 5-6) meist signifikant.



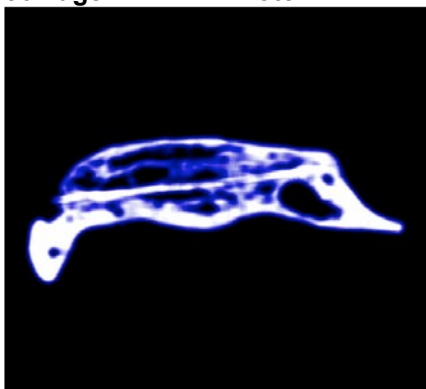
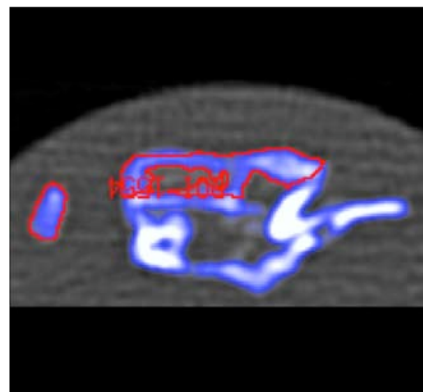
14 Tage rhBMP-2 Protein



28 Tage rhBMP-2 Protein



56 Tage rhBMP-2 Protein



112 Tage rhBMP-2 Protein

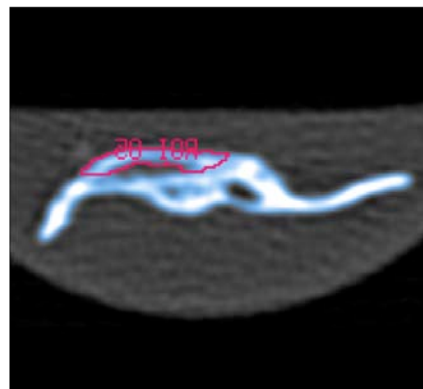


Abb. 5-8 links: μ CT, rechts: MSCT: 2D, coronar, farbkodierte Dichtedarstellung neuer, wenig dichter Knochen dunkelblau, dichter Knochen hell; rh-BMP-Gruppe mit ektope Ossifikation; Zunahme der TMD im zeitlichen Verlauf

	7d	14d	28d	56d	112d
2,5	825,00 ± 91,67	742,55 ± 85,68	848,01* ± 57,83	913,92* ± 29,22	1051,42*** ± 29,73
12,5				955,68 ± 25,07	1015,32* ± 25,49
25				985,79 ± 79,78	1022,16 ± 23,79
50			787,50 ± 14,46	909,74 ± 85,95	1024,43* ± 35,18
100			848,86 ± 17,68	922,4* ± 34,10	996,02** ± 35,28
BMP		664,39 ± 77,16	770,45* ± 57,39	869,81** ± 33,70	985,23** ± 62,39
BMP ektop		639,02 ± 21,68	736,69*** ± 36,61	816,23** ± 37,88	932,39*** ± 30,06
PDLLA				936,04 ± 45,22	1014,94** ± 35,45

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Signifikanz bezieht sich auf den vorangegangenen Wert

Tab. 5-5 μCT, Dichte der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf

	7d	14d	28d	56d	112d
2,5	448,86 ± 143,06	424,17 ± 183,07	570,12 ± 95,85	615,14 ± 92,86	680,13 ± 152,74
12,5				501,76 ± 145,43	632,48 ± 83,90
25				604,79 ± 57,45	634,24 ± 67,87
50			372,47 ± 67,73	526,57* ± 63,23	454,86 ± 70,73
100			461,20 ± 46,22	524,44 ± 97,19	549,30 ± 119,57
BMP		366,49 ± 97,74	371,09 ± 92,08	399,27 ± 75,54	575,28* ± 253,47
BMP ektop		319,81 ± 13,08	298,89 ± 40,46	397,85* ± 29,39	570,05* ± 136,65
PDLLA				560,44 ± 94,60	599,49 ± 233,26

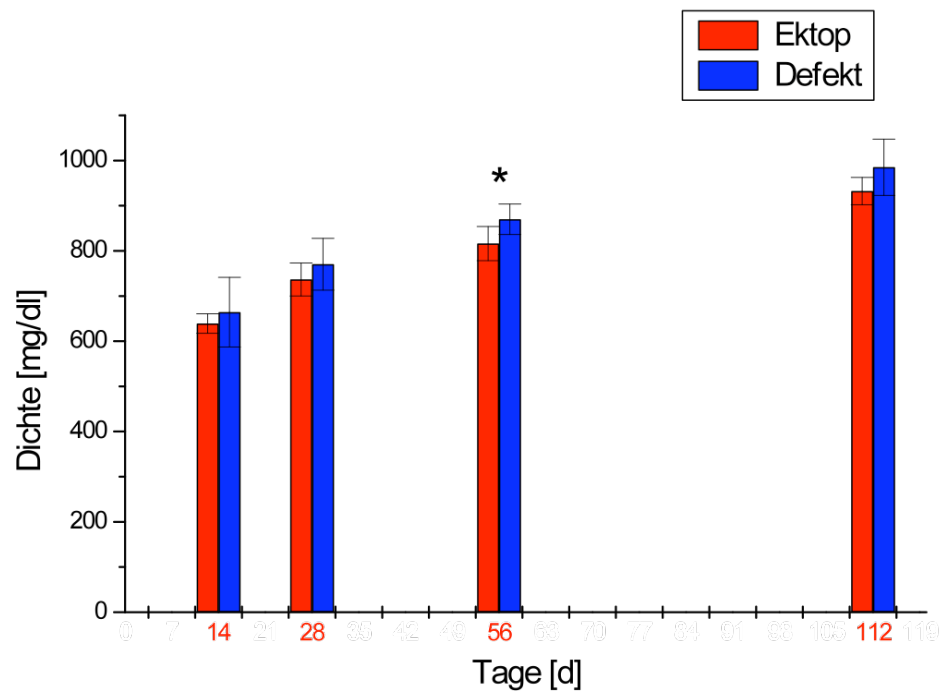
*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Signifikanz bezieht sich auf den vorangegangenen Wert

Tab. 5-6 MSCT, Dichte der einzelnen Therapien im zeitlichen Verlauf

Vergleicht man nun in der Gruppe des rhBMP-2 Proteins den ektopten Knochen mit dem ortständigen gewünschten Knochen im Zielgewebe, kann man feststellen, dass der Defektknochen zu allen Zeitpunkten eine teils signifikant höhere Dichte aufweist (Abb. 5-9 und Tab. 5-7).

Die Beurteilung der TMD im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer Plasmidgruppe ergab, dass die Dichte bei nahezu allen Gruppen kontinuierlich (meist signifikant) zunahm (Tab. 5-5 und Tab. 5-6). Dabei zeigte sich die 2,5μg BMP-2 Plasmidgruppe am erfolgreichsten (wie beim BV), da sie im Vergleich zu den anderen Therapien (Tab. 5-7 und Tab. 5-8) dem Nativknochen am nächsten kommt.

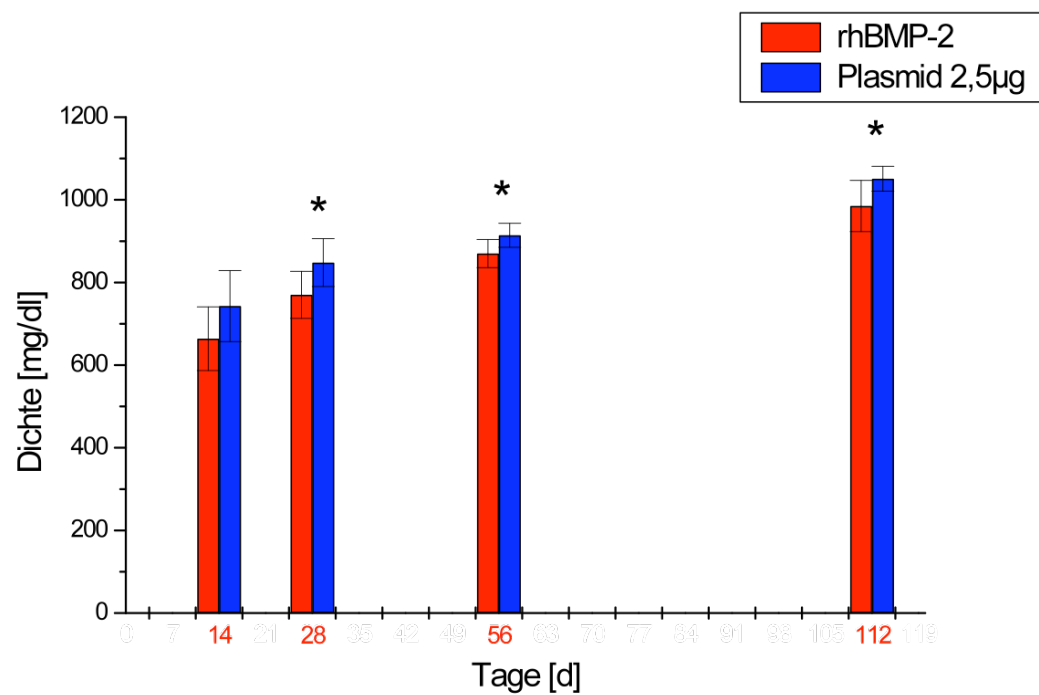
Diese Plasmidkonzentration führt ab dem 28. Tag ebenfalls zu einem signifikant dichteren Knochen als das rekombinante Protein im Defektbereich (Abb. 5-10 und Tab. 5-7).



* $p < 0,05$; bezogen auf den vorangegangenen Zeitpunkt

Abb. 5-9 Dichte (μ CT) rhBMP-2 Protein ektooper Knochen (rot) gegen medialen Defektbereich (blau) im zeitlichen Verlauf

* $p < 0,05$, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt



* $p < 0,05$; bezogen auf den vorangegangenen Zeitpunkt

Abb. 5-10 Dichte (μ CT) rhBMP-2 Protein medialer Defektbereich (rot) gegen BMP-2 Plasmid 2,5µg (blau) im zeitlichen Verlauf

* $p < 0,05$, bezogen auf den jeweiligen Zeitpunkt

	2,5	BMP	BMP ektop	Nativ
14d				
Dichte	742,55 ± 85,68	664,39 ± 77,16	639,02 ± 21,68	1138,64 ± 26,62
Sig.Dichte	BMP ektop*	Nativ***	2,5*	2,5***
	Nativ***		Nativ***	BMP***
				BMP ektop***
28d				
Dichte	848,01 ± 57,83	787,50 ± 14,46	848,86 ± 17,68	770,45 ± 57,39
Sig. Dichte	BMP*	Nativ***	BMP ektop**	2,5*
	BMP ektop***		Nativ**	Nativ***
	Nativ***			100**
				Nativ***
				100**
				BMP***
				BMP ektop***
56d				
Dichte	913,92 ± 29,22	955,68 ± 25,07	985,79 ± 79,78	909,74 ± 85,95
Sig. Dichte	12,5*	2,5*	2,5*	BMP*
	25*	BMP**	BMP**	BMP ektop***
	BMP*	BMP ektop***	BMP ektop***	Nativ***
	BMP ektop***	Nativ***	Nativ**	100*
	Nativ***			BMP ektop*
				PDLLA**
				Nativ***
				BMP***
				β-Gal/Luc**
				Nativ***
				BMP ektop***
112d				
Dichte	1051,42 ± 29,73	1015,32 ± 25,49	1022,16 ± 23,79	1024,43 ± 35,18
Sig.Dichte	100*	BMP ektop**	BMP ektop**	BMP ektop**
	BMP*	Nativ***	Nativ***	Nativ***
	BMP ektop***			BMP ektop*
	PDLLA*			Nativ***
	Nativ***			100*
				PDLLA**
				Nativ***
				BMP***
				BMP ektop***
				PDLLA***
				β-Gal/Luc**
				Nativ***
				BMP ektop***
				PDLLA***
				β-Gal/Luc***

Tab. 5-7 µCt, Dichte der einzelnen Therapien gegeneinander

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

	2,5	BMP	BMP ektop	Nativ
14d				
Dichte	424,17 ± 183,07	366,49 ± 97,74	319,81 ± 13,08	725,99 ± 102,35
Sig.Dichte	Nativ**	Nativ***	Nativ***	2,5** BMP*** BMP ektop***
28d				
Dichte	570,12 ± 95,85	372,47 ± 67,73	461,20 ± 46,22	371,09 ± 92,08
Sig.Dichte	50*	2,5*	BMP ektop**	2,5***
	BMP**	Nativ**	Nativ*	2,5**
	BMP ektop***		Nativ***	100**
	Nativ*		Nativ***	100*
			BMP***	BMP***
			BMP ektop***	BMP ektop***
56d				
Dichte	615,14 ± 92,86	501,76 ± 145,43	604,79 ± 57,45	526,57 ± 63,23
Sig. Dichte	BMP***	Nativ*	BMP**	BMP**
	BMP ektop***		BMP ektop**	BMP ektop**
			Nativ**	Nativ**
			BMP*	BMP*
			BMP ektop*	BMP ektop*
			Nativ**	Nativ**
			100*	100*
			PDLLA**	PDLLA**
			Nativ***	Nativ***
			BMP	BMP
			399,27 ± 75,54	397,85 ± 29,39
			524,44 ± 97,19	560,44 ± 94,60
			560,44 ± 94,60	477,41 ± 182,64
			725,99 ± 102,35	725,99 ± 102,35
			2,5***	BMP**
			25**	BMP ektop**
			50**	Nativ**
			100*	100**
			PDLLA**	BMP***
			Nativ***	BMP ektop***
			BMP	PDLLA**
			575,28 ± 253,47	599,49 ± 233,26
			570,05 ± 136,65	725,99 ± 102,35
			549,30 ± 119,57	50**
			Nativ*	100*
			2,5*	
			12,5*	
			25*	
			Nativ**	
112d				
Dichte	680,13 ± 152,74	632,48 ± 83,90	634,24 ± 67,87	454,86 ± 70,73
Sig.Dichte	50*	50*	50*	2,5*
				12,5*
				25*
				Nativ**

