

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und  
Kieferkrankheiten

der Universität Würzburg

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und

Zahnheilkunde

Vorstand: Prof. Dr. J. Groll

**Ortsgerichtete simultane Differenzierung von Stammzellen  
auf proteinmodifizierten Bruschi-Oberflächen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Nadine Alexander

aus Wuppertal

Würzburg, Juli 2017

Für meine Mutter,  
in Liebe und Dankbarkeit

**Referent:** Prof. Dr. Uwe Gbureck

**Koreferent:** Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2018**

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

1	Einleitung .....	1
1.1	Allgemeine Morphologie und Biologie des Knochens.....	1
1.1.1	Knochenzellen und Knochenumbau.....	3
1.1.2	Zellbiologie des Knochens .....	4
1.2	Knochenheilung.....	6
1.3	Einflussfaktoren auf die Knochenheilung .....	7
1.3.1	Die TGF- $\beta$ Superfamilie.....	7
1.3.2	Struktur und Signaltransduktionswege von BMP .....	10
1.3.3	rhBMP 2 .....	12
1.4	VEGF.....	12
1.4.1	Funktion und Struktur .....	12
1.4.2	Expression von VEGF.....	14
1.4.3	VEGF in der Therapie .....	15
1.5	VEGF in der Knochenregeneration und dessen Zusammenwirken mit BMP-2 .	15
1.6	Knochenersatzmaterialien.....	17
1.7	Calciumphosphate als Knochenersatzwerkstoffe .....	22
1.8	Calciumphosphat-Zemente .....	23
1.9	Tricalciumphosphate.....	26
1.10	Bruschi .....	27
1.11	Knochenersatzmaterialien im biologischen System .....	29
1.11.1	Tissue Engineering .....	29
1.11.2	Tissue Engineering von Knochen.....	30
1.11.3	Vaskularisierung von Scaffolds .....	31
1.12	Vaskulogenese, Wundheilung und Angiogenese .....	31
1.13	Humane mesenchymale Stammzellen.....	32
1.13.1	Adulte mesenchymale Stammzellen .....	34
1.13.2	Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und geeignetem Trägermaterial.....	36
2	Ziel der Arbeit.....	38
3	Material und Methode .....	40
3.1	Geräte und Hilfsmittel .....	40
3.2	Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	43

3.3	Herstellung der Prüfkörper .....	47
3.3.1	Herstellung von $\alpha/\beta$ -Tricalciumphosphat Pulver .....	47
3.3.2	3D Pulverdruck .....	47
3.3.3	Waschen der Prüfkörper, PBS-Puffer .....	49
3.4	Patienten und Untersuchungsmaterial .....	50
3.5	Zellkulturbedingungen .....	51
3.6	Immunfluoreszenz .....	51
3.6.1	Zellzählung.....	51
3.6.2	Versuchsdurchführung.....	52
3.6.2.1	Ansetzen der Versuche.....	52
3.6.3	Fixierung der Zellen .....	53
3.6.4	Inkubation mit dem 1. Antikörper .....	53
3.6.5	Inkubation mit dem 2. Antikörper .....	53
3.6.6	Einbettung .....	54
3.7	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	54
3.7.1	Ansetzen der Zellkulturen .....	54
3.7.2	Aufarbeiten der Proben für SDS Page und Westernblot .....	55
3.8	Polyacrylamid- Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteingemischen ..	55
3.8.1	Versuchsdurchführung .....	55
3.9	Durchführung des Westernblots .....	56
3.9.1	Versuchsdurchführung.....	56
3.10	Rasterelektronenmikroskopie .....	57
3.10.1	Ansetzen der Zellkulturen .....	57
3.10.2	Kritisch-Punkt-Trocknung.....	58
3.11	Rasterelektronenmikroskopie .....	59
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Immunfluoreszenz .....	59
4.2	Westernblot .....	65
4.3	Rasterelektronenmikroskopie .....	69
5	Diskussion .....	74
5.1	Diskussion der Methodik .....	74
5.2	Immunologische Detektionsmethoden .....	76

5.3	Rasterelektronenmikroskopie .....	77
5.4	Diskussion der Ergebnisse .....	78
6	Zusammenfassung .....	88
7	Literatur .....	90
8	Danksagung .....	
9	Lebenslauf .....	

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	alkalische Phosphatase
Ang	Angiopoetin
AT	anti Tubulin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BLC	bone lining cell
BMP	bone morphogenetic protein
Ca	Calcium
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
CaF	Calciumfluorid
CaO	Calciumoxid
CaP	Calciumphosphat
CaS	Calciumsulfat
CPC	Calciumphosphat-Zement
CSD	critical size defect
DCP	Dicalciumphosphat
DCPA	Monetit
DCPD	Bruschit
DOPC	determinierte Osteoprogenitorzelle
ESC	embryonale Stammzelle
EGF	Epidermal growth factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF	Fibroblast growth factor
GL	Glas

H	Stunde
HA	Hydroxylapatit
heSC	humane embryonale Stammzelle
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
hSC	humane Stammzelle
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IGF	Insuline like growth factor
IOP	Osteoprogenitorzelle
IOPC	induzierte Osteoprogenitorzelle
KAM	Knochenaufbaumaterial
KEM	Knochenersatzmaterial
KM	Knochenmark
LP	Löslichkeitsprodukt
MCPM	Monocalciumphosphatmonohydrat
MCSF	macrophage colony- stimulating factor
MgP	Magnesiumphosphat
MKG- Chirurgie	Mund-,Kiefer-Gesichtschirurgie
MSC	mesenchymale Stammzelle
NO	Stickstoffmonooxid
O?	Sauerstoff
OC	Osteocalcin
OCP	Octacalciumphosphat
OPG	Osteoprotegerin
P	Phosphat

PDGF	Platelet-derived growth Factor
PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth Factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PHA	präzipitiertes Hydroxylapatit
PIGF	Placenta growth factor
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP	Rapid Prototyping
rhBMP	rekombinantes humanes bone morphogenetic protein
SC	Stammzelle
SCID	severe combined immunodeficient
TCP	Tricalciumphosphat
TE	Tissue Engineering
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TTCP	Tetracalciumphosphat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Westernblot

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Knochens.....	2
Abbildung 2: Mechanismus der BMP induzierten zellulären Signalübertragung.....	10
Abbildung 3: Kristallstruktur von humanem BMP 2 .....	11
Abbildung 4: Zelluläre und physiologische Effekte nach Aktivierung des VEGF/VEGF Rezeptorkomplexes in Endothelzellen .....	14
Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Brushit .....	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Brushitbehandlung zur Differenzierung von hMSC mit Wachstumsfaktoren.....	39
Abbildung 7: 3 D Drucker der Firma Z-Corporation zur Herstellung der Prüfkörper ...	48
Abbildung 8: IF-Bilder von hMSC.....	60
Abbildung 9: IF-Bilder von hMSC.....	61
Abbildung 10: IF-Bilder von hMSC.....	62
Abbildung 11: IF-Bilder von hMSC.....	63
Abbildung 12: IF-Bilder von Brushit .....	65
Abbildung 13: Immunblot von hMSC.....	66
Abbildung 14: Immunblot von hMSC.....	68
Abbildung 15: REM von hMSC.....	69
Abbildung 16: REM von hMSC.....	70
Abbildung 17: REM von hMSC.....	71
Abbildung 18: REM von hMSC.....	72
Abbildung 19: humane Knochenmark-Stammzellen .....	74

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemeine Morphologie und Biologie des Knochens**

Der Knochen besteht zu ca. 35% aus der organischen Grundsubstanz. Davon macht Kollagen, vorwiegend Kollagen Typ 1, als häufigstes Protein im Körper den Hauptteil aus, gefolgt von nicht kollagenen Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden. Kollagen ist, als Bestandteil von Geweben wie z.B. Knorpel und Knochen für die strukturelle Stabilität im Körper wichtig [2, 3]. Die anorganische Substanz, die ca. 65% ausmacht, besteht zu ca. 95% aus Hydroxylapatit (HA). Knochenhartschubstanz wiederum besteht aus Calciumphosphat (CaP)- und Carbonat, gefolgt von Magnesium, Natrium und Fluorid, die mit Kollagen die wichtigsten Komponenten darstellen. Beides bestimmt die Härte und Festigkeit des Knochens [2–4]. Rein chemisch betrachtet ist der Knochen ein Verbundwerkstoff von CaP und Kollagen [5], wobei 99% des Calciums (Ca) zusammen mit 80% des Phosphats im Knochen als Apatit vorkommen. Überschüssiges Ca wird bei Bedarf mobilisiert [6].

Das menschliche Skelett weist über 200 Knochen auf. Entsprechend ihrer Form, lassen sich die Knochen in die kurzen Knochen (u.a. Hand- und Fußwurzelknochen), die flachen Knochen (u.a. Rippen, Beckenknochen, Schulterblatt und einige Schädelknochen) und die langen Röhrenknochen (u.a. Oberarmknochen, Oberschenkelknochen) einteilen. Letztere bestehen aus zwei Epiphysen, den Enden des Knochens und der Diaphyse, dem Knochenschaft. Außerdem gibt es noch die pneumatisierten Knochen im Bereich des Schädels, die Sesambeine und schließlich die unregelmäßig geformten Knochen. Das Knochengestüst ist das tragende Element des Körpers, es ist an allen Bewegungen beteiligt und zeichnet sich durch Stabilität und Elastizität aus. Für die Elastizität des Knochens sind die in diesem physiologisch enthaltenen Flüssigkeiten verantwortlich. Die Porosität des Knochens ist hingegen eine wichtige Komponente für den Stoffaustausch und die Invasion der Zellen [5]. Das knöcherne Skelett hat die Aufgabe als Stütz- und Schutzgewebe zu fungieren, es schützt die lebenswichtigen Organe wie ZNS und Thoraxorgane. Darüber hinaus hat es eine metabolische Funktion, es fungiert als Mineralstoffdepot des Körpers.

Der Knochen speichert eine große Zahl von Mineralien, darunter Ca- und Phosphat-Ionen (99% des Körpercalciums/ 75% des Körperphosphates) [5, 7]. Trotz der Stütz- und Schutzfunktion ist der knöcherne Gesamtapparat vergleichsweise leicht und keineswegs starr. Er nimmt nur ca. 20% des gesamten Körpergewichts in Anspruch. Das liegt an der filamentösen Trabekelstruktur, der Substantia spongiosa, die nach den Trajektorien, den Hauptspannungslinien ausgerichtet ist und das gallertige Knochenmark (KM) enthält. In den Gelenkflächen, als auch in den kurzen und platten Knochen befindet sich in den Hohlräumen der Substantia spongiosa das blutbildende Mark. In den Diaphysen, den langen Röhrenknochen, befindet sich keine Spongiosa, sie werden vollständig von blutbildendem Knochenmark ausgefüllt, das später durch Fetteinlagerungen in gelbes KM umgewandelt wird. Dieses ist nicht mehr an der Blutbildung beteiligt [8]. Die Substantia compacta ist die äußere kompakte Schicht, die den Knochen umgibt, also direkt unter dem Periost liegt. Ihr Grundbaustein ist das Osteon. Die Osteone legen sich als konzentrische Knochenschichten um das Haverssche System in dem zentral ein Blutgefäß, der Havers Kanal liegt. Der Havers Kanal steht mit dem Periost über die Volkmannkanäle in Verbindung und stellt so die Blut -und Nervenversorgung der Knochensubstanz sicher [9].

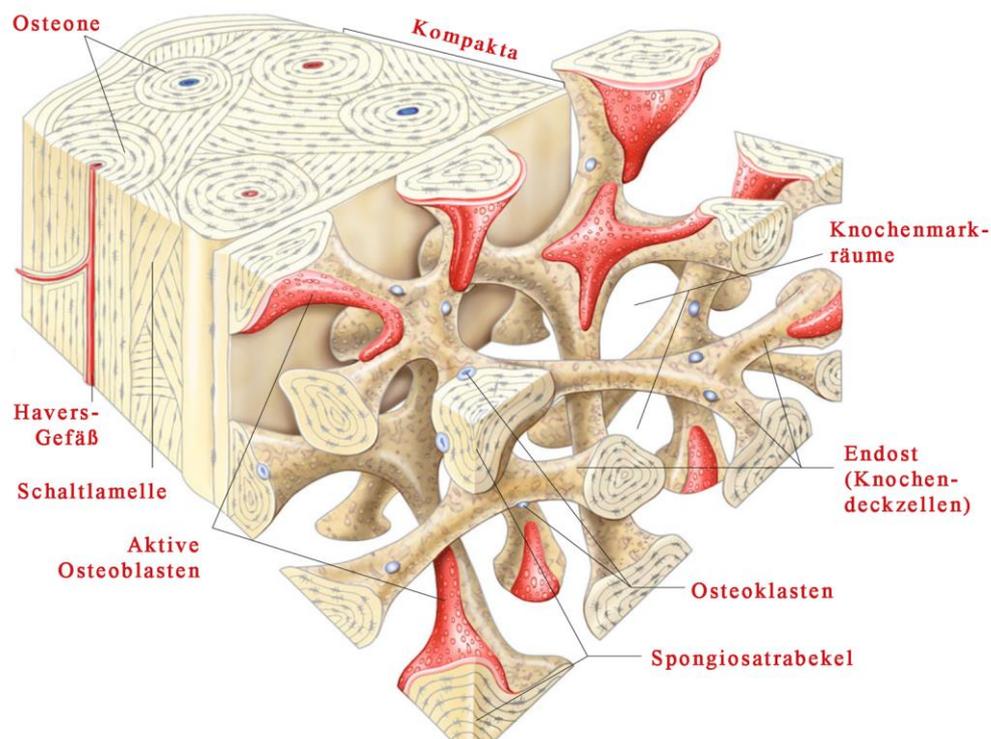


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Knochens. Bild modifiziert nach [10]

Mit Ausnahme der Gelenkflächen sind sämtliche inneren Knochenflächen von einer dünnen Bindegewebsschicht, dem Endost überzogen, bestehend aus unmineralisierten Kollagenfibrillen und bone lining cells (BLC), die sich wiederum aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), Osteoprogenitorzellen (IOP Zellen), ruhenden Osteoblasten- und klasten zusammensetzt. Diese Zellen sind in ihrer Gesamtheit für Reparaturmaßnahmen des Knochens wichtig. Die äußere Schicht des Knochens ist vom Periost, einer dünnen Schicht, die viele Blutgefäße und Nervenfasern führt, umgeben. Das Periost setzt sich ebenfalls aus zwei Schichten zusammen, von denen die eine die gleichen Zellen wie das Endost enthält und gleichsam an Reparatur- und Umbauvorgängen beteiligt ist [11].

### **1.1.1 Knochenzellen und Knochenumbau**

Die hierarchische Struktur des Knochens ist nicht statisch, die Knochen unterliegen einem ständigen Prozess von Auf- und Abbau. Die Knochen verändern sich in jedem Alter. Im Verlaufe des Wachstums wird aus unreifem Geflechtknochen Lamellenknochen, aber auch danach findet kontinuierlich der Prozess des Knochenumbaus (bone remodeling) statt, um das Skelettsystem stabil und funktionstüchtig zu halten und den wechselnden mechanischen Beanspruchungen gerecht zu werden. Allein die Spongiosa, verändert im Jahr rund ein Viertel ihrer Substanz, die kompakte Substanz in der gleichen Zeit nur ca. 3% [12, 13].

Das Knochengewebe beherbergt verschiedene Zelltypen: IOPs, Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und die BLCs [14, 15]. Diese Zellen sind sowohl am Auf- und Abbau, als auch am Knochenumbau beteiligt. Wenn die organische Matrix des Knochens, das Kollagen sowie CaP durch Osteoklasten abgebaut wird, wird an der gleichen Stelle neue Kollagenmatrix durch Osteoblasten gebildet, in der dann wieder neues Knochenmineral auskristallisiert. „Alter Knochen“ wäre nicht in der Lage gewisse Funktionen zu ermöglichen, das heißt im kortikalen Knochen den mechanischen Belastungen und im spongiösen Bereich den blutbildenden Fähigkeiten und der Homöostase zu genügen [12, 13]. Die Regulation für den Knochenumbau ist nicht eindeutig geklärt, man nimmt an, dass der Hormonhaushalt, die Ernährung, die Erbsubstanz und die körperliche Beanspruchung eine Rolle spielen. Bei fehlender körperlicher Beanspruchung atrophiert der Knochen [11].

Osteoblasten nehmen Calcium und andere Mineralstoffe aus dem Blut auf und bauen sie in den Knochen ein. Fehlen Calcium und Phosphat im Körper werden Osteoklasten aktiviert, sie liegen in den Spongiosabälkchen lokalisiert und setzen Mineralien frei. Der Umbauprozess des Knochens ist abhängig vom Mineralstoffgehalt des Körpers und des Knochens selbst. Die Osteozyten sind ursprünglich Osteoblasten, die sich während des Knochenaufbaus in die Knochenstruktur eingelagert haben. Sie überleben gut 10 Jahre, so lange wie der Knochen zur Komplettregeneration braucht [11].

### 1.1.2 Zellbiologie des Knochens

Der Knochen beherbergt unterschiedliche Zelltypen, die für das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau und die Regenerationsvorgänge zuständig sind. **Osteoprogenitorzellen** sind mesenchymale Knochenvorläuferzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren können. Ihre Aufgabe besteht darin sich bei Bedarf zu Osteoblasten zu differenzieren. Es werden zwei Arten von Vorläuferzellen des Knochens unterschieden: die determinierte Osteoprogenitorzelle (DOPC), die im Knochenmark ansässig ist und die induzierte Osteoprogenitorzelle (IOPC), eine im Blut, Lymphknoten, Milz oder anderen lymphoiden Geweben vorhandene MSC. [16, 17]. Der **Präosteoblast** ist im Gegensatz zu seinen Vorläuferzellen nur noch begrenzt teilungsfähig. Er ist dem Osteoblast, in den er sich später differenziert, sehr ähnlich. Er exprimiert, wie der Osteoblast, nur in viel geringeren Mengen, Extrazellulärmatrixproteine, wie Kollagen Typ 1 oder das Glykoprotein Osteopontin [18]. **Osteoblasten** sind spezialisierte knochenbauende Zellen, die aus MSC differenzieren. Verbunden durch ihre Zellfortsätze lagern sie sich der Knochenoberfläche- und innenfläche an und bilden den sog. Osteoblastensaum, als Teil des Periosts. Sie synthetisieren die Knochenmatrix (Osteoid), bestehend aus kollagenen und nicht-kollagenen Komponenten und sezernieren alkalische Phosphatase (ALP). Aktive Osteoblasten, die sich als kuboide Zellen darstellen, bilden pro Tag einen 1µm breiten Osteoidsaum, von dem 70% innerhalb von 4 Tagen verkalken [19–21]. Nach einhalb Monaten ist die Knochenmatrix mineralisiert. In diesem Zustand sind die Osteoblasten bereits auseinandergerückt und über dünne Canaliculi miteinander verbunden, wodurch die Havers-Kanäle entstehen.

In diesem Stadium werden sie auch als ruhende Osteoblasten bzw. Osteozyten bezeichnet [19–21]. Die sich aus den Osteoblasten entwickelnden **Osteozyten** sind Teil der Knochenstruktur, die sich während der Osteogenese selbst eingemauert haben und im Bereich der Hohlräume, der Knochenmatrix liegen. Sie machen 95% der Knochenzellen aus und überleben bis zu 25 Jahre. Sie produzieren keine Proteine mehr, stehen aber mit anderen Osteozyten in Verbindung, wodurch ein interzellulärer Austausch, z.B. zur Ernährung und Mobilisation sowie Aufnahme von Calcium- und Phosphationen ermöglicht wird. Der Osteozyt ist das Ende der osteogenen Differenzierung und ist nicht mehr teilungsfähig [7, 22]. **Knochenschützende Zellen (BLC)** sind extrem dünn, sie haben im Lichtmikroskop ein spindelförmiges Profil und besitzen einen gering differenzierten Golgi-Apparat und nicht viel raues endoplasmatisches Retikulum [23]. Die BLCs sind einer der terminalen Differenzierungswege der Osteoblasten. Osteoblasten die sich in BLCs umwandeln persistieren an den endostalen Oberflächen. Besonders im erwachsenen Skelett bedecken die BLCs bis zu 80% der Knochenoberflächen. Sie sind untereinander, aber auch mit Osteoblasten und Osteozyten über sog. gap junctions verbunden [24–26]. Die BLCs sind am bone remodelling selbst beteiligt oder vermitteln diesen Vorgang über Zell-Zell Kontakte, indem folglich Osteoklasten rekrutiert und die Bildung neuer Blutgefäße eingeleitet wird [13]. BLCs können durch bestimmte Stimuli in osteogene Zellen differenzieren. Zudem wurde eine Barrierefunktion der BLCs beschrieben, wobei die von ihnen gebildete Membran auf der Innen- und Außenseite des Knochens eine Trennung der intraossären Flüssigkeit und der Flüssigkeit im KM-Interstitium bewirkt soll [27]. BLCs spielen auch nach der Knochenresorption durch die Osteoklasten eine wichtige Rolle. Sie sind in diesem Fall dazu da die Knochenoberfläche zu bereinigen und so eine neue Apposition von Knochen durch die Osteoblasten zu gewährleisten [28]. **Osteoklasten**, eine mehrkernige Riesenzelle, entsteht bei Bedarf (bone remodeling/Knochenresorption) aus mononukleären Vorläuferzellen durch Verschmelzung. Im Gegensatz zu anderen im Knochen vorkommenden Zellen, sind sie hämatopoetischer Abstammung. Sie können bis zu 10 Zellkerne enthalten. Osteoklasten sitzen in den sog. Howship-Lakunen und bewegen sich amöboid [7, 29, 30]. Osteoklasten binden an die Knochenoberfläche und lösen Mineralsalze aus dem Knochen.

Des Weiteren produzieren Osteoklasten Enzyme, die die Knochenmatrix zerstören [7, 29, 30]. Die Osteoklastenbildung ist von exprimierten Faktoren der Osteoblasten und Stroma-Zellen abhängig [31].

## **1.2 Knochenheilung**

Wird durch Gewalteinwirkung die Elastizitätsgrenze überschritten und die Knochenkontinuität unterbrochen, spricht man von einer Fraktur. Das Knochengewebe ist im Gegensatz zum Weichgewebe fähig narbenlos abzuheilen, er unterscheidet sich dann nicht vom Ursprungsgewebe und ist wieder genauso belastbar (*restitutio ad integrum*) [32, 33]. Der Prozess der Knochenheilung ist von zahlreichen Botenstoffen, die im Laufe der Frakturheilung ausgeschüttet werden und den Knochenzellmetabolismus beeinflussen abhängig. Dabei handelt es sich um Zytokine oder Interleukine (IL), z.B. IL1, IL6, Wachstumsfaktoren wie Platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) und bone morphogenetic proteins (BMPs) [34–36]. Die BMPs, insbesondere BMP 2, 4, 6 und 7 sind in der Lage, als alleinig implantiert, effektiv die Knochenregeneration zu induzieren, indem sie den gesamten Prozess der Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblastenzellen stimulieren können [37–39]. Generell ist die Frakturheilung histologisch nach 6-8 Wochen im Spongiosabereich und 12-18 Monate nach der Verletzung komplett abgeschlossen.

Die Frakturheilung wird in die primäre und die sekundäre Bruchheilung eingeteilt [40]. Die primäre Bruchheilung entspricht im Prinzip dem Knochenumbau, dem koordinierten Zusammenspiel aus Knochenabbau und Knochenaufbau [41]. Sie findet vorwiegend in der Kortikalis statt und verläuft ohne Knorpelzwischenstufen, d.h. ohne Ausbildung von Geflechtknochen. Es wird direkt Lamellenknochen erzeugt [42]. Voraussetzung für die primäre Knochenheilung ist eine exakte Reponierung der Frakturrenden, was eine interfragmentäre Ruhe, auch bei funktionsbelastetem Knochen ermöglicht [40, 43]. Des Weiteren unterscheidet man bei der primären Knochenheilung die Kontaktheilung von der Spalthheilung. Bei einer Kontaktheilung erfolgt die Reparatur ohne den Umweg einer Kallusbildung. Sie geschieht einphasig, indem der Bruchspalt direkt mit vollwertigem Knochen überbrückt wird [42]. Bei suboptimaler Reposition der Frakturrenden gegeneinander und adäquatem Blutfluss interfragmentär

entsteht allerdings eine geringe Menge Kallus [44]. In der Natur kommt die Kontaktheilung nicht vor, da es selbst bei perfekt aneinander fixierten Frakturrenden meist nur einen punktuellen Kontakt zwischen der Kortikalis gibt [40]. Deshalb kommt es bei der primären Knochenheilung zu einem zweiten Typ der Knochenheilung, der Spaltheilung. Dabei kommt es zu einer Umwandlung in Lamellenknochen, indem geringe Spalten zwischen den zwei durch Osteosynthesematerialien befestigten Frakturrenden durch Geflechtknochen aufgefüllt werden. Bei der Spaltheilung wird Lamellenknochen im Gegensatz zur Kontaktheilung erstmal quer zur Längsachse gebildet, erst sekundär richten sich die Osteone zur Längsachse aus [43, 45]. Die sekundäre Bruchheilung, die am häufigsten stattfindet, verläuft über die Kallusbildung, mit der der Frakturspalt vorerst überbrückt und stabilisiert wird und der umso größer ist, je mehr Unruhe zwischen den Fragmentenden des funktionell belasteten Knochens herrscht [40]. Die sekundäre Bruchheilung läuft bei Frakturen mit z.B. konservativer Bruchbehandlung, wie Gips oder Marknagelosteosynthese ab [46].

### **1.3 Einflussfaktoren auf die Knochenheilung**

#### **1.3.1 Die TGF- $\beta$ Superfamilie**

Die Tumorstromwuchstumsfaktor (TGF)- $\beta$  Superfamilie ist eine Gruppe von zellregulatorischen Peptid-Wachstumsfaktoren, die bei verschiedenen Prozessen wie z.B. bei der Embryonalentwicklung, Immunantwort, Gewebemöostase und Gewebisdifferenzierung, sowie für die Wundheilung und Angiogenese, Proliferation und Differenzierung von Zellen wichtig ist [47]. Zur TGF- $\beta$  Superfamilie gehören aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit die BMPs, die mit ca. 47 Mitgliedern [48] die größte Untergruppe darstellen. Davon wurden 15 BMPs für den Menschen beschrieben [49, 50]. Einzige Ausnahme ist BMP 1, welches strukturelle Unterschiede aufweist und zur Gruppe der Astacin Metalloproteasen zählt [51]. BMPs sind strukturell verwandte Wachstumsfaktoren, die trotz ihrer geringen Menge im Knochen (1  $\mu$ g/kg Kortikalis) [52] stark auto- und parakrin wirken. Sie sind ubiquitär vorkommende extrazelluläre multifunktionale Glykoproteine [53]. BMPs werden als große dimere Proproteine im Zytoplasma synthetisiert und durch Proteasen während der Sekretion gespalten.

Das funktionelle BMP (100-200 Aminosäuren pro Monomer, ca. 21-25kDa) wird dann ins Extrazellulärkompartement freigesetzt und bindet dort die spezifischen Membranrezeptoren auf der Targetzelle [54]. Die BMPs spielen nicht nur während der frühembryonalen Knorpel- und Knochenbildung von Vertebraten und bei der Bildung der Körperachsen eine wichtige Rolle. Sie sind auch entscheidend bei der postfötalen Differenzierung von Geweben und Organen, wie z.B. bei der Entwicklung des Skelett-, Knorpel- und Zahnsystems [55–57]. Im Gefäßsystem fördern BMPs, wie z.B. BMP 2, 4 und 9 die endotheliale Spezifikation und die anschließende venöse Differenzierung. Auch sind sie für das adulte Gefäßendothel obligat und für die Förderung der Angiogenese [58]. Die BMP Proteine 1-7 werden im Knochen exprimiert [59, 60]. Die Induktion von Knochen, die durch BMP stimuliert wird ist ein funktionell konservierter Prozess. Dieser Prozess wird während der embryonalen Entwicklung genutzt, während der postfötalen Knochenbildung rekapituliert und kann auch für therapeutische Anwendungen genutzt werden. Insbesondere BMP 2, einer der stärksten osteogenen Faktoren, ist von entscheidender Bedeutung bei der Skelettentwicklung. BMPs, wie BMP 2, können durch ihre hohe osteogene Potenz für viele therapeutische Zwecke verwendet werden [55, 61]. Zudem wurden proangiogenetische Eigenschaften durch BMP 2 gezeigt, die in engem Verhältnis mit dessen osteoinduktiven Eigenschaften stehen [62]. BMP spielt sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine Rolle. Bei Defekt- oder Dysregulation der BMP Signalkaskade kann es zu diversen Erkrankungen kommen, die nicht nur Muskeln und Skelett betreffen [63, 56]. BMP Familienmitglieder einschließlich BMP 2, BMP 4 und BMP 7 werden während der kompletten Extremitätenentwicklung exprimiert. Knockout Studien an Mäusen zeigten, dass besonders die Inaktivierung von BMP 2 und -4 zu schweren Beeinträchtigungen der Osteogenese führen [64]. Diese Befunde bestätigen Untersuchungen an Knockout Mäusen, dass die Inaktivierung der BMP-Gene meistens letal oder zu schweren Missbildungen führt [65, 66]. Für die Osteogenese de novo durch rhBMP bedarf es einiger Voraussetzungen, wie die Anwesenheit geeigneter Zielzellen, in diesem Fall IOP-Zellen. BMP veranlasst die perivaskulär vorkommenden unspezialisierten MSC zu Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung, wodurch sie sich an der Stelle der Implantation zu Osteoblasten und Chondroblasten ausdifferenzieren. Werden isolierte MSC mit osteogenen Stimuli inkubiert, kommt es

zu einer Synthese von Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteinen sowie zur Hochregulation spezifischer Knochengene, wie z.B. Osterix, Runx2, alkalische Phosphatase (ALP) oder Osteocalcin (OC). Runx2 wurde als osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert und gilt als frühester bekannter Marker und ist essenziell für die osteoblastäre Differenzierung [67, 68]. Osterix ist ein Transkriptionsfaktor, der insbesondere in Osteoblasten sich entwickelnder Knochen exprimiert wird [67, 68]. ALP ist für die Mineralisation von Knochen unabdingbar und wird als entscheidender Marker für eine osteoblastäre Differenzierung betrachtet [67, 68]. OC wird im Knochen durch Osteoblasten gebildet und bindet Hydroxylapatit und Calcium. Es ist Teil der nicht-kollagenen Knochenmatrix [67, 68]. Die osteogene in vitro Differenzierungsfähigkeit der MSC ist klar spenderabhängig. Die Variabilität zeigt sich u.a. in unterschiedlich starker ALP-Induktion. Zudem führt BMP 2 dazu, dass neben der Knochenbildung die Menge an Typ 1- und Typ 2 Kollagen zunimmt und die Produktion von ALP, als Zeichen der osteoblastären Differenzierung, steigert [67, 68]. In vivo verstärken Osteoblasten die Bildung von BMPs durch autokrine oder parakrine Stimulation der Präosteoblasten [69, 70]. Darüber hinaus können die BMPs das Knochenwachstum in atopischen Arealen stimulieren. In der Orthopädie müssen große Mengen an BMPs verwendet werden, um eine vorteilhafte Wirkung der Knochenheilung zu induzieren. Eine weitere Voraussetzung ist die Anwesenheit von geeigneten Zielzellen, die auf ein osteoinduktives Agens reagieren können [56]. Die derzeit zugelassenen Dosierungen liegen bei 3-12mg rhBMP 2 pro Anwendung [71]. Höhere Spiegel von rhBMP 2 führen zu schnellerer de novo Knochenbildung. Zudem ist die Anzahl der mesenchymalen Zielzellen sowie die Halbwertszeit der BMP Moleküle im Implantatlager entscheidend für die Effektivität der Behandlung. Begrenzend wirken ein erhöhtes Lebensalter des Patienten sowie eine verminderte Vaskularisierung des Gewebes. Signifikant bessere osteoinduktive Eigenschaften erzielt man durch eine geeignete Trägersubstanz für die BMPs, wobei dessen Zusammensetzung und Formstabilität wichtig ist [72]. Passende Grundsubstanzen sind resorbierbare Kollagenmatrices oder Tricalciumphosphate (TCPs), die in der Lage sind, osteoinduktive Substanzen nach und nach freizusetzen. Weiterhin sollten diese Gerüstevollständig resorbierbar sein und ein Einwachsen in den geschädigten Bereich ermöglichen [48].

### 1.3.2 Struktur und Signaltransduktionswege von BMP

Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie übertragen ihre Signale durch Bindung und Aktivierung an heteromere transmembrane Komplexe aus Serin Threonin Kinasen. Man unterscheidet Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren. Nach Aktivierung der Rezeptoren werden sog. Smad Proteine phosphoryliert, die anschließend zum Zellkern wandern und dort die Transkription spezifischer Gene einleiten [73]. Neben den Smad abhängigen Signalwegen gibt es auch nicht Smad medierte Zellaktivierung nach Aktivierung der TGF- $\beta$  Rezeptoren. Wie bei TGF- $\beta$  aktivieren die BMPs die Rezeptoren, welche Serin Threonin Kinasen sind. Allerdings werden für die intrazelluläre Signalübertragung unterschiedliche Smads herangezogen (siehe Abb. 2) [73, 74]. Die BMP Rezeptoren sind transmembrane Proteine und teilen sich ähnliche strukturelle Eigenschaften. Sie bestehen aus 3 Regionen, einer kleinen extrazellulären Bindedomäne für die BMP Liganden sowie ein Transmembransegment sowie eine zytoplasmatische Domäne, die den Serin Threonin Kinaseteil enthält [50, 74].