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001

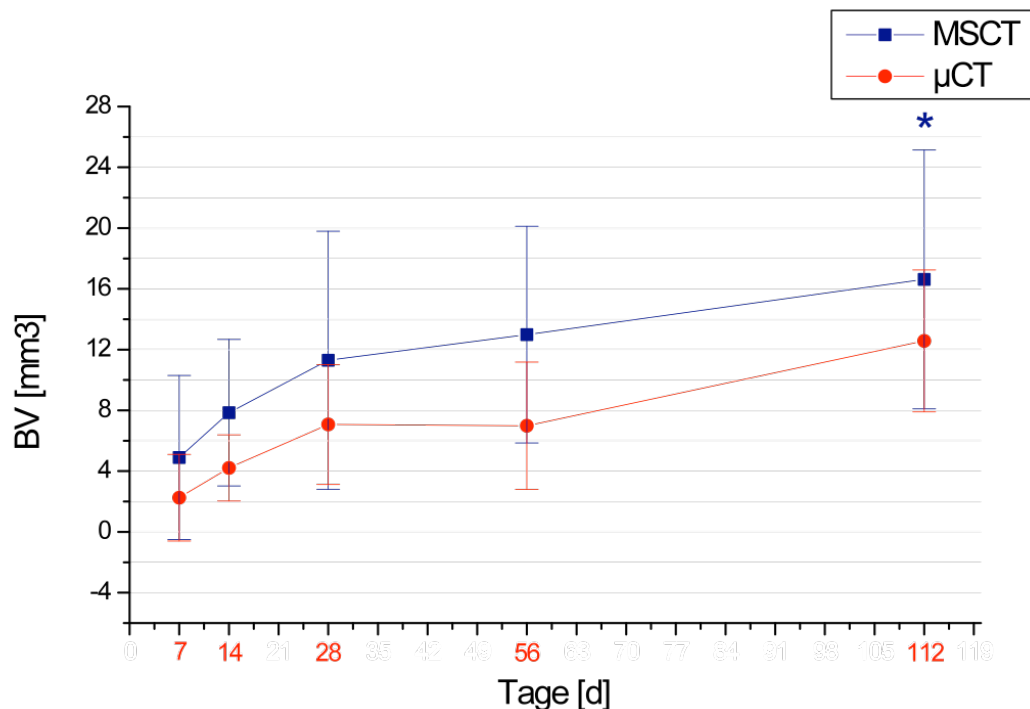
Tab. 5-8 MSCT, Dichte der einzelnen Therapien gegeneinander

5.3.3 Masse

Als weiteren Parameter haben wir die Masse (BMC: Bone mineral content) hinzugezogen, welche sich aus Dichte x Volumen zusammensetzt.

5.4 Korrelation des μ CT mit dem MSCT

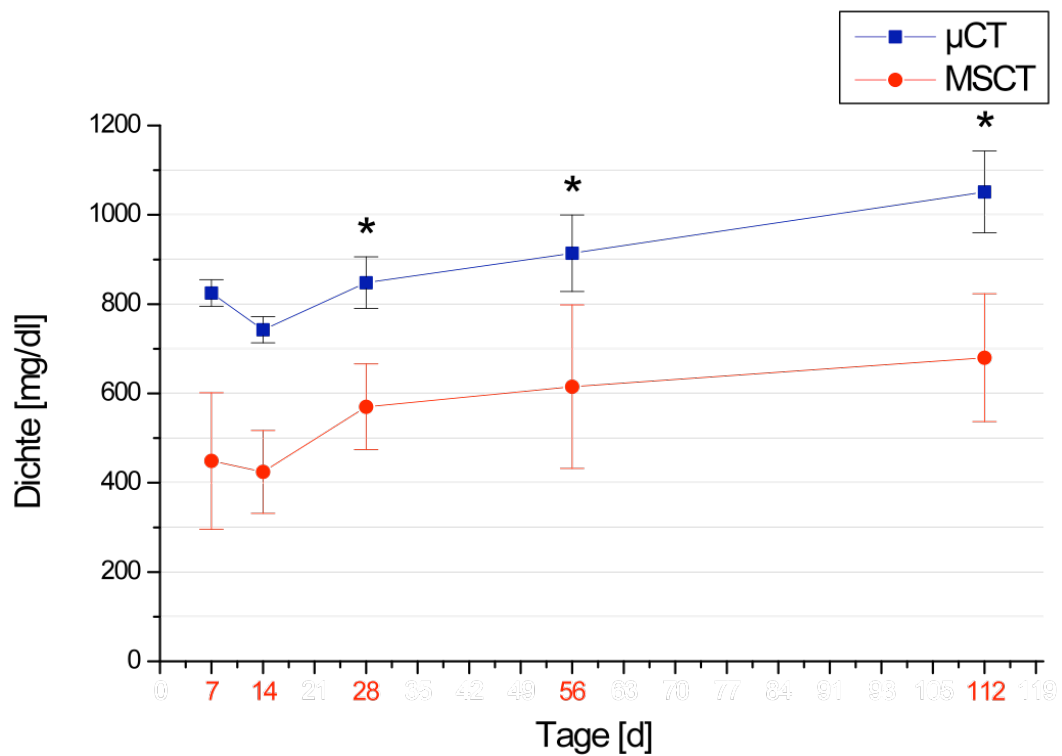
Die MSCT zeichnet sich durch fehlende Invasivität und sehr kurze Scannzeiten aus. Aus diesem Grund war es für uns von Interesse, die Daten der beiden Verfahren zu vergleichen, um die Reproduzierbarkeit des MSCT im Vergleich zur μ CT, welche den Goldstandard darstellt, zu verifizieren. Für die BMP-2 Plasmidgruppe ergaben sich im zeitlichen Verlauf für BV konstant höhere Werte des MSCT verglichen mit der μ CT (Abb. 5-11) bei einer Korrelation von $r^2=0,75$ ($p<0,05$).



* $p<0,05$. Bezogen auf den vorangegangenen Zeitpunkt

Abb. 5-11 BV von BMP-2 Plasmid μ CT vs MSCT im zeitlichen Verlauf

TMD zeigte konstant niedrigere Werte des MSCT bei einer Korrelation von $r^2=0,56$ ($p<0,05$) (Abb. 5-12).



* p<0,05; bezogen auf den vorangegangenen Wert

Abb. 5-12 TMD von BMP-2 Plasmid μCT vs MSCT im zeitlichen Verlauf

Die höchste Korrelation wies die BMC $r^2=0,94$ ($p<0,05$) auf (Abb. 5-13), was in Form eines Punktdiagrammes mit Regressionsgerade in Abb. 5-14 verdeutlicht wird.

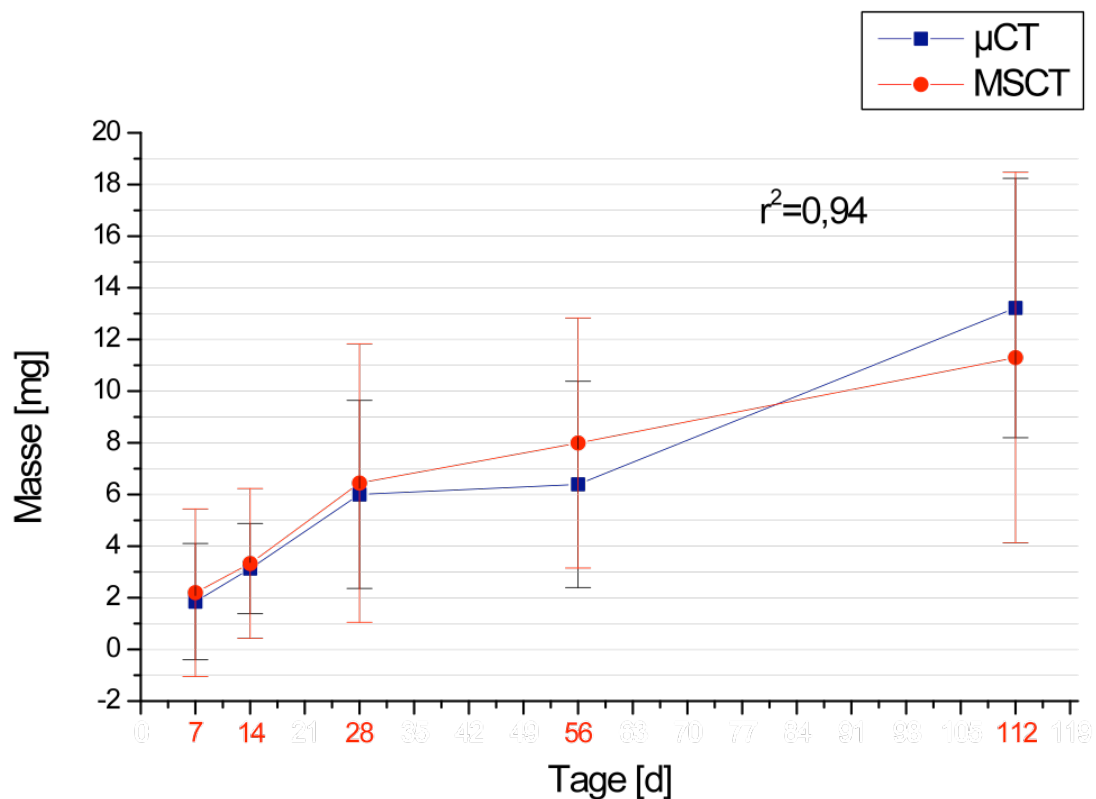


Abb. 5-13 BMC von BMP-2 Plasmid μ Ct vs MSCT im zeitlichen Verlauf

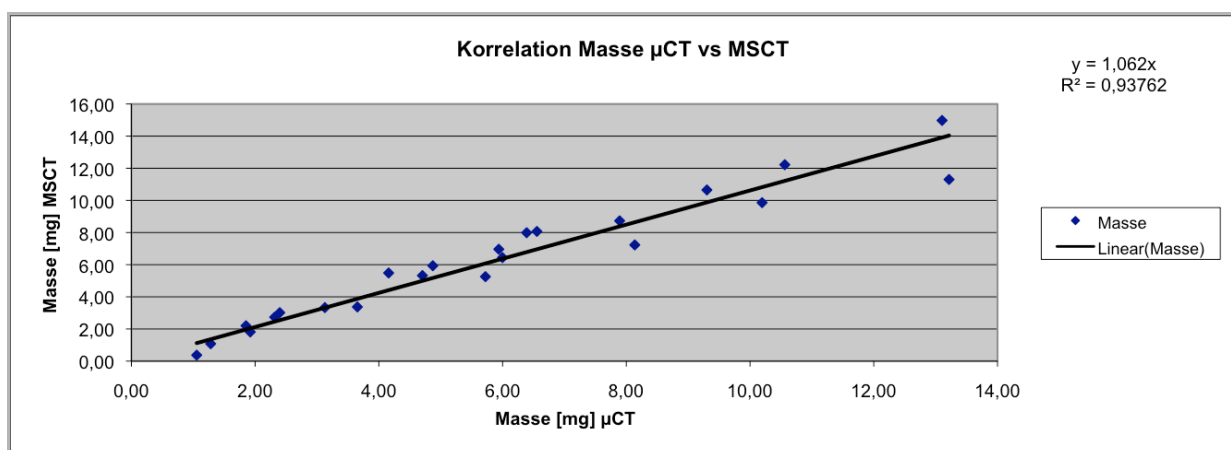


Abb. 5-14 Punktediagramm mit Regressionsgerade von BMC μ CT vs MSCT mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,94 bei einer Signifikanz von $p < 0,5$

5.5 Korrelation des μ CT mit der Histometrie

Um die Reproduzierbarkeit der Daten der zweidimensionalen Histomorphometrie mit der dreidimensionalen μ CT vergleichen zu können, korrelierten wir die Messdaten beider Verfahren. Dabei stellten wir die Mittelwerte aller Gruppen gegeneinander und erreichten einen Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,91$ ($p < 0,05$) (Abb. 5-15).

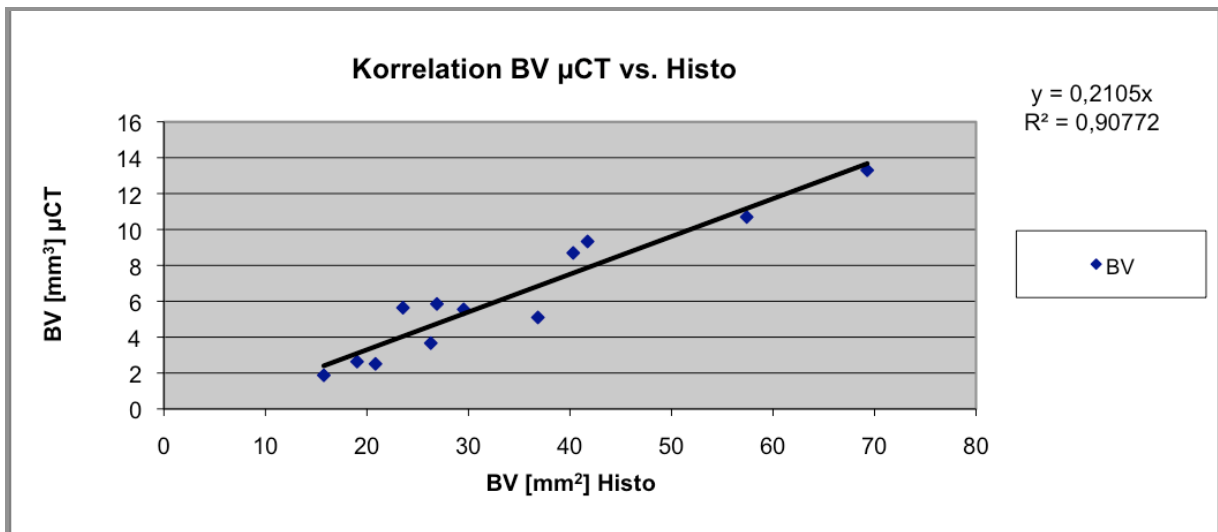


Abb. 5-15 Punktediagramm mit Regressionsgerade von BV μ CT vs Histometrie mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,91 bei einer Signifikanz von $p < 0,5$

In Abb. 5-16 sieht man einen Vergleich der Modalitäten Radiologie und Histologie. Hierbei handelt es sich immer um das gleiche Präparat (2,5 μ g Plasmid) in gleicher Schichtung (coronar). Auf der linken Seite sind Histologien unterschiedlicher Färbung abgebildet, während in den beiden rechten Spalten radiologische Verfahren zu sehen sind. Selbst mit dem MSCT besteht die Möglichkeit, unterschiedliche Knochenbildungsphasen aufgrund verschiedener Helligkeitsintensitäten voneinander zu unterscheiden. Rechts daneben eine farbcodierte Dichtedarstellung, welche die Unterschiede zusätzlich betont. Unterhalb entsprechende Bilder des μ CT's in höherer Auflösung, ganz unten eine μ -Radiographieaufnahme, rechts mit Detailvergrößerung, welche ebenfalls ortsständigen von neu gebildetem Knochen unterscheidet.

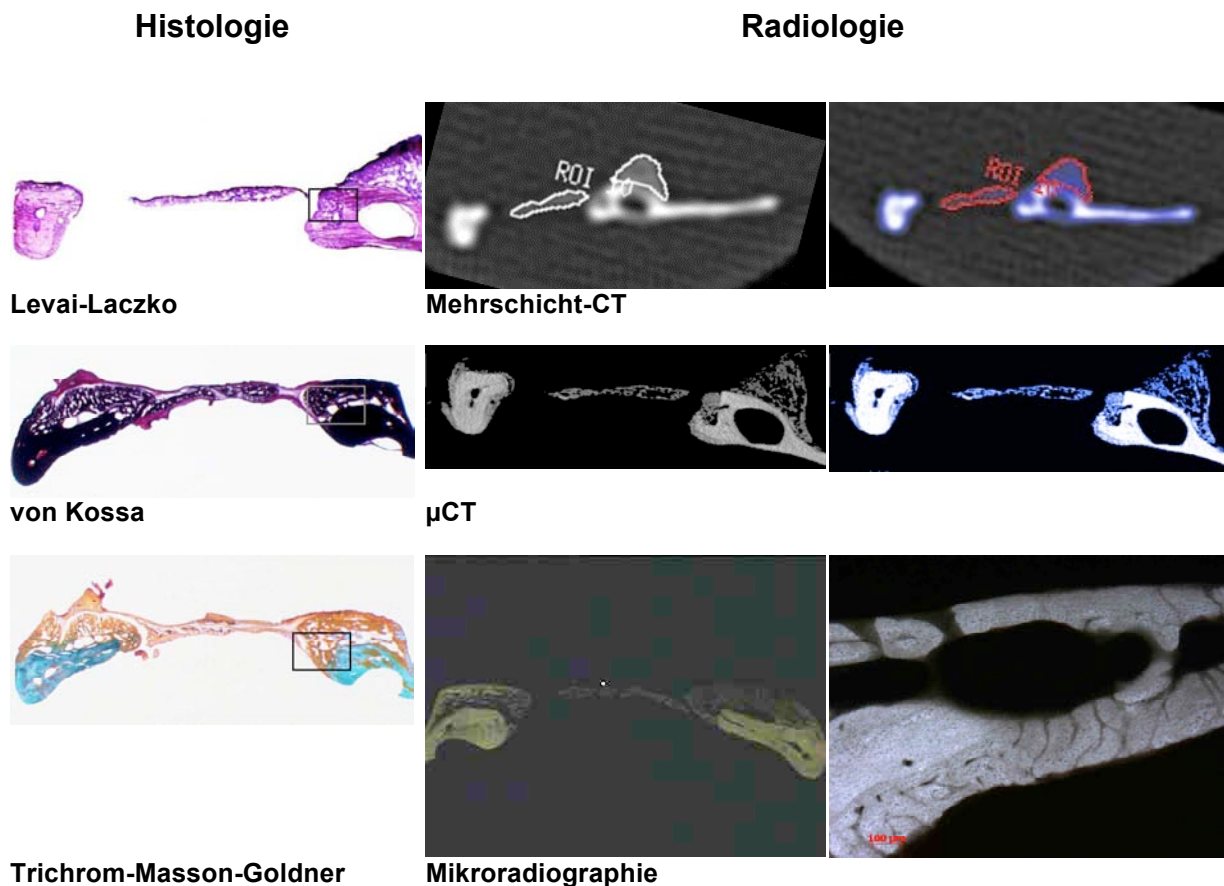


Abb. 5-16 Vergleich der Modalitäten Radiologie und Histologie

5.6 Einzelfeldanalyse

Die konventionell radiologischen Aufnahmen wurden wie beschrieben mit einer in 9 Felder aufgeteilten Schablone versehen und ausgewertet (9-Felderanalyse). Die Prozentwerte setzen sich aus n Kieferhälften mal dem jeweiligen Einzelfeld (V1-3, M1-3 und D1-3) zusammen. Der Übersichtlichkeit und Praktikabilität halber wurde nur der ventral gelegene Bereich (V1+V2+V3+M1) mit dem dorsal gelegenen Bereich (M2+M3+D1+D2+D3) verglichen, da weder im zeitlichen Verlauf noch im Dosisvergleich der einzelnen Gruppen untereinander im Hinblick auf ein singuläres Teilfeld eine wesentliche Aussage getätigt werden konnte.

Der Vergleich des ventralen Defektbereiches gegenüber dem dorsalen Defektbereich erbrachte in der Gesamtübersicht nach 56 und 112 Tagen vor allem in den Behandlungsgruppen 2,5µg und 12,5µg signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) (Tab. 5-9). Bei den restlichen gemessenen Behandlungsgruppen war ein Trend zu Gunsten des ventral gebildeten Knochens festzustellen (Tab. 5-9). Anhand unserer Hauptgruppe, der 2,5µg Plasmidgruppe, ist der prozentuale Anteil des neu gebildeten Knochens im

zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei sich der ventrale und der dorsale Anteil an neu gebildeter Knochenmatrix bis zum 112. Tag signifikant unterscheiden (Abb. 5-17 oben).

Es wurden zusätzlich alle 9 Einzelfelder an Hand ihrer unterschiedlichen prozentualen Anteile des neu gebildeten Knochens in Form eines 3D-Säulendiagrammes graphisch dargestellt, wobei die Lokalisation farblich kodiert wurde (Abb. 5-17 unten).

Tage		2,5µg	12,5µg	25µg	50µg	100µg	rhBMP	PDLLA
14	V	62,5					95,83	
	D	25					93,33	
28	V	75					100	
	D	40					100	
56	V	84,37	75	62,5	39,29	32,14	100	83,33
	D	60	25	45	22,86	11,43	100	63,33
112	V	100	81,25	87,5	31,25	25	100	62,5
	D	72,5	35	70	20	35	100	56,67

Tab. 5-9 Übersicht der Prozentwerte der radiologischen Auswertung in Bezug auf den ventralen und dorsalen Defektbereich
V: ventral (V1+V2+V3+M1); D: dorsal (M2+M3+D1+D2+D3)

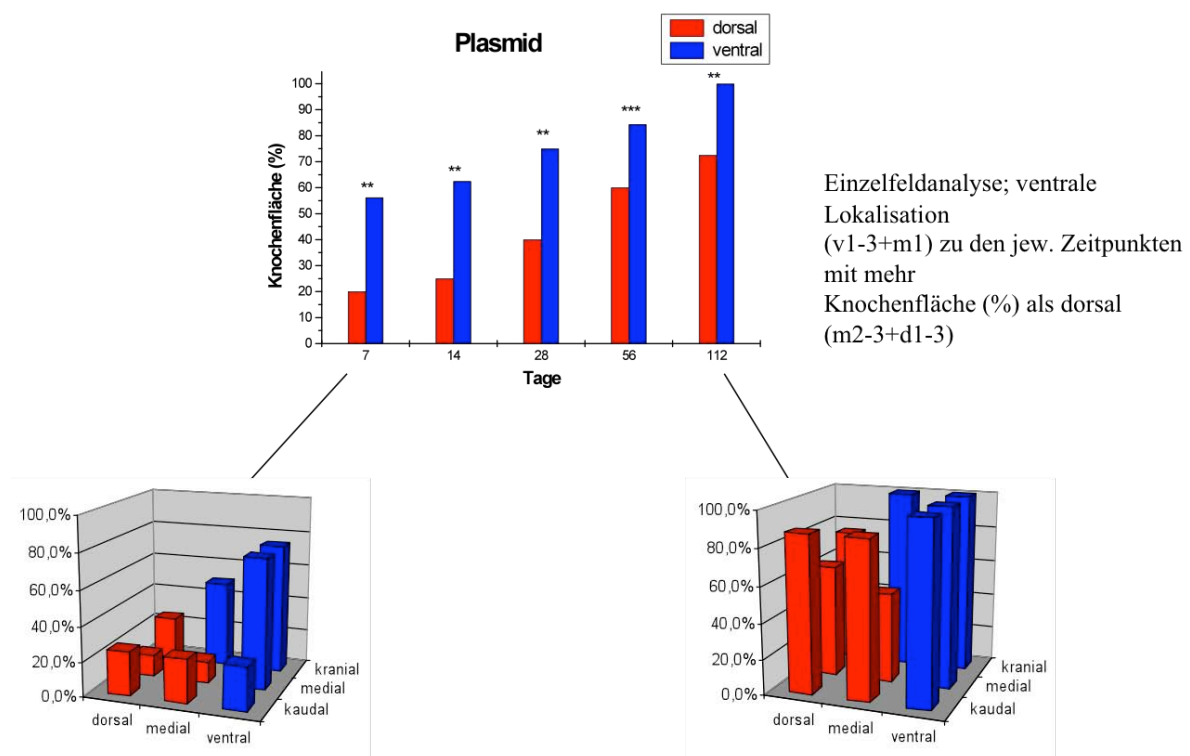


Abb. 5-17 Einzelfeldanalyse mit 3d-Säulendiagramm

5.7 Abhängigkeit der Knochenregeneration von der Lage des critical-size-Defektes

Beim Vergleich der Defekte mit Kontakt zum Parodontalspalt (ventrale Gruppe) und mit Abstand zu diesem (dorsale Gruppe) zeigte sich ein ähnliches Bild.

Im Säulendiagramm (Abb. 5-18) sieht man die 2,5µg Plasmidgruppe mit der Darstellung des Knochenvolumens im zeitlichen Verlauf, blau dargestellt die Defekte mit Kontakt zum Parodontalspalt, rot die Defekte ohne Kontakt zu diesem. Hierbei haben wir alle ventralen Lokalisationen zusammengefasst und diese mit allen dorsalen verglichen. Der Grund hierfür ist die für eine differenzierte Aussagekraft sonst zu geringe Anzahl n. Dabei zeigen die Plasmidtiere mit Kontakt zum Parodontalspalt einen signifikant höheren Knochenzuwachs als jene ohne Kontakt.

Darunter abgebildet sieht man repräsentative 3D-µCT-Bilder mit der ortsständigen Knochenbildung im ehemaligen Defekt zu den jeweiligen Opferungszeitpunkten. Die Zugehörigkeit zu der jeweiligen Gruppe ist analog zu der im Säulendiagramm farbko-diert.

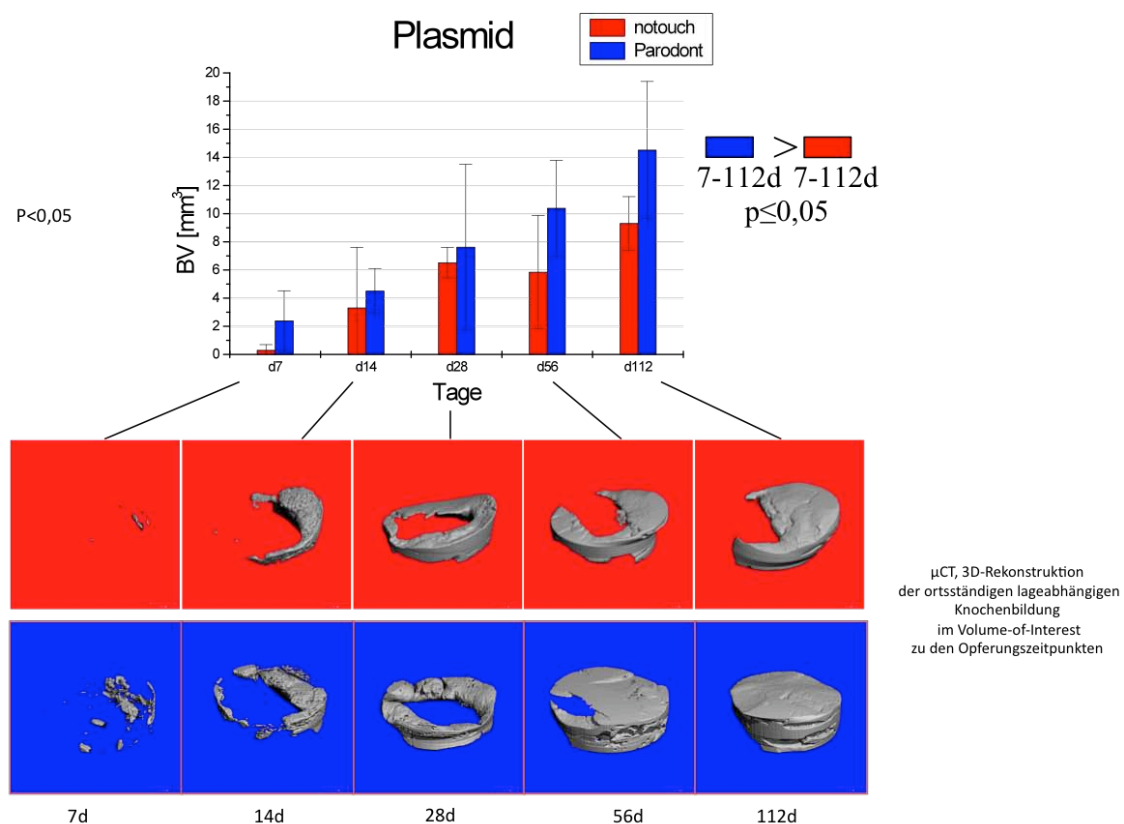


Abb. 5-18 Abhängigkeit der Knochenregeneration von der Lage des critical-size-Defektes

Bei der gleichen Untersuchung bezüglich der Dichte zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Lokalisationen. Man kann zwischen 7 und 56 Tagen lediglich einen Trend feststellen (Abb. 5-19). Unterhalb des Säulendiagrammes sieht man eine sagittale 2D- μ CT-Ansicht in farbkodierter Dichtedarstellung. Man erkennt im ventral gebohrten Defekt (rechts) zwar mehr Knochen, allerdings von ähnlichem Farbton bzw. Helligkeit wie im dorsal gebohrten Defekt (links), sprechend für eine ähnliche Dichte.