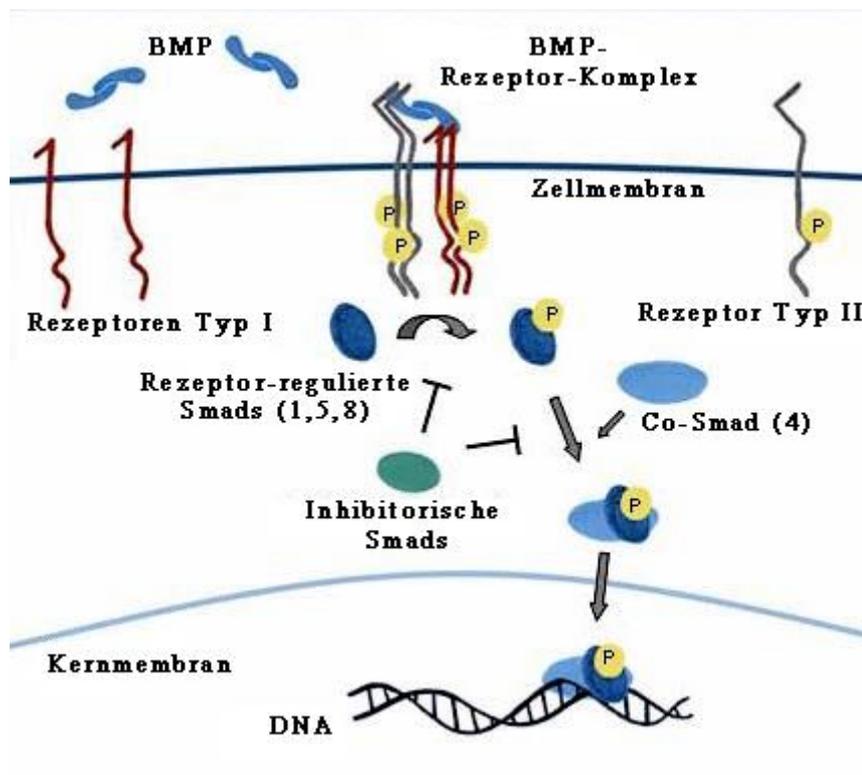


Abbildung 2: Mechanismus der BMP induzierten zellulären Signalübertragung. Bild modifiziert nach [75].

Bei Säugetieren gibt es sieben Typ 1 Rezeptoren, und vier Typ-II-Rezeptoren [47]. Obwohl strukturell homologe Wachstumsfaktoren, liegt die Sequenzähnlichkeit über alle BMPs teilweise unter 30% [76]. Durch die Aminosäuresequenz ist eine Unterteilung in Gruppen möglich [77]. Aufgrund ihrer hochkonservierten Aminosäuresequenz sind BMP 2 und BMP 4 in einer Gruppe aufgeführt. Sie gleichen sich mit 92 %, gefolgt von BMP 5-, 6- und 7 mit einer Sequenzähnlichkeit von jeweils 89% [78]. Aktive BMPs sind disulfidverknüpfte Homodimere oder disulfidverknüpfte Heterodimere [78]. BMP 2 wird als Proprotein mit 453 Aminosäure synthetisiert. Erst nach Abspaltung einer aminoterminalen Propeptidregion geht das Protein in seine aktive Form über. BMP 2 liegt in seiner aktiven Form als 32 kDa großes, 130 Aminosäuren langes disulfidverbrücktes Homodimer vor (siehe Abb. 3) [75, 79].



*Abbildung 3: Kristallstruktur von humanem BMP 2 [75]*

### **1.3.3 rhBMP 2**

Die Gewinnung von rekombinanten humanen BMP 2 (rhBMP 2) erfolgt aus Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) oder anderen Säugerzellen. Allerdings sind die geringen Ausbeuten und die hohen Kosten eukaryotischer Proteinexpressionssysteme ein Nachteil, so dass man eine praktikablere Alternative in der Expression von rhBMP 2 in *E. coli* fand. Den prokaryontischen Expressionssystemen fehlt zwar die Fähigkeit die korrekte posttranslatorische Modifikation inhärent auszuführen, doch durch *in vitro* Reinigung und Rückfaltung kann aktives rekombinantes BMP (rhBMP) gewonnen werden [80]. In *in vitro* Versuchen wurde allerdings festgestellt, dass die Wirksamkeit von in *E. coli* produzierten rhBMPs geringer ist als die von in Säugern produzierten rhBMPs [80]. Durch rekombinante gentechnische Herstellung von BMP 2 hat man eine alternative Quelle zur Induktion der Osteogenese zur Verfügung. Wie mit den endogen vorkommenden BMPs ist es auch mit rhBMPs möglich über Zelldifferenzierung Knochengewebe zu bilden. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Effektivität der BMPs durch Veränderungen ihrer Aminosäuresequenz noch gesteigert werden kann [81].

## **1.4 VEGF**

### **1.4.1 Funktion und Struktur**

Der vascular endothelial growth factor (VEGF) wurde ursprünglich als ein von Tumorzellen sezerniertes Protein entdeckt, welches zur Erhöhung der Permeabilität von Blutgefäßen führt und so die Durchgängigkeit von Zellen und Plasmaproteinen erhöht [82]. VEGF ist ein heparin-bindendes basisches homodimeres Polypeptidmitogen, welches eine wichtige Rolle bei der Induktion der Gefäßverzweigung spielt [83]. VEGF ist mit seinen Rezeptoren der am besten untersuchte Endothel-spezifische Wachstums- und Angiogenesefaktor und wirkt sowohl auf das Gefäßwachstum als auch auf die Gefäßpermeabilität [84]. Die Wirkung von VEGF auf die Gefäßpermeabilität ist 1000-fach stärker als die des vasoaktiven Histamins [85]. VEGF gilt als wichtigster Wachstums- und Überlebensfaktor für Endothelzellen [86] und kann u.a die Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung der Endothelzelle aktivieren [87]. Er ist der

Schlüsselregulator während der physiologischen Angiogenese indem er die Endothelzellproliferation stimuliert und reguliert [84, 86]. Des Weiteren beeinflusst VEGF die Entwicklung und Funktion des vaskulären Systems. VEGF beeinflusst das Skelettwachstum, es ist bei der Wundheilung aktiv und unterstützt die Gefäßneubildung in ischämischen Organen. Seit geraumer Zeit werden vermehrt der Einfluss und die Therapieoptionen von VEGF bei der Knochenheilung diskutiert. Die vaskuläre Versorgung bzw. die endothelzellgestützte Mikrovaskularisation- und zirkulation ist bei der Knochenbildung, als auch für den Strukturerehalt obligat [84]. VEGF hat eine Zielzellenspezifität für vaskuläre Endothelzellen. Der Wachstumsfaktor entfaltet diese direkte Wirkung auf Endothelzellen während der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, indem es die zytoplasmatische Calciumkonzentration erhöht, Änderungen an der Zellmorphologie induziert und die Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen zu stimulieren vermag. Diese stimulierenden Eigenschaften besitzt VEGF auch für die Migration von Makrophagen und Monozyten [82, 88–91].

Die Mitglieder der VEGF Familie sind potent mitogene und angiogene Proteine.

VEGF A, ein heparinbindendes Polypeptidmitogen [89], welches als Erstes entdeckt wurde, besitzt ein Molekulargewicht von 45kD und liegt als disulfid-verknüpftes basisches homodimeres Glykoprotein vor [83]. Zu den Mitgliedern der VEGF-Familie gehört ebenfalls VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E, VEGF F und der Placenta Growth Factor (PlGF) [87]. Während sie Unterschiede in ihrer Sekretion und der Fähigkeit Heparin zu binden zeigen, weisen sie sonst ähnliche biologische Eigenschaften auf [85]. Auch durch Exon-Splicing der VEGF-Mitglieder VEGF B und PlGF erhält man zahlreiche Isoformen. Die kürzeren Formen der „Klone“ werden effizient sezerniert im Gegensatz zu anderen Endothelzell-Mitogenen, wie dem basic fibroblast growth factor (bFGF) und Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), die länger zellassoziiert bleiben [89]. VEGF A ist die beim Menschen am häufigsten vorkommende Isoform [92], es liegt sowohl in löslicher Form als auch zellwandassoziiert vor [87].

Die verschiedenen Formen von VEGF binden mit unterschiedlichen Affinitäten an hauptsächlich zwei membranständige Tyrosin-Kinase -Rezeptoren, VEGFR-1- und 2,

die überwiegend an der Oberfläche von großen Endothelzellen exprimiert werden. Darüber hinaus wurde eine weitere VEGF Tyrosinkinase Rezeptor beschrieben, der sog. Typ 3 Rezeptor [83, 90]. VEGF A bindet an den Rezeptor 1- und 2, VEGF B und der placenta growth factor (PlGF) binden an den Rezeptor 1, VEGF C- und D binden an die Rezeptoren 2- und 3 und VEGF E- und F binden beide an die Rezeptoren Typ 2 [91]. Die VEGF-Rezeptoren dimerisieren bei Aktivierung. Nach gegenseitiger Phosphorylierung der Dimere wird das Signal ins Zellinnere weitergeleitet.

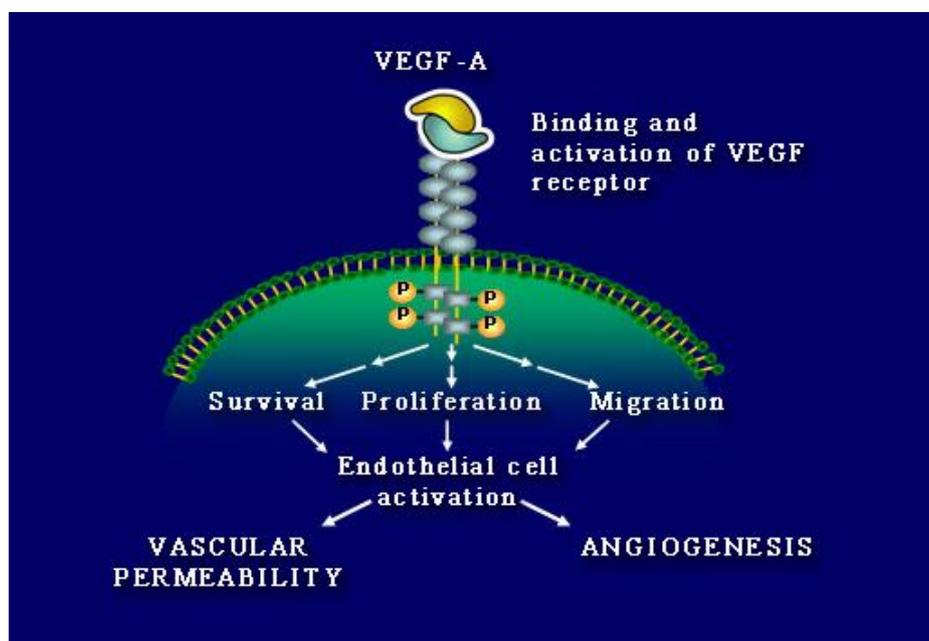


Abbildung 4: Zelluläre und physiologische Effekte nach Aktivierung des VEGF/VEGF Rezeptorkomplexes in Endothelzellen. Bild modifiziert nach [93]

#### 1.4.2 Expression von VEGF

VEGF wird im Zuge der Embryogenese von Dottersack-Endodermzellen produziert und ist im adulten Organismus nur noch schwach nachweisbar. Bei pathologischen Zuständen wie der Wundheilung, Arteriosklerose, Tumorangiogenese oder der Gewebischämie wird vermehrt VEGF durch Makrophagen, Endothelzellen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Keratinozyten und Muskelzellen exprimiert [87].

Die Menge an Sauerstoff spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation und Expression von einer Vielzahl von Genen. Wenn die Zellen bei pathophysiologischen Ereignissen nicht genug Sauerstoff erhalten (Hypoxie) ist das ein Signal für die Expression von VEGF. Zudem sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen und Onkogenen an der Hochregulation der VEGF mRNA beteiligt [83, 90]. Dazu gehören u.a. die Wachstumsfaktoren Epidermal Growth Factor (EGF), TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , Insulin-like Growth Factor (IGF)-1, Fibroblast Growth Factor (FGF) und PDGF. Das weist darauf hin, dass die parakrine und autokrine Freisetzung solcher Faktoren bei lokaler Hypoxie die Freisetzung von VEGF reguliert [83].

### **1.4.3 VEGF in der Therapie**

Im Tierversuch wurde gezeigt das VEGF gefäßdilatorische Eigenschaften hat und damit auch blutdrucksenkend wirken kann [94]. VEGF stimuliert die Angiogenese, indem es das Wachstum neuer Kollateralgefäße beeinflusst, die Durchblutung fördert und die Blutflussrate erhöht. Kumar et al. zeigten dies erst kürzlich an Versuchen am Schweinemodell mit chronischem Totalverschluss [95]. Schon Banai et al. beschrieben 1994 VEGF als Vermittler der myokardialen Neovaskularisation nach in vitro Versuchen am ischämischen Herzmuskel von Schweinen [96]. Auch spielt die VEGF induzierte Angiogenese eine zentrale Rolle beim Tumorwachstum, was sich auf Progression, Invasivität und Metastasierung auswirkt [83, 97]. VEGF wird insbesondere von Tumorzellen exprimiert, die benachbart zu ischämischen Tumornekroseregionen liegen. Das gezielte Ausschalten von Angiogenesefaktoren der VEGF-Familie ist eine mögliche Strategie in der Antitumorthherapie [97].

### **1.5 VEGF in der Knochenregeneration und dessen Zusammenwirken mit BMP-2**

Osteogenese und Angiogenese stehen wechselseitig in Beziehung und sind integrierte Bestandteile der Knochenregeneration. Damit die Knochenregeneration einwandfrei funktioniert, ist ein komplexes Zusammenspiel von Faktoren nötig. Bei der Knochenregeneration, der Osteogenese de novo als auch bei der Angiogenese sind BMP2 und VEGF Schlüsselregulatoren, wobei VEGF während den frühen Phasen, z.B. bei der Wiederherstellung der Durchblutung, exprimiert wird und BMP 2 bei der

Knochenbildung und beim Remodeling-Vorgang kontinuierlich exprimiert wird. VEGF wird überwiegend von Endothelzellen exprimiert und kann in die Kapillarbildung während der Knochenbildungsprozesse eingreifen. Bei Hypoxie im Knochendefekt wird die Ausschüttung von VEGF und weiteren Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\beta$  und inflammatorischen Zytokinen stimuliert. TGF- $\beta$  ist wiederum in der Lage die Produktion von VEGF in Osteoblasten anzuregen [84, 90, 98]. Ebenso ist VEGF bei der Knochenbildung und beim Remodeling-Vorgang durch seine mitogenen, differenzierungsfördernden und chemotaktischen Eigenschaften in der Lage auf die knochenbildenden Zellen einzuwirken [99, 100].

VEGF und BMP 2 wirken bezogen auf die Knochenbildung in synergistischer Weise. Endothelzellen antworten auf Stimuli der Fraktur wie Hypoxie oder VEGF durch die Produktion von BMP 2, welches dann als osteogenes Signal auf die Osteoblasten zurückwirken kann. Während Hypoxie und VEGF alleine die BMP 2 Expression induzieren können, führt ein Zusammenwirken beider Stimuli zu einer additiven Erhöhung der BMP 2 Ausschüttung [98, 101]. Damit spielen Endothelzellen bei der Bruchreparatur nicht nur durch Rekonstitution der unterbrochenen Gefäßstruktur eine wichtige Rolle, sondern wirken auch direkt auf die Osteoblasten. BMP 2 wiederum wirkt mitogen auf vaskuläre Glattmuskelzellen und unterstützt dadurch den strukturellen Umbau bei Gefäßschädigungen [98, 101]. Auch zeigte die Kombination von BMP 2 und VEGF verstärkte in vivo Knochenbildung durch Angiogenese aus Muskelstammzellen, die mit BMP 2 und VEGF transfiziert waren [101].

Die Gründe für die synergistischen Effekte von VEGF und BMP auf die Osteogenese sind nicht vollständig geklärt [102]. Wahrscheinlich aber wirkt VEGF nicht nur über die Induktion der Angiogenese, sondern auch durch Beschleunigung der Rekrutierung von Stammzellen sowie durch verstärktes Überleben der beteiligten Zellen [102, 103]. Außerdem ist VEGF nicht nur für die Blutgefäßbildung sondern auch für die Mineralisierung des Knochens notwendig. So konnte gezeigt werden, dass exogen zugegebenes VEGF die Angiogenese und die Knochenbildung bei Mäusefemurfrakturen und Defekten kritischer Größe (CSD) in Kaninchen fördert und dabei synergistisch mit BMP wirkt [102].

## 1.6 Knochenersatzmaterialien

Der medizinische Fortschritt führt dazu, dass die Menschen immer älter werden. Dabei wurden 41,9 % aller operativen Eingriffe an Personen durchgeführt, die älter als 65 Jahre sind [104]. Jährlich werden 2,2 Millionen Knochentransplantationen weltweit durchgeführt, damit ist diese Transplantation nach der Bluttransplantation die Häufigste [105, 106].

In der regenerativen Medizin bemüht man sich durch Forschung und Entwicklung den bestmöglichen Gewebeersatz für ausgedehnte Läsionen, entstanden durch Traumata, degenerative Prozesse, Tumorsektionen, Knochenanomalien oder andere Krankheiten zu finden. Gerade die Regeneration ausgedehnter Knochendefekte stellt eine große Herausforderung dar. Im Knochen bezeichnet man einen großen Defekt, der ohne Intervention nicht heilen wird, als „critical size defect (CSD)“. Der CSD wird definiert als die kleinste Größe einer knöchernen Verletzung, die auf Lebenszeit nicht im Sinne einer „restitutio ad integrum“ spontan verheilt [107]. Die Defekte werden oft durch fibröses funktionsloses Ersatzgewebe im Sinne von Narben aufgefüllt, da das umgebene Bindegewebe schneller proliferiert als das Knochengewebe, weshalb man sich in der modernen Wiederherstellungschirurgie häufig an Knochenersatzmaterialien (KEM) bedient. Knochenersatzwerkstoffe sind Materialien, die alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren die Knochenregeneration fördern sollen. Sie können dabei osteogene, osteoinduktive oder osteokonduktive Eigenschaften aufweisen und unterscheiden sich in ihrer Funktion, Beständigkeit und Biokompatibilität [108]. Ollier kategorisierte 1867 Knochenersatzstoffe in seinem Werk „Traité Experimental et Clinique de la Régénération des Os et de la Production Artificielle du Tissu Osseux“ erstmals in die Gruppen autogen (vom gleichen Individuum/Eigenknochen), allogene (von einem anderen Individuum) und xenogen (von tierischer Herkunft) ein und machte das Periost in der Transplantatheilung zu einem der wichtigsten Punkte [108, 109]. Des Weiteren gibt es die alloplastischen Materialien, die synthetisch hergestellt werden.

Der geeignete Gewebeersatz im Bereich des Knochens sollte zuverlässig im Rahmen der Behandlung, sicher und effizient für den Patienten und prinzipiell alle Vorteile des körpereigenen Knochengewebes aufweisen, ohne die Nachteile in Kauf nehmen zu müssen [110, 111].

Grundvoraussetzung ist die Biokompatibilität, die absolute Gewebeverträglichkeit garantiert und somit gewährleistet, dass von dem eingebrachten Material keine Toxizität, Teratogenität und Kanzerogenität ausgehen [110, 111]. Voraussetzung für einen langfristigen Behandlungserfolg sollte nicht nur sein, dass die Defektstelle überbrückt wird, sondern sich das knöchernen Transplantat auch knöchern integriert. Weiterhin sollte sich die Defektstelle möglichst schnell regenerieren, was KEM mit chemischer Ähnlichkeit zum Knochen und chemischer Stabilität voraussetzt und sich das eingebrachte Material an die dynamischen Gegebenheiten des Bewegungsapparates und des knöchernen Skeletts anpasst. Zudem sollte das verwendete Material keine Antigenität aufweisen, möglichst günstig herzustellen sein und in ausreichenden Mengen vorhanden sein. Es sollte sowohl Einsatz in funktionell belasteten als auch in belastungsschwächeren Bereichen finden und später durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden. Zudem spielen die Osteoinduktion, Osteokonduktion, Porosität, Formbarkeit und Sterilität eine wichtige Rolle [110–112]. Das eingebrachte KEM sollte die Osteogenese möglichst fördern bzw. eine Beschleunigung der Knochenbildung bewirken und als osteokonduktive Leitstruktur für regeneriertes Knochengewebe dienen. Dabei dient die Mikrostruktur des KEM dem einwachsenden Knochen als Leitschiene. Des Weiteren ist eine stimulierende Wirkung auf ortsständige knochenbildende Zellen von Vorteil [110]. Neben den materialeigenen Einflussfaktoren sind auch die interindividuellen patienteneigenen Faktoren wie die Beschaffenheiten des Implantatlagers, dessen Größe und Topographie wichtig. Außerdem ist die interindividuelle osteogenetische Potenz des Knochens bedeutsam für eine erfolgreiche Transplantation bzw. eine stabile, langfristige Integration des Implantats im Sinne einer *restitutio ad integrum*. Voraussetzung ist zudem eine adäquate Vaskularisierung. Darüber hinaus beeinflussen Infektfreiheit, sowie ein intaktes Weichgewebe, vitale Knochenenden und eine mechanisch stabile Umgebung den Heilungsprozess entscheidend [108]. Oftmals kommt avaskulärer oder mikrovaskulärer autologer Knochen, beispielsweise aus dem Beckenkamm zum Einsatz, der nach wie vor als Goldstandard zur Rekonstruktion von Defekten gilt, da er lebensfähige osteogene Zellen enthält [112–117, 106, 118].

Vorteile der autologen Transplantation sind die gute Biokompatibilität, Osseointegration, die osteogenen-, induktiven- und konduktiven Eigenschaften.

Zudem ist keine immunologische Reaktion zu erwarten [112–116, 119]. Durch Verpflanzung von vitalen Osteoblasten kommt es zur Osteogenese, wobei die adäquate Vaskularisierung Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation ist. Die Osteoinduktion wird durch die natürlich vorkommenden Zytokine und Wachstumsfaktoren wie BMP 2 erreicht, die aus der Knochenmatrix diffundieren und ortsständige oder transplantierte Stammzellen (SC) und Osteoprogenitorzellen zur osteogenen Differenzierung anregen [120]. Durch die Bereitstellung der natürlichen Knochenmatrix in autogenen Transplantaten kann auch die Osteokonduktion optimal gefördert werden, wodurch es zur Einwanderung von Zellen und Gewebe in den Defekt kommt. Allerdings können die losen Zellen danach weder vollständig Organ- noch Gewebefunktionen übernehmen und sich auch nicht räumlich organisieren. Oft brauchen die Zellen eine Leitstruktur im Sinne einer stabilisierenden 3D Struktur um sich räumlich orientieren zu können und um ihr Wachstum voll zu entfalten. Neben den Vorteilen der autologen Transplantation, ergeben sich auch einige Nachteile. Um einen bestehenden Defekt zu beheben, schafft man an anderer Stelle, an der Transplantat-Entnahmestelle, einen neuen Defekt. Mit diesem Zweiteingriff, gerade bei größeren Defekten, riskiert man eine Reihe von postoperativen Komplikationen, wie z.B. Blutungen und Infektionen [121, 118]. Des Weiteren besteht bei autologem Knochen eine limitierte Verfügbarkeit bei der Überbrückung von größeren Substanzdefekten und interindividuelle Qualitätsunterschiede [108, 122].

Der Aufbau bei allogenen und xenogenen KEM spiegelt die chemische Zusammensetzung des normalen Knochens wieder [108]. Nachteile der Überbrückung von Defekten mit allogenen oder auch xenogen KEM sind, dass sie generell aufgrund der Abwesenheit von lebensfähigen Zellen oder Wachstumsfaktoren keine osteogenen Eigenschaften aufweisen und auch nicht osteoinduktiv wirken. In diesen Fällen weisen beide nur osteokonduktive Eigenschaften auf [112, 121].

Zudem kann eine immunologische Reaktion des Empfängers nicht ausgeschlossen werden und es besteht die Möglichkeit der Übertragung von Infektionskrankheiten. Trotzdem bestreiten Allografts den Hauptteil der gewählten Transplantationsoptionen [105, 12, 118].

Aufgrund ausreichender Mengen erweitern seit langem alloplastische Materialien das Spektrum der Möglichkeiten fehlendes Knochenvolumen zu ersetzen und zu

regenerieren oder wenn eine allogene Entnahme aufgrund der damit verbundenen Risiken kontraindiziert ist [123]. Eingesetzte synthetisch- oder biologisch-alloplastische Knochenaufbaumaterialien werden vollsynthetisch hergestellt oder sind artfremde Materialien die durch aufwendige Verfahren gewonnen und gereinigt werden. Diese werden entweder knöchern integriert oder vollständig resorbiert und durch lamellären Knochen ersetzt [116]. Als synthetisch alloplastische KEM kommen klinisch Polymethylmethacrylat (PMMA)-Zemente, Calciumsulfate (CaS)- oder phosphate (CaP), wie Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP) oder andere Grundstoffe wie Metalle, Keramiken, Polymere oder Verbundstoffe aus allen dreien, sowie Biogläser und resorbierbare Polyester in Frage [123, 117]. Der Vorteil der alloplastischen Materialien liegt in geringeren Kosten und umgeht die Nachteile der allogenen und xenogenen KEM, wie dem möglichen Pathogentransfer und eventuellen Immunreaktionen bis hin zu Abstoßungsreaktionen. Die resultierenden biologischen Eigenschaften des Materials hängen entscheidend von der chemischen Zusammensetzung, der Applikationsform, den Struktureigenschaften sowie von den mechanischen Komponenten ab [108]. Verschiedene Formen der Materialien, wie z.B Granulate, knetbare Pasten, Gele, Formkörper oder Zemente werden eingesetzt. Der Nachteil ist, dass die alloplastischen KEM als anorganische Materialien keine biologische Aktivität besitzen. Die meisten kommerziell verfügbaren alloplastischen Materialien haben keinen osteoinduktiven Effekt, sondern wirken ausschließlich osteokonduktiv und unterliegen keinem Abbauprozess, sondern werden idealerweise knöchern durchbaut [108]. Materialien wie das hochkristalline HA, das über eine gute Bioverträglichkeit verfügt, wird aufgrund seiner fehlenden dreidimensionalen Porosität nicht resorbiert da eine Einwanderung von Gefäßen und Zellen verhindert wird.

Bei diesem Material wächst der Knochen nur randständig an. Ein osteoklastenabhängiger Abbau findet dann ebenfalls randständig statt [124]. Allerdings gibt es auch KEM die analog zum Umbau des Knochens abgebaut werden, wie verschiedene CaP [124].

Dabei hängt die Osteokonduktivität, die Umbaurate bzw. die Geschwindigkeit der Degradation u.a. von der Morphologie und der Porenstruktur des eingebrachten Materials ab. Von Bedeutung ist die Stabilität der Materialien in funktionsbelasteten Defekten, beispielsweise dem Bewegungsapparat, da die Festigkeit mit geringerer

Resorption korrelieren kann [108]. Wünschenswert sind Formulierungen, die der Funktion des eigenen Knochens nahe kommen, formbeständig sind, sich aber trotzdem rückstandslos resorbieren lassen, wobei die Resorptionsrate mit der Reperaturrate des eigenen Gewebes korrelieren sollte, um die notwendige Stabilität und Beständigkeit während der Resorptionsphase zu gewährleisten [125]. Anforderungen an Stoffe, wie Zemente, Biogläser oder resorbierbare Polymere, die nicht in kraft-belasteten Bereichen eingesetzt werden, sind geringer. Sie werden oft als Pulver, Granulat oder gesinterte Formkörper eingesetzt. Um den knöchernen Umbauprozess zu gewährleisten und zu optimieren, ohne Stabilitätseinbußen in Kauf zu nehmen, ist meist eine Kombination aus mehreren Werkstoffen, sogenannten Kompositmaterialien, sinnvoll. Durch das „additive Fertigungsverfahren (AM)“, welches verschiedene generative Fertigungs- und Formgebungsverfahren wie die „Stereolithographie“, das „Selektive-Laser-Sintern“ oder den „3D-Pulverdruck“ beinhaltet, ist es möglich, patientenspezifische Implantatformen mit einer definierten inneren und äußeren Geometrie als Knochenersatz zu schaffen [126].

Für die Verarbeitung von CaP, welches für die Herstellung von alloplastischem Knochenersatz aufgrund seiner chemischen und strukturellen Ähnlichkeit zur organischen Phase des Knochens und seiner sehr guten Biokompatibilität in Frage kommt, wurden bislang vor allem die Verfahren des Lasersinterns und des 3D-Pulverdrucks verwendet [127]. Der 3D-Pulverdruck basiert auf dem Prinzip der Tintenstrahldrucktechnik, wobei als Vorlage 3D Datensätze aus CT oder MRT gewonnen werden. Verschiedene Materialien wie beispielsweise TCP, HA oder PMMA-Pulver können durch geeignete Pulver-Bindemittelsysteme zur Erstellung von 3D-Formkörpern benutzt werden. Die Vorteile des 3D-Pulverdrucks gegenüber anderen AM-Verfahren liegen in der vergleichsweise einfachen und günstigen Anwendung mit pulverförmigen Substanzen poröse Scaffolds zu erstellen [127–129].

## 1.7 Calciumphosphate als Knochenersatzwerkstoffe

Zwei Drittel der Trockenmasse des Knochens bestehen aus anorganischer Grundsubstanz, die das Calciumphosphat (~85-90%), Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) mit (~8-10%), Magnesiumphosphat (MgP) (~1,5%) und das Calciumfluorid ( $\text{CaF}$ ) (~0,3%) beinhaltet. Dabei liegen die Mineralien im Knochen in Form von Apatitkristallen vor. Bei der Knochendefektauffüllung mittels KEM ergeben sich prinzipiell zwei verschiedene Lösungsansätze, die sich weitestgehend ergänzen:

1. Verwendung von langzeitstabilen KEM, die die Funktion des betroffenen Bereichs sofort wieder herstellen
2. Verwendung von vollständig biodegradierbaren KEM, was eine völlige Funktionsherstellung erst nach längerer Zeit zulässt.

In der vorliegenden Arbeit wird Punkt 2 thematisiert. Chemisch betrachtet besteht Knochen zu 60-70% aus dem anorganischen Mineral CaP beziehungsweise HA, weshalb synthetische CaP-Verbindungen geeignete KEM darstellen und als Biomaterial ihre Anwendung finden. CaP werden als Transplantate für die Knochenreparatur, als Augmentationsmaterial und zur Substitution verwendet [130, 117]. CaP besitzen eine ausgezeichnete Biokompatibilität, lassen sich synthetisch in reiner Form herstellen, sind nicht allergen und besitzen als anorganische Materialien keine eigene biologische Aktivität [116, 131, 117].

CaP lassen sich unterschiedlich formen und können unterschiedlich appliziert werden, beispielsweise als gesinterte Formkörper, nanokristalline Pasten und in situ härtende Zemente. Zudem besteht in einigen Fällen die Möglichkeit CaP zu injizieren, womit man einen chirurgischen Eingriff einspart. Der Zement härtet in diesen Fällen in vivo [132, 117].

Sie werden eingeteilt in: HA,  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCP, biphasische CaP (z.B. Mischung HA mit  $\beta$ -TCP) und ungesinterte oder calciumdefiziente Apatite [112]. Des Weiteren unterscheidet man bei KEM auf CaP Basis Zemente und Keramiken, wobei die Ausgangssubstanzen und Produkte überwiegend identisch sind. Lediglich die Herstellungsverfahren unterscheiden sich. Zemente gehen aus einer Lösung-Präzipitationsreaktion aus einer übersättigten Lösung bei Raum- oder Körpertemperatur hervor und weisen kleine miteinander verfilzte Partikel auf. Keramiken hingegen werden durch Hochtemperaturesinterung ( $>1000$  °C) geformt und weisen größere, über Sinterhalse verbundene Partikel auf [133].

Bei gleicher Ausgangssubstanz weisen keramische Werkstoffe höhere mechanische Festigkeiten auf als CaP-Zemente.

Die Resorption der TCP-Zemente geschieht durch Osteoklasten, so dass das Einwachsen von körpereigenem Knochen in die Defektstelle möglich wird. Bei zu geringer Porosität und demnach zu geringer Invasion der körpereigenen Zellen könnten die Materialien nicht vollständig abgebaut werden, auch wenn es zu einer guten Integration dieser Stoffe kommt [108].