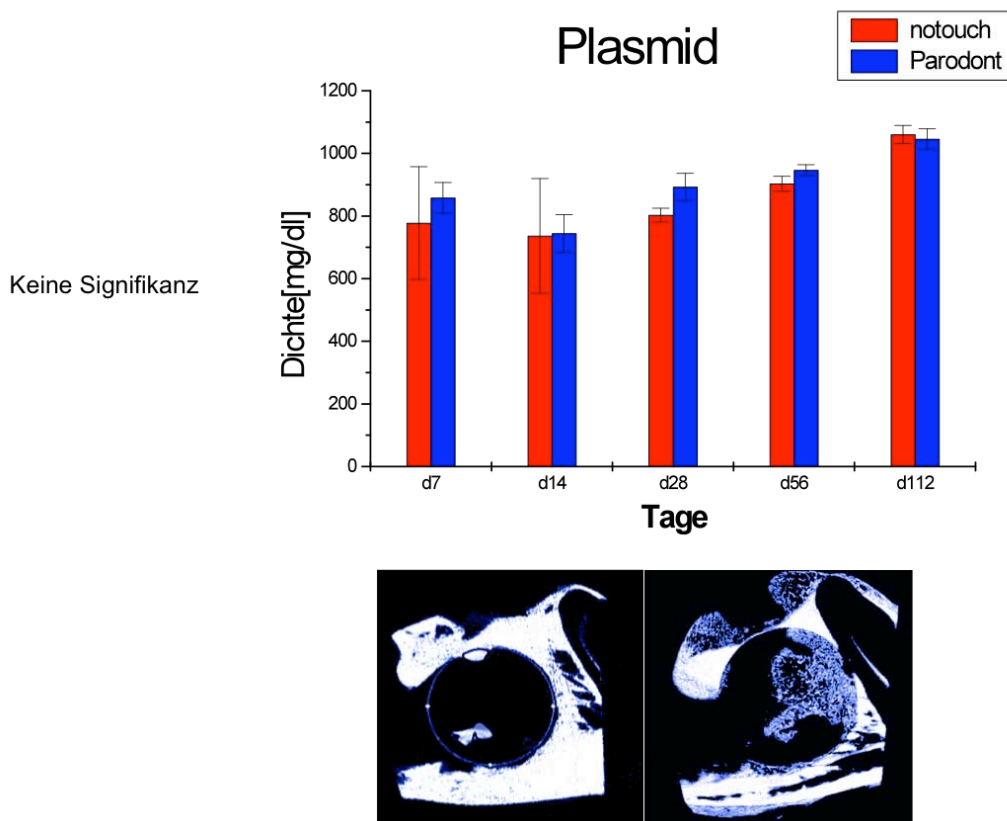
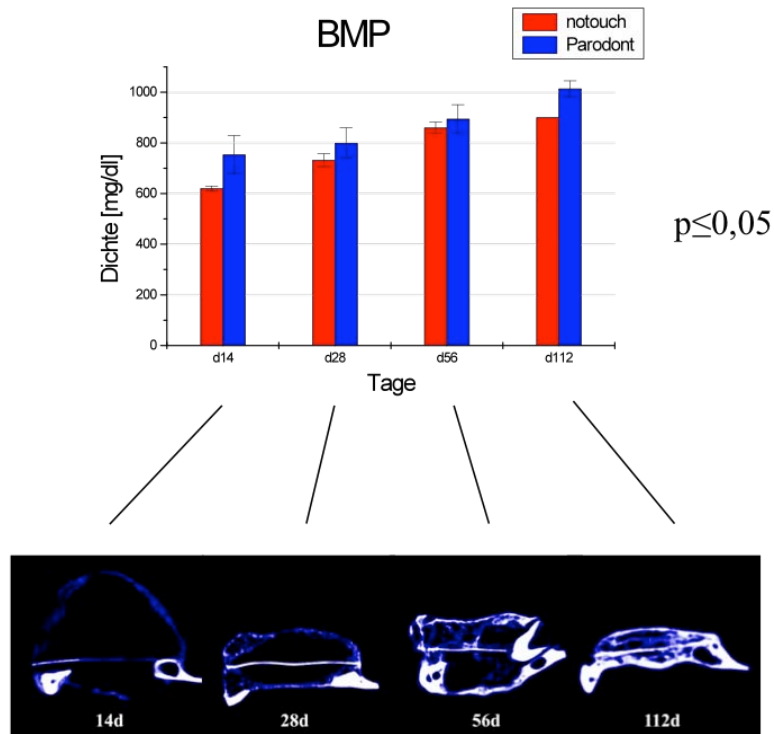


Abb. 5-19 Abhängigkeit der Dichte von der Lage des critical-size-Defektes (Plasmid)

Anders verhält es sich beim rekombinanten Protein BMP, bei welchem in der Gruppe mit Kontakt zum Parodont signifikant dichterere Knochen (TMD) gebildet wurde (Abb. 5-20). Darunter erkennt man in farbcodierter Dichtedarstellung coronare Schichten des μ CT im zeitlichen Verlauf. Die heller werdenden Blautöne im ventralen Defektbereich (ventral zu erkennen an der Schneidezahnwurzel bzw. indirekt dem Kanal) sind Zeichen dichteren Knochens in der Nähe zum Parodont.



μ CT, 2D coronar, farbcodierte Dichtedarstellung (neuer, wenig dichter Knochen dunkelblau, dichter Knochen hell); ventrale rhBMP- Gruppe mit ektopter Ossifikation; Zunahme der BMD im zeitlichen Verlauf ($p \leq 0,05$)

Abb. 5-20 Abhängigkeit der Dichte von der Lage des critical-size-Defektes (BMP)

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war in erster Linie die Untersuchung der Knochenregeneration am Unterkiefer der Ratte nach Implantation eines genaktivierten Poly(D,L)-Laktid beschichteten Metallträgers als lokale nicht-virale Gentherapie. Dabei wurden verschiedene BMP-2 Plasmide in den geschützten Genvektor COPROG resuspendiert. Als Beschichtung wird das biodegradierbare Poly(D,L)-Laktid R 203 verwendet, welches die hohen Anforderungen an einen Arzneistoffträger wie Biokompatibilität, Osteoinduktivität, Bakteriostase, fehlende Zelltoxizität und vollständige Biodegradierbarkeit erfüllt [Gollwitzer 2005]. Es ist fähig, WF (BMP-2) sowie die hier verwendeten, nicht-viralen Genvektoren COPROGs zu binden und zu schützen [Honig 2010, Wildemann 2004b]. Neben seiner Funktion als Beschichtung fungiert es zugleich als genaktivierte Oberfläche [Fang 1996], indem es Genvektoren in Biomaterialien integriert und somit Träger genetischer Information ist. PDLLA wird zudem seit einiger Zeit standardmäßig zur Beschichtung von Hüftkopfdoprothesen und Osteosynthesematerialien klinisch eingesetzt [Raschke 2004].

Nachdem nun unter Verwendung dieser Beschichtung in Verbindung mit den COPROGs bereits *in vitro* erfolgreiche Transfektionsnachweise, Daten zur DNA-Freisetzungskinetik aus PDLLA und zur Optimierung des Konzentrationsverhältnisses COPROG/PDLLA vorlagen, bei denen eine Dosis-Wirkungssystematik bewiesen werden konnte, sollten die hierbei gewonnenen Erkenntnisse auf ein *in vivo*-Modell übertragen werden:

Dafür wählten wir männliche Ratten im Alter von 6 Monaten nach vollständigem Wachstumsabschluss, welche gegenüber anderen Spezies erhebliche Vorteile wie beispielsweise einfachere Haltungsbedingungen, leichtere Handhabung und geringere Kosten aufweisen. Eine Beurteilung der gewonnenen Erkenntnisse ist objektiver und diese aussagekräftiger, da zahlreiche vergleichbare Veröffentlichungen zur Knochenheilung und anderen Regenerationsvorgängen an der Ratte vorliegen [Deppe 2004c, Deppe 2003, Hsu 2007, Schmidmaier 2002]. Die Knochenregeneration der Ratte ist mit der sekundären Knochenheilung des Menschen vergleichbar, wobei die gebildete relative Knorpelmenge während der Knochenheilung höher als bei größeren Wirbeltieren ist [Aro 1990, Henricson 1987]. Die Regeneration eines critical-size-Defektes im Kieferwinkelbereich der Ratte wurde bereits in Vorarbeiten erfolgreich eingesetzt [Arosarena 2003, Deppe 2003] und ist ein seit Langem etabliertes Modell [Hedner 1995, Schmitz 1986]. Entsprechend der *in vitro*-Versuchsphase wurden un-

terschiedliche Genvektorkonzentrationen in Bezug auf ihre Dosis-Wirkungsbeziehung ausgetestet, wobei die gentherapeutisch induzierte BMP-2 Bildung am Zielort der direkten Applikation des rekombinanten Proteins rhBMP-2 gegenüber gestellt wurde. BMP-2 ist als ein besonders effektiver knocheninduzierender Wachstumsfaktor bekannt [Chan 2008, Kolambkar 2010, Scheufler 1999], der alle Stadien der Knochenregeneration bzw. Implantateinheilung beeinflusst [Bostrom 1995]. Allerdings führt dieser WF in sämtlichen Geweben unspezifisch zu einer ektopen Knochenneubildung [Okubo 2000, Wang 1990].

Diese unkontrollierte Knochenbildung möchte man vermeiden und fordert daher eine gesteuerte und gezielte Freisetzung [Salvay 2010, Schmidmaier 2002]. Deshalb konnte sich dieser WF klinisch bislang trotz seiner osteoinduktiven Wirkung nicht durchsetzen [Lee 2010, Salata 2002]. Diese Wirkung ist Dosis abhängig [Kandziora 2003], wobei niedrige Konzentrationen zu einem proportional weniger stark ausgeprägten osteoinduktiven Effekt führen, während Dosiserhöhungen über ein bestimmtes Maß hinaus keine gesteigerte Knochenregeneration bewirken. Tierexperimentell konnte bewiesen werden, dass mittels Gentherapie im Gegensatz zu der direkten Applikation von rhBMP-2 viel weniger BMP-2 Plasmid benötigt wird, um Knochenmatrix zu bilden, da die Zellen befähigt werden, das BMP-2 selbst zu bilden [Chen 2007b].

Bekanntermaßen ist Gentherapie nur erfolgreich, wenn die applizierten Plasmide in Kontakt mit proteinbildenden Zellen kommen können [Hannallah 2003]. Somit sollte im Tiermodell geprüft werden, ob die von den lokalen Zellen im Bereich des Defektes der Ratte gebildete Menge an BMP-2 ausreicht, um einen entsprechenden Differenzierungsanreiz auf mesenchymale Stammzellen auszuüben [Discher 2009].

Bei der 50µg/100µg Plasmidgruppe bildete sich oft nur eine dünne Bindegewebslamelle über dem Defektbereich bei nahezu ausgebliebener Knochenregeneration aus, die bei Unterkieferexplantation wegen ihrer dünnen Beschaffenheit schwer zu erhalten war. Dieses war für das Zielvolumen BV und TMD bei den radiologischen Untersuchungen nicht von Belang, sehr wohl aber bei der Histometrie.

Die primär angefertigten Zahnfilme waren in ausreichender radiologischer Qualität beurteilbar, erwiesen sich aber bei der Auswertung, d.h. beim Festlegen der Lokalisation der Rasterschablone auf den Defektbereich, als klein. Darüber hinaus war es relativ schwierig, die Grenze zwischen wenig mineralisiertem Knochen und keinem Knochen – gerade wenn das Titanplättchen im Strahlengang war – festzulegen. Um

diese Probleme zu minimieren, wurden von zwei Untersuchern gemeinsam mit Hilfe der anderen Darstellungsformen (makroskopisches Bild, μ CT und Histologie) der zu bestimmende Defektbereich und die Grenzen der knöchernen Durchbauung festgelegt. Dies erwies sich als reproduzierbar und brachte enormen Zeitgewinn.

Die anschließend durchgeführten μ CT-Untersuchungen stellen in der Beurteilung des Knochens über der zellulären Ebene den Goldstandard dar [Muller 1998, Hedberg 2005, Marechal 2005, Yeom 2008, Thomsen 2005, Jiang 2000, Thomsen 2005, Link 2002].

Diese Methode ist nicht destruktiv, im Gegensatz zur Histologie entfällt eine aufwendige Probenpräparation, und es können direkt 3D-Daten der Knochenarchitektur erhoben werden. Über das Schwellenwertverfahren mit geeigneter Integrationszeit (IT) kann unproblematisch eine Trennung von Knochen und Mark vorgenommen werden. Wir wählten eine IT von 230, um das Signal-Rausch-Verhältnis in Anwesenheit von umgebendem Gewebe zu reduzieren [Bauer 2006a, Bauer 2007, Muller 1998]. Dieser Wert stellte einen sehr guten Kompromiss zwischen Bildqualität und Messzeit dar. Die TMD wurde mittels eines 5-stufigen Hydroxylapatit-Phantoms kalibriert. Um beam hardening-Effekte zu minimieren, wurde ein 1200 mg HA/ccm Phantom an Stelle des früher angewandten 200-er Phantoms angewendet [Kazakia 2008]. Dieses soll Streifen- bzw. Schlierenbildung (streaking), schwarze Ränder (dark banding), geometrische Ungleichmäßigkeit, d.h. Verschiedenheit der Intensität der Voxel in der Peripherie und im Zentrum (cupping) und Ringartefakte (ring artifacts) noch besser minimieren, so dass bei Geweben mit hohem BV/TV exaktere und damit reproduzierbarere Werte generiert werden können [Fajardo 2009]. Von Nachteil bei den μ CT-Messungen stellten sich die langen Scannzeiten von anfangs durchschnittlich 10,59 Stunden mit dem μ CT 20 dar, welche wir mit dem μ CT 40 auf 0,54 Stunden minimieren konnten. Darüber hinaus ist das VOI und damit der Probendurchmesser ebenfalls eingeschränkt, die Untersuchungen sind invasiv und kostenintensiv. Wegen unseres zylindrischen ROI's von 5 mm Durchmesser mit durchschnittlich 4,53 mm Höhe, konnten wir nicht die volumenabhängigen Parameter BV/TV und BMD bestimmen, da es hierzu erforderlich ist, den Knochen mittels der ROI zu umfahren und nicht wie von uns praktiziert, ein Standard-ROI von 5mm Durchmesser zu verwenden. Wir entschlossen uns dennoch dafür, da es für uns wichtiger war, den Knochen innerhalb des critical-size-Defektes genau zu bestimmen. Somit konnten wir den absoluten Knochen innerhalb des Defektes (BV) und die nicht volumenabhängi-

ge TMD bestimmen, welche den Nachteil hat, dass sie einen subjektiveren Parameter darstellt als die BMD. Sie ist schwellenwertabhängig und von Partialvolumeneffekten beeinflusst. Letztere werden ausgeglichen, indem zwei Pixel von jeder Seite der Oberfläche weggenommen werden (peeling) [Burghardt 2008, Morgan 2009]. Somit muss jedes Objekt fünf oder mehr Pixel umfassen, was bei allen unseren Proben gegeben war. Der Schwellenwert wurde visuell durch zwei unabhängige Untersucher anhand einer großen Anzahl von Proben festgelegt, somit war dieser reproduzierbar. Die Strukturparameter, welche automatisch mittels der Software bestimmt werden, sind ursprünglich für den trabekulären Knochen definiert worden [Singh 1978]. In unserer Regenerationsstudie macht einerseits die Mischung aus kortikalem und trabekulärem Knochen, andererseits die unterschiedlich stark ausgeprägte Kallusbildung zwischen den verschiedenen Therapieformen und im zeitlichen Verlauf die Interpretation der Strukturparameter schwierig und deren Aussagekraft wackelig. So besteht gerade bei den unoperierten, nativen Kiefern ein Missverhältnis zum kortikalen Knochen, so dass dieser Vergleich nicht überbewertet werden darf. Bei den Tieren mit appliziertem rhBMP-2 beobachtet man den geringsten Anteil an kortikalem Knochen, wobei der Anteil bis zum 112. Tag im Sinne einer trabekulären Adaption an Belastung über Modelling und Remodelling zunimmt. Somit beschränkten wir uns auf die restlichen Parameter, welche per definitionem ohne Einschränkung anwendbar waren und eindeutig interpretierbare Ergebnisse generierten.

Trotz Weiterentwicklung der μ CT-Technologie mit Pixelgrößen von bis zu einem halben μm , stellt die Histologie auf zellulärer Ebene den Goldstandard dar, zudem bietet sie die Möglichkeit, verschiedene Gewebe darzustellen und zu differenzieren. Allerdings kann man nur eine restriktive Anzahl an Schnitten analysieren, da beim Schneidevorgang eine große Materialmenge auf Grund der Dicke des Sägeblattes verloren geht. Ebenfalls sind zeitlicher und personeller Aufwand trotz automatisierter Techniken hoch. Darüber hinaus fallen nicht unerhebliche Kosten an, und man hat das weiterhin ungelöste Problem, dass man 2D-Bilder von dreidimensionalen Strukturen erhält. Somit muss man indirekt über die Annahme von Strukturmodellen auf Strukturparameter schließen. Die Ergebnisse sind abhängig von Schnittrichtung und -winkel und schwierig zu quantifizieren [Hedberg 2005]. Will man den zeitlichen Verlauf der Knochenregeneration darstellen, eignet sich die polychrome Sequenzmarkierung [Pautke 2005] als sehr objektiven Parameter, da durch die sukzessive Applikati-

on unterschiedlich fluoreszierender Farbstoffe das Anfluten im neu gebildeten Knochen zeitlich abgebildet werden kann.

Es war es ein weiteres Ziel der Untersuchung, zu prüfen, ob die geringere Auflösung des MSCT's ausreicht, das Knochenwachstum am Rattenunterkiefer während einer Knochenregenerationsstudie quantitativ und qualitativ zu evaluieren, da die μ CT ein invasives Verfahren darstellt, somit eine Messung nur post mortem möglich ist und dadurch Opferungszeitpunkte erfordert.

Die vorliegende Studie ergab vier wesentliche Erkenntnisse:

1. Der non-virale Gentransfer des BMP-2 Plasmids bewirkt eine Dosis abhängige, kontinuierliche, aber langsame Zunahme des BV im Defektbereich, wobei eine konzentrationsabhängige Zellinaktivierungsgrenze nachgewiesen werden konnte.
2. Im anterioren Defektbereich ist eine gesteigerte Regeneration im Vergleich zum dorsalen Defektbereich zu verzeichnen.
3. Im Gegensatz zum BMP-2 Plasmid führte die direkte Applikation des rekombinanten Proteins rhBMP-2 zu einer schnelleren und überschießenden Zunahme des BV.
4. Die nicht invasive MSCT überschätzt durch Partialvolumeneffekte das BV, unterschätzt die TMD, kann aber die BMC auch kleiner Volumina exakt wiedergeben.

Die niedrigen Plasmidkonzentrationen (2,5 μ g, 12,5 μ g und 25 μ g) zeigten keine lineare Dosis- Wirkungsbeziehung, mittels μ CT konnte signifikant mehr BV (am meisten bei 2,5 μ g) im Defektbereich verglichen mit den höheren Plasmidkonzentrationen oder der Kontrollgruppe detektiert werden. Diese Tatsache konnte radiologisch und histomorphometrisch dargestellt werden, wobei die Ergebnisse histomorphometrisch nur bedingt zu korrelieren waren, da hier bei der PDLLA-Gruppe stellenweise Bindegewebe bzw. bindegewebige Vorstufen mitgemessen wurden. Ein weiterer Grund für die teils differierenden Ergebnisse ist den verschiedenen Auswertungsarten anzurechnen, da konventionell radiologische und histomorphometrische Berechnungen den dreidimensionalen μ CT-Werten unterlegen waren. Somit konnten die Prozentwerte, welche mittels einer einzigen radiologischen Aufnahme generiert wurden, vor allem aber die histomorphometrisch berechneten mm²-Werte nur bedingt mit den dreidimensionalen mikrocomputertomographischen Werten verglichen werden. Die TMD stieg sowohl für den Defektbereich als auch für den ektopen Knochen im zeitlichen Ablauf bei allen Gruppen mittels μ Ct und MSCT meist signifikant an, wobei hier erneut die Gruppe mit der Plasmidkonzentration von 2,5 μ g der Nativgruppe, also

dem unversehrtem Kiefer, am nächsten kam. Die im zeitlichen Verlauf heller werden den Blautöne der farbkodierten Dichtedarstellung sind Zeichen der Dichtezunahme im zeitlichen Verlauf und Anpassung an den ortsständigen Knochen als Ergebnis des Remodellingprozesses.

Bei klar zu erkennender Abnahme der metabolischen Aktivität der 50µg/100µg Plasmidkonzentrationen zeigte sich in allen Modalitäten nur geringste, auf den anterioren Bereich begrenzte Knochenregeneration, was die Annahme zulässt, dass in dieser Gruppe initial möglicherweise keine ausreichende Vektormenge zur Verfügung stand. Alternativ könnte auch eine erhöhte Toxizität des PEI-Komplexes des Vektors als Ursache in Frage kommen [Peng 2010]. Diese mangelnde Knochenneubildung war ohne weitere Verfahren klinisch zu erkennen, selbstverständlich wurde sie radiologisch und histomorphometrisch verifiziert, wobei nicht viel mehr Knochen gebildet wurde als bei einem trepanierten Kiefer ohne Einheilphase. Damit erübrigt sich auch die Diskussion über die Dichte innerhalb dieses BV.

Aus in vitro-Versuchen war bekannt, dass die DNS-Freisetzung aus der PDLLA-Oberfläche, d.h. aus dem Vektorkonstrukt, mit einem so genannten „initial burst“ [Luan 2006, Salvay 2010] in den ersten 24 Stunden vonstattengeht, während sich die anschließende Freisetzungskurve schließlich beständig abflacht. Das PDLLA-Polymer hydrolysiert sehr langsam [Tsuji 2004], so dass eine Genvektorfreisetzung beschränkt auf die äußeren Bereiche der Beschichtung postuliert wird. Damit ist eine erhöhte Vektormenge auch nur fähig, die erst im späteren Verlauf zur Verfügung stehenden Anteile im Inneren der Beschichtung zu steigern. Anders als die äußeren Anteile vergrößerten sich diese Abschnitte bei höheren Vektorkonzentrationen überproportional, so dass eine dicke Polymerschicht wider Erwarten zu einer relativ geringen Expression bzw. Freisetzung führte. Somit stehen erhebliche Plasmidanteile in den entscheidenden ersten Tagen zur Transfektion nicht zur Verfügung, weil sie sich im Inneren der Beschichtung befinden. Damit lässt sich der geringere bzw. inverse Effekt steigender Plasmidkonzentrationen auf den Knochendefekt erklären.

Die fehlende Dosis-Wirkungsbeziehung der niedrigen Plasmidkonzentrationen ist darauf zurückzuführen, dass gentherapeutischer Erfolg nicht nur von der Transfektionseffizienz des Vektorkonstruktes, sondern auch vom Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl an Zielzellen am Wirkort abhängig ist. Um einen osteoinduktiven Effekt zu erreichen, scheint bei geschützten Genvektoren in Verbindung mit einer PDLLA-Beschichtung für jedes Tiermodell sowie jeden Regenerationsbereich eine

individuell erforderliche Plasmiddosis zu berücksichtigen zu sein. Bei etlichen Therapiegruppen dieser Studie besteht insbesondere während der frühen Opferungszeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen dem dorsalen und anterioren Volumen nahe der Wurzel des Rattenschneidezahnes, was diese These untermauert. Diese Besonderheit konnte sowohl radiologisch als auch histomorphometrisch bestätigt werden. Gerade im Bereich der Schneidezahnwurzel mit ihrem spongiosa- und damit gefäßreichen Knochengewebe sowie den parodontalen Ligamenten, welche zahlreiche BMP-2 Rezeptoren aufweisen, sind im Gegensatz zur dorsalen/zentralen Defektregion eine höhere Anzahl an Progenitorzellen und damit Zielzellen zu erwarten [Dereka 2006]. Erstaunlicherweise entwickelte die PDLLA-Kontrollgruppe eine so nicht erwartete hohe Menge an BV, wobei eine exakte Erklärung für diese Polymer bedingte Knochenheilung bisher nicht gefunden werden konnte. Mutmaßlich könnten Bindungen zwischen WF und Bindungsproteinen durch das beim PDLLA-Abbau entstehende saure Milieu aufgelöst werden, so dass sich die Konzentration an freiem WF im Defekt temporär erhöhen würde, und so eine osteoinduktive Wirkung resultieren würde. Für andere Biomaterialien auf Polymerbasis wurden jedoch Fremdkörperreaktionen wie vermehrte Makrophagenansammlungen und Bildung von osteolytischen Resorptionssäumen beschrieben, so dass dies eine PDLLA-spezifische Wirkung zu sein scheint [Peltoniemi 1999]. Fremdkörperreaktionen konnten bei der PDLLA-Kontrollgruppe weder makroskopisch noch histologisch nachgewiesen werden.

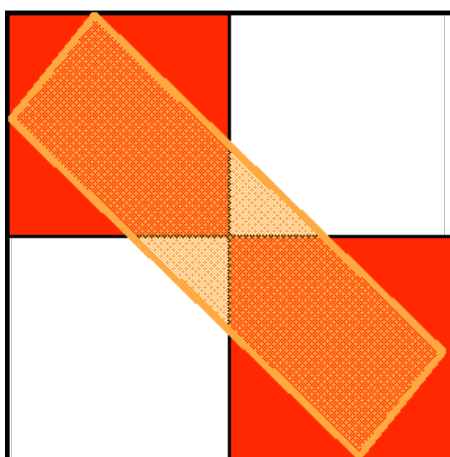
Betrachtet man nun die mit dem rekombinanten Protein rhBMP-2 behandelte Gruppe, konnte man eine sowohl in zeitlicher als auch volumenmäßiger Hinsicht grundsätzlich verschiedene Knochenregeneration nachweisen. Hierbei entwickelte sich im Vergleich zu den Plasmidgruppen aber auch zur Kontrollgruppe PDLLA signifikant mehr neu gebildete Knochenmatrix insbesondere zu den frühen Untersuchungszeitpunkten nach 14 und 28 Tagen, wobei dieser Effekt bereits nach 28 Tagen nicht mehr signifikant war. Dieser Effekt war bereits makroskopisch zu erkennen und bestätigte sich mittels der anderen Verfahren. Zu den späteren Messzeitpunkten näherten sich die Gruppen bezüglich des BV (ausgenommen die Plasmidkonzentrationen von 50 und 100 µg) an, zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden dann keine signifikanten Unterschiede mehr.