### **1.8 Calciumphosphat-Zemente**

Calciumphosphat-Zemente (CPC) wurden als osteotransduktive, d.h., dass sie nach Implantation im Knochen in neues Knochengewebe transformiert wurden [134, 135], und osteokonduktive Materialien entwickelt, die als pastös eingebrachtes Material in der Lage sind die Form des Defekts exakt auszufüllen. Durch ihre Ähnlichkeit mit der anorganischen Komponente des Knochens werden CaP vielfach als KEM eingesetzt. Diese bilden dann optimalerweise eine Matrix, die das sich neu bildende Knochengewebe als Leitstruktur nutzen kann. Das Konzept ist nicht neu. Bereits 1892 wurde Gips, bestehend aus CaS, in solcher Weise verwendet [136] Le Geros et al. und Brown und Chow berichteten dann als erste über erfolgreich gelungene Versuche mit einem formbaren, selbsthärtenden CPC [124, 131, 136–138].

Die ersten kommerziellen CPC wurden vor mehr als 20 Jahren für die Behandlung in der MKG-Chirurgie, bei Missbildungen und Frakturen angewandt [137].

Zemente auf CaP-Basis wie TCP und HA können durch ihre chemische Ähnlichkeit zur Mineralphase des Knochens eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit, Osteoinduktivität [139] und Osteokonduktivität vorweisen und werden vielfach als KEM verwendet [130, 140, 141, 118]. Durch seine Biokompatibilität und nanokristalline Struktur kann der Zement resorbiert werden und ermöglicht die Knochenbildung an seiner Oberfläche, solange Kontakt zum natürlichen Knochen besteht [130, 140, 141]. Bei der Osteokonduktivität gewährleistet das zur Verfügung stehende Gerüst eine Vorlage für die Knochenformation (Leitschienenefekt) und begünstigt die Osteoblasten- Adhäsion-und Proliferation [130, 141].

Bei dem Prozess der Osteoinduktion werden ua. Knochenmarks-Stromazellen durch den CP-Zement rekrutiert um die Knochenbildung zu induzieren [141]. Zudem ermöglichen in situ härtende CPC, während sie pastös sind, durch ihre freie Formbarkeit eine nahezu perfekte geometrische Anpassung an den Defekt [139].

Klinisch angewandt werden verschiedene physikalische Formen, beispielsweise Pulver, Granulat und gesinterte Formkörper; dicht oder porös. Neben den Materialeigenschaften des Biomaterials hängt der klinische Einsatz maßgeblich von der Topographie des Defektes, den anatomischen Gegebenheiten und den zu erwartenden mechanischen Belastungen ab [142]. CPC können für nicht tragende Anwendungen, besonders zur Gesichts- und Schädelrekonstruktion genutzt werden [143–146]. Aber auch im spongiösen Knochen (Wirbel/Fersenbein) und im epi- und metaphysären Bereich, die größtenteils aus spongiösem Knochen aufgebaut sind und im Stande sind axiale Kompressionskräfte weiterzuleiten, finden sie ihre Anwendung [142]. Ein Einsatz als stabilisierender Faktor im Diaphysenbereich, in dem die Corticalis im Vordergrund steht, macht keinen Sinn, da dieser den Biege- und Torsionskräften widerstehen muss. [142, 117]. Grund des eingeschränkten Einsatzes im spongiösen, epi- und metaphysären, craniofacialen, maxillofacialen Bereich sowie dem Orbitabereich ist ihre biomechanische Spezifikation. Durch das Fehlen von Kollagen, wie im natürlichen Knochen wirken sie lediglich als Stütze für das Gewebe und besitzen nur eine spezifische axiale Kompressionsstabilität [142]. Die Festigkeiten variierten je nach Zementtyp zwischen 20-83 MPa [123]. Die Druckfestigkeit für HA-Zemente liegt im ausgehärteten Zustand bei 40-100 MPa und die Zugfestigkeit bei ca. 8 MPa, die Druckfestigkeit für Bruschzemente liegt bei 1-24 MPa [139, 143]. Entsprechend sollten keine last-tragenden Defekte mit einer maximalen Fläche von mehr als 25 cm<sup>2</sup> versorgt werden [143, 144].

CPC sind Zwei-oder Dreikomponentensysteme und bestehen aus einer oder mehreren Pulverkomponenten und einer flüssigen Phase. Als Zementkomponenten kommen u.a. TCP, Tetracalciumphosphat (TTCP), Octacalciumphosphat (OCP), Monocalciumphosphat Monohydrat (MCPM), Calciumhydrogenphosphat, Monit (DCPA) und das entsprechende Dihydrat Bruschit (DCPD) in Frage [123, 146]. Nach dem Anmischen der Teilkomponenten entsteht eine, im Bezug auf das Reaktionsprodukt, an Calcium (Ca) und Phosphat (P) übersättigte Lösung bzw. Paste. Die abhängig von

den eingesetzten CaP-Komponenten temperaturabhängige, leicht exotherme oder endotherme Abbindereaktion bzw. Aushärtung erfolgt in situ durch eine Lösungs-Fällungs-Reaktion, auf Grundlage der unterschiedlichen Löslichkeit der CaP [147].

Die Zeit zwischen der Herstellung bis zu Beginn der Aushärtung des Zementes (Verarbeitungszeit) sollte optimalerweise 10-20 min. betragen, wobei nach Aushärtung eine ausreichende Belastbarkeit gewährleistet sein sollte. Des Weiteren sollte das Material gut zu applizieren sein um ein Auslaufen in das Weichgewebe zu verhindern [131]. Durch Modifikation der Zementpaste mit Adjuvantien kann die Abbindezeit verändert werden. Als Abbindebeschleuniger kommen Alkaliphosphate oder Phosphorsäure in Frage, während wasserlösliche Polymere, Citrate oder Pyrophosphate den Abbindevorgang verlangsamen [123]. Die bei der Abbindereaktion resultierende Verfilzung der sich bildenden Kristallite generieren ein stabiles Zementgefüge, wobei das Erreichen der endgültigen Festigkeit Stunden bis Tage dauern kann [136, 147]. Ausgehärtete CPC bestehen entweder aus nanokristallinem HA oder Brushit, wobei die Art des Endproduktes und dessen Bildungsrate maßgeblich vom pH-Wert der Zementpaste abhängt. Stellt man durch saure Zusätze wie Phosphorsäure oder primäre CaP den pH-Wert unterhalb von 4,2 ein, bildet sich Brushit aus, oberhalb von 4,2 entsteht als Reaktionsprodukt nanokristallines HA [123, 139, 148]. Durch den Lösungs- Fällungsprozess sind die Reaktionsprodukte nanokristallin und haben eine hohe spezifische Oberfläche. Die Löslichkeit sinkt mit steigendem pH-Wert. Somit stellt HA oberhalb eines pH-Wertes von 4,2 das thermodynamisch stabilste und am wenigsten lösliche CaP dar. Dies führt auch dazu, dass sich andere CaP-Salze lösen und als HA geringerer Kristallinität ausfallen [149]. Es ist aufgrund seiner speziellen Oberflächenbeschaffenheit, mit der die Geweberegeneration entscheidend gefördert wird im Prinzip der ideale Knochenersatz. Dies erklärt auch warum HA der Hauptbestandteil des menschlichen und tierischen Hartgewebes ist. Aufgrund der hohen Kristallinität und Stabilität von HA ist dieses aber noch nach Jahren, fast in unveränderter Form am Anwendungsort nachweisbar und beeinflusst die mechanischen Eigenschaften des Knochens eher negativ [131]. Durch den Sintervorgang bei ca. 1100-1500°C erhöht sich die Materialdichte mit Porositätseinbußen, wodurch die interkonnektierenden Eigenschaften verloren gehen was wiederum eine geringe Osteokonduktivität und schlechte Resorption zur Folge hat. Aufgrund der geringen

Biodegradierbarkeit ist Hydroxylapatit nicht als Knochenaufbaumaterial geeignet sondern nur als KEM [150]. Heute greift man immer häufiger auf TCP zurück. TCPs sind resorbierbar und werden vollständig durch neuen Knochen ersetzt [131, 118].

Neben den oben genannten Einflussfaktoren wie dem unterschiedlichen Löslichkeitsprodukt (LP) der CaP, dem pH-Wert und der Temperatur, sind auch die Größe des knöchernen Defektes und dessen Lokalisation entscheidend. Des Weiteren wird der Prozess der Osseointegration und Resorption von der Phasenreinheit, Primärkorngröße, dem Gefüge, der Porosität und Oberflächenstruktur des eingebrachten Zementes bestimmt [131, 117]. Darüber hinaus sollte der Zement vollsynthetisch hergestellt und frei von organischen, allopathen oder xenogenen Bestandteilen sein. Das Material sollte sterilisierbar und nicht kanzerogen sein, keine antigenen Eigenschaften aufweisen und die Resorption sollte ohne zelluläre Reaktionen und Entzündungsprozesse vollständig erfolgen. Die genaue Porenstruktur ist einer der wichtigsten Eigenschaften der KEM bzw. Keramiken. Dabei spielen die Mikro- und Makroporosität sowie auch die Interkonnektion und die Ausrichtung der Poren eine Rolle [142, 117, 118]. Diese sind entscheidend für eine adäquate Vaskularisierung und ihre osteotropen und osteokonduktiven Eigenschaften [142], wobei die ideale Porengröße dem spongiösen, natürlichen Knochen entspricht [112, 151]. Desweiteren erweitern Poren die biologisch zur Verfügung stehende Fläche zur Aufnahme von z.B. Wachstumsfaktoren. Diese Eigenschaften machen CaP für das TE interessant [117].

## **1.9 Tricalciumphosphate**

Insbesondere  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP und HA oder Mischungen dieser Materialien eignen sich zur Behandlung ossärer Defekte [150]. Die TCP-Produktion erfolgt durch Sinterung von Calciumhydrogenphosphat und  $\text{CaCO}_3$ . Die synthetische Herstellung mit dem damit verbundenen Sinterprozess garantieren Keim- und Pyrogenfreiheit. TCP ist im Gegensatz zu dem wenig degradierbaren HA im Körper löslich und bietet sich als osteokonduktives Knochenaufbaumaterialien zur Unterstützung der Knochenregeneration an [116, 152].  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP und HA haben bei gleichbleibender Chargenqualität den Vorteil, weder toxisch, immunologisch aktiv, noch teratogen oder kanzerogen zu sein [116, 153]. Sowohl TCP als auch HA zeichnen sich dadurch aus,

dass sie synthetisch mit genau definierten physio- und kristallchemischen Eigenschaften herstellbar sind und so eine abschätzbare biologische Reaktionsweise ermöglichen [116]. Das Niedrigtemperaturpolymorph  $\beta$ -TCP wird durch calcinieren oberhalb von 800 °C aus z.B. äquimolaren Mischungen aus DCPD und präzipitiertem HA (PHA) mit einem CaP-Verhältniss von 1:67 hergestellt [116, 154, 5] oder auch durch Sinterung von DCPA und  $\text{CaCO}_3$  im Verhältnis 2:1 [155]. Es ist bis in den Bereich der Normaltemperatur stabil [116]. Phasenreines  $\beta$ -TCP wird vollständig, aber langsamer als autologer Knochen resorbiert und durch körpereigenen Knochen ersetzt [156]. Oberhalb von 1125°C wandelt sich  $\beta$ -TCP in die bei Raumtemperatur metastabile Hochtemperaturphase  $\alpha$ -TCP um.

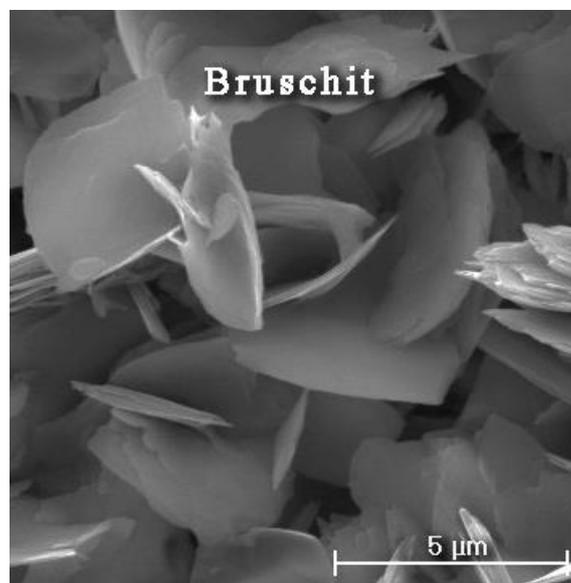
$\alpha$ -TCP kann durch Hydrolyse zu einem anderen Gemisch von CaP reagieren [5] und oberhalb von 1430°C zur Super- $\alpha$ -TCP-Phase reagieren, welches nach Abkühlen wieder in die metastabile  $\alpha$ -TCP-Phase zurück reagieren kann, allerdings nicht in die  $\beta$ -Modifikation [157].  $\alpha$ -TCP ist im Gegensatz zu  $\beta$ -TCP bei Normaltemperatur instabil. Obwohl  $\alpha$ -TCP sehr gut löslich ist, zeichnet es sich durch eine niedrige Resorption aus. Das liegt daran, dass  $\alpha$ -TCP in situ entweder partiell oder vollständig in HA umgelagert wird und dann nicht mehr in Lösung geht. Die so entstehenden HA-Kristalle sind nur unvollständig degradierbar und werden durch phagozytäre Zellen abgebaut [116]. Reines  $\beta$ -TCP kommt als natürliches Biomaterial nicht vor, nur die magnesiumhaltige Form Whitlockit wurde im Menschen z.B. bei der Kariesbildung und arthritischen Verkalkungen entdeckt [5].

### **1.10 Bruschit**

Bruschit (DCPD) wird bei einem pH-Wert unter 4,2 gebildet [139].  $\beta$ -TCP, Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM) bzw. Phosphorsäure bilden die Ausgangswerkstoffe für Bruschit [158]. Die Umsetzung von  $\beta$ -TCP und saurem MCPM führt im Verhältnis 1:1 zu Bruschit [139]. Verwendet man Phosphorsäure als Anmischflüssigkeit wird Bruschit aufgrund des niedrigen pH Wertes von Phosphorsäure gebildet. Auf die Zugabe von MCPM kann dann dementsprechend verzichtet werden [139, 159].

Eine weitere Möglichkeit Bruschit herzustellen ist die Reaktion von Tetracalciumphosphat (TTCP) + MCPM + Calciumoxid (CaO) [154]. Weniger stabile Zemente entstehen bei geringerer Umsatzrate und höherer Porosität der Zementmatrix. Röntgenkristallographische Untersuchungen ergaben, dass in abgebundenen Bruschit-Proben überschüssiges bzw. unreaktiertes  $\beta$ -TCP unverändert vorliegt [160]. Monetit (DCPA) ist die wasserfreie Form von Bruschit und unterhalb von einem pH-Wert von 4,2 das stabilste und am geringsten lösliche CaP. Da Monetit in saurem Milieu aber nur eine geringe Kristallbildungsrate aufweist, bildet sich das Dihydrat Bruschit [5, 117]. Durch Erhitzen auf Temperaturen von 120-170°C erhält man unter Abspaltung von Wasser wieder DCPA.

Bruschit ist biokompatibel, biologisch abbaubar und osteokonduktiv [154, 158]. Je nach Gegebenheit wird Bruschit resorbiert oder bleibt in vivo stabil, nachdem es in HA hydrolysiert ist [148]. Bruschit ist metastabil und kann in Octacalciumphosphat (OCP) (pH $\approx$ 6-7), PHA (pH>7) und Dicalciumphosphat (DCP) (pH<6) umgewandelt werden [154]. Bruschit hat fast die gleiche Zusammensetzung und kristallographische Struktur wie CaS-Dihydrat, das Mineral aus dem Gips aufgebaut ist [154].



*Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Bruschit, Bild modifiziert nach [1]*

Bruschi hat im Gegensatz zu HA eine wesentlich geringere Stabilität, ist aber im Gegensatz zu HA unter physiologischen Bedingungen besser resorbierbar, da es bei einem pH-Wert von 7,4 eine viel höhere Löslichkeit hat [137, 148, 117].

Somit kann der verloren gegangene Knochen ohne Verluste an Volumen oder Integrität des Gewebes vollständig und schneller durch neuen Knochen ersetzt werden [151]. Der schnellere Austausch durch neu gebildeten Knochen kann je nach medizinischer Indikation von Vorteil sein. Der Abbau von Bruschi erfolgt durch Lösungsprozesse im Serum, Erosion, Fragmentierung [148] und andere physiologische Abbauprozesse, beispielsweise durch Makrophagen und Osteoklasten, wobei letztere in diesem Zusammenhang wohl eine untergeordnete Rolle außerhalb des Bindegewebes spielen [157, 161]. CPC, die relativ schnell resorbiert werden, werden vorwiegend von Makrophagen und Riesenzellen entfernt, während die langsamer resorbierten CPC durch Osteoklasten-ähnliche Zellen abgebaut werden [148]. Die Druckfestigkeit für Bruschi-Zemente liegt im ausgehärteten Zustand bei 1-24Mpa, die Zugfestigkeit bei 0,7-4,5MPa, die für HA-Zemente zum Vergleich bei Werten von 40-100MPa und einer Zugfestigkeit von ca. 8MPa deutlich höher [139, 143]. Für Bruschi-Zemente wird nach kompressionsfreier Aushärtung eine Druckfestigkeit von 10MPa erreicht, wobei eine Vorverdichtung der Zementpaste zu einer Festigkeitssteigerung führen kann, was für den klinischen Bereich aber eher uninteressant ist, sondern nur dem Vergleich unterschiedlicher Zementchargen dient [123]. Allerdings kommt es aufgrund der höheren Kristallwachstumsrate bei Bruschi bildenden Zementen, im Gegensatz zu HA, zu einer frühzeitigen exothermen Abbindereaktion. Um den Einsatz von Bruschi in der Klinik zu realisieren kann man mit Hilfe von Zusätzen wie Pyrophosphat-, Citrat- oder Sulfat, die Abbindezeit verzögern [139, 162].

## **1.11 Knochenersatzmaterialien im biologischen System**

### **1.11.1 Tissue Engineering**

Der Begriff Tissue Engineering (TE) wurde wie folgt definiert: Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften für das Grundverständnis der Wechselwirkung von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und kranken Geweben. TE wird auch zur Entwicklung von biologischem

Gewebeersatz zur Wiederherstellung, Erhalt oder Verbesserung der Gewebefunktion eingesetzt [163]. Der Begriff des TE ist relativ neu, die Idee dahinter geht jedoch in das 16. Jahrhundert zurück. Gasparo Tagliacozzi (1546–99) beschrieb in seinem 1597 veröffentlichten Werk “De Custorum Chirurgia per Insitionem“ den Ersatz einer Nase, die er aus einem Unterarmklappen formte und konstruierte [2]. Das TE stützt sich auf das sogenannte trianguläre Konzept, bestehend aus einer Kombination von Zellen (zumeist mesenchymale Stammzellen), Scaffolds und Wachstumsfaktoren/Signalmolekülen [63, 164, 165]. Wachstumsfaktoren sorgen natürlicherweise für die Migration, Differenzierung und Proliferation aus dem Randbereich eines Defektes. Unter Einsatz von Wachstumsfaktoren, sollen die das Scaffold besiedelten Zellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden, was später deren Leistungsfähigkeit und Integration in vivo fördern soll. „Guidet Tissue Engineering“ ist der Fachbegriff für dieses Vorhaben [63].

### **1.11.2 Tissue Engineering von Knochen**

Da die allogenen und xenogenen Knochenersatzmaterialien oben genannte Nachteile aufweisen und anorganische Materialien Schwierigkeiten bezüglich Korrosion, Degradation und Materialermüdung zeigen, bleibt die autologe Knochenentnahme teilweise unverzichtbar [166, 117]. Dagegen werden im Bereich des bone tissue engineering mit Wachstumsfaktoren behandelte Scaffolds in den Defekt implantiert, wobei es dann zur optimierten Einheilung kommen sollte [108, 122]. Nach Implantation des Konstruktes sollte es idealerweise parallel zur Resorption des Trägermaterials zur Knochenneubildung kommen, wobei sich die eingebrachten synthetischen Biomaterialien am besten im Körper auflösen sollten, nachdem sich das Gewebe gebildet und organisiert hat [108]. Der Vorteil der Implantation bioaktiver bzw. resorbierbarer/degradierbarer Materialien ist, dass es nicht zur Ausbildung von Narbengewebe im regenerierten Defekt kommt, sondern die fehlende knöcherne Substanz überwiegend durch neuen Knochen ersetzt wird. Will man größere Defekte, wie die oben angesprochenen CSD überbrücken, muss man Vaskularisierung und Durchblutung beeinflussen [164]

### 1.11.3 Vaskularisierung von Scaffolds

Das TE von Gefäßen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Größere, Gewebsformationen wie Weichgewebs- und Knochentransplantate, die später in vivo einwandfrei organisiert sein sollen müssen durch komplexe Gefäßsysteme ernährt und mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden [167]. Ein für die Oxygenierung und Ernährung erforderlicher Diffusionsprozess bleibt auf ca. 150µm von den nächsten Kapillaren aus beschränkt [167]. Gerade bei Knochen- und Weichgewebetransplantaten im MKG-Bereich ist eine Gefäßversorgung unerlässlich, da Transplantate einen Zugang zur intra- oder extraoralen Oberfläche haben [167]. Die Einheiltiefe bei vielen osteokonduktiven Materialien ist auf 3mm beschränkt. Anderenfalls könnte eine knöcherne Durchbauung, je nach Defektgröße, ausbleiben [142]. Bei offenen Frakturen mit fehlender Weichteilabdeckung und infizierten Bereichen wird der Einsatz von nicht-vaskularisierten KEM ganz vermieden da das Infektionsrisiko zu groß ist [142]. Allerdings ist der Einsatz von nicht-vaskularisierten KEM denkbar wenn Wachstumsfaktoren zur Anwendung kämen, die die Neovaskularisation und Osteoneogenese fördern würden. Des Weiteren wäre eine Antibiotikazugabe denkbar, die dem Infektionsrisiko entgegenwirkt.

### 1.12 Vaskulogenese, Wundheilung und Angiogenese

Alle Formen der Neubildung von Blutgefäßen gehören im erwachsenen Organismus zur Neovaskularisierung, an der zwei unterschiedliche Mechanismen, die Vaskulogenese und die Angiogenese, beteiligt sind. Bei der **Vaskulogenese**, können Blutgefäße aus mesodermalen Vorläuferzellen, wie Angio- und Hämangioblasten, aber auch aus endothelialen Vorläuferzellen aus dem adulten Blut entstehen [85].

Die Entwicklung des Gefäßsystems hat ihren Ursprung in der Ausbildung von Blutinseln, die aus formierten Hämangioblasten aus dem splanchnopleuralen Mesoderm des Dottersacks entstehen. Die innere Schicht der Blutinsel im Dottersack differenziert zu hämatopoetischen Stammzellen, die periphere Zellschicht differenziert zu Angioblasten, die zu endothelialen Stammzellen differenzieren können.

Durch Wachstum und Fusion der Endothelzellen und Blutinseln bildet sich unter Einfluss der Blutflussrichtung, Gewebsoxygenierung, Apoptose und endothelialer

Transdifferenzierung ein vaskulärer Plexus und schließlich eine vaskuläres Gesamtsystem [85, 87]. Als **Angiogenese** bezeichnet man die Ausweitung und den Umbau von neuen Gefäßstrukturen durch Migration und Proliferation ausdifferenzierter Endothelzellen von bestehenden Blutgefäßen. Unter physiologischen Bedingungen ist der angiogenetische Mechanismus im Erwachsenenalter mit Ausnahme des weiblichen Reproduktionszyklus abgeschlossen. Die Angiogenese ist auch mit pathophysiologischen Prozessen, wie z.B. der Tumorbildung assoziiert [85]. Ein häufiger Stimulus für die Angiogenese ist die Hypoxie, eine Minderversorgung mit Sauerstoff, aber auch mechanische Faktoren, wie erhöhter Blutfluss und dementsprechende Scherkräfte [85]. Die Angiogenese wird u.a. durch Stickstoffmonoxid (NO) initiiert, eine Substanz die zur Vasodilatation führt und eine Hochregulation des proangiogenen vascular endothelial growth factor (VEGF) bewirkt. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was die Extravasation von Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zellen erlaubt [85]. Es kommt zu Umbauvorgängen der Basalmembran und die Migration von Endothelzellen wird angeregt. Darüber hinaus kommt es zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF. Nachdem sich die Endothelzellen aus ihrem engen Verband gelöst haben, kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren wie VEGF, fibroblast growth factor (FGF), Differenzierungsfaktoren wie Angiopoetin und platelet-derived growth factor (PDGF) und der transforming growth factor (TGF)- $\beta$  Familie zur Endothellzellproliferation und Migration in Richtung des angiogenen Stimulus. Die Endothelzellen formieren sich letztendlich neu und können in Fusion mit anderen Gefäßen ein neues Lumen bilden [168].

### **1.13 Humane mesenchymale Stammzellen**

Humane Stammzellen (hSC) gehören zu einem Pool pleiotroper undifferenzierter Zellen in ansonsten ausdifferenzierten Geweben. Sie sind in der Lage in spezialisierte Zellen zu differenzieren, Gewebe aufzubauen, zu regenerieren und zu reparieren [169–172].

Je nach Ursprungsgewebe, Differenzierungspotential und Phänotyp werden mehrere Stammzellpopulationen unterschieden.

So sind hämatopoetische SC über die Vorstufe der Progenitorzelle der Ursprung aller differenzierten Blutzellen und die MSC sind Ursprung für Zelltypen die aus dem Mesenchym entstammen [173].

Generell unterscheidet man zwei Stammzellpopulationen, die embryonale Stammzelle (ESC) und die adulte SC (z.B. neuronale SC, hämatopoetische SC, MSC) [174].

Als totipotent werden jene Zelltypen bezeichnet, die im Stande sind einen kompletten Organismus zu generieren. Dies trifft auf frühembryonale SC bzw. Blastomeren im 8-Zell-Morulastadium und der Zygote zu [174–176]. Sie bilden während der frühen Embryonalphase die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) und damit die Grundlage für die Entstehung aller Gewebetypen und Organe eines jeden Organismus [177]. Mit den folgenden Zellteilungen geht die Eigenschaft der embryonalen Stammzellen einen komplexen Organismus zu generieren verloren, u.a. deswegen weil ihnen die Fähigkeit zur Trophoblastenbildung fehlt [176]. Im Gegensatz zu totipotenten Zellen sind pluripotente SC nicht mehr fähig komplette Organismen auszubilden, können sich aber in fast jeden Zelltyp eines Organismus differenzieren [169, 177, 178]. Dadurch wird auch das große wissenschaftliche Interesse an diesem Stammzelltyp geweckt, sich im undifferenzierten Stadium endlos teilen zu können (Proliferationspotential) und sich in jeden Zelltyp der 3 Keimblätter weiterentwickeln zu können (Potenz) [177]. Des Weiteren sind ESC im Gegensatz zu anderen Stammzellpopulationen im Stande, ihren Phänotyp über längere Zeit in Kultur aufrecht zu erhalten (ESC können über ein Jahr in Kultur gehalten werden) und besitzen die Fähigkeit sich alle 35-40 Stunden zu verdoppeln [179]. Allerdings ist es äußerst schwierig ESC zu gewinnen, da sie aus der inneren Zellmasse des Blastocoels bzw. der Blastozyste des 4-5 Tage alten Embryos isoliert werden müssen [169]. Im erwachsenen Organismus befinden sich normalerweise keine pluripotenten Stammzellen.

Die erste pluripotente Zelllinie aus der inneren Zellmasse von murinen Blastozyten wurde in den 1980er Jahren von Evans und Kaufmann aus Mäuseembryonen gewonnen [174, 180] und humane ESC (heSC) wurden erstmals 1998 von amerikanischen Wissenschaftlern isoliert [174, 181]. Thompson et al. konnten in Experimenten zeigen, dass heSC in SCID (severe combined immunodeficient) Mäusen subkutan injiziert Teratome bildeten.

Jede der injizierten Mäuse bildete ein gutartiges Teratom aus, jedoch enthielten die Teratome alle Zellen die aus den 3 Keimblättern stammen, nämlich Darmepithel,-Knorpel,-Knochen,-Muskelzellen, als auch neurales Epithel, embryonale Nerven und stratifiziertes Plattenepithel, was folglich die Pluripotenz der injizierten Zellen bewies. Für Forschungszwecke nachteilig, bewies diese Versuchsstudie, dass ESC durch ihr ausgeprägtes Vermehrungspotential nach Transplantation unkontrollierbar wachsen und durch ihre hohe Regenerationskapazität karzinomfördernd sein könnten [181]. Der Umgang mit ESC stellt die Wissenschaft vor Herausforderungen. Obwohl diese Zellen extremes Potential haben, werden durch ethische Gegebenheiten Forschungsaktivitäten eingeschränkt. Dadurch ist es notwendig auf adulte SC zurückzugreifen.

### **1.13.1 Adulte mesenchymale Stammzellen**

Adulte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) können aus den unterschiedlichsten Geweben endodermalen, mesodermalen oder ektodermalen Ursprungs gewonnen werden [175]. Die daraus isolierten Zellen müssen internationalen Minimalkriterien gerecht werden, um als Stammzellen bezeichnet werden zu können [122, 177].

Die Minimalkriterien sind: 1. Die Zellen müssen plastik-adhären wachsen und sich in Kultur als spindelförmige, den Fibroblasten ähnliche Zellen zeigen 2. die Zellen dürfen keine hämatopoetischen Oberflächenmarker exprimieren. Sie können aber ein typisches Oberflächenmarkerprofil für mesenchymale Marker wie z.B. CD90, CD105 und CD73 exprimieren 3. die Zellen können sich in vitro z.B. in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren lassen, insofern die Kulturbedingungen klar definiert sind [122]. Diese heute als MSC bekannten Zellen sind undifferenzierte multipotente Zellen die jeder erwachsene Mensch in geringer Zahl in ausdifferenzierten Geweben enthält und die sich u.a. aus Geweben wie Knochenmark (KM), Blut, Fettgewebe, Muskeln, Periost, Nabelschnur, Zahnpulpa, Lunge und der Dermis isolieren lassen [165, 169, 173]. MSC aus jüngeren Geweben überleben in Zellkultur länger und haben ein höheres Differenzierungs- und Proliferationspotential als MSC aus älteren Geweben [122]. Obwohl die Aufgabe der ortsständigen MSC darin liegt die ständige Erneuerung und Reparatur von Gewebe zu unterstützen, nimmt ihr Differenzierungspotential sowie ihre

Proliferationsrate mit zunehmendem Alter ab [182]. Diese Tatsache spiegelt sich auch indirekt in vitro wieder, denn hier unterliegen sie der replikativen Seneszenz und sind in Kultur maximal 118 Tage zu halten [183]. Die Fähigkeit zur Proliferation hängt entscheidend von der Telomeraseaktivität ab [183], vom Alter des Spenders und ist zudem abhängig vom Zelltyp [175]. Die Telomerlängen werden mit biologischen Vorgängen in Verbindung gebracht, die mit der Alterung der Zellen zusammenhängen sowie mit deren Immortalisierung und Entstehung von Krebs [169]. Das Enzym Telomerase, eine reverse Transkriptase, ist an der Regulation der Telomerlänge beteiligt [169]. Auch ESC verfügen über eine hohe Telomeraseaktivität und sind aus diesem Grund im undifferenzierten Zustand unbegrenzt zu vervielfältigen [173].

MSC findet man in zahlreichen Geweben, die bei Schädigung begrenzt zur Selbsterneuerung fähig sind. Eine ausreichende Organfunktion kann oft nicht wiederhergestellt werden. MSC differenzieren in erster Linie in die Gewebe, aus dem sie stammen. Eine Differenzierung in Gewebetypen neuroektodermaler und endodermaler Keimblätter, die in einigen Studien beschrieben worden sind, würde als Pluripotenz oder phänotypische Plastizität bezeichnet und wird kontrovers diskutiert [172]. Zur Isolierung von MSC durch Verfahren wie positive oder negative Selektion sowie FACS (fluorescence-activated cell sorting) oder MACS (magnetic-activated cell sorting) werden spezialisierte Oberflächenmarker vorausgesetzt, aber bisher ist kein monospezifischer Epitop-Marker für die Zelloberfläche der MSC vorhanden um sie von anderen Zelltypen abzugrenzen [169, 175, 184]. Da für MSC keine spezifischen Marker vorhanden sind werden die Zellen durch die Abwesenheit bestimmter hämatopoetischer Marker wie CD34, CD45, CD14 und durch die Expression bestimmter Muster von Zelloberflächenmolekülen wie CD90, CD105 und CD44 gekennzeichnet [184]. Zudem werden sie aus dem KM durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und nach mehreren Waschschritten in Zellkulturschalen ausplattiert. Von den hämatopoetischen SC des KM sind sie dann durch ihre Adhärenz an Plastik abzugrenzen und gut zu separieren. MSC lassen sich dementsprechend leicht isolieren, haben sehr gute Wachstumseigenschaften, bilden schnell Kolonien und hohe Zellzahlen und verfügen über eine gute Regenerationskapazität [169].

Die leichte Gewinnung, Expandierbarkeit und ihre leichte Vervielfältigung in geeignetem Medium, sowie ihre Transduzierbarkeit und Versatilität machen hMSC zu einem geeigneten Zelltyp für die regenerative Medizin [185]. Auch aufgrund ihres mesodermalen Ursprungs liefern sie eine ideale Quelle für zellbasierte TE-Verfahren für die Knochenregeneration.