Die Gruppe der mit rhBMP-2 behandelten Tiere zeigte sogar bereits nach 28 Tagen einen der Nativgruppe entsprechenden Zuwachs innerhalb des Defektbereiches, wo-

bei es im weiteren Verlauf zu einer langsameren Regeneration des Defektknochens kam. Trotz der gesteuerten Freisetzung kam es in dieser Behandlungsgruppe wie bereits in anderen Studien vorbeschrieben [Bessho 2002, Oda 1997, Yoshida 1998] zu einer ausgeprägten unerwünschten ektopen Knochenbildung im Bereich der Masseter-Muskelschlinge. Dies konnte schon am 14. Tag festgestellt werden, wobei dieses ektote BV des gesamten Knochens einen deutlichen Volumenrückgang an den folgenden Opferungszeitpunkten zeigte. Dies untermauert die Ansicht, dass WF und hier v.a. rhBMP-2 lediglich einen initialen, stimulierenden Einfluss auf die Knochenmatrixmenge haben, welcher im zeitlichen Verlauf entfällt. Vermutlich ist der Organismus zumindest bei der Ratte nicht fähig, diese unnatürlich große Knochenmenge ausreichend zu vaskularisieren, um einen physiologischen Remodellingprozess zu ermöglichen. Histologisch ließ sich bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach 112 Tagen ein relativ unstrukturierter, eher geflechtknochenartiger Knochen darstellen. Dabei wurde eine initiale Stimulation des Knochens mit einer überschießenden Kallusbildung durch die innerhalb der ersten 48h zu 50% aus der Beschichtung freigesetzten WF nachgewiesen [Schmidmaier 2001b], während die physiologische Frakturheilung zu späteren Zeitpunkten nicht beschleunigt bzw. beeinflusst wurde [Raschke 2002, Schmidmaier 2001a, Schmidmaier 2002]. In Anlehnung an andere Arbeitsgruppen [Schmidmaier 2002] und eigene Untersuchungen [Deppe 2003], [Deppe 2004b] wurde die rhBMP-2 Konzentration von 62,5µg pro Implantat festgelegt, welche für die Entstehung der unerwünschten ektopen Knochenbildung durchaus mitverantwortlich sein kann. Es wurde bereits ein Dosis abhängiger Effekt der ektopen Ossifikation des Muskelgewebes beschrieben [Oda 1997]. Dadurch wurde die lokale Vaskularisation als notwendige Vorbedingung der ektopen Knochenneubildung verstärkt, wodurch es darüber hinaus zu einer lokalen, zum Teil synergistisch wirkenden WF-Ausschüttung z.B. von VEGF kam. Betrachtet man nun die Entwicklung der TMD, fällt auf, dass die Dichte im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ansteigt und innerhalb des Zielvolumens immer höher als die des ektopen Knochens ist, jedoch immer auf einem niedrigeren Niveau als durch das BMP-2 Plasmid induziert. Fasst man die eigenen Ergebnisse in der rhBMP-2 Gruppe im Vergleich mit denen anderer Publikationen zusammen, so kann gesagt werden, dass WF im Allgemeinen und rhBMP-2 im Speziellen zwar in den Initialphasen das BV auch bei verzögerter Freisetzung stark erhöhen, dieser Reiz jedoch keinen langfristig positiven Effekt auf

die Knochenregeneration hat, ebenso wenig auf die Dichteentwicklung [Kandziora 2002a, Schmidmaier 2002, Schopper 2008].

Korrelieren wir nun das BV mittels MSCT erhoben mit dem des μ CT, fällt auf, dass dieses mittels MSCT konstant höhere Werte im Vergleich zum μ CT aufweist. Zurückzuführen ist dies auf den Partialvolumeneffekt bedingt durch die niedrigere Auflösung des MSCT. Die MSCT generiert aufgrund der niedrigeren Auflösung mit größeren Voxeln ein höheres Volumen als der tatsächliche Knochen, während das μ CT aufgrund hoher Auflösung und sehr kleiner voxelgröße ein nahezu korrektes Volumen generiert (Abb. 6-1). Formelbedingt verhält es sich bei der Dichte (= Masse / Volumen) entgegengesetzt, bei höherem Volumen werden mittels MSCT konstant niedrigere Dichtewerte gemessen. Demgegenüber zeigt sich bei der Bestimmung der Masse eine sehr hohe Korrelation zwischen beiden Verfahren, weil sich hierbei die Partialvolumeneffekte herausmitteln, da die Masse das Produkt aus Volumen und Dichte darstellt. Das MSCT bietet sich aufgrund der Non-Invasivität und der wesentlich kürzeren Aquisitionszeiten für in vivo-Verlaufsmessungen an. Da man keine Operierungszeitpunkte vor dem Endzeitpunkt der Tierstudie bräuchte, würde dies zugleich ein Einsparen von Versuchstieren und eine beträchtliche Kostenersparnis bedeuten. Allerdings konnten bei unserem Defektmodell wegen der geringeren Auflösung des MSCT keine Strukturparameter erfasst werden.

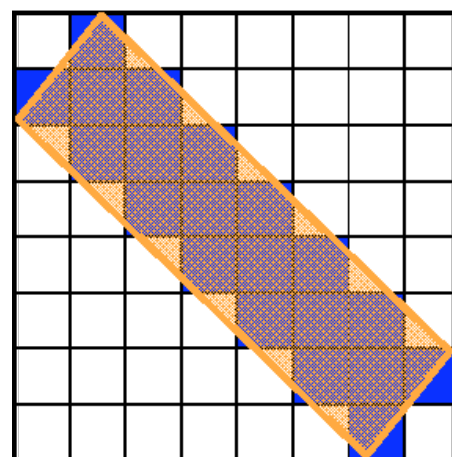


MSCT

Abb. 6-1

Partialvolumeneffekt

Diagonal sieht man ein gelbes Rechteck, welches den zu messenden Knochen darstellt. Voxel, welche mit mehr als 50% ausgefüllt sind, werden als Knochen gezählt (rot bzw. blau), Voxel, welche mit weniger als 50% ausgefüllt sind, werden nicht mitgezählt (weiß). Somit ergibt sich mit dem Mehrschicht-CT aufgrund der niedrigeren Auflösung mit größeren Voxeln ein höheres Volumen als der tatsächliche Knochen (rot), während das μ CT aufgrund hoher Auflösung und sehr kleiner voxelgröße ein nahezu korrektes Volumen (blau) generiert.

 μ CT

7 Zusammenfassung

Der aus zahlreichen in vitro- und in vivo-Studien bekannte positive osteoinduktive Effekt des Wachstumsfaktors BMP-2 wurde in dieser Arbeit in einem nicht-viralen Genvektormodell angewendet und tierexperimentell untersucht. Dabei konnten die positiven Eigenschaften des rh BMP-2 ohne die virusassoziierten Risiken des viralen Gentransfers für die Knochenregeneration genutzt werden. Es kamen radiologische und histologische Verfahren zum Einsatz.

In 70 sechs Monate alten Sprague-Dawley-Ratten wurden critical-size-Defekte (5mm) beidseits im Bereich des Kieferwinkels gesetzt und zur Knochenheilung mit beschichteten bioaktiven Implantaten bedeckt. Es wurden vier Hauptgruppen untereinander verglichen, darunter zwei therapeutische (Beschichtung mit BMP-2 Plasmid in verschiedenen Konzentrationen, rh-BMP-2 Protein) und zwei Kontrollen (PDLLA, PDLLA/COPROGS). Diese wurden dem unbehandelten Knochen ohne Defekt der gleichen Spezies gegenüber gestellt. Opferungszeitpunkte lagen am 7., 14., 28., 56. und 112. Tag. Mittels μ CT und MSCT wurden hochauflösende Schnittbilder der Defektregion angefertigt, um Knochenvolumen (BV), -dichte (TMD) und -masse (BMC) sowie trabekuläre Strukturparameter zu bestimmen.

Durch die radiologischen und histomorphometrischen Untersuchungen konnte eine gegenüber den Kontrollgruppen gesteigerte, im zeitlichen Verlauf kontinuierlich zunehmende Durchbauung der critical-size-Defekte nachgewiesen werden. Höhere Plasmidkonzentrationen führten möglicherweise auf Grund toxischer Nebeneffekte zu einer signifikant geringeren Knochenneubildung gegenüber den niedrigen Konzentrationen. Die durch das rekombinante Protein rhBMP-2 geförderte Knochenregeneration erfolgte signifikant stärker als in den Plasmidgruppen, jedoch unkontrolliert und mit zusätzlicher ektopter Knochenneubildung. Das Volumen der Gesamtknochenmenge nahm im zeitlichen Verlauf ab. Zusätzlich konnte im anterioren Defektbereich, wo mit entsprechenden Zielzellen nahe der Schneidezahnwurzel zu rechnen ist, eine im Vergleich zum dorsalen Anteil gesteigerte Regeneration gezeigt werden. Es wurde als zweites Studienziel auch überprüft, ob die geringere Auflösung des nicht-invasiven MSCT's ausreicht, das Knochenwachstum am Rattenkiefer qualitativ und quantitativ ausreichend zu evaluieren. Durch Partialvolumeneffekte überschätzt die nicht-invasive MSCT das Knochenvolumen, unterschätzt die Dichte, kann aber die Knochenmasse auch kleiner Volumina exakt wiedergeben. So könnte bei Verlaufsunter-

suchungen im Tiermodell durch die fehlende Invasivität eine beträchtliche Anzahl an Versuchstieren eingespart werden. Es konnte an Hand unterschiedlicher Verfahrenstechniken erfolgreich die in diesem Tierexperiment verwendete Beschichtungstechnologie zur gezielten Implantateinheilung und damit Knochenregeneration dargestellt werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C.A., Economides, A.N., Stahl, N., Jilka, R.L., Manolagas, S.C. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 663-673
2. Abiraman, S., Varma, H.K., Umashankar, P.R., John, A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 23 (2002) 3023-3031
3. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A.M., Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med* 7 (2005) 657-663
4. Akizuki, S., Yasukawa, Y., Takizawa, T. A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty. *Bull Hosp Jt Dis* 56 (1997) 222-224
5. Albrektsson, T., Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2 (2001) S96-101
6. Alden, T.D., Pittman, D.D., Hankins, G.R., Beres, E.J., Engh, J.A., Das, S., Hudson, S.B., Kerns, K.M., Kallmes, D.F., Helm, G.A. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 10 (1999) 2245-2253
7. Alton, E.W., Stern, M., Farley, R., Jaffe, A., Chadwick, S.L., Phillips, J., Davies, J., Smith, S.N., Browning, J., Davies, M.G., Hodson, M.E., Durham, S.R., Li, D., Jeffery, P.K., Scallan, M., Balfour, R., Eastman, S.J., Cheng, S.H., Smith, A.E., Meeker, D., Geddes, D.M. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 353 (1999) 947-954
8. Amling, M., Herden, S., Posl, M., Hahn, M., Ritzel, H., Delling, G. Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 36-45
9. Aro, H.T., Wippermann, B.W., Hodgson, S.F., Chao, E.Y. Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res* 8 (1990) 238-246
10. Arosarena, O.A., Collins, W.L. Defect repair in the rat mandible with bone morphogenetic protein 5 and prostaglandin E1. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129 (2003) 1125-1130
11. Aspenberg, P., Lohmander, L.S. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthop Scand* 60 (1989) 473-476
12. Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of

- Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med* 79 (1944) 137-158
13. Aviles, M.O., Lin, C.H., Zelivyanskaya, M., Graham, J.G., Boehler, R.M., Messersmith, P.B., Shea, L.D. The contribution of plasmid design and release to in vivo gene expression following delivery from cationic polymer modified scaffolds. *Biomaterials* 31 (2009) 1140-1147
 14. Baltzer, A.W., Lieberman, J.R. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther* 11 (2004) 344-350
 15. Barbier, A., Martel, C., de Vernejoul, M.C., Tirode, F., Nys, M., Mocaer, G., Morieux, C., Murakami, H., Lacheretz, F. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *J Bone Miner Metab* 17 (1999) 37-44
 16. Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14 (1999) 1805-1815
 17. Bauer, J.S., Issever, A.S., Fischbeck, M., Burghardt, A., Eckstein, F., Rummeny, E.J., Majumdar, S., Link, T.M. [Multislice-CT for structure analysis of trabecular bone - a comparison with micro-CT and biomechanical strength]. *Rofo* 176 (2004) 709-718
 18. Bauer, J.S., Kohlmann, S., Eckstein, F., Mueller, D., Lochmuller, E.M., Link, T.M. Structural analysis of trabecular bone of the proximal femur using multislice computed tomography: a comparison with dual X-ray absorptiometry for predicting biomechanical strength in vitro. *Calcif Tissue Int* 78 (2006a) 78-89
 19. Bauer, J.S., Link, T.M., Burghardt, A., Henning, T.D., Mueller, D., Majumdar, S., Prevrhal, S. Analysis of trabecular bone structure with multidetector spiral computed tomography in a simulated soft-tissue environment. *Calcif Tissue Int* 80 (2007) 366-373
 20. Bauer, J.S., Muller, D., Ambekar, A., Dobritz, M., Matsuura, M., Eckstein, F., Rummeny, E.J., Link, T.M. Detection of osteoporotic vertebral fractures using multidetector CT. *Osteoporos Int* 17 (2006b) 608-615
 21. Bax, B.E., Wozney, J.M., Ashhurst, D.E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 65 (1999) 83-89
 22. Baylink, D.J., Finkelman, R.D., Mohan, S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2 (1993) S565-572
 23. Bessho, K., Carnes, D.L., Cavin, R., Ong, J.L. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res* 61 (2002) 61-65
 24. Bevill, G., Eswaran, S.K., Gupta, A., Papadopoulos, P., Keaveny, T.M. Influence of bone volume fraction and architecture on computed large-

- deformation failure mechanisms in human trabecular bone. *Bone* 39 (2006) 1218-1225
25. Bier, A. Observations on regeneration in humans. XII. Essay. Regeneration of bones. 2. Pseudo-arthritis. *Deut Med Wochenschr* 44 (1918) 452-456
 26. Bolander, M.E. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200 (1992) 165-170
 27. Bonadio, J. Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev* 44 (2000) 185-194
 28. Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., Goldstein, S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 5 (1999) 753-759
 29. Boss, J.H. Osseointegration. *J Long Term Eff Med Implants* 9 (1999) 1-10
 30. Bostrom, M.P., Lane, J.M., Berberian, W.S., Missri, A.A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S.B., Glaser, D., Rosen, V.M. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13 (1995) 357-367
 31. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 7297-7301
 32. Branemark, P.I. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50 (1983) 399-410
 33. Brown, B.D., Lillicrap, D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 100 (2002) 1133-1140
 34. Brunski, J.B. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res* 13 (1999) 99-119
 35. Burghardt, A.J., Kazakia, G.J., Laib, A., Majumdar, S. Quantitative assessment of bone tissue mineralization with polychromatic micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int* 83 (2008) 129-138
 36. Cameron, H.U., Pilliar, R.M., MacNab, I. The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *J Biomed Mater Res* 7 (1973) 301-311
 37. Caplen, N.J., Alton, E.W., Middleton, P.G., Dorin, J.R., Stevenson, B.J., Gao, X., Durham, S.R., Jeffery, P.K., Hodson, M.E., Coutelle, C., et al. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1 (1995) 39-46
 38. Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A., Wozney, J.M. Identification of transforming growth factor beta family