In letzter Zeit werden immer mehr Studien mit MSC durchgeführt, bei denen nicht die mesenchymalen Differenzierungsvorgänge im Vordergrund stehen, sondern die immunmodulatorischen, antiapoptotischen- und fibrotischen Faktoren. Des Weiteren werden die proangiogenen Aktivitäten sowie die Remodellierung der EZM und die trophischen Effekte, die über die Fähigkeit der Sekretion biologisch aktiver parakriner Faktoren zustande kommt, untersucht [122]. Neben Osteoblasten und Osteozyten ist eine stabile EZM obligat für einen stabilen Knochenersatz [122]. In vielen Studien wird erwähnt, dass MSC durch ihre intrinsische und sekretorische Aktivität Einfluss auf die Wundheilung und dessen Beschleunigung nehmen [186]. Dies geschieht, indem MSC durch ihre trophischen Effekte die Apoptose und Fibrose hemmen und die Angiogenese induzieren, indem sie VEGF produzieren und damit für die Anbindung der verletzten Region an das Blutssystem sorgen. Auch die Mitoseaktivität der ortsständigen Progenitorzellen wird gefördert [187]. MSC sondern eine Vielzahl bioaktiver Makromoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine ab [172]. Diese Moleküle wirken als Immunsuppressiva, weswegen MSC neben einer antiinflammatorischen Wirkung eine immunregulatorische Wirkung und eine immunsuppressive Wirkung auf Immunzellen, wie T-Zellen zugeschrieben wird [172].

### **1.13.2 Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen und geeignetem Trägermaterial**

Für das TE von Knochen braucht man eine für das Vorhaben brauchbare nicht-immunogene Zellquelle mit osteogenem Potential, ein biokompatibles Trägermaterial, das die EZM humaner Gewebe nachahmt und gegebenenfalls Wachstumsfaktoren [122]. Um Langzeiterfolg und Funktionalität zu gewährleisten, sollte das Trägermaterial biokompatibel, biodegradierbar und porös sein und ein günstiges Freisetzungsprofil haben, die Zelladhäsion- und Funktion gewährleisten oder sogar fördern, um in vivo die

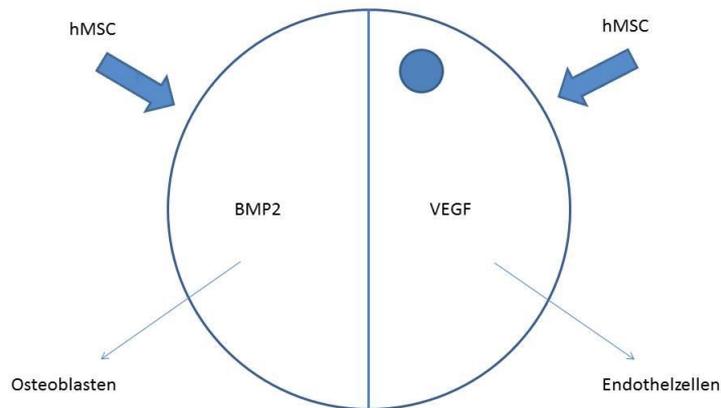
Leistungsfähigkeit und Integration der Zell-Scaffold-Einheit zu steigern [122]. Durch ihr multipotentes Differenzierungspotential und ihre immunmodulatorischen und trophischen Eigenschaften sind MSC geeignete Zellen für das Bone-TE [122]. Von der Firma BioTissue Technologies aus Freiburg, werden bereits Transplantate aus körpereigenen Knochenzellen (Bioseed-Oral Bone) angeboten.

Diese bestehen aus autologen osteogenen Zellen, die im Labor vermehrt wurden, sowie Fibrinkleber und einem Polylactid-Polyglykolid-Gerüst. Dabei wird versucht die Funktion der MSC durch ein mit Wachstumsfaktoren/Zytokinen beladenes Konstrukt zu ersetzen. Dadurch könnten die Stammzeleigenschaften und deren trophische Effekte aufrechterhalten werden. Wichtig ist auch die Identifizierung geeigneter Trägermaterialien, die die MSC-Differenzierung anregen können. Entscheidend ist zudem die Induktion von vaskulären Systemen des Empfängers.

## **2 Ziel der Arbeit**

Die Anwendung von Wachstumsfaktoren wie z.B. bone morphogenetic protein (BMP) beschränkt sich zurzeit nur auf Tibiafrakturen und Pseudoarthrosen. Angestrebt wird die potentiell klinische Anwendung auch z.B. kraniofazialer Defekte mit individuell gefertigten Implantaten aus Biomaterialien wie z.B. Brushit. Aus dem Knochenzement werden mittels eines 3D Druckers sog. Scaffolds hergestellt, die nach vorangegangener Computertomografie eine Anpassung des Implantats an den individuellen Defekt ermöglichen. Nach Infiltration mit Wachstumsfaktoren soll das Brushit dann die körpereigenen Stammzellen des Patienten dazu anregen mit dem Implantat zu interagieren, was zu einer schnelleren Differenzierung zu Knochen und zur Angiogenese führen soll. Eine Implantation von fremden Stammzellen in den Patienten ist hierbei nicht angedacht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) in vitro auf einer osteokonduktiven Matrix wie Brushit zu kultivieren und zu untersuchen. Darüber hinaus sollen die Zellen durch Behandlung mit den Wachstumsfaktoren BMP 2 bzw. vascular endothelial growth factor (VEGF) zu einer ortsgerichteten Differenzierung angeregt werden (siehe Abb. 6). Die Experimente sollen mittels immunologischer Methoden wie Immunfluoreszenz (IF) und Westernblot (WB) sowie durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen analysiert werden.



*Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bruschi-Behandlung zur Differenzierung von hMSC mit Wachstumsfaktoren.*

*Die jeweiligen Hälften des Prüfkörpers werden zunächst mit den Wachstumsfaktoren BMP2 oder VEGF behandelt und anschliessend mit hMSC besiedelt. Die Gegenwart der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren soll die Differenzierung der hMSC in Osteoblasten (über BMP2) oder Endothelzellen (über VEGF) bewirken.*

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Geräte und Hilfsmittel

Zentrifuge	Fa. Kendro GmbH, Langenselbold
24 Well-Platten/ 6 Well-Platten	Fa. Nunc, Dänemark
6 Well-Platten/ 24 Well-Platten	Fa. Nunc, Dänemark
Analysenwaage	Fa. Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt
Bio Doc. Analysesystem	Fa. UVP Cambridge, UK
Blotkammer	Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Brutschank	Fa. Heraeus Hera Cell, Hanau
CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System	Fa. Schärfe Systeme, Reutlingen
Critical Point Dryer CPD 030	Fa. BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein
Deckgläschen bzw. Präparateständer	Eigenbau FMZ, Würzburg
Deckgläschen für Mikroskopie rund 12mm	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Drehschüttler	Fa. Labinco, Breda, Holland
ECL Detektionskit (Reagenz 1 und 2)	Fa. Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Einmalkanülen	Fa. Braun AG, Melsungen
Einmalpipetten	Fa. Costar GmbH, Bodenheim
Einmalspitzen	Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Entwicklungsmaschine	Fa. Dürr Dental, Würzburg
Eppendorfpipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
feuchte Kammer / Glasschale rund	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Fluoreszenzmikroskop	Fa. Zeiss, Axiolab, HBO 50/AC

Folienschweißgerät	Fa. CTC Clatronic GmbH, Kempten
Gelkammer (MTV1/ TV21)	Fa. CTI
Glasflaschen-, kolben- und zylinder	Fa.Schott GmbH, Main
Glasplatten, Glasschalen, Abstandhalter aus Kunststoff, Halteklammern, Käme aus Kunststoff	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Gold-Sputter-Coater K 550	EMITEC, Ashford, England
Heizblock	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Kamera mit Mikroskopieaufsatz	Fa. Leica, Digital-Kamera EC3
Kassette für Röntgenfilme	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Kühl-Gefrierkombination	Fa. Bosch GmbH, München
Magnetrührer	Fa. IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen
Magnetrührstäbchen	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Nitrozellulose Transfermembran	Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Parafilm	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Pasteurpipetten mit Syphonsauger	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
pH-Meter, inoLab	Fa. WTW GmbH, Tuttingen
Pipettierhilfe	Fa. Brand GmbH u CoKG, Wertheim
Plexiglasrahmen	Eigenbau FMZ, Würzburg
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss Digital Scanning Microscope 940, Oberkochen
Reaktionsgefäße mit Deckel	Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Röntgenfilm	Fa. Agfa- Gevaert N.V. Mortsel, Würzburg
Rotlichtlampe	Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
Skalpell	Fa. Aeskulap AG u. Co KG, Tuttingen
Spannungsquelle	Fa. Pharmacia Biotech AG, Upsala, Schweden

Sterile Werkbank	Fa. Heraeus Hera Cell, Hanau
Whatman Filterpapier	Fa. Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Wippschüttler	Fa. Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen
Zentrifuge	Fa. Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen

### 3.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Absättigungslösung (TBST + 1% BSA+ 1 % TWEEN 20)	selbst angesetzt
Acutase	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Gibco DMEM/ F12 Medium	Fa. Gibco Lifetechnologies, Carlsbad, Kalifornien
Gibco fetales Kälberserum (FKS)	Fa. Lifetechnologies, Carlsbad, Kalifornien
Reinstwasser	
Isoton	Fa. Beckmann Coulter, Krefeld
<b>PBS Rezeptur ( für 2 Liter PBS- Puffer):</b>	
16 g Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
0,4 g Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
4 g Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
2,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Aqua dest. 2 Liter	
bisBenzimide-Hoechst 33258, Trihydrochloride	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Stammlösung 5 µg/ml in PBS	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Arbeitslösung 20 µl/1000 µl in PBS (aus Stammlösung)	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Mowiol Rezeptur:  3 g Mowiol zu 40 ml PBS geben und 16 h rühren  20 ml wasserfreies Glycerin zugeben und 16 h rühren  15 min bei 12.000 rpm zentrifugieren  aliquotieren und bei -20 °C lagern	

primärer AK: PECAM 1 (2F7B2), mouse monoclonal IgG1, Verdünnung 1:100	Fa. Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Osteocalcin polyclonal goat IgG, Verdünnung 1:100	Fa. Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
sekundärer AK: Goat anti-mouse Cy2, IgG, Verdünnung 1:75	Fa. Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Aceton 100 % (-20 °C)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (-20 °C)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96 %	Fa. Brückemann, Heilbronn
0,2% Triton X-100	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
96% Ethanol	Fr. Brückemann GmbH, Heilbronn
1% Agarose	Fa. Roth GmbH u Co, Karlsruhe
Trenngel (Lösung 1): 0,3g Bis-acrylamid 2K 200ml Acrylamid 4K	Hersteller: Fa. Applichem GmbH, Darmstadt Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
Sammelgel (Lösung 2): Acrylamid 4K-Lösung 30%	Hersteller: Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
Trenngelpuffer (Lösung 3) : 3M (=36,3 g auf 100 ml) Tris-HCL, pH 8,8 0,4 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Sammelgelpuffer (Lösung 4): 0,75 M (=9,09g auf 100 ml) Tris- HCl, pH6,8 0,4 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat- Lösung (10%) in Reinstwasser (APS) (Lösung 5):	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
Elektrophoresepuffer (Lösung 6):	Hersteller:

50mM (=6,0 g auf 1000 ml) Tris- HCl, pH 8,8	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
0,38 M (=28, 7 g auf 1000 ml) Glycerin	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
-0,1 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Färbelösung (Lösung 7):	Hersteller:
0,1 % Coomassie brillant blue	Fa. Serva GmbH, Heidelberg
20% Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
7,5% Essigsäure	Fa. Roth GmbH u. Co, Karlsruhe
Entfärbelösung (Lösung 8):	Hersteller:
20% Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
7,5% Essigsäure	Fa. Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Probenpuffer nach Lämmli, 1970 [188](Lösung 9):	Hersteller:
60 mM ( = 7,2g auf 1000ml)Tris- HCl, pH 6,8	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
10% Glycerin	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
10 % b-Mercaptoethanol	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
TEMED, Tetramethylethylene diamine	Fa. Serva GmbH, Heidelberg
Proteinmassenstandarts (High- und Lowmarker)	Fa Biorad GmbH, München
Bromphenolblau in Probenpuffer (1 Spatelspitze/ml)	Fa. Serva GmbH, Heidelberg
TBS (Tris gepufferte Salzlösung):	Hersteller:
140 mM (=8,18g auf 1000ml) NaCl	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
10mM (=1,21g auf 1000ml) Tris Hcl, pH 7,4	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
TBST (pH 8,0)	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen

TBS+ 0,05 % Tween 20	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
Graphitblotpuffer 1 25mM (=3,027g auf 1000ml) Tris Hcl, pH 10,4 20% Methanol	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Graphitblotpuffer 2: 300 mM (= 36,33g auf 100ml) Tris Hcl, pH 10,4 20% Methanol	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Graphitblotpuffer 3: 25 mM (=3,027g auf 100ml) Tris Hcl, pH 9,4 40 mM (=5,248g auf 1000ml) DL Norleucin 20% Methanol Ponceau S Absättigungslösung (PBS und FCS)	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Merck KGaA, Darmstadt Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
1.AK anti Tubulin: 1:200 verdünnt in Absättigungslösung anti PECAM: 1:100 verdünnt in Absättigungslösung anti alkalische Phosphatase: 1:100 verdünnt in Absättigungslösung anti Osteocalcin: 1:500 verdünnt in Absättigungslösung	Hersteller: Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen Fa. Santa Cruz, Heidelberg Fa. Acris, Herford Fa. Santa Cruz, Heidelberg
2.AK anti Maus Biotin (1:5000)	Hersteller: Jackson Immuno Research, Newmarket, UK
Pufferlösung (pH 7)	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Glutaraldehyd	Fa. Merck KGaA, Darmstadt

### 3.3 Herstellung der Prüfkörper

#### 3.3.1 Herstellung von $\alpha/\beta$ -Tricalciumphosphat Pulver

Die Herstellung von  $\alpha/\beta$ -Tricalciumphosphat (TCP)-Pulver erfolgte durch Sinterung von Pulvergemischen mit dem Calcium (Ca)-Phosphor-Verhältnis 1,5 von 2,15 mol Calciumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt) und 1,00 mol (Calciumcarbonat)  $\text{CaCO}_3$  (Merck, Darmstadt). Die Pulver wurden im Plugmischer (M5R, Gebrüder Lödige, Paderborn) für 1 Stunde (h) vermengt und im Anschluss für 5 h bei  $1400\text{ C}^\circ$  gesintert.

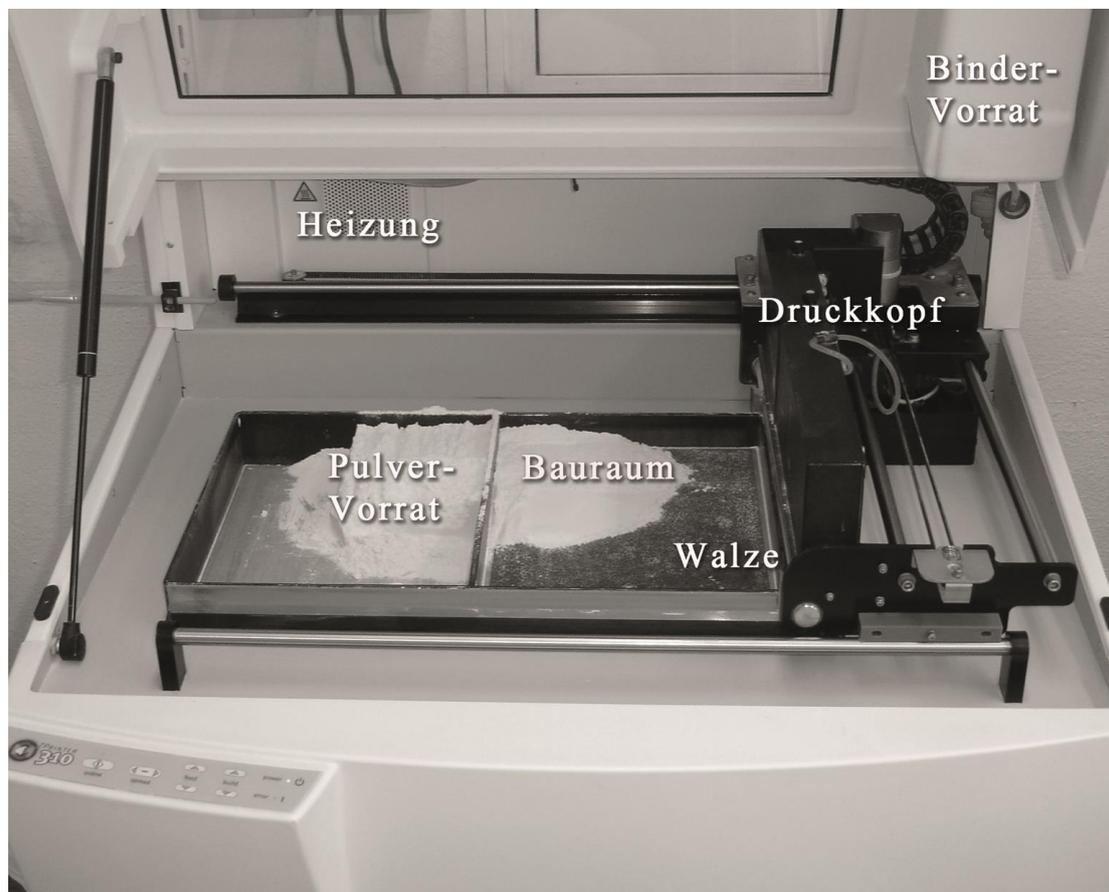


Um eine thermische Zersetzung der metastabilen  $\alpha$ -TCP Phase, die im Temperaturbereich von  $1100\text{-}1200\text{ C}^\circ$  gebildet wird, zu vermeiden, wurde der Sinterkuchen nach dem Sintervorgang zügig auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurde der Sinterkuchen auf eine Korngröße kleiner 2mm gemörsert. Im Anschluss daran wurde das Material auf eine Größe unter  $355\text{ }\mu\text{m}$  gesiebt. Zuletzt wurde das Pulver mit Achatmahlwerkzeugen (Becher 500 ml gefüllt mit 125 g Pulver und jeweils 4 Kugeln á  $\text{Ø} = 30\text{ mm}$ ) in einer Kugelmühle (PM400, Retsch, Haan) bei einer Mahlggeschwindigkeit von 200 U/min (10 min.) aufgemahlen.

#### 3.3.2 3D Pulverdruck

Mittels des Rapid-Prototyping Verfahrens ist es möglich drei-dimensionale Formkörper mathematisch zu generieren. Es wurden Prüfkörper, aus Bruschi bestehend, mit Hilfe des Z-Printer 310 (Firma Z-Corporation) gedruckt. Das Design der Prüfkörper wurde dafür zuvor mit dem Programm Think3 Design® (think3 Inc., Dallas, Texas, USA) erstellt. Es besteht die Möglichkeit mit diesem Drucker sowohl STL-Datensätze, als auch Vektorgrafiken zu drucken. Über die entsprechende Software, auf Basis von 3D Vektorgrafiken wurden die dreidimensionalen Objekte in den entsprechenden Größen im Schichtverfahren gedruckt, wobei das von der Software 2-dimensionale als 3D Objekt generierte Formteil von der Druckersoftware erstmals in Schichten, im Abstand

von 0,075-0,2 mm zerlegt wird, um anschließend durch den Prototyper wieder physikalisch abgebildet werden zu können. Der Drucker wird mit dem präparierten  $\alpha/\beta$ -TCP befüllt. Der Drucker verfügt über einen Zufuhrbehälter und einen Bauraum. Beide werden mit Pulver befüllt und manuell mittels Metallplatte leicht verdichtet. Zum Übertrag der Pulverschichten in den Bauraum sowie dessen Glättung dient der sog. Schlitten, bestehend aus einer Walze und der Druckpatrone. Der Drucker ist funktionsbereit, nachdem das eingebrachte  $\alpha/\beta$ -TCP Pulver verdichtet wurde und die Tintenpatrone mit dem individuellen Binder gefüllt wurde. Die Binderabgabe geschieht durch einen handelsüblichen HP 11-Druckkopf mit einem Ink-Jet-Düsenkopf der in das Pulverbett Binder einspritzt.



*Abbildung 7: 3 D Drucker der Firma Z-Corporation zur Herstellung der Prüfkörper*  
Durch Schichtübertragung und Binderapplikation entsteht das gewünschte dreidimensionale Objekt. Diesem Pulver-Binder-Mechanismus liegt eine Lösungs/Fällungsreaktion zu Grunde. Das  $\alpha/\beta$ -TCP Pulver bindet mit der

Phosphorsäure zu einer Matrix aus Brushit ab, wobei ein Teil TCP unreaktiert bleibt. Dabei reagiert die Phosphorsäure besonders gut mit dem  $\alpha$ -TCP. Der Durchmesser der Prüfkörper lag für die kleinen Prüfkörper ohne Längsteilung bei 15 mm und für die großen mit Längsteilung bei 35 mm. Die Software zerlegt hierfür die Datensätze in einzelne Schichten, die von dem Drucker nacheinander aufgebracht werden können. Pulver und Binder müssen ein festes Gebilde entstehen lassen, weshalb ein präzises Einstellen des Binder-Volumen Verhältnisses notwendig ist. Bei dem Druck werden immer abwechselnd Pulver und Binder pro Lage geschichtet, so entsteht Schicht für Schicht ein 3D Objekt, in unserem Fall das Brushit-Scaffold. Die einzelnen Schichten werden dabei in der xy-Ebene gefertigt und in der z-Ebene zusammengefügt. Die anisotrope Skalierung war für alle Einstellungen  $x=y=z=1$ . Die Lagendicke betrug 125 $\mu$ m. Anschließend senkt sich die Plattform um den Betrag der gewählten Schichtdicke. Das Binder-Volumenverhältnis wurde auf 0,33 eingestellt. Der Sättigungsgrad für die Hülle wurde auf 166% und 659% für den Kern generiert. Als Lösung beim Druckverfahren wurde 20%ige Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ ) verwendet. Zur Steigerung der Umsetzungsrate wurde eine Nachhärtung durch Nachätzen mit 20%iger Phosphorsäure vorgenommen, nachdem die fertigen Prüfkörper mit Druckluft abgeblasen wurden um überschüssiges Pulver zu entfernen. Für das Nachhärten wurden die großen Scaffolds 3 mal 60 sec und die kleinen Scaffolds für 30 sec lang in Phosphorsäure eingelegt, um den Umsetzungsgrad von unreaktiertem TCP zu Brushit zu steigern. Anschließend wurden die Prüfkörper für mindestens 24 h auf einer saugfähigen Unterlage bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.3.3 Waschen der Prüfkörper, PBS-Puffer**

Nachdem die Prüfkörper mit 20%iger Phosphorsäure nachgehärtet wurden, wurden sie mit sterilem Reinstwasser und PBS, eines Phosphatsalzpuffers, gewaschen um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu erzielen. Zur Prüfung des pH-Wertes wurden pH-Sticks (Firma A. Hartenstein) verwendet. Die hergestellten Prüfkörper wurden für den Waschvorgang in eine sterile Glasschale eingelegt. Der komplette Vorgang wurde auf einem Schüttler durchgeführt. Die Prüfkörper wurden eine Woche lang jeden Tag insgesamt elfmal mit sterilem Reinstwasser gewaschen. In der 2. Woche wurden die

Prüfkörper 9-mal pro Tag mit sterilem PBS gewaschen. In der dritten Woche wurde der pH-Wert letztendlich mit pH-Fix-Sticks der Firma A. Hartenstein (Machery-Nagel) bestimmt. Die von den pH-Testpapieren verwendeten Indikatorstoffe ließen den pH-Wert durch eine hervorgerufene Farbreaktion schnell und einfach auf einen von uns gewünschten pH-Wert von 7 bestimmen. Danach wurden die Prüfkörper mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Dazu wurden die Prüfkörper von jeder Seite 30 min. in Ethanol eingelegt. Danach wurden die Prüfkörper in eine neue sterile Glasschale gelegt und 4 Stunden getrocknet.

### **3.4 Patienten und Untersuchungsmaterial**

Für die vorliegende Arbeit wurden adulte mesenchymale Stammzellen verwendet. Diese wurden im Rahmen von endoprothetischer Versorgung des Hüftgelenks im Zeitraum 1.1.2011-30.3.2011 aus dem Hüftkopf von Patienten in der orthopädischen Klinik des König-Ludwig-Hauses in Würzburg isoliert. Dafür wurde Knochenmark (KM) aus dem Hüftkopf von Spendern unterschiedlichen Alters und Geschlechts entnommen. Das Material wurde in 50 ml Röhren überführt und 20 ml Medium dazu gegeben (DMEM/ Ham's 12, GIBCO). Danach erfolgte die standardmäßige Dichtegradientenzentrifugation bei 1200 U/min für 5 min. Das Medium wurde danach abgesaugt und wieder neues frisches Medium dazu gegeben. Danach wurde das Röhren mit dem Inhalt mehrfach invertiert und die entstehende Zellsuspension in ein neues Röhren überführt. Nach Wiederholung des Waschvorganges wurden die Zellen resuspendiert und gezählt. Es wurden  $100 \times 10^6$  Zellen/175cm<sup>2</sup> Flasche in dem Kulturmedium DMEM/Ham's 12+ 1xPen/Strep + 10%FCS + 50 µg/ml L-Ascorbinsäure 2-Phosphat ausgesät. In diesem Stadium wurden die Zellen für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 3-4 Tagen. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen (nicht adhärente Zellen wurden entfernt). Anschließend wurde das Medium 2x pro Woche gewechselt.

### **3.5 Zellkulturbedingungen**

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurden in entsprechenden Kulturflaschen in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Kultivierung wurden hMSC in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingesetzt. Der Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage statt, wobei das alte Medium mit sterilen Pipetten abgesaugt und durch Neues ersetzt wurde. Zur Kultivierung wurde das Standardkulturmedium „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM/F12) mit 10% fötalem Kälberserum und den Antibiotika Penicillin/Streptomycin (1000 UE/1000µg/ml) verwendet. Zur Passage wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50 % nach Absaugen des Kulturmediums 1 x mit PBS gewaschen und dann durch Zugabe von Acutase Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS durch vorsichtiges Resuspendieren gewaschen und anschließend in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen entsprechend ausgesät und weiter kultiviert. Während der Zellkultur wurde eine Zelldichte von 50% in den Kulturflaschen der hMSC und hFOB nie überschritten. Sämtliche Arbeiten mit allen Zelllinien erfolgten in einer sterilen Arbeitsbank, die über einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom verfügte. hMSC wurden nur bis zur 1. Passage kultiviert. Während der Experimente wurden die Zellen auf Polyesterol (PS), Glas (Gl) und Bruschit kultiviert und für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)-, IF- und Westernblot (WB)-Versuche verwendet.

### **3.6 Immunfluoreszenz**

#### **3.6.1 Zellzählung**

Die Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit dem „CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System“, Modell TTC (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland). Zur Messung gab man 100 µl Zellen, die in Nährmedium gut resuspendiert wurden, in ein Zählröhrchen mit vorgelegten 10 ml Isoton. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Messung durchgeführt.

### **3.6.2 Versuchsdurchführung**

Stammkulturen der hMSCs wurden mit Acutase für 12 min. bei 37 °C inkubiert und die abgelösten Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Für die IF wurden die abgelösten Zellen auf Deckgläschen und Scaffolds, die sich in 24 Well- Kulturplatten befanden, in einer Konzentration von 100.000 Zellen/Well eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> 10 Tage lang inkubiert. Nach Kontrolle der Adhärenz mittels Mikroskop wurde das Medium in den Kulturschalen gewechselt und die Zellen für weitere 10 Tage bis zur gewünschten Zelldichte unter oben genannten Zellkulturbedingungen gezüchtet. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

#### **3.6.2.1 Ansetzen der Versuche**

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden hMSC aus Stammkulturen wie in 3.6.2. beschrieben entnommen und auf Glasplättchen und Scaffolds ausgesät. Diese wurden für mindestens 5 Tage kultiviert. Für die IF Versuche wurden die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen und Scaffolds entweder einmal mit vascular endothelial growth factor (VEGF) (VEGF 20 ng/ml + 0,6 ng/ml bFGF) Passage 0 bzw. Passage 1 oder 1,6 ng/ml BMP 2 (100 nM Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 10  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure), ebenso Passage 0 und Passage 1, behandelt. Im Anschluss daran wurden die behandelten Zellen für mindestens 5 Tage bei 37 °C weiter kultiviert um eine Wiederaufnahme des Zellstoffwechsels zu gewährleisten. Die Adhärenz der Zellen wurde stetig unter dem Mikroskop kontrolliert.

### **3.6.3 Fixierung der Zellen**

Zur Vorbereitung der Immufluoreszenzanalyse wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturwells entfernt und die Präparate mittels einer Pinzette in speziell dafür vorgesehenen Trägern angeordnet. Um eine Austrocknung zu vermeiden, lagerten die Träger, sowie die Prüfkörper in PBS. Die Prüfkörper wurden mit PBS gewaschen und dann bei -20°C für 10 min. in Methanol und danach in Aceton für weitere 4 min. bei -20°C fixiert und entwässert. Danach wurden die Proben für 30 min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

### **3.6.4 Inkubation mit dem 1. Antikörper**

Die primären Antikörper (AK) gegen Osteocalcin (OC) und platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) wurden in Absättigungslösung verdünnt (anti-PECAM: 1:100/anti OC: 1:500). Die Präparate wurden mit den fixierten Zellen mit der Zellseite nach oben in eine feuchte Kammer gelegt. Anschließend wurden jeweils 80 µl der AK-Lösung auf die Präparate pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 30 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate 3-mal für 5 min. in PBS gewaschen.

### **3.6.5 Inkubation mit dem 2. Antikörper**

Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte AK Cy2 anti mouse wurde in PBS verdünnt (1:75). Dann wurden 80 µl der Lösung auf die Präparate in der feuchten Kammer pipettiert. Nach 20 min. wurden jeweils 2 Tropfen des DNA Farbstoffes Hoechst 33258 pro Präparat dazu gegeben und für 7 min. inkubiert. Anschließend wurde wiederum 3 mal 5 min. mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden mit 96 % Ethanol eine min. entwässert und dann zum Trocknen (30 min) bei Raumtemperatur mit der Zellseite nach oben auf Filterpapier gelegt.

### **3.6.6 Einbettung**

Die Präparate werden mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt auf den zuvor ein Tropfen Mowiol<sup>®</sup> (siehe 3.2) gebracht wurde. Bei den Probenplättchen wurde ein Tropfen Mowiol auf die Zellen gebracht und ein frisches Deckglas darauf gelegt. Die Scaffolds wurden mit der Zellseite nach oben mittels Mowiol auf den Objektträger fixiert. Anschließend wurde die Expression von PECAM (CD 31) bzw. OC über Immunfluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Axiolab, HBO 50/AC) detektiert.

## **3.7 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

### **3.7.1 Ansetzen der Zellkulturen**

Zum Nachweis der zellspezifischen Proteinexpression wurden hMSC in den Passagen 0 oder 1 durch Zusatz der Differenzierungsfaktoren VEGF (VEGF 32 ng/ml + 2,5 ng/ml bFGF) oder BMP 2 (1,6 ng/ml BMP 2+100 nM Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 10 $\mu$ g/ml Ascorbinsäure) angiogen oder osteogen differenziert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und auf Glasplättchen und Scaffolds kultiviert. Die Scaffolds waren rund und in der Mitte mit einer Sollbruchstelle versehen. In 6 Wellplatten wurden 15 Scaffolds eingelegt. Fünf Wells blieben als unbehandelte Kontrolle leer. Fünf weitere Scaffolds dienten als weitere Kontrollen, die nicht mit Faktoren behandelt wurden. Je fünf weitere Scaffolds wurden mit entsprechenden Faktoren (BMP 2  $\mu$ g/ml bzw. VEGF 10  $\mu$ g/ml Stammlösung) behandelt, die jeweils auf einer Hälfte der Prüfkörper pipettiert wurden. Zur besseren Haftung der Zellen auf die Scaffolds wurde noch Gelatine (0,5%) in die Wells pipettiert. Die Gelatine wurde dazu in sterilem H<sub>2</sub>O reinst angesetzt und in die Wells pipettiert und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Gelatine wurden die verschiedenen Faktoren (Endkonzentration: siehe Methodenteil), welche zuvor in Wachstumsmedium gelöst wurden, in 50 $\mu$ l auf die Scaffolds gegeben. Danach wurden die MSC dazu pipettiert und in DMEM F12 Medium (Gibco), 1% Pen Strep und 10% fetales Kälberserum (FCS) kultiviert. Für das Experiment wurden auf die Prüfkörper 105.000

Zellen/ml pipettiert, in die Wells ohne Prüfkörper wurden 48.000 Zellen/ml pipettiert. Der Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt.