- members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 9843-9847
39. Chan, G., Mooney, D.J. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol* 26 (2008) 382-392
 40. Chen, B., Lin, H., Wang, J., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, W., Sun, W., Dai, J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28 (2007a) 1027-1035
 41. Chen, J.C., Winn, S.R., Gong, X., Ozaki, W.H. rhBMP-4 gene therapy in a juvenile canine alveolar defect model. *Plast Reconstr Surg* 120 (2007b) 1503-1509
 42. Chiu, E.S., Kraus, D., Bui, D.T., Mehrara, B.J., Disa, J.J., Bilsky, M., Shah, J.P., Cordeiro, P.G. Anterior and middle cranial fossa skull base reconstruction using microvascular free tissue techniques: surgical complications and functional outcomes. *Ann Plast Surg* 60 (2008) 514-520
 43. Choleris, E., Little, S.R., Mong, J.A., Puram, S.V., Langer, R., Pfaff, D.W. Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 4670-4675
 44. Chu, G., Hayakawa, H., Berg, P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 1311-1326
 45. Cooke, H. Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects. *Cloning Stem Cells* 3 (2001) 243-249
 46. Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kirlappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H., Birnstiel, M.L. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 4033-4037
 47. David, V., Laroche, N., Boudignon, B., Lafage-Proust, M.H., Alexandre, C., Ruegsegger, P., Vico, L. Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res* 18 (2003) 1622-1631
 48. Davies, J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245 (1996) 426-445
 49. Davies, J.E. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 (1998) 391-401
 50. Day, J.S., Ding, M., Odgaard, A., Sumner, D.R., Hvid, I., Weinans, H. Parallel plate model for trabecular bone exhibits volume fraction-dependent bias. *Bone* 27 (2000) 715-720

51. De Laporte, L., Shea, L.D. Matrices and scaffolds for DNA delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 292-307
52. Deng, C.X., Sieling, F., Pan, H., Cui, J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol* 30 (2004) 519-526
53. Deppe, H., Greim, H., Brill, T., Wagenpfeil, S. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 (2002) 707-714
54. Deppe, H., Horch, H.H., Kolk, A. Microstructured dental implants and palatal mucosal grafts in cleft patients: a retrospective analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 32 (2004a) 211-215
55. Deppe, H., Kolk, A., Stemberger, A. Zur Knochenregeneration unter CO₂-Laser-modifizierten Titanfolien - Eine tierexperimentelle Studie. *LaserZahnheilkunde* 1 (2004b) 39-44
56. Deppe, H., Stemberger, A. Effects of laser-modified versus osteopromotively coated titanium membranes on bone healing: a pilot study in rat mandibular defects. *Lasers Med Sci* 18 (2004c) 190-195
57. Deppe, H., Stemberger, A., Hillemanns, M. Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18 (2003) 369-376
58. Dereka, X.E., Markopoulou, C.E., Vrotsos, I.A. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 24 (2006) 260-267
59. Ding, M., Odgaard, A., Hvid, I. Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *J Biomech* 32 (1999) 323-326
60. Discher, D.E., Mooney, D.J., Zandstra, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324 (2009) 1673-1677
61. Donath, K., Breuner, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11 (1982) 318-326
62. Dragoo, J.L., Choi, J.Y., Lieberman, J.R., Huang, J., Zuk, P.A., Zhang, J., Hedrick, M.H., Benhaim, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21 (2003) 622-629
63. Einhorn, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (1998) S7-21
64. Eloot, L., Buls, N., Covens, P., Willekens, I., Lahoutte, T., de Mey, J. Quality control of micro-computed tomography systems. *Radiat Prot Dosimetry* 139 (2010) 463-467
65. Engelke, K., Karolczak, M., Lutz, A., Seibert, U., Schaller, S., Kalender, W. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe* 39 (1999) 203-212

66. Fajardo, R.J., Cory, E., Patel, N.D., Nazarian, A., Laib, A., Manoharan, R.K., Schmitz, J.E., DeSilva, J.M., MacLatchy, L.M., Snyder, B.D., Bouxsein, M.L. Specimen size and porosity can introduce error into microCT-based tissue mineral density measurements. *Bone* 44 (2009) 176-184
67. Fang, J., Zhu, Y.Y., Smiley, E., Bonadio, J., Rouleau, J.P., Goldstein, S.A., McCauley, L.K., Davidson, B.L., Roessler, B.J. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 5753-5758
68. Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G., Kleerekoper, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4 (1989) 3-11
69. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 7413-7417
70. Finsinger, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Koch, C., Plank, C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther* 7 (2000) 1183-1192
71. Fischer, A., Hacein-Bey, S., Cavazzana-Calvo, M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 615-621
72. Fischer, J., Kolk, A., Wolfart, S., Pautke, C., Warnke, P., Plank, C., Smeets, R. Future of local bone regeneration e Protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg* in press (2010)
73. Fritsch, H. Staining of different tissues in thick epoxy resin-impregnated sections of human fetuses. *Stain Technol* 64 (1989) 75-79
74. Fritz, M.E. Two-stage implant systems. *Adv Dent Res* 13 (1999) 162-169
75. Fujimoto, R., Tanizawa, T., Nishida, S., Yamamoto, N., Soshi, S., Endo, N., Takahashi, H.E. Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab* 17 (1999) 11-17
76. Furlong, R.J., Osborn, J.F. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br* 73 (1991) 741-745
77. Gill, D.R., Southern, K.W., Mofford, K.A., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., Thomson, A., MacVinish, L.J., Ratcliff, R., Bilton, D., Lane, D.J., Littlewood, J.M., Webb, A.K., Middleton, P.G., Colledge, W.H., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Higgins, C.F., Hyde, S.C. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 4 (1997) 199-209
78. Goldberg, V.M., Jinno, T. The bone-implant interface: a dynamic surface. *J Long Term Eff Med Implants* 9 (1999) 11-21

79. Gollwitzer, H., Thomas, P., Diehl, P., Steinhauser, E., Summer, B., Barnstorf, S., Gerdesmeyer, L., Mittelmeier, W., Stemberger, A. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. *J Orthop Res* 23 (2005) 802-809
80. Gondolph-Zink, B. [Effect of hydroxyapatite layering on the osteo-integration of weightbearing and non-weightbearing implants. Comparison to other microporous surfaces in animal experiments]. *Orthopade* 27 (1998) 96-104
81. Goulet, R.W., Goldstein, S.A., Ciarelli, M.J., Kuhn, J.L., Brown, M.B., Feldkamp, L.A. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* 27 (1994) 375-389
82. Gruber, H.E. Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone. *Biotech Histochem* 67 (1992) 30-34
83. Grunder, U., Hurzeler, M.B., Schupbach, P., Strub, J.R. Treatment of ligature-induced peri-implantitis using guided tissue regeneration: a clinical and histologic study in the beagle dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 8 (1993) 282-293
84. Habal, M.B., Reddi, A.H. Bone grafts and bone induction substitutes. *Clin Plast Surg* 21 (1994) 525-542
85. Haensler, J., Szoka, F.C., Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 4 (1993) 372-379
86. Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J.R., Fu, F.H., Huard, J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 52 (2003) 753-768
87. Hedberg, E.L., Kroese-Deutman, H.C., Shih, C.K., Lemoine, J.J., Liebschner, M.A., Miller, M.J., Yasko, A.W., Crowther, R.S., Carney, D.H., Mikos, A.G., Jansen, J.A. Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 11 (2005) 1356-1367
88. Hedner, E., Linde, A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes--an experimental study in rat mandibular defects. *Eur J Oral Sci* 103 (1995) 236-241
89. Henricson, A., Hulth, A., Johnell, O. The cartilaginous fracture callus in rats. *Acta Orthop Scand* 58 (1987) 244-248
90. Henry, P.J. Clinical experiences with dental implants. *Adv Dent Res* 13 (1999) 147-152
91. Herrmann, R., Schmidmaier, G., Markl, B., Resch, A., Hahnel, I., Stemberger, A., Alt, E. Antithrombogenic coating of stents using a biodegradable drug delivery technology. *Thromb Haemost* 82 (1999) 51-57
92. Hildebrand, T., Ruegsegger, P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1 (1997) 15-23

93. Honig, D., DeRouchey, J., Jungmann, R., Koch, C., Plank, C., Radler, J.O. Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules* 11 (2010) 1802-1809
94. Horch, H.H., Sader, R., Pautke, C., Neff, A., Deppe, H., Kolk, A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35 (2006) 708-713
95. Hsu, W.K., Sugiyama, O., Park, S.H., Conduah, A., Feeley, B.T., Liu, N.Q., Krenek, L., Virk, M.S., An, D.S., Chen, I.S., Lieberman, J.R. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone* 40 (2007) 931-938
96. Huang, Q., Goh, J.C., Hutmacher, D.W., Lee, E.H. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng* 8 (2002) 469-482
97. Huja, S.S., Katona, T.R., Burr, D.B., Garetto, L.P., Roberts, W.E. Microdamage adjacent to endosseous implants. *Bone* 25 (1999) 217-222
98. Hurzeler, M.B., Quinones, C.R., Schupback, P., Morrison, E.C., Caffesse, R.G. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: Histologic findings. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12 (1997) 168-175
99. Isgaard, J., Nilsson, A., Lindahl, A., Jansson, J.O., Isaksson, O.G. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 250 (1986) E367-372
100. Ito, M., Nakamura, T., Matsumoto, T., Tsurusaki, K., Hayashi, K. Analysis of trabecular microarchitecture of human iliac bone using microcomputed tomography in patients with hip arthrosis with or without vertebral fracture. *Bone* 23 (1998) 163-169
101. Jenó, L., Geza, L. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 31 (1975) 1-4
102. Jiang, Y., Zhao, J., White, D.L., Genant, H.K. Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1 (2000) 45-51
103. Joyce, M.E., Jingushi, S., Bolander, M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21 (1990) 199-209
104. Kandziora, F., Bail, H., Schmidmaier, G., Schollmeier, G., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Pflugmacher, R., Mittlmeier, T., Raschke, M., Haas, N.P. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 97 (2002a) 40-48

105. Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Schollmeier, G., Bail, H., Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M., Haas, N.P. Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF- α 1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* 11 (2002b) 482-493
106. Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Schafer, J., Schollmeier, G., Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M., Haas, N.P. Dose-dependent effects of combined IGF-I and TGF- β 1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* 12 (2003) 464-473
107. Karoussis, I.K., Kotsovilis, S., Fourmoussis, I. A comprehensive and critical review of dental implant prognosis in periodontally compromised partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 18 (2007) 669-679
108. Kawai, M., Bessho, K., Kaihara, S., Sonobe, J., Oda, K., Iizuka, T., Maruyama, H. Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. *Hum Gene Ther* 14 (2003) 1547-1556
109. Kazakia, G.J., Burghardt, A.J., Cheung, S., Majumdar, S. Assessment of bone tissue mineralization by conventional x-ray microcomputed tomography: comparison with synchrotron radiation microcomputed tomography and ash measurements. *Med Phys* 35 (2008) 3170-3179
110. Kim, S.K., Lee, H.N., Choi, Y.C., Heo, S.J., Lee, C.W., Choie, M.K. Effects of anodized oxidation or turned implants on bone healing after using conventional drilling or trabecular compaction technique: histomorphometric analysis and RFA. *Clin Oral Implants Res* 17 (2006) 644-650
111. Kinney, J.H., Lane, N.E., Haupt, D.L. In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone. *J Bone Miner Res* 10 (1995) 264-270
112. Kircheis, R., Wightman, L., Wagner, E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev* 53 (2001) 341-358
113. Klaushofer, K., Peterlik, M. [Pathophysiology of fracture healing]. *Radiologe* 34 (1994) 709-714
114. Knoell, D.L., Yiu, I.M. Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials. *Am J Health Syst Pharm* 55 (1998) 899-904
115. Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Boerckel, J.D., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W., Guldberg, R.E. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* (2010)
116. Kopatz, I., Remy, J.S., Behr, J.P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *J Gene Med* 6 (2004) 769-776
117. Kubler, N.R. [Osteoinduction and -reparation]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1 (1997) 2-25

118. Kuhn, J.L., Goldstein, S.A., Feldkamp, L.A., Goulet, R.W., Jesion, G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res* 8 (1990) 833-842
119. Lee, K., Silva, E.A., Mooney, D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* (2010)
120. Lind, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 283 (1998) 2-37
121. Linder, L. Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 60 (1989) 129-134
122. Link, T.M., Bauer, J.S. Imaging of trabecular bone structure. *Semin Musculoskelet Radiol* 6 (2002) 253-261
123. Linkhart, T.A., Mohan, S., Baylink, D.J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19 (1996) 1S-12S
124. Luan, X., Skupin, M., Siepmann, J., Bodmeier, R. Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Int J Pharm* 324 (2006) 168-175
125. Marechal, M., Luyten, F., Nijs, J., Postnov, A., Schepers, E., van Steenberghe, D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res* 16 (2005) 708-714
126. Martens, M., Ducheyne, P., De Meester, P., Mulier, J.C. Skeletal fixation of implants by bone ingrowth into surface pores. *Arch Orthop Trauma Surg* 97 (1980) 111-116
127. Marukawa, E., Asahina, I., Oda, M., Seto, I., Alam, M., Enomoto, S. Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 (2002) 287-295
128. Marx, R.E., Garg, A.K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 7 (1998) 267-276
129. Masuda, T., Yliheikkila, P.K., Felton, D.A., Cooper, L.F. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13 (1998) 17-29
130. McKibbin, B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B (1978) 150-162
131. Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., Guy, R.H. Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *J Control Release* 104 (2005a) 203-211
132. Mehier-Humbert, S., Guy, R.H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005b) 733-753