### **3.7.2 Aufarbeiten der Proben für SDS Page und Westernblot**

Nach Versuchsende wurden die 6 Well- Platten mit den Proben mittels PBS gewaschen. Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Bei den Zellkulturwells ohne Prüfkörper wurde PBS abgesaugt und 1 ml Probenpuffer (Lösung 9, s.o.) dazu gegeben. Die Zellen wurden dann mit dem Zellschaber abgelöst und in ein Röhrchen pipettiert. Um dabei nicht abgelöste Zellen zu ernten, wurde dieser Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Die unbehandelten Calciumphosphat (CaP) Kontrollen wurden als Ganzes belassen und wurden in 0,6 ml Probenpuffer abgeschabt. Auch dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die VEGF bzw. BMP 2 behandelten Oberflächen wurden getrennt und wie oben, mittels Zellschaber, in Probenpuffer abgeschabt. Auch dieser Vorgang wurde wiederholt. Die Proteine wurden anschließend in 6 Volumina eiskaltem Aceton über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Nach Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C, 15 min) wurden die ausgefallenen Proteine pelletiert und das Aceton im Überstand abgenommen und nach Trocknen des Pellets 0,15 ml Lösung 9 (Probenpuffer ) dazu gegeben. Die Proben wurden dann resuspendiert und 5 min. lang bei 95 °C auf einem Heizblock gekocht. Für die SDS Gele wurden 40-70 µl der Proteinproben eingesetzt.

## **3.8 Polyacrylamid- Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteingemischen**

### **3.8.1 Versuchsdurchführung**

Nach dem Zusammenbau der Glasplatten (Abstandshalter, Halteklammern) wurden die Ränder zwischen den Glasplatten und den Abstandhaltern mit heißer Agarose abgedichtet. Dann wurde das Trenngel (12 % Acrylamid) gegossen. Dazu wurden 4 ml der Lösung 1, 2,5 ml der Lösung 3, 3,4 ml H<sub>2</sub>O reinst, 100 µl der Lösung 5 (APS) und 5 µl TEMED zusammen pipettiert. Die Gellösung wurde in die Glasplattenapparatur eingefüllt und mit Wasser überschichtet um Luftblasenbildung auf der Oberfläche des Gels zu vermeiden. In der Regel war das Gel nach 20 min. auspolymerisiert. Zur Herstellung des Sammelgels wurden folgende Lösungen zusammen pipettiert: 650 µl

der Lösung 2, 1,25 ml der Lösung 4, 3,1 ml H<sub>2</sub>O reinst, 150 µl der Lösung 5 (APS) und 5 µl TEMED. Nachdem das Wasser vom Trenngel entfernt wurde, wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben und der Probenkamm vorsichtig luftblasenfrei in das frisch gegossene Sammelgel gesteckt. Das Gel war nach 20 min. auspolymerisiert. Die Proteinprobe, sowie der Proteinmarker wurde in einer entsprechenden Menge Probenpuffer (Lösung 9) aufgenommen und 5 min. bei 95 °C im Heizblock gekocht. In gleicher Weise wurden die Proteinmarker in Probenpuffer aufgenommen und ebenfalls bei 95 °C gekocht. Die Gele wurden in die Gelkammer gegeben und die Kammern wurden mit Lösung 6 befüllt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden kurz abzentrifugiert und gemäß Beladungsschema in die Probenaschen des Sammelgels pipettiert. Die Gelkammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen und mit 80 mA für ca. 45-60 min. betrieben. Nach Beendigung des Laufes wurde die Gelkammer abgebaut, die Glasplatten getrennt und Sammelgel vom Trenngel abgelöst. Das Trenngel wurde danach für 1-2 h in Coomassie Blue- Lösung gefärbt oder für den WB in Graphitblotpuffer 3 gelegt. Zum Entfärben wurde das Gel in Lösung 8 gelegt und die Lösung mehrmals gewechselt. Das Gel wurde danach zwischen Cellophanfolie gelegt und getrocknet.

### **3.9 Durchführung des Westernblots**

#### **3.9.1 Versuchsdurchführung**

Das Gel wurde nach der Proteingelelektrophorese für 15 min. in Graphitblotpuffer 3 eingelegt. Für den WB wurden 18 Blatt Whatman Papier und ein Blatt Nitrocellulose in Gelgröße zugeschnitten. Zum Stapelaufbau wurden 2x3 Blatt Whatman Filter in Graphitblotpuffer 2 getränkt und auf die untere Platte der Blot-Apparatur gelegt. Weitere 3 Blatt Whatmanpapier wurden in Graphitblotpuffer 1 getränkt und aufgelegt. Anschließend wurde Nitrozellulose in Graphitblotpuffer 1 getränkt und sorgfältig ohne Rollen auf den Whatmanpapierstapel gelegt. Dann wurde das Polyacrylamidgel auf das Nitrocellulosepapier gelegt. Zur Orientierung wurde die rechte untere Ecke des Geles und des Nitrocellulosepapiers abgeschnitten. Dann wurden 3 mal jeweils 3 Blatt Whatmanpapier in Graphitblotpuffer 3 getränkt und aufgelegt. Nach jedem 3-er Stapel

wurde der Papierstapel glatt gerollt. Die obere Graphitplatte der Blotkammer wurde aufgelegt. Die Blotkammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen. Die Apparatur wurde mit 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Nitrocellulose betrieben (ca. 80 mA für 2 Gele). Die Blottingzeit betrug 90 min. Danach wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für 2 min. in Ponceau S eingelegt und hiernach mit Reinstwasser abgespült. Die angefärbten Markerbanden wurden abgetrennt und getrocknet. Zum Entfärben wurden die Probenspuren abhängig von den AK in TBS oder TBST 10 min. lang gewaschen. Dann wurde Absättigungslösung (TBST, 1% BSA und 1% Tween 20) auf die Nitrocellulosemembran gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Für die Inkubation mit dem ersten AK wurde die Nitrocellulose in Haushaltsschweißfolie an drei Seiten eingeschweißt und dann 1-5 ml der AK-Lösung entsprechend der Antikörperverdünnung in die offene Seite pipettiert. Nachdem Luftblasen entfernt wurden, wurde die vierte Seite ebenfalls verschweißt und dann die Nitrozellulose 1,5 h bei Raumtemperatur mit der AK-Lösung inkubiert. Danach wurde die Folie aufgeschnitten, die Nitrocellulosemembran entnommen und 3 mal 10 min. lang mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten AK (anti Maus biotin, 1:5000 verdünnt) wurde im Anschluss für 1h durchgeführt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBST (10 min). Zur Analyse des Blottes wurde Q dot Streptavidin hinzugefügt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 mal 10 min. TBST) erfolgte die Analyse des Blottes mit dem Programm Bio Doc. Analysesystem (Fa. UVP Cambridge, UK)

### **3.10 Rasterelektronenmikroskopie**

#### **3.10.1 Ansetzen der Zellkulturen**

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden hMSC der Passage 0 bzw. Passage1 durch Zusatz von den Differenzierungsfaktoren VEGF (VEGF 20 ng/ml + 0,6 ng/ml bFGF) oder BMP 2 (1,6 ng/ml BMP 2+100 nM Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 10  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure) angiogen oder osteogen differenziert. Anschließend wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gelöst und auf Glasplättchen und auf Scaffolds unter den oben beschriebenen Bedingungen mit Differenzierungsfaktoren weiter kultiviert. Um

sowohl Zellwachstum als auch Zellmorphologie zu visualisieren wurden die Oberflächen der zelltragenden Scaffolds und Glasplättchen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die zelltragenden Präparate wurden aus den Well-Platten in kleine Schnappdeckelgläschen überführt und 4-mal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Proben mit kaltem Glutaraldehyd (6 % in PBS, 4 °C, 15 min) fixiert. Danach wurden die Plättchen nacheinander zunächst 5-mal für je 5 min. in PBS auf Eis gewaschen. Anschließend wurden die Präparate bei Raumtemperatur über eine aufsteigende Aceton-Reihe (30 %, 50 %, 75 %, 90 % und fünf mal 100 %) dehydriert. Dazu wurden die Proben 15 min. in 30 % Aceton, 20 min. in 50 % Aceton, 30 min. in 75 % Aceton, 45 min. in 90 % Aceton eingelegt. Zur vollständigen Entwässerung wurden die Proben 5-mal für 30 min. in 100 % Aceton, ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Bei allen Schritten war darauf zu achten, dass die Präparate nicht austrocknen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei Raumtemperatur in 100 % Aceton gelagert. Als nächstes erfolgte die Kritisch-Punkt- Trocknung.

### **3.10.2 Kritisch-Punkt-Trocknung**

Die entwässerten Proben wurden in eine mit Aceton gefüllte Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners, Fa. BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein, gegeben. Hier wurde unter Druck das gesamte Aceton bei 8 °C gegen flüssiges CO<sub>2</sub> ausgetauscht. Im Anschluss wurden die Proben auf 40-42 °C erhitzt um zu gewährleisten, dass das Kohlenstoffdioxid in die Gasphase übergeht. Danach wurde das gasförmige CO<sub>2</sub> langsam abgelassen. Die getrockneten Proben wurden mit leitfähigen beidseits klebenden Plättchen auf REM-Trägertischchen (Fa. Provac, Oestrich-Winkel) befestigt. Anschließend wurden diese für 4-6 min. mit Gold bedampft (Gold-Sputter-Coater K 550, (EMITEC, Ashford, England))

### **3.11 Rasterelektronenmikroskopie**

Die für die REM präparierten Proben wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (Zeiss Digital Scanning Microscope 940, Oberkochen) im Bereich von 10-100 µm aufgenommen und durch Photographie belegt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Immunfluoreszenz**

Um die angiogene und osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) auf unterschiedlichen Substraten zu untersuchen, wurden differenzierungsspezifische Markerproteine mittels Immunfluoreszenz (IF) untersucht. Als Indikator für die Angiogenese wurden Antikörper (AK) eingesetzt, die gegen das Oberflächenprotein PECAM/CD 31 gerichtet waren.

PECAM ist ein 130 kD Glyco-Transmembranprotein, das zur Familie der Zelladhäsionsproteine gehört. PECAM wird besonders auf frühen und differenzierten Endothelzellen, aber auch auf Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten stark exprimiert. Es sitzt bei den Endothelzellen an den interzellulären Zellverbindungen und ist sowohl bei der Bildung neuer Blutgefäße aber auch z.B. an der Steuerung der Leukozytentransmigration beteiligt [189–191].

Um die osteogene Differenzierung zeigen zu können, wurden Antikörper gegen Osteocalcin (OC), das häufigste nicht-kollagene Protein der extrazellulären Knochenmatrix eingesetzt.

OC wird nur von Osteoblasten synthetisiert und kann daher zur Beurteilung der Aktivität der Knochenneubildung herangezogen werden. Es ist ein Peptidhormon, bestehend aus 49 Aminosäuren (5.8 kDa) und seine Synthese kann durch Calcitriol (Vitamin 1,25 Dihydroxy-Vitamin-D) beeinflusst werden. Nach Stimulation mit Calcitriol wird OC sekretiert und in die Skelettmatrix inkorporiert. Ein Teil des neusynthetisierten OC wird in die Zirkulation frei gesetzt, wo es immunchemisch bestimmt werden kann und als Marker der Knochenbildung Verwendung findet [192, 193].

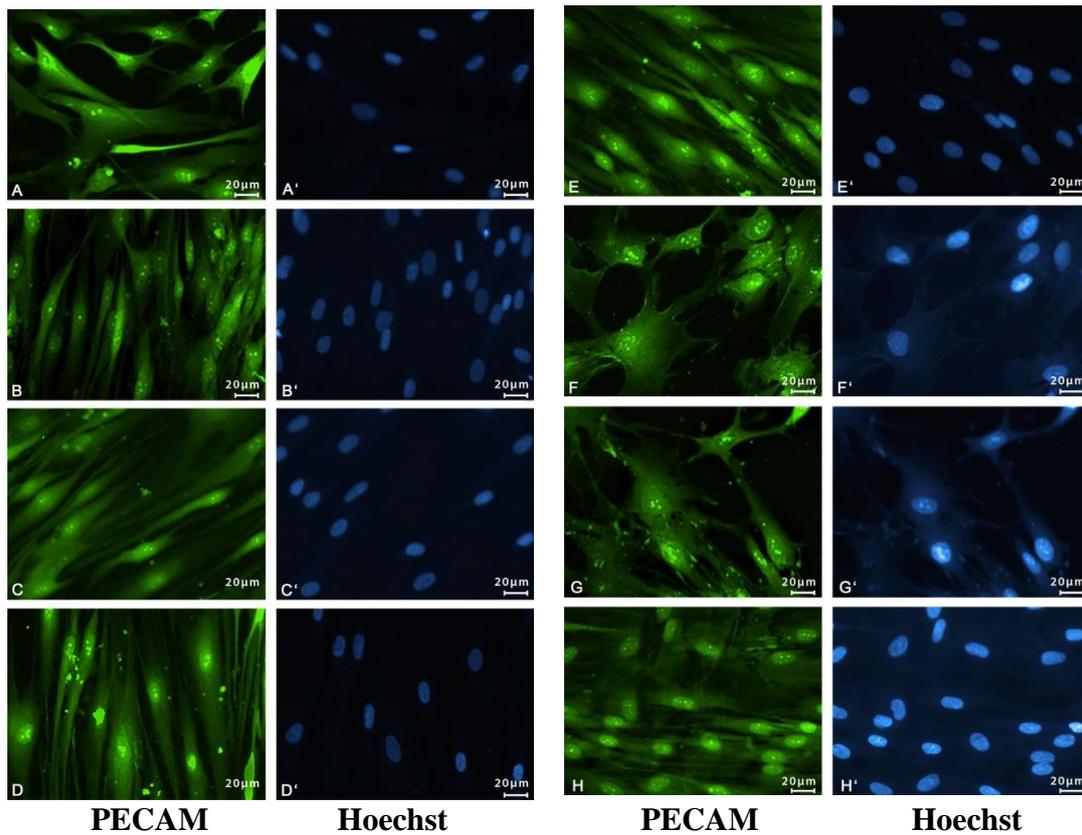
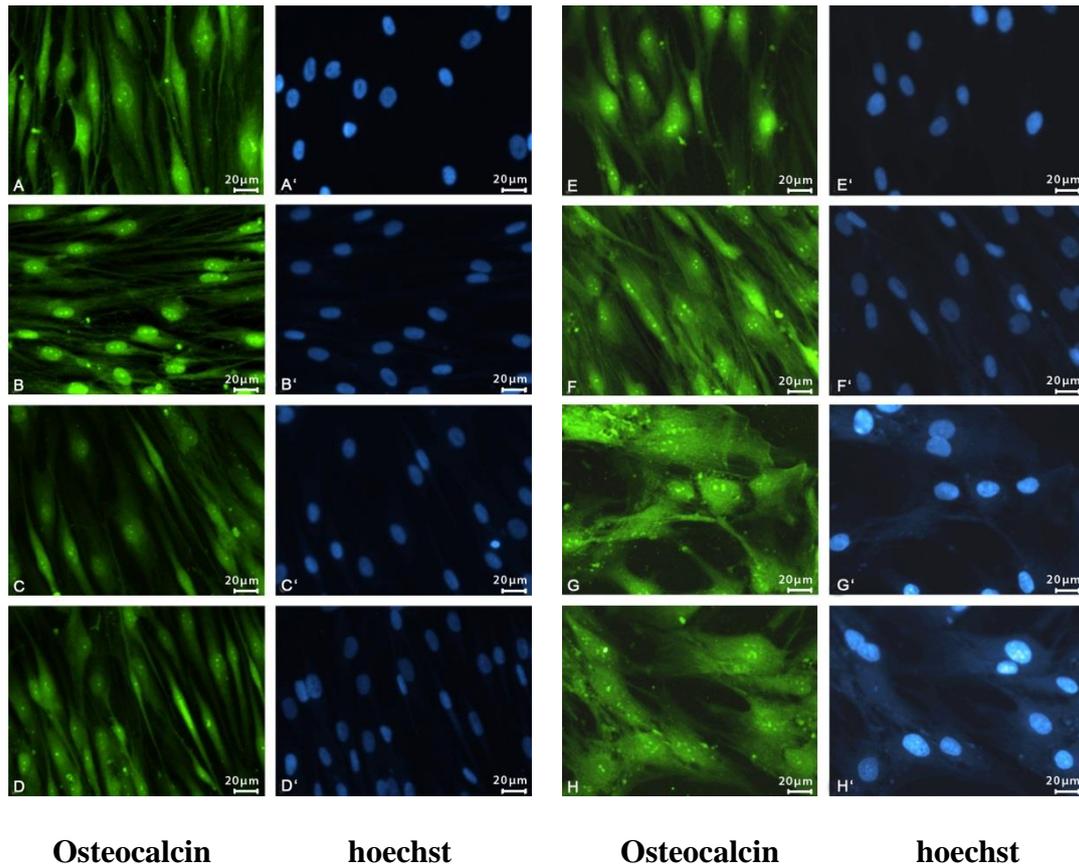


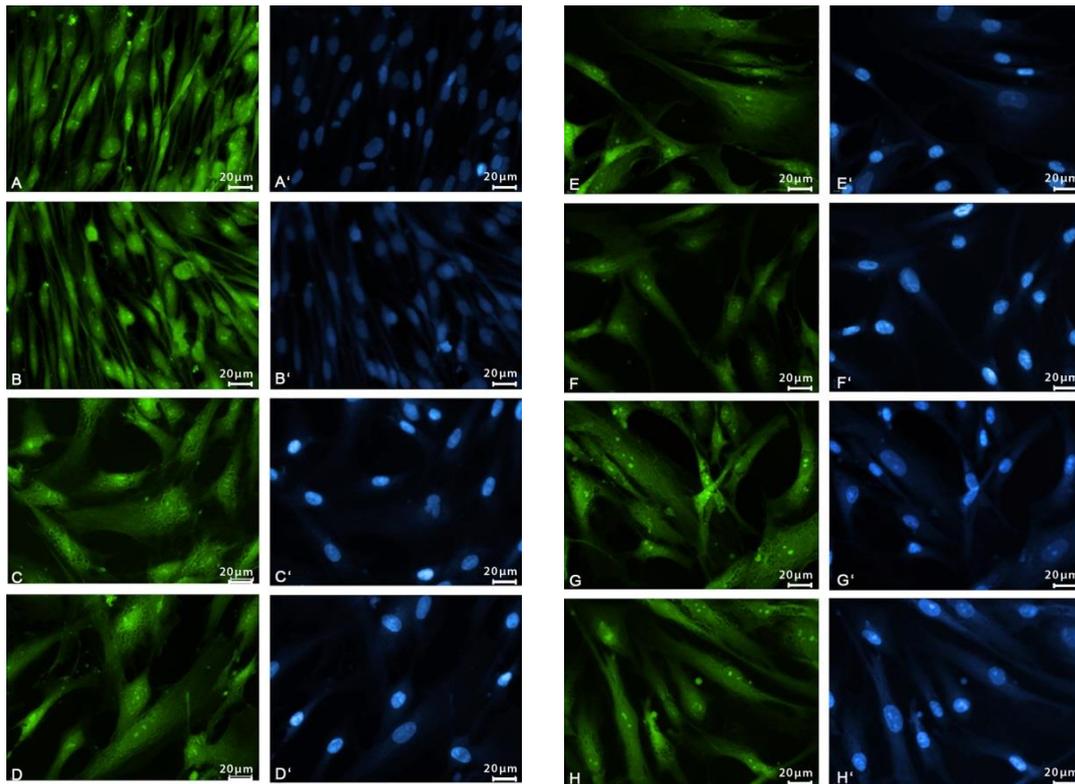
Abbildung 8: IF-Bilder von hMSC

*Fluoreszenzmikroskopische Detektion der PECAM Expression auf hMSC, die in Gegenwart von BMP 2 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) auf Glasplättchen kultiviert wurden. Die Darstellungen sind verschiedene representative Aufnahmen aus einem Experiment. Die abgebildeten Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie. In allen Zellen konnte PECAM mittels spezifischem AK detektiert werden (A-H). Die Abbildungen A'-H' zeigen die korrespondierenden Zellkerne nach Hoechst (33258)-Färbung. Es handelt sich hierbei um representative Bilder die aus unterschiedlichen Experimenten stammten. Die Balkenlänge im unteren rechten Teil des Bildes beträgt 20  $\mu\text{m}$ .*



*Abbildung 9: IF-Bilder von hMSC*

*Fluoreszenzmikroskopische Detektion der Osteocalcin Expression auf hMSC, die in Gegenwart von BMP 2 (10 µg/ml) auf Glasplättchen kultiviert wurden. Die Darstellungen sind verschiedene representative Aufnahmen aus einem Experiment. Die abgebildeten Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie. In allen Zellen konnte Osteocalcin mittels spezifischem AK detektiert werden (A-H). Die Abbildungen A'-H' zeigen die korrespondierenden Zellkerne nach Hoechst (33258)-Färbung. Es handelt sich hierbei um representative Bilder die aus unterschiedlichen Experimenten stammen. Die Balkenlänge im unteren rechten Teil des Bildes beträgt 20µm.*



**PECAM**

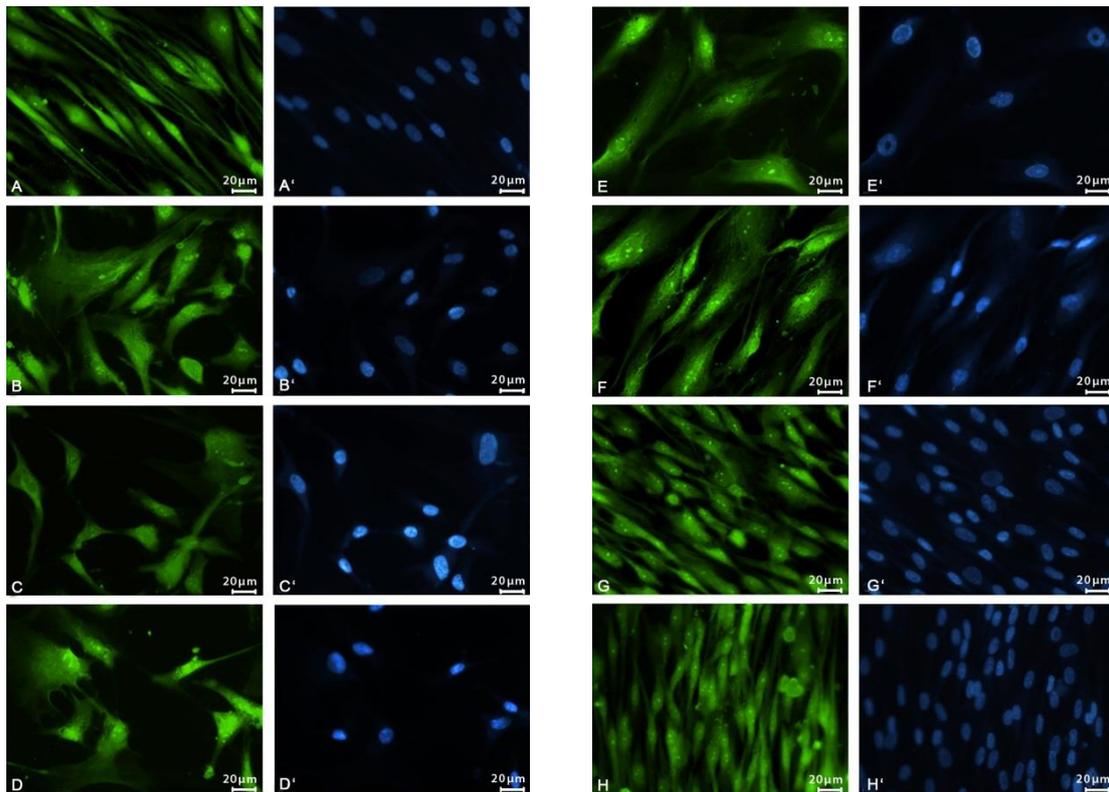
**hoechst**

**PECAM**

**hoechst**

*Abbildung 10: IF-Bilder von hMSC*

*Fluoreszenzmikroskopische Detektion der PECAM Expression auf hMSC, die in Gegenwart von VEGF (10  $\mu\text{g/ml}$ ) auf Glasplättchen kultiviert wurden. Die Darstellungen sind verschiedene representative Aufnahmen aus einem Experiment. Die abgebildeten Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie. In allen Zellen konnte PECAM mittels spezifischem AK detektiert werden (A-H). Die Abbildungen A'-H' zeigen die korrespondierenden Zellkerne nach Hoechst (33258)-Färbung. Es handelt sich hierbei um representative Bilder die aus unterschiedlichen Experimenten stammten. Die Balkenlänge im unteren rechten Teil des Bildes beträgt 20 $\mu\text{m}$ .*



**Osteocalcin**

**hoechst**

**Osteocalcin**

**hoechst**

*Abbildung 11: IF-Bilder von hMSC*

*Fluoreszenzmikroskopische Detektion der Osteocalcin Expression auf hMSC, die in Gegenwart von VEGF (10 µg/ml) auf Glasplättchen kultiviert wurden. Die Darstellungen sind verschiedene representative Aufnahmen aus einem Experiment. Die abgebildeten Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie. In allen Zellen konnte Osteocalcin mittels spezifischem AK detektiert werden (A-H). Die Abbildungen A'-H' zeigen die korrespondierenden Zellkerne nach Hoechst (33258)-Färbung. Es handelt sich hierbei um representative Bilder die aus unterschiedlichen Experimenten stammten. Die Balkenlänge im unteren rechten Teil des Bildes beträgt 20µm.*

Um den Effekt von bone morphogenetic protein (BMP 2) und vascular endothelial growth factor (VEGF) auf die Zellmorphologie von osteogen und angiogen differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zu untersuchen, wurden die Zellen auf Glasplättchen und Scaffolds jeweils in Gegenwart von BMP 2 und/oder VEGF mindestens 5 Tage lang kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit AK, die PECAM oder OC erkennen sowie sekundärem Fluorophor gekoppelten AK mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die subkonfluenten adhären Zellen (siehe Abb. 8-11) zeigten nach Behandlung sowohl mit BMP 2 als auch mit VEGF größtenteils eine flächige und verzweigte Form. Des Weiteren ist auch eine spindelförmige bipolare Morphologie ohne prominente Zellfortsätze sichtbar. PECAM (CD31), auch als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül bekannt, welches an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird und an der Steuerung der Leukozytentransmigration beteiligt ist [190, 191], zeigt eine eindeutige Expression in allen Gruppen (siehe Abb. 8-11). PECAM 1 ist zudem Hauptbestandteil der interzellulären Verbindungen zwischen Endothelzellen [191]. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Intensität der Färbung zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das Peptidhormon OC, ein Teil der extrazellulären, nicht kollagenen Knochenmatrix und ein Marker der Osteoblastenaktivität und somit der Knochenneubildung [192], wird durch die Behandlung mit den Wachstumsfaktoren induziert und kann durch die IF eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 8-11). Wie im Falle von PECAM konnten keine Unterschiede bezüglich der Intensität der Färbung zwischen den Gruppen festgestellt werden. Der Nachweis der Proteine war unabhängig von der Zelldichte. Abb. 12 zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen von hMSC, die in Gegenwart von VEGF/BMP 2 auf Bruskit kultiviert wurden. Wie bei den Glas Plättchen wurden zur Detektion der spezifischen Oberflächen-Antigene zu den kultivierten hMSC Antikörper gegen PECAM und OC dazugegeben. Allerdings sind, wie in den Abbildungen zu sehen, keine spezifischen Zellphänotypen nachzuweisen.

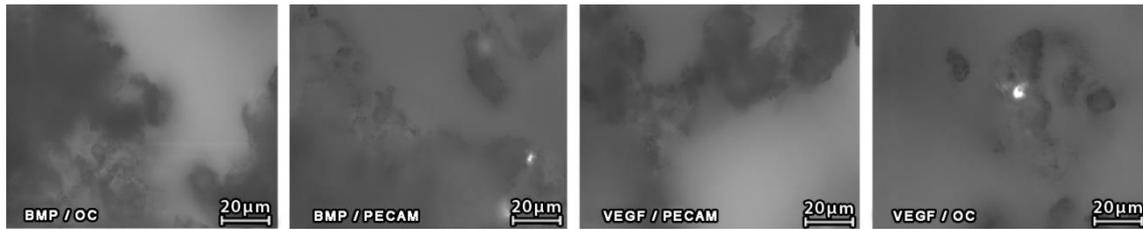


Abbildung 12: IF-Bilder von Bruschit

Fluoreszenzmikroskop-Bilder von hMSC auf Bruschit-Oberflächen. Es handelt sich hierbei um representative Bilder, die aus unterschiedlichen Experimenten stammten. Zu erkennen sind die für Bruschit typischen tafelförmigen Ausprägungen. Die Balkenlänge im unteren rechten Teil des Bildes beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Westernblot

Zur Analyse der Effekte von BMP 2 und VEGF auf die Proteinexpression wurden hMSC auf Polystyrol (PS), Bruschit oder auf Bruschit in Gegenwart von BMP 2 oder VEGF kultiviert. Dabei wurde die eine Hälfte des Bruschitplättchens mit BMP 2 und die andere Hälfte mit VEGF beladen. Allerdings wurde der mit den Wachstumsfaktoren behandelte Prüfkörper in einem Well in Kulturmedium inkubiert. Ein Vermischen der Wachstumsfaktoren kann daher nicht ausgeschlossen werden. Im Anschluss daran wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression mittels verschiedenen AK durch die Westernblotmethode analysiert.

Zur Normalisierung wurde als Proteinstandard Tubulin detektiert, ein Bestandteil der Mikrotubuli, die Teil des Zytoskeletts sind. Die osteogenen Marker konnten in allen Zelllysaten gut detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass Stammzellen die auf Bruschit kultiviert wurden, verstärkt sowohl den endothelialen Marker PECAM, als auch die Osteoblastenmarker alkalische Phosphatase (ALP) und OC (Abb. 13) exprimierten. Im Gegensatz dazu, zeigten die Zellen, die auf PS kultiviert wurden, bezogen auf die untersuchten Proteine, eine deutlich geringere Proteinexpression. Normalisierung der Proteinbildung bezüglich Tubulin zeigte, dass die Zugabe von VEGF oder BMP eine Reduktion der Expression der Markerproteine bewirkte. Im Gegensatz dazu blieb die Behandlung der auf PS gewachsenen Zellen mit den Faktoren ohne Auswirkungen (Abb. 13). Außerdem zeigte die auf Tubulin bezogene Normalisierung, dass von den drei osteogenen Markern besonders OC am stärksten induziert wird. Die Steigerung der

Expression ist bei OC größer als bei ALP. Am geringsten ist die Expression bei PECAM gesteigert (Abb. 13).

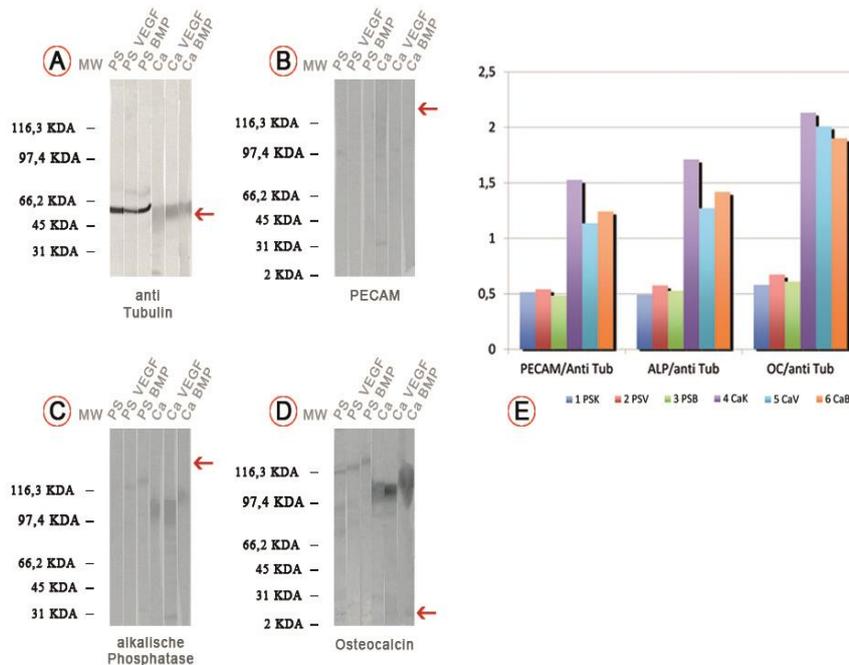


Abbildung 13: Immunblot von hMSC

anti-Tubulin (A), anti-PECAM (B), anti-alkalische Phosphatase (C), anti-Osteocalcin (D). Immunblot von hMSC, die in Gegenwart von VEGF oder BMP 2, entweder auf Polystyrol (PS)(VEGF=PSV/BMP2=PSB) oder Bruschit (Ca) kultiviert wurden (24 h). Auf die linke Hälfte des Prüfkörpers wurde BMP2 pipettiert (CaB), auf die rechten Seite VEGF (CaV). Die Marker werden durch Pfeile markiert. (E) Normalisierung der Marker bezüglich Tubulin. Im linken Bildteil befinden sich representative Westernblotoriginale.

Abbildung 14 die Proteinexpression von hMSC, die auf Bruschitplättchen kultiviert wurden. Dabei handelt es sich um eine Wiederholung des in Abbildung 13 beschriebenen Versuches. Wie auch bei Abb. 13 aufgeführt, wurde die eine Hälfte des Bruschitplättchens mit VEGF und die andere Hälfte mit BMP 2 beladen. Da das gesamte Plättchen im Medium in Gegenwart von hMSC inkubiert wurde, kann eine Vermischung der Wachstumsfaktoren durch Diffusion nicht ausgeschlossen werden. Als Kontrolle dienten Zellen die auf PS und unbehandeltem Bruschit kultiviert wurden. Nach Inkubationsende wurden die mit den Wachstumsfaktoren behandelten Plättchen geteilt, jeweils die Zellen lysiert und durch Westernblot (WB) analysiert. Dabei zeigte sich, dass alle Marker gut detektiert werden konnten. Normalisierung bezüglich Tubulin zeigte, dass die osteogenen Differenzierungsmarker bereits deutlich in den Zellen induziert worden sind, die ohne Wachstumsfaktorbehandlung auf den Bruschit-Proben kultiviert wurden. Die Behandlung mit den Wachstumsfaktoren BMP 2 und VEGF führte allerdings zu keiner weiteren Steigerung der Synthese der Differenzierungsmarker im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen war die Expression der Markerproteine nach Wachstumsfaktorenbehandlung sogar leicht reduziert. Ausserdem waren keine Unterschiede zwischen den mit BMP 2 bzw VEGF behandelten Bruschithälften zu beobachten. Unter den gemessenen Differenzierungsmarkern waren ALP und OC am deutlichsten erhöht.

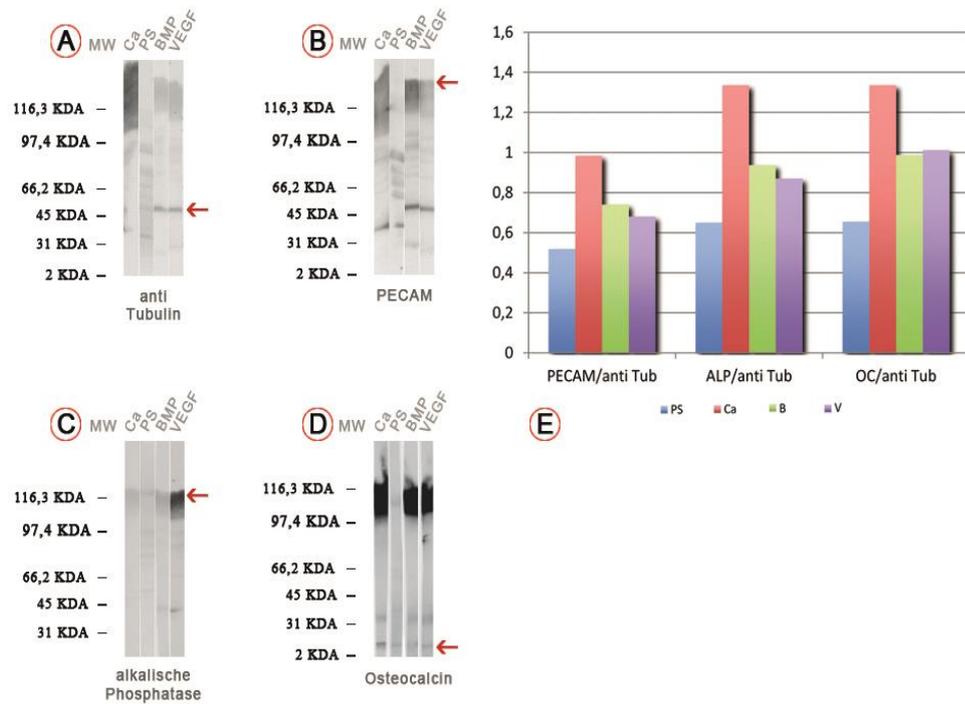


Abbildung 14: Immunblot von hMSC

anti-Tubulin (A), anti-PECAM (B), anti-alkalische Phosphatase (C), anti-Osteocalcin (D). Immunblot von hMSC, die in Gegenwart von VEGF oder BMP 2 entweder auf Polystyrol (PS) oder Bruschit (Ca) kultiviert wurden (48 h). Auf die linke Hälfte des Prüfkörpers wurde BMP2 pipettiert (B), auf die rechte Seite VEGF (V). Die Marker werden durch Pfeile markiert. (E) Normalisierter Mittelwert aus Einzelexperimenten der Marker bezüglich Tubulin. Im linken Bildteil befinden sich representative Westernblot-Originale.

### 4.3 Rasterelektronenmikroskopie

Um Unterschiede in der Morphologie aufgrund der Differenzierung der hMSC im Detail aufzuklären, die mit normaler Lichtmikroskopie nicht aufgelöst werden können, wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) eingesetzt. Die Zellen wurden entweder auf Glasplättchen oder Bruschit in Gegenwart von BMP 2 (mit Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat) oder VEGF (mit bFGF) kultiviert. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, dehydriert und mit Gold bedampft und mittels REM im Bereich von 10-100  $\mu\text{m}$  analysiert.

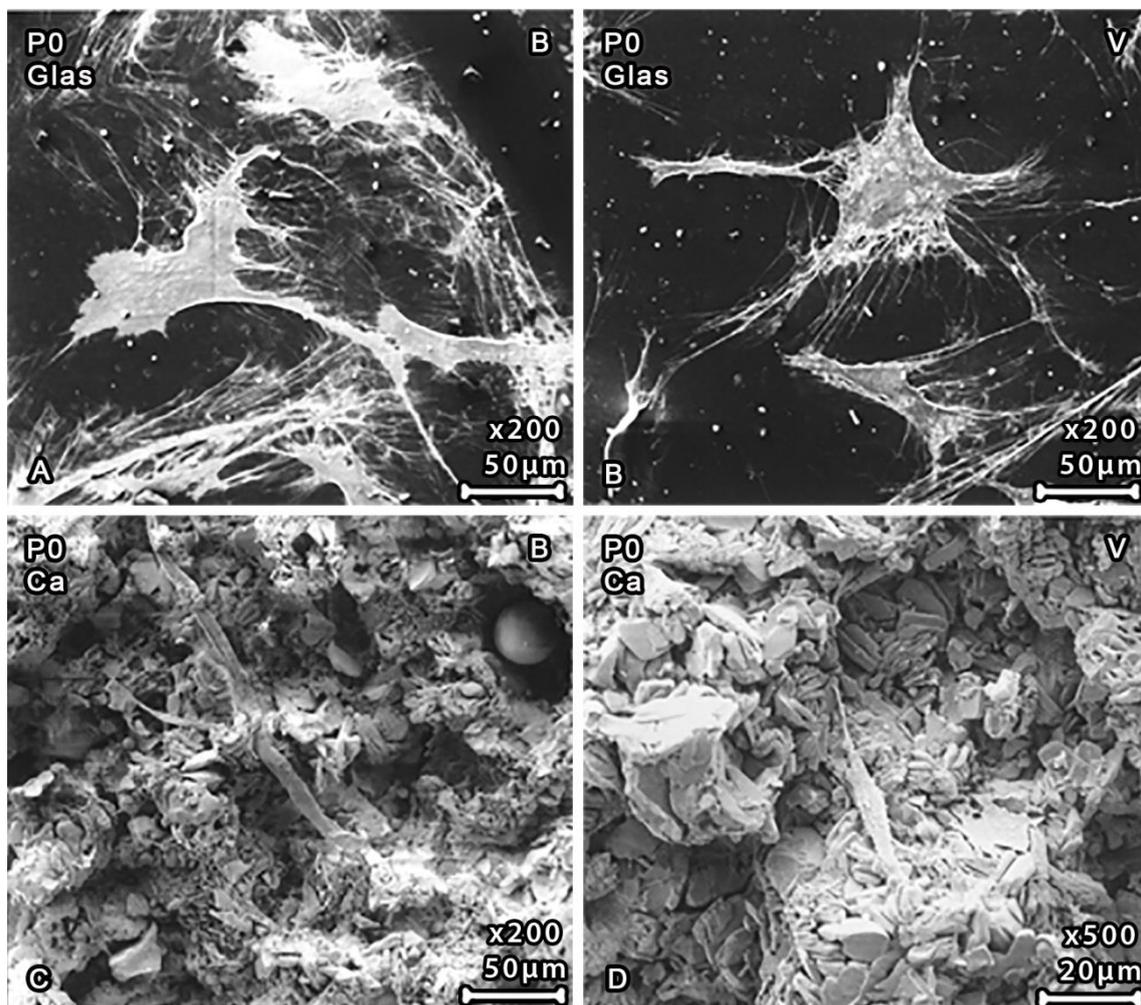


Abbildung 15: REM von hMSC

Repräsentative Darstellung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von hMSC (Passage 0) die auf Glas (A,B) oder Bruschit (C,D) in Gegenwart von VEGF (B,D) oder BMP 2 (A,C) kultiviert wurden. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, dehydriert und mit Gold bedampft und mittels REM analysiert. Vergrößerung: 50x (A, B,C); 20x (D).

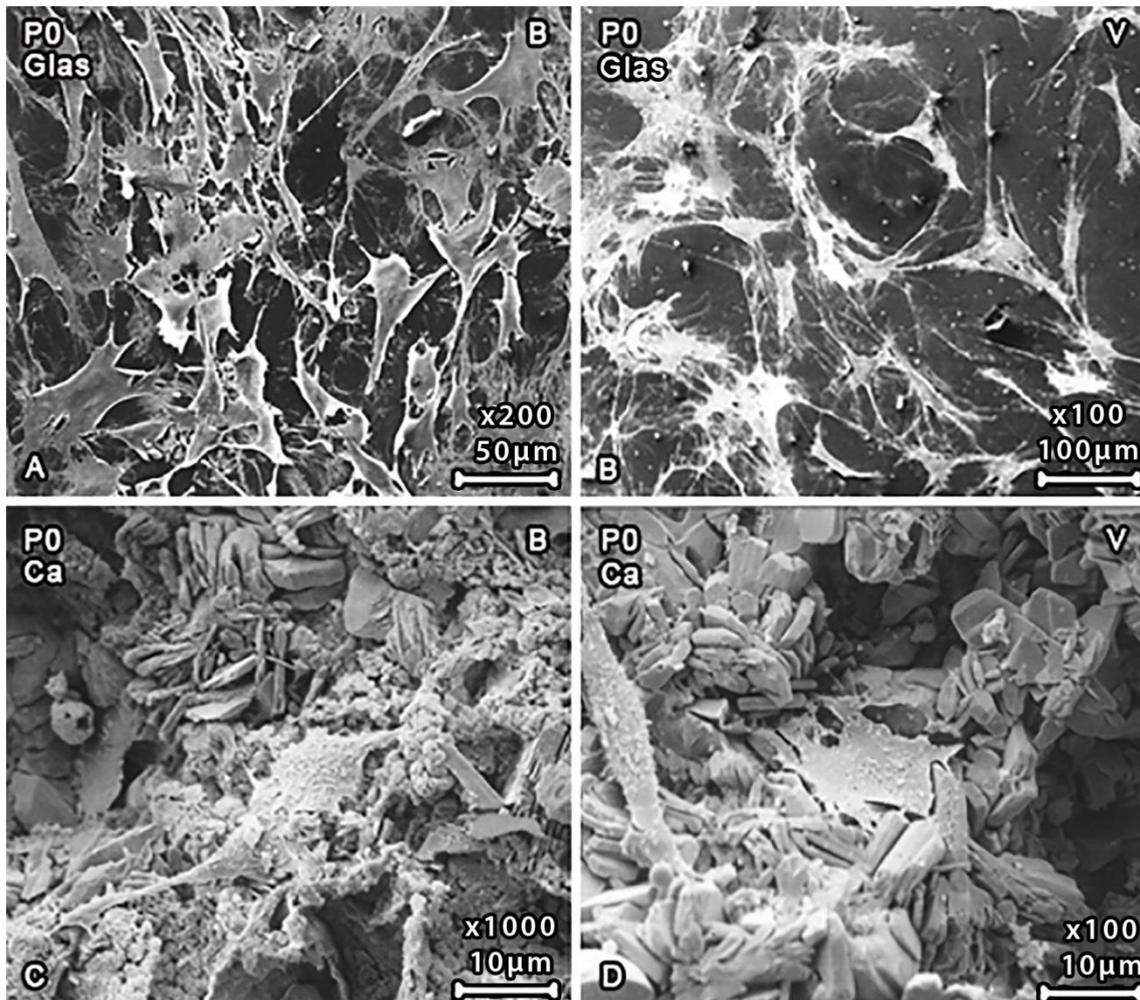


Abbildung 16: REM von hMSC

Repräsentative Darstellung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von hMSC (Passage 0) die auf Glas (A, B) oder Brushit (C,D) in Gegenwart von VEGF (B,D) oder BMP 2 (A,C) kultiviert wurden. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, dehydriert und mit Gold bedampft und mittels REM analysiert. Vergrößerung: 50x (A); 100x (B); 10x (C,D).

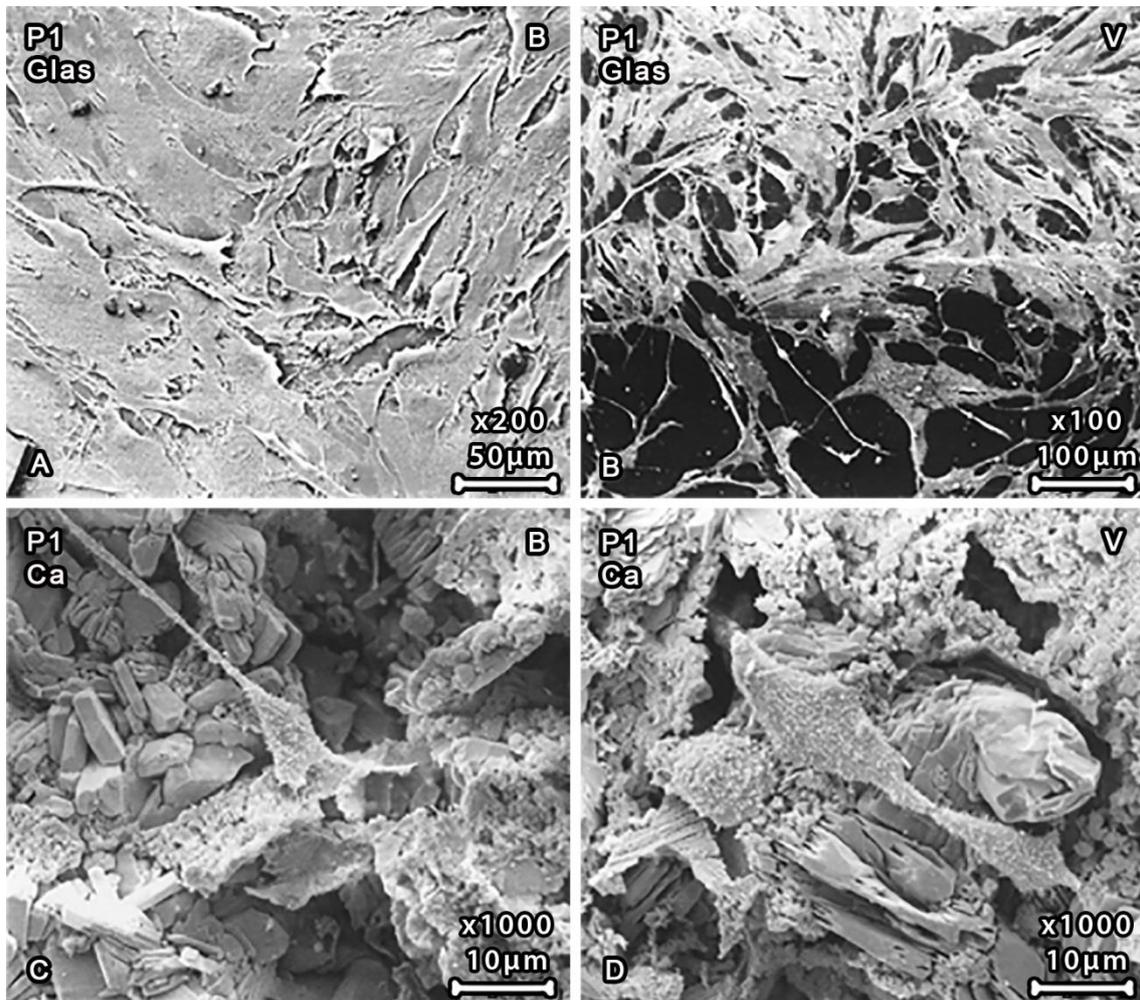


Abbildung 17: REM von hMSC

Repräsentative Darstellung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von hMSC (Passage 1) die auf Glas (A,B) oder Brushit (C,D) in Gegenwart von VEGF (B,D) oder BMP 2 (A, C) kultiviert wurden. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, dehydriert und mit Gold bedampft und mittels REM analysiert. Vergrößerung: 50x (A); 100x (B); 10x (C,D).

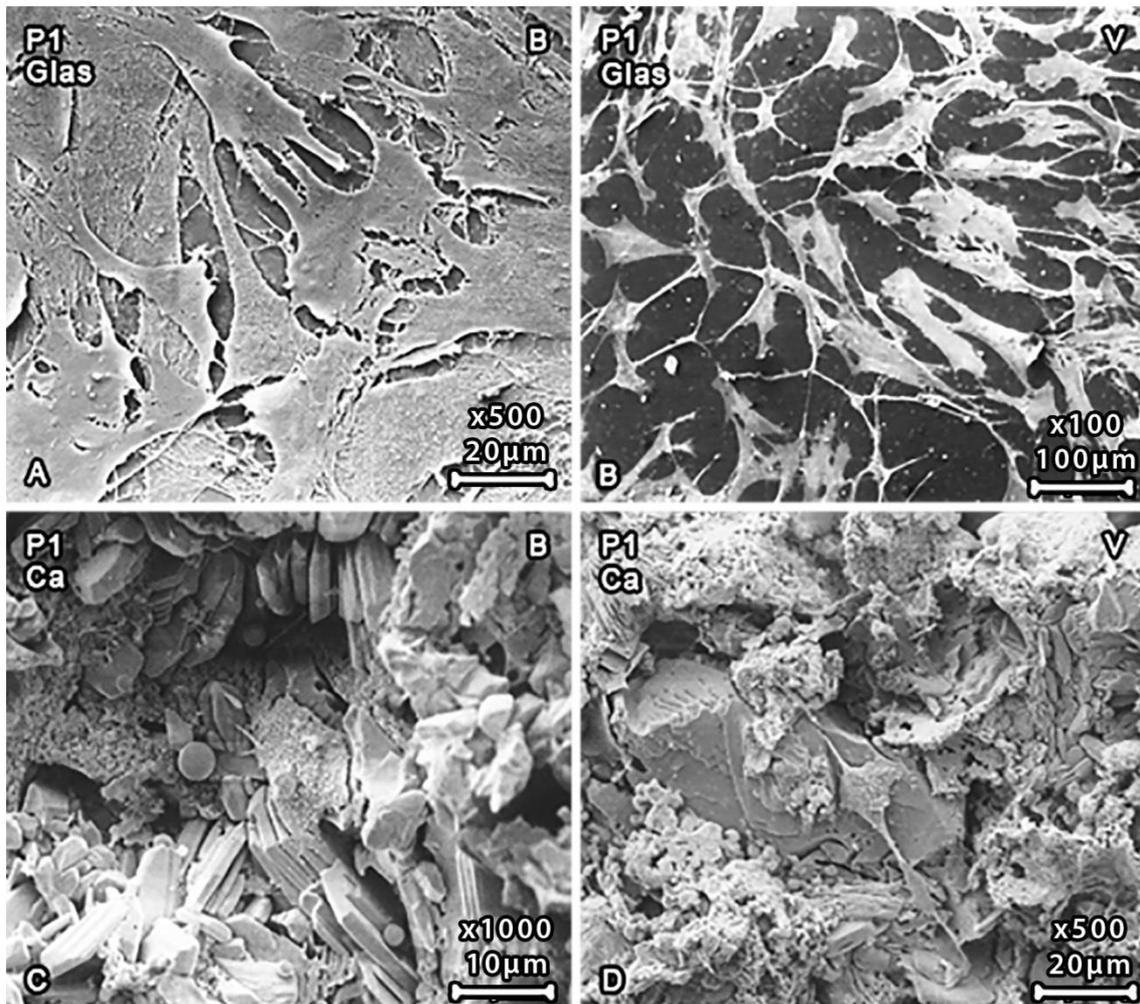


Abbildung 18: REM von hMSC

Repräsentative Darstellung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von hMSC (Passage 1) die auf Glas (A,B) oder Brushit (C,D) in Gegenwart von VEGF (B,D) oder BMP 2 (A,C) kultiviert wurden. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert, dehydriert und mit Gold bedampft und mittels REM analysiert. Vergrößerung: 20x (A); 100x (B); 10x (C); 20x (D).

Wurden Zellen der Passage 0 bzw. 1 auf Glasplättchen kultiviert, zeigte sich bei BMP 2 Behandlung eine eher kompakte, flächige Morphologie mit geringen Ausläufern (Abbildung 15 A; Abbildung 16 A), wohingegen VEGF behandelte Zellen trotz flächiger Morphologie deutlich mehr Zellfortsätze, sog. Pseudopodien ausbildeten (Abbildung 15 B; Abbildung 16 B).

Die Zellen waren adhärent und zeigten im Fall von VEGF-Behandlung einen mehr subkonfluenten und im Falle von BMP 2 einen mehr konfluenten Zellrasen. Die Zellrasen lagen zum Teil mehrlagig vor. Die Zellen standen untereinander mit Pseudopodien in Kontakt (Abbildung 15-18 REM von hMSC).

Im Gegensatz dazu waren die auf Bruschit kultivierten Zellen in der BMP 2 Behandlungsgruppe eher länglich oder spindelförmig mit kürzeren Ausläufern (Abbildung 15 C; 16 C). Die VEGF behandelten Zellen zeigten sowohl den länglich-spindelförmigen Typ als auch den flächigen, polygonalen Zelltyp (Abbildung 15 D; 16 D). Durch die unterschiedliche Ausprägung der Ausläufer und durch die flächige aber auch teils längliche Morphologie der Zellen gestaltete sich deren Aussehen polymorph. Des Weiteren zeigten die Zellen auf Bruschit mikrovillähnliche Ausstülpungen auf ihrer Oberfläche (Abbildung 15 - 18). Auf den Bruschit-Oberflächen der BMP 2 -und VEGF-Gruppen lagen die Zellen vereinzelt vor, Mehrlagigkeit oder ein konfluenter Zellrasen wie auf den Glasproben war nicht zu beobachten. Dadurch war die Bruschitoberfläche mit den Bruchspalten gut sichtbar (Abbildung 15 - 18). Es wurde keine Ablösung oder Absprengung von Bruschitpartikeln beobachtet. Wie bei Kultivierung auf Glasplättchen erkannte man bei Zellen, die auf Bruschit gewachsen waren, vereinzelt Kontaktaufnahme über Zellfortsätze (Abbildung 16 C, 17 D, 18 D). Die Zellen zeigten sowohl auf Bruschit, als auch auf Glas, eine osteoblastenähnliche Morphologie. Zellen auf Glasplättchen kultiviert, die bereits einmal passagiert wurden, (Passage 1) zeigten wie im Fall der Zellen aus Passage 0 nach BMP 2 Behandlung eine kompakte, flächige Ausprägung, wohingegen VEGF behandelte Zellen eine längliche und mit vielen Fortsätzen versehene Morphologie aufwiesen (Abbildung 17 A, B). Die auf Bruschit gewachsenen Zellen der Passage 1 zeigten ebenfalls eine eher kompakte Form in der BMP 2 Behandlungsgruppe, wohingegen die VEGF behandelten Zellen flächig, aber deutlich mehr Fortsätze hatten (Abbildung 17, 18). Die auf Bruschit kultivierten Zellen der Passage 1 lagen vereinzelt vor und es fand keine ausgeprägte Kontaktaufnahme zwischen den benachbarten Zellen statt. Auf beiden Proben konnte man deutlich die Verankerung an das Glas und Bruschit durch Pseudopodien erkennen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

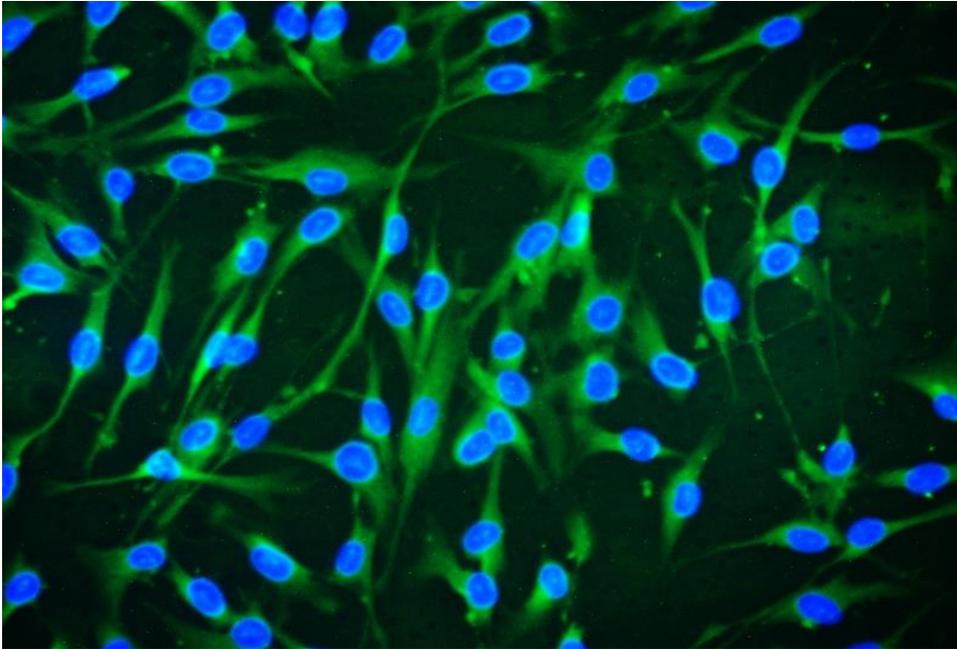


Abbildung 19: humane Knochenmark-Stammzellen [194]

*Die blaue Färbung bildet den Zellkern ab, die grüne Färbung zeigt einen MSC spezifischen Oberflächenmarker, z.B. CD 73, Immunostaining gegen CD 90, 200x*

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind eine gut charakterisierte Population adulter Stammzellen. Sie können aus dem Knochenmark (KM) isoliert werden und in vitro und in vivo in eine Vielzahl von mesenchymalen Geweben differenziert werden. In dieser Arbeit wurden hMSC verwendet, weil sie unter geeigneten Versuchsbedingungen das Potential haben sich u.a. in Osteoblasten oder Endothelzellen zu differenzieren. Durch ihre Fähigkeit sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, haben die mesenchymalen Stammzellen (MSC) das Potential, in verletzte Gewebe transplantiert oder auf biomimetischen Gerüsten kultiviert zu werden. Auch kann das Gerüst per se die Osteogenese fördern, indem es als extrazelluläre Matrix fungiert und osteogene Zellen stimuliert. Mit den daraus resultierenden Gewebekonstrukten kann man knöcherne Pathologien schneller regenerieren. So konnte in mehreren Studien bereits gezeigt werden, dass die Kultivierung von MSC auf einer dreidimensionalen Matrix, eingesetzt in einen ossären Defekt, die Heilung beschleunigt und optimiert [195].

Stammzelltransplantationen wurden sowohl bei Tieren [196–199], als auch am Menschen [184, 200], bereits erfolgreich durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass MSC nach xenogener Transplantation ihre Pluripotenz behalten und durch ihre immunologischen Eigenschaften, wie z.B. durch lokale Immunsuppression, trotz xenogener Umgebung Beständigkeit zeigen [196].

Die in dieser Arbeit verwendeten hMSC wurden aus dem Hüftkopf isoliert und zu in vitro Differenzierungsuntersuchungen verwendet. Häufiges Passagieren setzt die Zellen einem Stress aus, der zur Alterung bzw. vorzeitigen Differenzierung der Zellen führen kann [201]. Um dies auf ein Minimum zu reduzieren wurden nur Zellen der Passage 0 und 1 verwendet. Für die Differenzierungsversuche wurden die hMSC ausgesät, vermehrt und in Gegenwart von osteogenen (BMP 2) und endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) differenziert. Die hMSC differenzieren in Serum mit Ascorbinsäure und Dexamethason zu Osteoblasten. Zum Nachweis der Differenzierung wurden Proteine bevorzugt, die in der Literatur als immunzytochemische Standardmarker für die osteoblastäre bzw. vaskuläre Differenzierung beschrieben wurden (OC, ALP, PECAM) [193, 202].

Die Alkalische Phosphatase (ALP) wurde gewählt, weil das Enzym ein allgemein verwendeter klinischer Marker für die Knochenbildung bei Patienten die keine Leber- und Gallenwegserkrankungen haben ist [193]. Bei Knochenumbauvorgängen wie Umstrukturierung oder pathologischer Degeneration von Knochengewebe steigt der Anteil der im Serum vorkommenden ALP [203]. Darüber hinaus weist die Erhöhung der ALP-Aktivität auf eine osteogene Differenzierung hin. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass mit der Induktion der ALP in vitro die knochenbildende Fähigkeit von hMSC einhergeht [204, 205].

Osteocalcin (OC) wird von den Osteoblasten exprimiert und akkumuliert in der Extrazellulärmatrix (EZM) des Knochens. Serum-OC ist ein Marker für die Osteoblastenaktivität und die OC-Konzentration reflektiert die Geschwindigkeit der Knochenbildung [192].

Als Marker für die Differenzierung für die Endothelzellen wurde das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM 1 verwendet. PECAM ist ein integrales Glycoprotein, welches konstitutiv von Endothelzellen, aber auch Blutplättchen, Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird und die Zelladhäsion mediiert [202].

## 5.2 Immunologische Detektionsmethoden

Als Methode zur Charakterisierung der hMSC und Zellen der osteoblastären und endothelialen Differenzierungskaskade, wurde mit der Immunfluoreszenz (IF) eine Technik gewählt, die eine Charakterisierung auf Ganzzellniveau erlaubt. Vorteile der IF sind Untersuchungen auf Einzelzellniveau sowie die spezifische Detektion zelltypischer Proteine nach Differenzierungsvorgängen und deren Zuordnung zu bestimmten zellulären Strukturen wie z.B. der Zellmembran oder des Zellkerns. Des Weiteren können Veränderungen in der Zellmorphologie sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden für die IF-Versuche ein primärer Antikörper (AK) der spezifisch mit PECAM bzw. OC reagiert und ein sekundärer AK, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Goat anti mouse IgG gekoppelt an Cy2), verwendet. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings die aufwendigere Präparation der zu untersuchenden Proben, deren Austrocknung sowie Eigenfluoreszenz zu Artefakten führen kann.

Eine weitere Methode, die Proteine mittels Antikörper detektiert, ist der sog. Westernblot (WB). Im Gegensatz zur IF in situ, werden Zellen oder Gewebe durch Homogenisation zerstört und die zu untersuchenden Proteine nach Auftrennung mittels Elektrophorese und nach Übertragung auf eine Membran, z.B. Nitrozellulose, durch spezifische AK detektiert. Obwohl Zellen und Gewebe zerstört werden müssen, ist der Vorteil dieses Verfahrens die biochemische Charakterisierbarkeit der Zielproteine, z.B. bezüglich des Molekulargewichts. Des Weiteren ist eine Quantifizierung des detektierten Proteins möglich und zwar durch Normalisierung auf bestimmte Proteine, die in der Zelle in konstanten Mengen exprimiert werden, den sog. Haushaltsproteinen. So wurde in dieser Arbeit  $\beta$ -Tubulin als interner Proteinstandard herangezogen.  $\beta$ -Tubulin ist ein globuläres Protein, welches in den Zellen von Eukaryonten vorkommt und neben dem  $\alpha$ -Tubulin zu den wichtigsten Tubulinen gehört. Beide Tubuline sind Bestandteil der Mikrotubuli, die ein Teil des Zytoskeletts darstellen. Der Nachteil des Westernblots ist die Zerstörung der Zelle durch Lyse und Homogenisation, wodurch eine Aussage über die strukturelle Lokalisation des zu untersuchenden Proteins nicht möglich ist.

Die Verwendung des Westernblots ist eine ideale Ergänzung zur IF, da man dadurch zu den Ergebnissen an Ganzzellen in situ semiquantitative Aussagen erheben kann.

### 5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die IF Untersuchung sowie die WB-Analyse der behandelten hMSC wurden zur Detektion bzw. Quantifizierung der Differenzierung eingesetzt. Um die Morphologie der durch Wachstumsfaktoren differenzierten Zellen zu beurteilen, wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet. Die REM ermöglicht es eine biologische Oberfläche mittels gebündelten Elektronenstrahl abzutasten (rastern) und die entstehenden elektrischen Signale als schwarz-weiß Bild darzustellen. Dazu muss die zu detektierende Oberfläche durch entsprechende Konditionierung absolut wasserfrei sein und mittels Gold-Bedampfung leitfähig gemacht werden. Mittels REM ist es möglich Bildpunkte mit einem Abstand von 1 nm noch unterscheidbar zu machen. Hierdurch kann eine bis zu 100000fache Vergrößerung erzielt werden. Um während des Abbildungsvorganges Wechselwirkungen von Strahlenelektronen mit Gasatomen und Gasmolekülen in der Probenkammer zu vermeiden, findet der Vorgang im Hochvakuum statt. In dieser Arbeit wurden Vergrößerungen eingesetzt die ein Auflösungsvermögen von 10-100  $\mu\text{m}$  erlaubten. Von den differenzierten Zellen wurden sowohl Übersichts- als auch Detailaufnahmen angefertigt. Die Aufnahmen der Abbildungen 15-18 zeigen Zellen nach 5 tägiger Inkubation, die in Gegenwart von oben genannten Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Sowohl auf Glas als auch auf Bruschi konnten mittels REM zum Teil aus hMSC differenzierte Osteoblasten detektiert werden. Letztere zeigten die für Osteoblasten typischen Zellfortsätze, mit denen die Osteoblasten mit den Nachbarzellen in Kontakt stehen. Dies dient dazu über die spätere knöcherne Grundsubstanz hinweg ein ausgedehntes Zellnetzwerk auszubilden [206]. Auf den Glasplättchen waren im Gegensatz zu Bruschi deutlich mehr Zellen zu erkennen, was auf unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen sein kann, z.B. durch schlechtere Adhäsion der hMSC an die Bruschi-Oberfläche. Oberflächenstrukturen und Bruchflächen bei Bruschi waren deutlich zu erkennen. Vereinzelt sind kleine Verunreinigungen auf den REM Bildern sichtbar, diese Artefakte störten die Abbildung der Zelle nicht.