133. Meyer, U., Wiesmann, H.P., Berr, K., Kubler, N.R., Handschel, J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (2006) 899-906
134. Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346
135. Mitani, K., Kubo, S. Adenovirus as an integrating vector. *Curr Gene Ther* 2 (2002) 135-144
136. Morgan, E.F., Mason, Z.D., Chien, K.B., Pfeiffer, A.J., Barnes, G.L., Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44 (2009) 335-344
137. Muller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Ruegsegger, P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23 (1998) 59-66
138. Musgrave, D.S., Bosch, P., Ghivizzani, S., Robbins, P.D., Evans, C.H., Huard, J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24 (1999) 541-547
139. Nakamura, Y., Wakitani, S., Nakayama, J., Wakabayashi, S., Horiuchi, H., Takaoka, K. Temporal and spatial expression profiles of BMP receptors and noggin during BMP-2-induced ectopic bone formation. *J Bone Miner Res* 18 (2003) 1854-1862
140. Nazarian, A., Snyder, B.D., Zurakowski, D., Muller, R. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. *Bone* 43 (2008) 302-311
141. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1 (1982) 841-845
142. Nielsen, H.M., Andreassen, T.T., Ledet, T., Oxlund, H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65 (1994) 37-41
143. Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Peterson, L., Isaksson, O. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40 (1987) 91-96
144. Nishikawa, M., Hashida, M. Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biol Pharm Bull* 25 (2002) 275-283
145. Oda, S., Kinoshita, A., Higuchi, T., Shizuya, T., Ishikawa, I. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Med Dent Sci* 44 (1997) 53-62

146. Odgaard, A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20 (1997) 315-328
147. Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Iizuka, T., Miyatake, S.I. In vitro and in vivo studies of a bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001) S99-104
148. 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 (2000) 62-66
149. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (1987) 595-610
150. Parfitt, A.M., Mathews, C.H., Villanueva, A.R., Kleerekoper, M., Frame, B., Rao, D.S. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J Clin Invest* 72 (1983) 1396-1409
151. Partridge, K., Yang, X., Clarke, N.M., Okubo, Y., Bessho, K., Sebald, W., Howdle, S.M., Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 292 (2002) 144-152
152. Pautke, C., Bauer, F., Bissinger, O., Tischer, T., Kreutzer, K., Steiner, T., Weitz, J., Otto, S., Wolff, K.D., Sturzenbaum, S.R., Kolk, A. Tetracycline bone fluorescence: a valuable marker for osteonecrosis characterization and therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 68 (2010) 125-129
153. Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H., Milz, S., Schieker, M., Kolk, A. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 37 (2005) 441-445
154. Peltoniemi, H.H., Hallikainen, D., Toivonen, T., Helevirta, P., Waris, T. SR-PLLA and SR-PGA miniscrews: biodegradation and tissue reactions in the calvarium and dura mater. *J Craniomaxillofac Surg* 27 (1999) 42-50
155. Peng, L., Gao, Y., Xue, Y.N., Huang, S.W., Zhuo, R.X. Cytotoxicity and in vivo tissue compatibility of poly(amidoamine) with pendant aminobutyl group as a gene delivery vector. *Biomaterials* 31 (2010) 4467-4476
156. Piattelli, A., Trisi, P., Passi, P., Piattelli, M., Cordioli, G.P. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone-titanium interface: an experimental study in rabbits. *Biomaterials* 15 (1994) 194-200
157. Pjetursson, B.E., Tan, K., Lang, N.P., Bragger, U., Egger, M., Zwahlen, M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial

- dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 15 (2004) 667-676
158. Raschke, M., Wildemann, B., Inden, P., Bail, H., Flyvbjerg, A., Hoffmann, J., Haas, N.P., Schmidmaier, G. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone* 30 (2002) 144-151
159. Raschke, M.J., Schmidmaier, G. [Biological coating of implants--a new key technology?]. *Unfallchirurg* 107 (2004) 651
160. Reddi, A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001) S1-6
161. Rosen, V., Thies, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8 (1992) 97-102
162. Rueggegger, P., Koller, B., Muller, R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 58 (1996) 24-29
163. Salata, L.A., Franke-Stenport, V., Rasmusson, L. Recent outcomes and perspectives of the application of bone morphogenetic proteins in implant dentistry. *Clin Implant Dent Relat Res* 4 (2002) 27-32
164. Salvay, D.M., Zelivyanskaya, M., Shea, L.D. Gene delivery by surface immobilization of plasmid to tissue-engineering scaffolds. *Gene Ther* 17 (2010) 1134-1141
165. Schenk, R.K., Buser, D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17 (1998) 22-35
166. Scherer, F., Schillinger, U., Putz, U., Stemberger, A., Plank, C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 4 (2002) 634-643
167. Scheufler, C., Sebald, W., Hulsmeyer, M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 287 (1999) 103-115
168. Schliephake, H., Scharnweber, D., Dard, M., Rossler, S., Sewing, A., Meyer, J., Hoogestraat, D. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 13 (2002) 312-319
169. Schmidmaier, G., Lucke, M., Schwabe, P., Raschke, M., Haas, N.P., Wildemann, B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants* 16 (2006a) 61-69
170. Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., Haas, N.P., Raschke, M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 37 Suppl 2 (2006b) S105-112

171. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N.P., Raschke, M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28 (2001a) 341-350
172. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Cromme, F., Kandziora, F., Haas, N.P., Raschke, M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 30 (2002) 816-822
173. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Gabelein, T., Heeger, J., Kandziora, F., Haas, N.P., Raschke, M. Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. *Acta Orthop Scand* 74 (2003a) 604-610
174. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Lubberstedt, M., Haas, N.P., Raschke, M. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65 (2003b) 157-162
175. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 58 (2001b) 449-455
176. Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (1986) 299-308
177. Schopper, C., Moser, D., Spassova, E., Goriwoda, W., Lagogiannis, G., Hoering, B., Ewers, R., Redl, H. Bone regeneration using a naturally grown HA/TCP carrier loaded with rh BMP-2 is independent of barrier-membrane effects. *J Biomed Mater Res A* 85 (2008) 954-963
178. Seto, I., Asahina, I., Oda, M., Enomoto, S. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 59 (2001) 53-61; discussion 62-53
179. Seto, I., Tachikawa, N., Mori, M., Hoshino, S., Marukawa, E., Asahina, I., Enomoto, S. Restoration of occlusal function using osseointegrated implants in the canine mandible reconstructed by rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* 13 (2002) 536-541
180. Simon, R.H., Engelhardt, J.F., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Grossman, M., Wilson, J.M. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 4 (1993) 771-780
181. Singh, I. The architecture of cancellous bone. *J Anat* 127 (1978) 305-310

182. Smeets, R., Maciejewski, O., Gerressen, M., Spiekermann, H., Hanisch, O., Riediger, D., Blake, F., Stein, J., Holzle, F., Kolk, A. Impact of rhBMP-2 on regeneration of buccal alveolar defects during the osseointegration of transgingival inserted implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108 (2009) e3-e12
183. Soballe, K., Hansen, E.S., Brockstedt-Rasmussen, H., Pedersen, C.M., Bunger, C. Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit. *Acta Orthop Scand* 61 (1990) 299-306
184. Solheim, E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 22 (1998) 410-416
185. Stemberger, A., Grimm, H., Bader, F., Rahn, H.D., Ascherl, R. Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. *Eur J Surg Suppl* (1997) 17-26
186. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, N., Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 140 (1999) 2125-2133
187. Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Goff, S.P., Weinberg, R.A. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol Cell Biol* 2 (1982) 426-436
188. Tamada, T., Sone, T., Jo, Y., Imai, S., Kajihara, Y., Fukunaga, M. Three-dimensional trabecular bone architecture of the lumbar spine in bone metastasis from prostate cancer: comparison with degenerative sclerosis. *Skeletal Radiol* 34 (2005) 149-155
189. Tang, M.X., Szoka, F.C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther* 4 (1997) 823-832
190. Tayalia, P., Mooney, D.J. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater* 21 (2009) 3269-3285
191. Thies, R.S., Bauduy, M., Ashton, B.A., Kurtzberg, L., Wozney, J.M., Rosen, V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130 (1992) 1318-1324
192. Thoma, K., Schlutermann, B. [Biodegradable polymers as retardation excipients for drugs]. *Pharmazie* 46 (1991) 821-830
193. Thomsen, J.S., Laib, A., Koller, B., Prohaska, S., Mosekilde, L., Gowin, W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc* 218 (2005) 171-179
194. Tsuji, H., Ikarashi, K. In vitro hydrolysis of poly(L-lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites. Part I: long-term hydrolysis in phosphate-buffered solution at 37 degrees C. *Biomaterials* 25 (2004) 5449-5455

195. Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H.E., Hara, T. A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 61 (1997) 493-498
196. Underwood, E.E. Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures. *J Microsc* 89 (1969) 161-180
197. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (1965) 893-899
198. Varady, P., Li, J.Z., Alden, T.D., Kallmes, D.F., Williams, M.B., Helm, G.A. CT and radionuclide study of BMP-2 gene therapy-induced bone formation. *Acad Radiol* 9 (2002) 632-637
199. Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., Birnstiel, M.L. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 3410-3414
200. Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P., et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2220-2224
201. Weber, F.E., Eyrich, G., Gratz, K.W., Maly, F.E., Sailer, H.F. Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 (2002) 60-65
202. Wei, C.M., Gibson, M., Spear, P.G., Scolnick, E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39 (1981) 935-944
203. Whitehouse, W.J. The quantitative morphology of anisotropic trabecular bone. *J Microsc* 101 (1974) 153-168
204. Wildemann, B., Bamdad, P., Holmer, C., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 34 (2004a) 862-868
205. Wildemann, B., Kandziora, F., Krummrey, G., Palaschies, N., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release* 95 (2004b) 249-256
206. Wildemann, B., Lubberstedt, M., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 25 (2004c) 3639-3644
207. Wildemann, B., Schmidmaier, G., Ordell, S., Stange, R., Haas, N.P., Raschke, M. Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced

- by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65 (2003) 150-156
208. Wolf, H., Rols, M.P., Boldt, E., Neumann, E., Teissie, J. Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 66 (1994) 524-531
209. Wolff, K.D., Holzle, F., Wysluch, A., Mucke, T., Kesting, M. Incidence and time of intraoperative vascular complications in head and neck microsurgery. *Microsurgery* 28 (2008) 143-146
210. Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E., Crystal, R.G. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 8 (1997) 37-44
211. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242 (1988) 1528-1534
212. Yasko, A.W., Lane, J.M., Fellingner, E.J., Rosen, V., Wozney, J.M., Wang, E.A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992) 659-670
213. Yeom, H., Blanchard, S., Kim, S., Zunt, S., Chu, T.M. Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. *J Craniofac Surg* 19 (2008) 446-452
214. Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 26 (1998) 112-115
215. Zauner, W., Kichler, A., Schmidt, W., Sinski, A., Wagner, E. Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection. *Biotechniques* 20 (1996) 905-913
216. Zellin, G., Linde, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 35 (1997a) 181-190
217. Zellin, G., Linde, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 31 (1997b) 97-104
218. Zheng, M.H., Wood, D.J., Papadimitriou, J.M. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract* 188 (1992) 1104-1121

9 Danksagung

Mit dem Abschluss dieser Dissertation danke ich Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus Dietrich Wolff, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München, und Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, die mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit in ihrer Klinik bzw. ihrem Institut durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Kolk für die Überlassung des Themas, das Studiendesign, die vielen Anregungen und seine nicht auf Tageszeiten beschränkte Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit und nicht zuletzt für die zeitnahe schnelle Korrektur. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für seine Tipps, sowie die Bereitstellung und Entwicklung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Genvektortechnologie.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Forschungsgruppe der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München und hier insbesondere Herrn Univ.- Prof. Dr. med. dent. Herbert Deppe für die erfolgreichen Vorarbeiten mit Wachstumsfaktoren und auch Frau Dr. med. vet. Cornelia Haczek sowie meinen Kollegen Dr. med. dent. Kilian Kreutzer und Michael Stöhrer für ihre kooperative Unterstützung. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Jan Bauer aus dem Institut für Röntgendiagnostik der TU München für die vielen Anregungen und die Hilfsbereitschaft bei den CT-Messungen und der gesamten radiologischen Auswertung. Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Reinhard Putz, ehemaliger Direktor der Anatomischen Anstalt der LMU, für die Bereitstellung der radiologischen und histologischen Arbeitsplätze und hier insbesondere Frau Maiko Matsuura für die freundliche Unterstützung bei allen Fragen bezüglich des μ CT 20 und Prof. Dr. med. dent. Karl-Heinz Kunzelmann aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie für die Nutzung des μ CT 40.

Nicht zuletzt danke ich Herrn PD Dr. Stefan Wagenpfeil sowie seiner Mitarbeiterin Frau Catherine Riehle für die Beratung und Unterstützung im Rahmen der statistischen Auswertung.

Ein wesentlicher Dank gilt auch Bettina Kleber, meinen Eltern und Großeltern, die mich immer unterstützten und ohne deren Verständnis die Promotion so nicht möglich gewesen wäre.

10 Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Marc Oliver Bissinger
 Geburtsdatum: 21. Januar 1980
 Geburtsort: Tübingen, Baden-Württemberg
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

1987 - 1991 Grundschole Herterichschule, München
 1991 - 2000 Pater-Rupert-Mayer-Gymnasium, Pullach bei München
 30.06.2000 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

WEHRDIENST

09/2000 – 06/2001 Prinz-Heinrich-Kaserne, Lenggries

HOCHSCHULSTUDIUM

10/2001 – 04/2008 Studium der Humanmedizin an der LMU und TU München und an der University of Sydney, 08/2003 ärztl. Vorprüfung, 04/2008 ärztl. Prüfung (Gesamtnote: Sehr gut)
 19.05.2008 Approbation als Arzt
 seit 04/2008 Studium der Zahnmedizin an der LMU München

VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE IM RAHMEN DER PROMOTION

02/2008/2009 Vortrag und Poster auf dem 12./13. Kongress der ÖGMKG
 05/2008/2009 Vortrag und Poster auf dem 59./60. Kongress der DGMKG

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit 15.05 2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München.