## 5.4 Diskussion der Ergebnisse

Knochenersatzmaterialien (KEM) wie das aus Calciumphosphat (CaP) bestehende Brushit werden sowohl in der regenerativen Medizin als Träger für osteogene und endotheliale Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Osteoblastenbildung genutzt, als auch in der orthopädischen Chirurgie als KEM oder zur Augmentation eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es hMSC in vitro zu kultivieren und das Wachstum und die Differenzierung der Zellen nach Kultivierung auf Brushit zu beobachten.

Darüber hinaus sollte die ortsgerichtete Differenzierung der hMSC durch bone morphogenetic protein 2 (BMP 2) und vascular endothelial growth factor (VEGF) untersucht werden. Bei den hMSC handelt es sich um pluripotente Zellen, die aus dem menschlichen Hüftknochen isoliert wurden. Diese Zellen wurden verwendet, weil sie einfach zu isolieren und zu kultivieren sind. Ziel bei der Verwendung von primären Stammzellen war es, möglichst nah an der klinischen Anwendung zu sein, um eine representative Evaluation zu generieren, wie hMSC auf das Brushitträgersystem reagieren.

Somit ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo Situation gegeben.

Nach Inkulturnahme wurden diese Zellen nach maximal zwei Passagen auf Glasplättchen und Brushit ausgesät und mittels IF, WB und REM untersucht. Wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte, waren die Zellen auf Glasplättchen in ausreichend großer Zahl angewachsen und proliferierten. Die Zellen konnten sowohl mittels IF und REM gut nachgewiesen werden. Wie von Soicher et al. [207] beschrieben, wuchsen die Zellen auch auf Brushit.

Allerdings waren in der vorliegenden Arbeit die Zellen auf der Brushitoberfläche mittels IF nicht nachweisbar. Eine wahrscheinliche Ursache für die fehlende Detektion ist die mögliche Eigenfluoreszenz der Brushitkörper. Daneben kann aber auch eine Schädigung und darauf folgendes Ablösen während der Aufarbeitung der Brushitplättchen bei der IF nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen zur Differenzierung der hMSC wurden immer in Gegenwart von Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure durchgeführt. Die Zugabe von osteogenen Stimuli wie Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat führen zu einer erhöhten osteogenetischen Differenzierung, wie es durch die Ausbildung von osteoblastischer Zellmorphologie und erhöhter Expression von osteogenen

Markerproteinen gezeigt wird [208]. Der Induktor von Knochenmarkszelldifferenzierung, Dexamethason, stimuliert zuverlässig die Entwicklung von vielen, aber nicht allen phänotypischen Eigenschaften humaner Osteoblasten. Allerdings wurde gezeigt, dass Glucocorticoide in vivo auch schädigende Effekte auf Knochen haben können, was zur Hemmung der Osteoblastenfunktion führen kann [209, 210].

Andere Induktoren der Osteoblastendifferenzierung in vitro sind z.B. die physiologischen Stimuli TGF- $\beta$  und BMP 2, beides essentielle Faktoren für die postnatale Knochenformation.

Weil BMP 2 ein körpereigener Knochenwachstumsfaktor ist, wurde der Faktor zur Induktion der Osteoblastendifferenzierung in vielen humanen Studien sowie in Tiermodellen eingesetzt. Dagegen ist Dexamethason, ein Glucocorticoid, das ursprünglich antiinflammatorisch und immunsuppressiv eingesetzt wurde, ebenfalls ein osteogener Stimulus [209, 210]. So konnte in verschiedenen Studien in vitro gezeigt werden, dass Dexamethason die Osteoblastendifferenzierung, ALP-Aktivität und die Knochenmineralisierung steigert [211–213].

Von Cuelho et al. konnte gezeigt werden, dass Kulturen, in Gegenwart von  $\beta$ -Glycerophosphat alleine oder in Kombination mit Dexamethason mineralische Ablagerungen bilden.  $\beta$ -Glycerophosphat wird routinemäßig zu Knochenzellkulturen hinzugegeben, um die Osteogenese zu induzieren und die Ablagerung von CaP zu fördern. Die Verbindung wird durch ALP hydrolysiert um hohe Spiegel lokaler Phosphationen zu produzieren, die in Mineralablagerungen Verwendung finden [214]. Neben der Funktion als Phosphatquelle induziert  $\beta$ -Glycerophosphat die osteogene Genexpression. So konnte gezeigt werden, dass anorganisches Phosphat als intrazelluläre Signalsubstanz agiert, die an der Regulation vieler osteogener Gene, einschließlich Osteopontin und BMP 2, beteiligt ist [215]. Darüber hinaus führt das Zusammenspiel von Dexamethason und  $\beta$ -Glycerophosphat zu einer deutlichen Zunahme des Zellwachstums. Diese Effekte sind wahrscheinlich auf die Fähigkeit von Glucocorticoiden zurückzuführen, die Proliferation und/oder Differenzierung von Knochenosteoprogenitorzellen zu stimulieren [214]. Darüber hinaus wird die Sensitivität der hMSC für andere Differenzierungsagenzien in Gegenwart von Dexamethason gesteigert. So konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die Antwort

von hMSC auf die osteogene Stimulation durch BMP 2 erhöht [216]. Ascorbinsäure dient als Cofaktor für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin im Kollagen und damit zur korrekten Proteinfaltung des Kollagenmoleküls. Darüber hinaus führt es zur Erhöhung der Synthese von nicht-kollagenen Matrixproteinen [208]. Kollagen und EZM-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Osteoblastendifferenzierung. So müssen Osteoblasten zunächst zur Differenzierung in Kontakt mit Kollagen enthaltender EZM treten. Die Bindung an die EZM-Proteine von Osteoblasten findet durch Interaktionen zwischen Kollagen und Integrinen statt. Die Integrinaktivierung wiederum führt zur intrazellulären Signalkaskadenstimulation und Gentranskription [215].

Die Stimulation der Differenzierung der hMSC durch den osteogenen Faktor BMP 2 und den endothelialen Faktor VEGF konnte mittels IF nachgewiesen werden. Wie in der IF gezeigt, führte die Stimulation mit BMP 2 in Gegenwart der osteogenen Ergänzungsstoffe Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure zu einer deutlichen Fluoreszenz, was auf die Hochregulation des osteoblastenspezifischen Markers OC zurückzuführen sein könnte. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Rickard et al., der zeigte, dass rhBMP 2 in Rattenstromazellen vergleichbare Effekte wie Dexamethason auf die Osteoblastendifferenzierung z.B. bezüglich gesteigerter Aktivität von ALP hervorrief und dass durch BMP 2 in Anwesenheit von Dexamethason die OC-mRNA in synergistischer Weise erhöht wurde. BMP 2 und Dexamethason induzieren unabhängig voneinander eine Vielzahl von Osteoblastendifferenzierungsmarkern, die zur maximalen Differenzierung führt, wenn beide Agenzien zusammen wirken [208, 217].

Die frühe Phase der Knochenbildung nach Osteoblastendifferenzierung dauert in der Regel 7-14 Tage [101]. Außerdem gibt es Hinweise auf die sequenzielle Aktivierung von Genen während der Osteoblastendifferenzierung. So ist die Expression spezifischer Gene in Rattenosteoblasten abhängig von der Zellproliferation und dem Aufbau der extrazellulären Matrix [218].

Da in dieser Arbeit die Kinetik der Differenzierung der kultivierten und behandelten Zellen nicht bestimmt wurde, kann über den Zeitverlauf der Expression der Markerproteine keine Aussage getroffen werden. Allerdings konnten Rickard et al. zeigen, dass die osteoblastische Differenzierung in Anwesenheit von Dexamethason erst

nach mindestens 8 Tagen zu einer signifikanten Stimulation der OC-mRNA geführt hat [217].

Der Knochen ist ein vaskularisiertes Gewebe in welchem Blutgefäße und Knochenzellen zum Erhalt der skelettalen Integrität zusammenarbeiten. Aus diesem Grund sind nicht nur Osteogenese sondern auch die Angiogenese als auch Osteogenese wichtig für die Knochenregeneration.

Die beiden Wachstumsfaktoren BMP 2 und VEGF verstärken die Knochenregenerierung in synergistischer Weise [101, 103, 219–221]. Lokal freigesetztes BMP 2 und VEGF bewirken die Einwanderung endogener Zellen einschließlich von MSC in den Defekt. Beide Faktoren stimulieren die Differenzierung eingewanderter Zellen zu Endothelzellen respektive Osteoprogenitorzellen [103]. VEGF-Stimulierung fördert die Bildung von supportiven vaskulären Netzwerken, die die knochenbildenden Effekte von BMP 2 erhöhen. Darüber hinaus kann VEGF auch als mobilisierendes Zytokin für endotheliale Progenitorzellen wirken, die die Vaskularisierung des neuen Knochens herbeiführen [222].

VEGF und BMP 2 wirken positiv auf die Endothelzell- und Osteoblastenmigration aus benachbartem Gewebe. Darüber hinaus unterstützt VEGF die Regeneration von Knochen nicht nur durch Angiogeneseinduktion, sondern auch direkt durch Stimulation der osteogenen Differenzierung von MSC [222].

Demgemäß stimuliert BMP 2 die Angiogenese durch Expression von VEGF aus Osteoblasten oder durch direkte Aktivierung von Endothelzellen [103].

Die synergistische Wirkung von BMP 2 und VEGF konnte auch an Periostzellen gezeigt werden, die mit BMP 2 oder VEGF bzw. mit VEGF und BMP 2 transfiziert wurden und dadurch mehr mRNA von ALP, OC und Kollagen Typ 1 produzierten als Zellen, die nur mit VEGF oder Vehikel behandelt wurden, was zur beschleunigten Osteoblastendifferenzierung führt [101]. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass genetisch veränderte Periostalzellen, die mit BMP 2 und/oder VEGF transfiziert wurden und auf  $\beta$ -TCP Scaffolds wuchsen, die Knochenbildung nach Transplantation in Mäuse im Zeitraum von vier Wochen deutlich stärker ausgebildet war, als bei Zellen, die nur mit VEGF transfiziert wurden. Die Gründe für die additive oder synergistische Wirkung von BMP 2 und VEGF auf die Knochenbildung und die Rolle von VEGF hierbei können die Induktion der Angiogenese, die Beschleunigung der Rekrutierung

körpereigener Stammzellen bzw. die Verstärkung des Überlebens der Zellen sein [101]. Morphologische Veränderungen geschehen während dem Anheften und dem Ausbreiten von Zellen, was einer Reorganisation des Zytoskeletts, einer Struktur, die eine Rolle in Zellform und Verhalten spielt, entspricht.

Unter in dieser Arbeit gegebenen experimentellen Bedingungen sollte sich die Zellmorphologie von einer fibroblastenähnlichen (zum Vergleich siehe Abb. 19) zu einer polygonalen Erscheinung verändern, was auf die Entwicklung in Richtung osteoblastischer Differenzierung hindeutet [214]. Eine Auswirkung der Wachstumsfaktorbehandlung auf die Zellmorphologie zeigte sich auch in diesen Untersuchungen. Die subkonfluent adhären Zellen zeigten nach Behandlung mit BMP 2 und VEGF zum Teil ein flächig verzweigtes Aussehen. Allerdings waren auch Zellen zu erkennen, die der spindelförmigen fibroblastenähnlichen Morphologie der hMSC ähnelt. Wie beschrieben wurde, zeigen aber auch hMSC unterschiedliche Morphologien, wobei der Fibroblastentypus überwog. Bei denen in der Literatur und auch in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen bleibt unklar, ob es sich um undifferenzierte hMSC handelt oder bereits um osteoblastäre Vorläuferzellen [223, 224]. Trotz osteogener und endothelialer Stimulation fällt es schwer hMSC von differenzierten Zellen, nur aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes, zu unterscheiden. Lediglich in Kombination mit anderen Untersuchungen wie z.B mit immunologischen Methoden, kann die Beurteilung des Aussehens der Zelle zur Charakterisierung von Differenzierungsvorgängen herangezogen werden. Zur immunologischen Charakterisierung der hMSC Differenzierung mittels IF wurden AK gegen OC, das neben dem Transkriptionsfaktor *cbfa1* als charakteristischer Osteoblastendifferenzierungsmarker gilt, herangezogen [225]. Die Behandlung der auf den Glasplättchen angewachsenen hMSC durch BMP 2 führte zur Expression von OC, was gut über die IF nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein Indiz, das die präosteoblastäre Differenzierung begonnen hat.

Des Weiteren wurden die Expression von PECAM, einem endothelialen Differenzierungsmarker, untersucht. Bei Verletzung initiiert das Endothel de novo Synthesen von Cytokinen und Wachstumsfaktoren wie VEGF. VEGF wiederum induziert die Synthese des endothelzellspezifischen Markers PECAM 1/CD31, ein Glycoprotein der Immunoglobulin-Superfamilie. PECAM kommt nur in Zellen des

vaskulären Systems, wie z.B. den Endothelzellen vor, aber auch in Monozyten oder neutrophilen T-Zellen. In Endothelzellen ist PECAM an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und spielt eine Rolle bei Zelladhäsion, vaskulärer Permeabilität und der Organisation des Zytoskeletts [226].

Zellen die mit VEGF behandelt wurden, zeigten eine klare Expression von PECAM, was auf die Induktion der Differenzierung zum Endothelzelltyp hindeutet.

Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Hung et al., der die BMP 2 und VEGF bedingte Expression dieser Differenzierungsmarker für MSC aus dem Oberschenkelknochen von Mäusen beschrieb [68] sowie von Carpenter et al., der die Expression an hMSC und Pferdestammzellen aus dem Knochenmark untersuchte [227].

Ergänzend zur IF wurde das ortsgerichtete Differenzierungsverhalten der hMSC mittels Westernblot biochemisch analysiert (siehe Abbildung 13 und 14). Dabei wurden die Zellen auf Polystyrol (PS) als Kontrollsubstrat und Bruschiplättchen mit einer in der Mitte vorhandenen Sollbruchstelle kultiviert (Abb 6).

Die eine Hälfte des Bruschiplättchens wurde mit BMP 2 und die andere Hälfte mit VEGF beladen (Abb 6). Allerdings wurde der komplette mit den Wachstumsfaktoren behandelte Prüfkörper mit den hMSC in einem Well in Kulturmedium inkubiert. Ein Ausdiffundieren und Vermischen der Wachstumsfaktoren ist daher wahrscheinlich. Nach Inkubationsende wurden die mit den Wachstumsfaktoren behandelten Plättchen an der Sollbruchstelle geteilt, die Zellen lysiert und durch WB analysiert. Als Differenzierungsmarker sollten neben PECAM und OC noch ALP im WB detektiert werden. ALP ist ein weiterer osteoblastärer Differenzierungsmarker, der in Studien zum Nachweis der osteogenen Potenz von Zellen Verwendung findet (siehe oben) [204, 205]. Wie in Abb 13 und 14 gezeigt, konnten alle Marker gut detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Zellen, die auf Bruschi gewachsen waren, eine deutlich stärkere Expression der Differenzierungsmarker PECAM, ALP und OC hatten, als die auf PS kultivierten Zellen. Allerdings bewirkten die Wachstumsfaktoren weder bei den Zellen die auf PS gewachsen waren noch bei den Zellen auf Bruschi substrat eine weitere Steigerung der Markerexpression. Es wurde sogar ein Trend zur Reduktion der Marker nach Wachstumsfaktorbehandlung auf den Bruschi zellkulturen beobachtet. Auch konnte kein ortsgerichteter selektiver Effekt von BMP 2 oder VEGF auf die Expression

von OC und ALP als osteoblastenspezifische und PECAM als endothelzellspezifische Marker beobachtet werden. Dies mag auf die Ablösung der Wachstumsfaktoren aus dem Bruschitsubstrat und der darauf folgenden diffusionsbedingten Durchmischung bei der Inkubation des kompletten Plättchens zurückzuführen sein. Die verstärkte Induktion der Differenzierungsmarker in Zellen, die auf Bruschit gewachsen waren, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Calcium (Ca) aus dem Bruschit in Zellen über Ionenkanäle wie z.B. spannungsabhängige Ca-Kanäle eintritt. Dies führt dann zur Aktivierung von Signalkaskaden wie z.B. Kinase-abhängigen Phosphorylierungsreaktionen. So konnte gezeigt werden, dass spannungsabhängige Ionenkanäle vom L-Typ durch CaP-Kristalle oder gelöstes Ca aktiviert werden, was zu einer erhöhten Expression von ALP, OC, aber auch BMP 2 führte [228, 229]. Interessanterweise bewirkte die Zugabe von BMP 2 und VEGF keine weitere verstärkte Expression sondern eher eine Reduktion der Expression der gemessenen Differenzierungsmarker. Eine mögliche Erklärung für die geringere Expression von PECAM, ALP und OC könnte in der Beeinflussung der Konformation der Peptide bzw. Beeinflussung der Signaltransduktionskaskade von BMP 2 oder VEGF durch Ca-Ionen liegen. So konnten Zhang et al. in vitro zeigen, dass rekombinantes humanes BMP 2 Calcium bindet. Niedrige Konzentrationen von Ca (0,18mM) erhöhten die osteogene Differenzierung einer aus dem Skelettmuskel abgeleiteten pluripotenten myogenen Progenitorzelllinie durch rekombinantes humanes BMP 2, wohingegen höhere Ca-Konzentrationen (>1,8mM) negative Effekte auf die BMP 2 induzierte Differenzierung hatten. Ektopische Knochenbildung in vivo zeigte vergleichbare Ergebnisse. Diese Effekte sollen durch eine Hemmung der Bindung von BMP 2 an seinen Rezeptor in Gegenwart von hohen Ca-Konzentrationen stattfinden [230]. Eine Beeinflussung der durch VEGF ausgelösten Signalkaskade durch hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen durch Feedback-Mechanismen kann nicht ausgeschlossen werden [231].

Zur Untersuchung der ortsgerichteten Differenzierung wurde in dieser Arbeit die Behandlung eines Bruschitplättchens mit einer in der Mitte befindlichen Sollbruchstelle ausgewählt. Dabei wurden auf die jeweiligen Hälften die Wachstumsfaktoren pipettiert, in der Annahme, dass sich die Proteine in das Substrat einlagern und langsam wieder freigesetzt werden und den Stammzellen sukzessive zugänglich gemacht werden.

Allerdings zeigten die in Abb 13 und 14 beschriebenen Ergebnisse, dass die beiden Faktoren unter diesen Bedingungen keine verstärkte Stimulation der Markerexpression gegenüber den Bruschitkontrollen bewirken konnten. Auch konnte keine zellspezifische Differenzierung durch BMP 2 und VEGF beobachtet werden. Wie bereits oben diskutiert kann dies an der Freisetzung und Durchmischung der Faktoren während der Inkubationsphase und/oder einer Inaktivierung der Proteine per se oder deren Signalkaskade liegen. Es ist daher notwendig alternative Untersuchungsmethoden zur ortsgerichteten Differenzierung anzuwenden. Um zu verhindern, dass die Wachstumsfaktoren zu schnell aus dem Substrat freigesetzt werden und sich vermischen könnte man die Proteine eventuell durch eine Hydrogel- oder Polymerphase am Substrat immobilisieren und dadurch stärker am Wirkort binden [232, 233].

Um den Vorgang der mesenchymalen Zelldifferenzierung durch Adhäsion, Proliferation und morphologischen Veränderungen zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten der hMSC auf Bruschit, im Vergleich zu Kontrollkulturen, mit Hilfe der REM untersucht. Als Kontrollkulturen dienten hMSC, die auf Glasplättchen kultiviert wurden, um das normale Verhalten der Zellwachstums zu beobachten. Die osteogene Differenzierung der Zellen in vitro wurde sowohl bei den Bruschitkulturen als auch auf Glas durch BMP 2, in Gegenwart von Dexamethason (induziert ua. die RunX 2 Expression), Ascorbinsäure (erhöht die Kollagen Sekretion) und  $\beta$ -Glycerophosphat (dient als Phosphatquelle zur Mineralisierung) stimuliert [234].

Zur endothelialen Differenzierung wurden die Bruschit- und Glasplättchen-Kulturen mit VEGF in Gegenwart von bFGF induziert. Als Folge davon zeigten die Kulturen auf Glas oder Bruschit Unterschiede bezüglich Adhäsion, Proliferation und Zellmorphologie. Die hMSC adhärten nicht nur auf dem Glassubstrat, sondern auch auf Bruschit. Zellen, die auf Glasplättchen angewachsen waren, proliferierten so gut, dass es zu subkonfluenten bis konfluenten Zellmonolayern kam. Dieser Effekt war sowohl bei BMP 2 als auch VEGF Behandlung zu beobachten. Interessanterweise kam es in den BMP 2 behandelten Kulturen teilweise zur Ausbildung mehrlagiger Zellrasen. Die Ursache hierfür ist unklar. Weitere qualitative Unterschiede bezüglich Proliferation und Adhäsion bezüglich der BMP 2 - und VEGF -Gruppen konnten bei den Glasplättchenkulturen nicht beobachtet werden. Sowohl die BMP 2 als auch die VEGF behandelten Zellen wiesen kompakte, flächige Morphologien auf. Die VEGF

stimulierten Zellen zeigten aber auch, trotz flächigem Erscheinungsbild deutlich mehr Zellfortsätze. Da es bekannt ist, dass trotz Differenzierungsstimulation die Endothelzellen, aber auch Osteoblasten [223, 224], ein uneinheitliches Aussehen haben können, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass der Differenzierungsprozess angeschoben wurde. Besonders die Ausbildung der Pseudopodien bei den VEGF behandelten Zellen deutet auf eine beginnende endotheliale Ausprägung hin, wie sie bei der Angiogenese abläuft [235].

Scaffolds für das Knochen Tissue Engineering wären ideal, wenn sie inhärente osteoinduktive Eigenschaften neben Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Biodegradierbarkeit hätten, sowie die Angiogenese fördern würden. Unter anderem sind Bruschitzemente besonders resorbierbare Materialien für Scaffolds und Knochensubstitutionen, da sie Ähnlichkeiten mit der mineralischen Komponente des Knochens aufweisen [234]. Langer, Tirrell und Hollister bestätigten die Wichtigkeit der strukturellen Eigenschaften des KEM, welches genau definiert werden sollte. Durch die Oberflächenmorphologie, Steifheit oder Topografie des Scaffolds wird direkt die Zell-Interaktion beeinflusst und damit auch die gewünschte Gewebsbildung [236, 237].

Die REM Aufnahmen dieser Arbeit zeigten deutlich eine raue Oberflächenstruktur des Bruschits. Durch diese Oberflächentopographie ist eine gute Anheftung der Zellen gewährleistet [238]. Die Zellbindung erfolgt über bestimmte Strukturproteine, die mit besonderen Strukturmotiven ausgestattet sind. Variationen in der Oberflächenstruktur können einen deutlichen Einfluss auf die Zelladhäsion ausüben [238]. In den im Ergebnisteil gezeigten Abbildungen konnten keine Ablösungen oder Abspaltungen von Bruschitpartikeln beobachtet werden. Das hier verwendete Bruschitsubstrat wurde von den hMSC als geeignete Trägersubstanz angenommen. Unabhängig von der Behandlung mit BMP 2 oder VEGF adhärirten hMSC auf dem Bruschit. Die REM Aufnahmen der Zellen mit Bruschit als Substrat zeigen Einzelzellaufnahmen. Die Morphologie dieser Zellen zeigten kein einheitliches Erscheinungsbild [223, 224], welches darauf zurückzuführen sein kann, dass Bruschit Auswirkung auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen hat. Eine Veränderung der Zellkulturbedingungen durch andere Zellchargen oder verschiedene Zellkulturmedien könnte eventuell zu besseren Wachstums- und Differenzierungsbedingungen führen. Darüber hinaus könnten andere Faktoren aus der BMP Familie, wie beispielsweise BMP

4- oder 7 für die Kultivierung der Zellen auf Brushit in vitro besser geeignet sein [239]. Die Zellzahl war auf der Brushitoberfläche im Vergleich zur Glasplättchenkontrolle deutlich erniedrigt. Da der Versuch unter gleichen Bedingungen wie bei den Glasplättchen durchgeführt wurde, könnte dies auf Einwirkungen des Brushits auf die Zellkulturbedingungen bzw. auf die zu untersuchenden Zellen zurückzuführen sein. So konnte Kraski 2012 zeigen, dass der pH-Wert des Kulturmediums der Brushitkulturen über die Beobachtungszeit signifikant erniedrigt war, was zu Einschränkungen beim Zellwachstum führen kann [240, 241].

Die BMP 2 Behandlung differenzierte die Zellen zu Osteoblasten ähnlichen Zellen, die mit deutlich erkennbarem Zellkörper, aber eher länglich oder spindelförmig mit wenigen Ausläufern ausgestattet waren. Die mit VEGF behandelten Zellen bildeten eine sowohl flächige als auch längliche Morphologie aus. Die Ausprägung von Ausläufern war vorhanden, was teilweise auch zur Kontaktaufnahme der Zellen untereinander führte.

Neben den differenzierten Zellen sieht man auf einigen REM Aufnahmen kugelförmige Gebilde, welche bakterielle Verunreinigungen sein könnten, die bei der Herstellung in die Präparate gekommen sein könnten und bei der Sterilisierung abgetötet wurden. Obwohl das Kulturmedium mit einer Penicillin/Streptomycin Mischung versehen war, konnte eine Besiedlung nicht verhindert werden. Um Bakterienkontaminationen effektiver zu verhindern, könnte eine Zugabe von Antibiotika direkt in den Zement eingebracht werden. Dieser lokale Infektschutz könnte eine Bakterienbesiedlung erfolgreich verhindern [241]. So konnten Studien von Haleem et al. [242] zeigen, dass eine systemische Gabe von Gentamycin keinen Effekt auf die Knochenheilung hatte. Es ist aber unklar, ob systemische Gaben die hohe Konzentrationen erreichen können, wie sie nach lokalen Antibiotikagaben vorhanden sind [241]. Aufgrund der REM Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das hier verwendete Brushit mit hMSC unter den hier eingesetzten Wachstumsbedingungen interagiert und für den Einsatz im TE geeignet ist.

## 6 Zusammenfassung

Damit die Knochenregeneration *lege artis* abläuft ist ein sensibles und komplexes Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren notwendig. Neben bestimmten Zelltypen, die für die Knochenregeneration essentiell sind, sind auch eine Reihe von Wachstumsfaktoren notwendig um die Kommunikation zwischen den Zellverbänden zu gewährleisten und die einzelnen Entwicklungsstadien zu steuern und zu regulieren.

Zur Untersuchung der Möglichkeit, sowohl die Osteokonduktion als auch Vaskularisation eines Scaffolds zu initiieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Untersuchungsmethoden eingesetzt. Damit wurden adulte humane mesenchymale Stammzellen untersucht, die zur Differenzierung mit den Wachstumsfaktoren bone morphogenetic protein 2 (BMP 2) und/oder vascular endothelial growth factor (VEGF) inkubiert und auf Glas- oder Bruschitoberflächen kultiviert wurden. Die Experimente wurden mittels immunologischer Methoden wie Immunfluoreszenz (IF) und Westernblot (WB), sowie über Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert. Es konnte mit diesen Methoden gezeigt werden, dass die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) auf den verschiedenen Substraten adhärten und proliferierten. Darüber hinaus konnte in der Arbeit nachgewiesen werden, dass unter diesen bestimmten Bedingungen sowohl knöcherne als auch vaskuläre Zellbildung angeregt werden kann. So konnte sowohl auf Glas als auch auf Bruschit mittels IF und REM zum Teil aus hMSC differenzierte Osteoblasten detektiert werden. Diese zeigten die für Osteoblasten typischen Zellfortsätze, mit denen die Osteoblasten mit den Nachbarzellen in Kontakt stehen. Die beginnende Differenzierung zu Osteoblasten bzw. Endothelzellen konnte auch durch Detektion spezifischer Marker, wie z.B. alkalische Phosphatase und PECAM mittels WB gezeigt werden. Jedoch war die in dieser Arbeit zur Untersuchung der ortsgerichteten Differenzierung auf Bruschitsubstrat eingesetzte Methodik nicht geeignet, eindeutige Aussagen zu treffen. Daher müssen zur Untersuchung dieses Vorganges alternative Methoden entwickelt und optimiert werden.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine reine *in vitro* Studie. Dennoch könnten diese Ergebnisse Hinweise auf das Verhalten von hMSC unter Stimulation mit osteogenen und endothelialen Wachstumsfaktoren *in vivo* im Tierversuch oder im Menschen liefern.

Allerdings wird es bei der Übertragung auf ein kombiniertes in vitro- in vivo Vorgehen hinauslaufen, da das ungerichtete Wachstum von Gewebsformationen eine Hürde für in vivo Studien darstellt.

## 7 Literatur

- 1 *Gelinsky M.*: Calciumphosphat-Knochenzemente für die lokale Therapie von Defekten des systemisch erkrankten Knochens, im Internet: [https://www.uni-giessen.de/fbz/fb11/forschung/schwerpunkte/sfb/tr79/teilprojekte/material/projekt\\_M2](https://www.uni-giessen.de/fbz/fb11/forschung/schwerpunkte/sfb/tr79/teilprojekte/material/projekt_M2)
- 2 *O'Brien F. J.*: Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 2011; 14 (3): 88 – 95
- 3 *Kalfas I. H.*: Principles of bone healing, *Neurosurgical Focus*, 2001; 10 (4): 488 – 498
- 4 *Felsenberg D.*: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. Struktur und Funktion des Knochens, *Pharmazie in unserer Zeit*, 2001; 30 (6): 488 – 494
- 5 *Dorozhkin S. V., Epple M.*: Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002; 41 (17): 3130 – 3146
- 6 *Buddecke E.*: Grundriss der Biochemie / F R Studierende der Medizin, Zahnmedizin Und Naturwissenschaften, 3. Auflage, Berlin, De Gruyter, 1973.
- 7 *Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R, Krahn V*: Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie, 2. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2006: 9-13
- 8 *Bourne GH, Hrsg.*: The Biochemistry and Physiology of Bone / Volume II: Physiology and Pathology, 2. Auflage, New York, Academic Press, 1972: 79-120
- 9 *Soldner E., Herr G.*: Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien / Trauma und Berufskrankheit, *Trauma Berufskrankh*, 2001; 3 (4): 256 – 269
- 10 *Harder L, Kuster M*: Frakturen, Gelenk- und Weichteilverletzungen in: Grifka J., Kuster M., Hrsg., Orthopädie und Unfallchirurgie, Frakturen, Gelenk- und Weichteilverletzungen, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011: 355 – 382
- 11 *Lüllmann-Rauch R*: Histologie / Verstehen, Lernen, Nachschlagen, 10 Tabellen, Stuttgart, Thieme, 2003: 122-140
- 12 *Epple M., Schiller C., Meyer-Zaika W.; Prymak, O.; Welzel, T.*: Hart wie die Natur / Knochenimplantate aus Calciumphosphat, *Forum Forschung* 2004/2005 - Universität Duisburg - Essen, 2004 - 2005 (1): 22 – 26
- 13 *Parfitt A. M.*: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1994; 55 (3): 273 – 286
- 14 *W.S.S. Jee*: the skeletal tissues in: Weiss L., Hrsg., *Histology : cell and tissue biology, the skeletal tissues*, 5. Auflage, New York, Elsevier, 1983: 200 – 255
- 15 *Miller S. C., Jee W. S.*: The bone lining cell: a distinct phenotype?, *Calcified Tissue International*, 1987; 41 (1): 1 – 5
- 16 *Friedenstein A. J.*: Precursor cells of mechanocytes, *International Review of Cytology*, 1976; 47 (1): 327 – 359
- 17 *Caplan A. I., Bruder S. P.*: Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century, *Trends in Molecular Medicine*, 2001; 7 (6): 259 – 264

- 18 *Smeets R*: Der Einsatz neuartiger Zellträger- und Membranstrukturen zur Geweberegeneration und zum Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Habilitation, Aachen, Technische Hochschule, 2009.
- 19 *Datta H. K., Ng W. F., Walker J. A.; Tuck, S. P.; Varanasi, S. S.*: The cell biology of bone metabolism, *Journal of Clinical Pathology*, 2008; 61 (5): 577 – 587
- 20 *Marks S. C., Odgren P. R.*: Structure and Development of the Skeleton, *Principles of Bone Biologie*, 2002 (2): 3 – 15
- 21 *Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM*: Osteoblastic cell lineage in: Noda M., Hrsg., *Cellular and molecular biology of bone*, San Diego, Academic Press, 1993: 2 – 29
- 22 *Franz-Odendaal T. A., Hall B. K., Witten P. E.*: Buried alive: how osteoblasts become osteocytes, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2006; 235 (1): 176 – 190
- 23 *G. Schmidmaier, B. Wildemann*: Biologische und physiologische Grundlagen in: Gradinger R., Gollwitzer H., Hrsg., *Ossäre Integration*, Heidelberg, Springer, 2006: 24 – 29
- 24 *Miller V. J.*: The effect of age on condylar asymmetry in patients with craniomandibular disorders of arthrogenous origin, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 1992; 67 (6): 845 – 846
- 25 *Bennett M. V., Goodenough D. A.*: Gap junctions, electrotonic coupling, and intercellular communication, *Neurosciences Research Program Bulletin*, 1978; 16 (3): 1 – 486
- 26 *Miller S. C., Bowman B. M., Smith J. M.; Jee, W. S.*: Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles, *The Anatomical Record*, 1980; 198 (2): 163 – 173
- 27 *Miller S. C., Saint-Georges L. de, Bowman B. M.; Jee, W. S.*: Bone lining cells: structure and function, *Scanning Microscopy*, 1989; 3 (3): 953 – 960
- 28 *Doty S. B.*: Morphological evidence of gap junctions between bone cells, *Calcified Tissue International*, 1981; 33 (5): 509 – 512
- 29 *Walker D. G.*: Enzymatic and electron microscopic analysis of isolated osteoclasts, *Calcified Tissue Research*, 1972; 9 (4): 296 – 309
- 30 *Teitelbaum S. L.*: Bone resorption by osteoclasts, *Science*, 2000; 289 (5484): 1504 – 1508
- 31 *Boyce B. F., Xing L.*: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin, *Arthritis Research & Therapy*, 2007; 9 (1): 1 – 7
- 32 *Hulth A.*: Current concepts of fracture healing, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1989 (249): 265 – 284
- 33 *DeLacure M. D.*: Physiology of bone healing and bone grafts, *Otolaryngologic Clinics of North America*, 1994; 27 (5): 859 – 874
- 34 *Lieberman J. R., Daluiski A., Einhorn T. A.*: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2002; 84-A (6): 1032 – 1044

- 35 Hill P. A., Tumber A., Papaioannou S.; Meikle, M. C.: The cellular actions of interleukin-11 on bone resorption in vitro, *Endocrinology*, 1998; 139 (4): 1564 – 1572
- 36 Li Y., Toraldo G., Li A.; Yang, X.; Zhang, H.; Qian, W.-P.; Weitzmann, M. N.: B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo, *Blood*, 2007; 109 (9): 3839 – 3848
- 37 Biase P. de, Capanna R.: Clinical applications of BMPs, *Injury*, 2005; 36 (3): 43 – 46
- 38 Kang Q., Sun M. H., Cheng H.; Peng, Y.; Montag, A. G.; Deyrup, A. T.; Jiang, W.; Luu, H. H.; Luo, J.; Szatkowski, J. P.; Vanichakarn, P.; Park, J. Y.; Li, Y.; Haydon, R. C.; He, T.-C.: Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery, *Gene Therapy*, 2004; 11 (17): 1312 – 1320
- 39 Kübler N. R.: Osteoinduktion und- reparation, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 1997 (1): 2 – 25
- 40 Austermann KH: Frakturen des Gesichtsschädels in: Schwenzer N., Ehrenfeld M., Austermann K. H., Hrsg., *Spezielle Chirurgie*, 3. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2002: 275 – 286
- 41 Zerwekh JE: Bone Growth, Remodeling, and Repair: Interactions of Parathyroid Hormone, Calcitonin, Vitamin D, Growth Factors, and the Prostaglandins in: Foà P. P., Hrsg., *Humoral Factors in the Regulation of Tissue Growth, Blood, Blood Vessels, Skeletal System, and Teeth*, New York, NY, Springer New York, 1993: 160 – 193
- 42 Zilch H, Weber U: *Lehrbuch Orthopädie mit Repetitorium*, Berlin, Walter de Gruyter, 1989: 49-58
- 43 Marsell R., Einhorn T. A.: The biology of fracture healing, *Injury*, 2011; 42 (6): 551 – 555
- 44 McKibbin B.: The biology of fracture healing in long bones, *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 1978; 60-B (2): 150 – 162
- 45 Perren S. M.: Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1979; 1 (138): 175 – 196
- 46 Krischak G, Hrsg.: *Traumatologie für Physiotherapeuten*, 2. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2009.
- 47 Shi S., de Gorter D. J. J., Hoogaars W. M.; 't Hoen, P. A. C.; Dijke, P.: Overactive bone morphogenetic protein signaling in heterotopic ossification and Duchenne muscular dystrophy, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013; 70 (3): 407 – 423
- 48 Bramlage C. P., Häupl T., Kaps C.; Bramlage, P.; Müller, G.-A.; Strutz, F.: Bone Morphogenetic Proteins im Skelettsystem, *Zeitschrift für Rheumatologie*, 2005; 64 (6): 416 – 422
- 49 Groeneveld E., Burger E.: Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration, *European Journal of Endocrinology*, 2000; 142 (1): 9 – 21

- 50 Miyazono K., Kamiya Y., Morikawa M.: Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction, *Journal of Biochemistry*, 2010; 147 (1): 35 – 51
- 51 Dijke P., Fu J., Schaap P.; Roelen, B. A.: Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2003; 85-A (3): 34 – 38
- 52 Steinmeyer J.: Bone morphogenetic proteins (BMP), *Lexikon Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2014 (1): 1
- 53 Sykaras N., Opperman L. A.: Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?, *Journal of Oral Science*, 2003; 45 (2): 57 – 73
- 54 Zhao G.-Q.: Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse, *Genesis*, 2003; 35 (1): 43 – 56
- 55 Di Chen, Zhao M., Mundy G. R.: Bone morphogenetic proteins, *Growth Factors*, 2004; 22 (4): 233 – 241
- 56 Wagner D. O., Sieber C., Bhushan R.; Börgermann, J. H.; Graf, D.; Knaus, P.: BMPs: from bone to body morphogenetic proteins, *Science Signaling*, 2010; 3 (107): 1 – 6
- 57 Kaneko H., Arakawa T., Mano H.; Kaneda, T.; Ogasawara, A.; Nakagawa, M.; Toyama, Y.; Yabe, Y.; Kumegawa, M.; Hakeda, Y.: Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts, *Bone*, 2000; 27 (4): 479 – 486
- 58 Dyer L. A., Pi X., Patterson C.: The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction, *Trends in endocrinology and metabolism*, 2014; 25 (9): 472 – 480
- 59 Wozney J., Rosen V., Celeste A.; Mitsock, L.; Whitters, M.; Kriz, R.; Hewick, R.; Wang, E.: Novel regulators of bone formation / Molecular clones and activities, *Science*, 1988; 242 (4885): 1528 – 1534
- 60 Wozney J. M.: Bone Morphogenetic Proteins, *Progress in Growth Factor Research*, 1989; 1 (4): 267 – 280
- 61 Regauer M: Knochenneubildung und Knochendefektheilung durch den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor Osteogenic Protein-1 (BMP-7), Dissertation, Abteilung Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München, 2009.
- 62 Tilp S, Alt V, Schneider D, Obert M, Schnettler R, Hrsg.: BMP-2 weist eine hohe angiogenetische Potenz auf - Eine in vitro und in vivo Studie an Mäusen, *German Medical Science*; Düsseldorf, 2011.
- 63 Brochhausen C., Lehmann M., Zehbe R.; Watzler, B.; Grad, S.; Meurer, A.; Kirkpatrick, C. J.: Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle zur Anwendung im "Tissue Engineering" / Targeting und innovative Releasesysteme, *Der Orthopäde*, 2009; 38 (11): 1053 – 1062
- 64 Bandyopadhyay A., Tsuji K., Cox K.; Harfe, B. D.; Rosen, V.; Tabin, C. J.: Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4 and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis, *PLoS genetics*, 2006; 2 (12): e216

- 65 Jena N., Martín-Seisdedos C., McCue P.; Croce, C. M.: BMP7 Null Mutation in Mice / Developmental Defects in Skeleton, Kidney, and Eye, *Experimental Cell Research*, 1997; 230 (1): 28 – 37
- 66 Cao X., Di Chen: The BMP signaling and in vivo bone formation, *Gene*, 2005; 357 (1): 1 – 8
- 67 Koch H., Jadowiec J. A., Whalen J. D.; Robbins, P.; Lattermann, C.; Fu, F. H.; Merk, H. R.; Hollinger, J. O.: Osteoblastäre Differenzierung von humanen adulten mesenchymalen Stammzellen durch transgenes BMP-2 in Abwesenheit von Dexamethason, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 2005; 143 (6): 684 – 690
- 68 Huang Z., Ren P.-G., Ma T.; Smith, R. L.; Goodman, S. B.: Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability, *Cytokine*, 2010; 51 (3): 305 – 310
- 69 Linkhart T. A., Mohan S., Baylink D. J.: Growth factors for bone growth and repair / IGF, TGF $\beta$  and BMP, *Bone*, 1996; 19 (1): 1 – 12
- 70 Azari K., Doll B. A., Sfeir C.; Mu, Y.; Hollinger, J. O.: Therapeutic potential of bone morphogenetic proteins, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2001; 10 (9): 1677 – 1686
- 71 Becker K.: Osteoinduktive Substanzen und Faktoren in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, *Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK)*, 2006 (1): 1 – 7
- 72 Kübler N. R., Würzler K. K., Reuther J. F.; Sieber, E.; Kirchner, T.; Seebald, W.: Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs / Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2000; 4 (2): 465 – 469
- 73 Chen G., Deng C., Li Y.-P.: TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation, *International journal of biological sciences*, 2012; 8 (2): 272 – 288
- 74 Müller T., Seebald W.: Knochenbildende Proteine / Wie BMPs (bone morphogenetic proteins) ihre Rezeptoren binden und aktivieren, *BIOspektrum*, 2007 (13): 236 – 240
- 75 Kübler N. R.: Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), *Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität* 2002, 2002 (1): 91 – 103
- 76 Griffith D. L., Keck P. C., Sampath T. K.; Rueger, D. C.; Carlson, W. D.: Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996; 93 (2): 878 – 883
- 77 Matthews S. J.: Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMP's), *Injury*, 2005; 36 (3): 34 – 37

- 78 *Sakou T.*: Bone Morphogenetic Proteins / From Basic Studies to Clinical Approaches, *Bone*, 1998; 22 (6): 591 – 603
- 79 *Scheufler C., Sebald W., Hülsmeier M.*: Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, 1999; 287 (1): 103 – 115
- 80 *Lee J.-H., Kim C.-S., Choi K.-H.; Jung, U.-W.; Yun, J.-H.; Choi, S.-H.; Cho, K.-S.*: The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*, *Biomaterials*, 2010; 31 (13): 3512 – 3519
- 81 *Kübler N. R.*: Herstellung und Biologie der bone morphogenetic proteins, *Biomaterialien*, 2000; 1 (1): 12 – 18
- 82 *Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D. T.*: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science*, 1989; 246 (4935): 1309 – 1312
- 83 *Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J.*: The biology of VEGF and its receptors, *Nature Medicine*, 2003; 9 (6): 669 – 676
- 84 *Spector J. A., Mehrara B. J., Greenwald J. A.; Saadeh, P. B.; Steinbrech, D. S.; Bouletreau, P. J.; Smith, L. P.; Longaker, M. T.*: Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment, *American journal of physiology. Cell Physiology*, 2001; 280 (1): 80
- 85 *Kalka C., Asahara T., Krone W.; Isner, J. M.*: Angiogenese und Vaskulogenese Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation, *Herz*, 2000; 25 (6): 611 – 622
- 86 *Kleinheinz J., Wiesmann H.-P., Stratmann U.; Joos, U.*: Beurteilung der Angiogenese und Osteogenese unter dem Einfluss von Vascular endothelial growth factor (VEGF), *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2002; 6 (3): 175 – 182
- 87 *Kroll J., Waltenberger J.*: Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A), *Zeitschrift für Kardiologie*, 2000; 89 (3): 206 – 218
- 88 *Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N.*: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, 1989; 246 (4935): 1306 – 1309
- 89 *Ferrara N., Houck K. A., Jakeman L. B.; Winer, J.; Leung, D. W.*: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1991; 47 (3): 211 – 218
- 90 *Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S.; Poltorak, Z.*: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb journal*, 1999; 13 (1): 9 – 22
- 91 *Ylä-Herttuala S., Rissanen T. T., Vajanto I.; Hartikainen, J.*: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine, *Journal of the American College of Cardiology*, 2007; 49 (10): 1015 – 1026

- 92 Ostendorf T., Kunter U., Eitner F.; Loos, A.; Regele, H.; Kerjaschki, D.; Henninger, D. D.; Janjic, N.; Floege, J.: VEGF165 mediates glomerular endothelial repair, *Journal of Clinical Investigation*, 1999; 104 (7): 913 – 923
- 93 *Medscape Ophthalmology*: Targeting Vascular Endothelial Growth Factor in Retinal Disease, im Internet: <http://www.medscape.org/viewarticle/560009>
- 94 Henry T. D., Annex B. H., McKendall G. R.; Azrin, M. A.; Lopez, J. J.; Giordano, F. J.; Shah, P. K.; Willerson, J. T.; Benza, R. L.; Berman, D. S.; Gibson, C. M.; Bajamonde, A.; Rundle, A. C.; Fine, J.; McCluskey, E. R.: The Viva trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis, *Circulation*, 2003; 107 (10): 1359 – 1365
- 95 Kumar A. H., Martin K., Doyle B.; Huang, C.-L.; Pillai, G.-K. M.; Ali, M. T.; Skelding, K. A.; Wang, S.; Gleeson, B. M.; Jahangeer, S.; Ritman, E. L.; Russell, S. J.; Caplice, N. M.: Intravascular cell delivery device for therapeutic VEGF-induced angiogenesis in chronic vascular occlusion, *Biomaterials*, 2014; 35 (32): 9012 – 9022
- 96 Banai S., Shweiki D., Pinson A.; Chandra, M.; Lazarovici, G.; Keshet, E.: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis, *Cardiovascular Research*, 1994; 28 (8): 1176 – 1179
- 97 Dimova I., Popivanov G., Djonov V.: Angiogenesis in cancer - general pathways and their therapeutic implications, *Journal of the Balkan Union of Oncology*, 2014; 19 (1): 15 – 21
- 98 Bouletreau P., Warren S., Spector J.; Peled, Z.; Gerrets, R.; Greenwald, J.; Longaker, M.: Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2002; 109 (7): 2384 – 2397
- 99 Decker B., Bartels H., Decker S.: Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic, *The Anatomical Record*, 1995; 242 (3): 310 – 320
- 100 Bilic-Curcic I., Kalajzic Z., Wang L.; Rowe, D. W.: Origins of endothelial and osteogenic cells in the subcutaneous collagen gel implant, *Bone*, 2005; 37 (5): 678 – 687
- 101 Samee M., Kasugai S., Kondo H.; Ohya, K.; Shimokawa, H.; Kuroda, S.: Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation, *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008; 108 (1): 18 – 31
- 102 Filvaroff E.H.: VEGF and bone, *J Musculoskel Neuron Interact*, 2003; 3 (4): 304 – 3007
- 103 Zhang W., Zhu C., Wu Y.; Ye, D.; Wang, S.; Zou, D.; Zhang, X.; Kaplan, D. L.; Jiang, X.: VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation, *European Cells and Materials*, 2014; 27 (1): 1

- 104 *Scheuermann A.*: Durchschnittlicher Aufenthalt im Krankenhaus: 8,1 Tage, Destatis, 2013; 359 (13): 1 – 2
- 105 *Giannoudis P. V., Dinopoulos H., Tsiridis E.*: Bone substitutes: an update, *Injury*, 2005; 36 (3): 20 – 27
- 106 *Wang P., Zhao L., Liu J.; Weir, M. D.; Zhou, X.; Xu, H. H.*: Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells, *Bone Research*, 2014; 2: 14017
- 107 *Spicer P. P., Kretlow J. D., Young S.; Jansen, J. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G.*: Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect, *Nature Protocols*, 2012; 7 (10): 1918 – 1929
- 108 *Garcia P., Franz D., Raschke M.*: Knochenersatzmaterialien - Grundlagen und klinischer Nutzen, *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2014; 152 (2): 152 – 160
- 109 *Ollier L.*: Traite experimentel et clinique de la regeneration des os et de la production artificielle du tissu osseux, Harvard Medical Library in the Francis A.Countway Library of Medicine - Boston, 1867
- 110 *Smeets R, Kolk A*: Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien – Teil 1, ZMK-aktuell.de, Zahnheilkunde, im Internet: <http://www.zmk-aktuell.de/dynamic/zahnheilkunde/implantologie/story/osteokonduktive-und-induktive-knochenersatzmaterialien-teil-1.html>; Stand: 06.10.2015
- 111 *Lüthkehermölle W., Behrens P., Burch S*: Biomaterialien für die Knochenregeneration in: Wintermantel E., Ha S. W., Hrsg., *Medizintechnik, Biomaterialien für die Knochenregeneration, Life Science Engineering (German Edition)*, 4. Auflage, Dordrecht, Springer, 2008: 1365 – 1378
- 112 *Le Guéhennec L., Layrolle P., Daculsi G.*: A review of bioceramics and fibrin sealant, *European Cells and Materials*, 2004; 8 (1): 1 – 10
- 113 *Lane J. M., Tomin E., Bostrom M. P.*: Biosynthetic bone grafting, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1999 (367): 107 – 117
- 114 *Scaduto A. A., Lieberman J. R.*: Gene therapy for osteoinduction, *The Orthopedic Clinics of North America*, 1999; 30 (4): 625 – 633
- 115 *Bauer T. W., Muschler G. F.*: Bone graft materials. An overview of the basic science, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2000 (371): 10 – 27
- 116 *Horch H. H., Sader R., Kolk A.*: Synthetische, phasenreine Beta-Trikalziumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer / Eine klinische Langzeitstudie mit Literaturübersicht, *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 2004 (59): 680 – 686
- 117 *Zhang J., Liu W., Schnitzler V.; Tancret, F.; Bouler, J.-M.*: Calcium phosphate cements for bone substitution / Chemistry, handling and mechanical properties, *Acta Biomaterialia*, 2014; 10 (3): 1035 – 1049
- 118 *Oryan A., Alidadi S., Moshiri A.; Maffulli, N.*: Bone regenerative medicine / Classic options, novel strategies, and future directions, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2014; 9 (1): 18

- 119 *Laurencin C., Khan Y., El-Amin S. F.*: Bone graft substitutes, *Expert Review of Medical Devices*, 2006; 3 (1): 49 – 57
- 120 *Nogami H., Urist M. R.*: Transmembrane bone matrix gelatin-induced differentiation of bone, *Calcified Tissue Research*, 1975; 19 (1): 153 – 163
- 121 *Petite H., Viateau V., Bensaïd W.; Meunier, A.; Pollak, C. de; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L.; Guillemain, G.*: Tissue-engineered bone regeneration, *Nature Biotechnology*, 2000; 18 (9): 959 – 963
- 122 *Schneider R. K., Neuss S., Knüchel R.; Perez-Bouza, A.*: Mesenchymale Stammzellen für das "tissue engineering" des Knochens, *Der Pathologe*, 2010; 31 (2): 138 – 146
- 123 *Gbureck U., Barralet J. E., Grover L. M.; Hofmann, M.; Thull, R.*: Mechanische Festigkeit und Porosität von Calciumphosphat-Zementen, *Biomaterialien*, 2003 (4): 258 – 263
- 124 *Mai R., Reinsdorf A., Pilling E.; Lauer, G.; Gelinsky, M.; Eckelt, U.*: Frei modellierbare Hydroxylapatit-Kollagen-Komposite zur Sanierung ossärer Defekte, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2005; 9 (1): 12 – 17
- 125 *Helf C.*: Herstellung von Polymethacrylat/Calciumphosphat- Implantatwerkstoffen durch den 3D-Pulverdruck, *Dissertation, Abteilung Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*, 2009.
- 126 *Gebhardt A.*: Generative Fertigungsverfahren / Additive Manufacturing und 3D-Drucken für Prototyping - Tooling - Produktion, 5. Auflage, München, Hanser, 2016.
- 127 *Khalyfa A., Vogt S., Weisser J.; Grimm, G.; Rechtenbach, A.; Meyer, W.; Schnabelrauch, M.*: Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2007; 18 (5): 909 – 916
- 128 *Castilho M., Moseke C., Ewald A.; Gbureck, U.; Groll, J.; Pires, I.; Teßmar, J.; Vorndran, E.*: Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects, *Biofabrication*, 2014; 6 (1): 15006
- 129 *Castilho M., Dias M., Gbureck U.; Groll, J.; Fernandes, P.; Pires, I.; Gouveia, B.; Rodrigues, J.; Vorndran, E.*: Fabrication of computationally designed scaffolds by low temperature 3D printing, *Biofabrication*, 2013; 5 (3): 35012
- 130 *LeGeros R. Z.*: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2002 (395): 81 – 98
- 131 *Claes L., Hoellen I., Ignatius A.*: Resorbierbare Knochenzemente, *Der Orthopäde*, 1997; 26 (5): 459 – 462
- 132 *Vorndran E.*: Rapid-Prototyping hydraulisch härtender Calcium- und Magnesiumphosphatzemente mit lokaler Wirkstoffmodifikation, *Dissertation, Fakultät für Physik und Astronomie, Julius-Maximilians-Universität*, 2011.
- 133 *Fernández E., Gil F. J., Ginebra M. P.; Driessens, F. C.; Planell, J. A.; Best, S. M.*: Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: precipitate

- formation during setting reactions, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 1999; 10 (3): 177 – 183
- 134 *Perez R. A., Kim H.-W., Ginebra M.-P.*: Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements, *Journal of Tissue Engineering*, 2012; 3 (1): 1 – 20
- 135 *Driessens F. C., Planell J. A., Boltong M. G.; Khairoun, I.; Ginebra, M. P.*: Osteotransductive bone cements, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 1998; 212 (6): 427 – 435
- 136 *Frayssinet P., Gineste L., Conte P.; Fages, J.; Rouquet, N.*: Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 1998; 19 (11-12): 971 – 977
- 137 *Bohner M., Gbureck U., Barralet J. E.*: Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment, *Biomaterials*, 2005; 26 (33): 6423 – 6429
- 138 *Fukase Y., Eanes E. D., Takagi S.; Chow, L. C.; Brown, W. E.*: Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements, *Journal of Dental Research*, 1990; 69 (12): 1852 – 1856
- 139 *Gbureck, U., Dembski S., Barralet J. E.; Thull, R.*: Bruschi-Knochenzemente aus biphasigen  $\beta$ -Tricalciumphosphat/ Calciumpyrophosphat Keramiken, *Biomaterialien*, 2004 (5(4): 255 – 260
- 140 *Munting E., Mirtchi A. A., Lemaitre J.*: Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement / An in vivo study, *Journal of Materials Science*, 1993; 4 (3): 337 – 344
- 141 *Samavedi S., Whittington A. R., Goldstein A. S.*: Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering / A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomaterialia*, 2013; 9 (9): 8037 – 8045
- 142 *Schildhauer T. A., Gekle C. J., Muhr G.*: Neue Biomaterialien am Skelettsystem, *Chirurg*, 1999; 70 (8): 888 – 896
- 143 *Pistner H., Reuther J., Reinhart E.; Kübler, N. R.; Priessnitz, B.*: Neuer Hydroxylapatitzement für die kraniofaciale Chirurgie, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 1998; 2 (1): 37 – 40
- 144 *Piesold J.-U., Merwald M., Braxein K.; Pistner, H.*: Schnell abbindender Kalziumphosphatzement für die kranio-maxillofaziale Chirurgie. Erfahrungen über sechs Jahre, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2004; 8 (1): 5 – 11
- 145 *Gamblin A.-L., Brennan M. A., Renaud A.; Yagita, H.; Lézot, F.; Heymann, D.; Trichet, V.; Layrolle, P.*: Bone tissue formation with human mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics / The local implication of osteoclasts and macrophages, *Biomaterials*, 2014; 35 (36): 9660 – 9667
- 146 *Sugawara A., Asaoka K., Ding S.-J.*: Calcium phosphate-based cements / Clinical needs and recent progress, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013; 1 (8): 1081 – 1089

- 147 *Schnürer S. M., Gopp U., Kühn K.-D.; Breusch, S. J.*: Knochenersatzwerkstoffe, *Der Orthopäde*, 2003; 32 (1): 2 – 10
- 148 *Xia Z., Grover L. M., Huang Y.; Adamopoulos, I. E.; Gbureck, U.; Triffitt, J. T.; Shelton, R. M.; Barralet, J. E.*: In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line, *Biomaterials*, 2006; 27 (26): 4557 – 4565
- 149 *Takagi S., Chow L. C., Ishikawa K.*: Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements, *Biomaterials*, 1998; 19 (17): 1593 – 1599
- 150 *Henkel K.-O., Gerber T., Dietrich W.; Bienengraber, V.*: Neuartiges Knochenaufbaumaterial auf Kalziumphosphatbasis. Erste In-vivo-Langzeitergebnisse, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2004; 8 (5): 277 – 281
- 151 *Laurence C. Chow, Shozo Takagi*: Self-setting calcium phosphate cements and methods for preparing and using them [Patentschrift] (US5525148 A), Sep 24, 1993.
- 152 *Kissling S., Seidenstuecker M., Pilz I. H.; Suedkamp, N. P.; Mayr, H. O.; Bernstein, A.*: Sustained release of rhBMP-2 from microporous tricalciumphosphate using hydrogels as a carrier, *BMC Biotechnology*, 2016; 16 (1): 44
- 153 *Gbureck U., Rösch P., Thull R.*: Einfluss von Aminosäuren auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Calcium-Phosphat-Zementen, *Biomaterialien*, 2006; 7 (4): 271 – 277
- 154 *Bohner M.*: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*, 2000; 31 (4): 37 – 47
- 155 *Bangert K.*: Herstellung und Charakterisierung von Calciumorthosphaten für die Anwendung als Knochenersatzwerkstoffe, Dissertation, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, 2005.
- 156 *Jensen S. S., Broggin N., Hjørting-Hansen E.; Schenk, R.; Buser, D.*: Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs, *Clinical Oral Implants Research*, 2006; 17 (3): 237 – 243
- 157 *Berger G., Gildenhaar R.*: Resorbierbarer Knochenersatz auf der Basis von Calciumphosphaten, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 1995; 26 (7): 379 – 385
- 158 *Bohner M., van Landuyt P., Merkle H. P.; Lemaitre, J.*: Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 1997; 8 (11): 675 – 681
- 159 *Grover L. M., Knowles J. C., Fleming G. J.; Barralet, J. E.*: In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 2003; 24 (23): 4133 – 4141
- 160 *Charrière E., Terrazoni S., Pittet C.; Mordasini, P. H.; Dutoit, M.; Lemaître, J.; Zysset, P. H.*: Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements, *Biomaterials*, 2001; 22 (21): 2937 – 2945

- 161 *Ishikawa K., Takagi S., Chow L. C.; Ishikawa, Y.; Eanes, E. D.; Asaoka, K.:* Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro, *Dental Materials*, 1994; 10 (1): 26 – 32
- 162 *Bohner M., Merkle H. P., Landuyt P. V.; Trophard, G.; Lemaitre, J.:* Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2000; 11 (2): 111 – 116
- 163 *Langer R., Vacanti J. P.:* Tissue engineering, *Science*, 1993; 260 (5110): 920 – 926
- 164 *Orban J. M., Marra K. G., Hollinger J. O.:* Composition options for tissue-engineered bone, *Tissue engineering*, 2002; 8 (4): 529 – 539
- 165 *Schmidt-Rohlfing B., Tzioupis C., Menzel C. L.; Pape, H. C.:* Tissue Engineering von Knochengewebe: Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten, *Der Unfallchirurg*, 2009; 112 (9): 785 – 794
- 166 *Shinoka T., Shum-Tim D., Ma P. X.; Tanel, R. E.; Isogai, N.; Langer, R.; Vacanti, J. P.; Mayer, J. E.:* Creation Of Viable Pulmonary Artery Autografts Through Tissue Engineering, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1998; 115 (3): 536 – 546
- 167 *Frerich B., Kurtz-Hoffmann J., Lindemann N.; Müller, S.:* Untersuchungen zum Tissue engineering vaskularisierter knöcherner und weichgewebiger Transplantate, *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2000; 4 (S2): 490 – 495
- 168 *Joussen A. M., Kirchhof B., Gottstein C.:* Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Möglichkeiten antiangiogener Therapie, *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 2003; 100 (4): 284 – 291
- 169 *Richter W.:* Stammzellen in der Knorpelforschung, *Aktuelle Traumatologie*, 2005; 35 (5): 249 – 254
- 170 *Schöler H. R.:* Das Potenzial von Stammzellen. Eine Bestandsaufnahme, *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 2004; 47 (6): 565 – 577
- 171 *Glenn J. D., Whartenby K. A.:* Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy, *World Journal of Stem Cells*, 2014; 6 (5): 526 – 539
- 172 *Caplan A. I.:* Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine, *Journal of Cellular Physiology*, 2007; 213 (2): 341 – 347
- 173 *Eblenkamp M, Neuss-Stein S, Salber S, Jacobs VR, Wintermantel E:* Stammzellen in: Wintermantel E., Ha S.-W., Hrsg., *Medizintechnik*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2009: 443 – 471
- 174 *Müller LP:* Stammzellen und ihre Bedeutung für die Onkologie in: Schmoll H.-J., Höffken K., Possinger K., Hrsg., *Kompodium Internistische Onkologie*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2006: 2333 – 2359
- 175 *Brehm W.:* Stammzellen, Stammzelltherapie – Begriffsklärung, Zusammenhänge und mögliche klinische Anwendungen, 2006 (22): 259 – 267

- 176 *Zimmermann W.-H.*: Individualisierte Therapie mit Stammzellen, *Herz*, 2014; 39 (2): 201 – 205
- 177 *Bartsch G., Frimberger D.*: Embryonale und adulte Stammzellen für Tissue Engineering in der Urologie, *Der Urologe*. Ausg. A, 2004; 43 (10): 1229 – 1236
- 178 *Beier HM*: Totipotenz und Pluripotenz: Von der klassischen Embryologie zu neuen Therapiestrategien in: Raem A. M., Braun R. W., Fenger H., Michaelis W., Nikol S., Winter S. F., Hrsg., *Gen-Medizin, Eine Bestandsaufnahme*, Berlin, Heidelberg, Springer, 2001: 63 – 79
- 179 *Rosler E. S., Fisk G. J., Ares X.; Irving, J.; Miura, T.; Rao, M. S.; Carpenter, M. K.*: Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions, *Developmental Dynamics*, 2004; 229 (2): 259 – 274
- 180 *Evans M. J., Kaufman M. H.*: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981; 292 (5819): 154 – 156
- 181 *Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M.*: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 1998; 282 (5391): 1145 – 1147
- 182 *Fehrer C., Lepperdinger G.*: Mesenchymal stem cell aging, *Experimental gerontology*, 2005; 40 (12): 926 – 930
- 183 *Bonab M. M., Alimoghaddam K., Talebian F.; Ghaffari, S. H.; Ghavamzadeh, A.; Nikbin, B.*: Aging of mesenchymal stem cell in vitro, *BMC Cell Biology*, 2006; 7 (1): 14
- 184 *Trombi L., Mattii L., Pacini S.; D'Alessandro, D.; Battolla, B.; Orciuolo, E.; Buda, G.; Fazzi, R.; Galimberti, S.; Petrini, M.*: Human autologous plasma-derived clot as a biological scaffold for mesenchymal stem cells in treatment of orthopedic healing, *Journal of Orthopaedic Research*, 2008; 26 (2): 176 – 183
- 185 *Tögel F., Lange C., Zander, A. R.; Westenfelder, C.*: Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark, *Deutsches Ärzteblatt*, 2007; 104 (23): 1663 – 1670
- 186 *Sellheyer K., Krahl D.*: Mesenchymale Stammzellen der Haut / Gegenwärtiger Stand der Forschung, potenzielle klinische Anwendungen, *Hautarzt*, 2010; 61 (5): 429 – 434
- 187 *Schneider R. K., Knüchel R., Neuss S.*: Mesenchymale Stammzellen und ihre Interaktionen mit Biomaterialien, *Pathologe*, 2011; 32 (2): 296 – 303
- 188 *Holtzhauer M.*: *Biochemische Labormethoden / Arbeitsvorschriften und Tabellen*, Berlin, Heidelberg, Springer, 1988.
- 189 *DeLisser H. M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R. M.; Burdick, M. D.; Robinson, C. S.; Wexler, R. S.; Kerr, J. S.; Garlanda, C.; Merwin, J. R.; Madri, J. A.; Albelda, S. M.*: Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis, *The American Journal of Pathology*, 1997; 151 (3): 671 – 677
- 190 *Muller W. A., Weigl S. A., Deng X.; Phillips, D. M.*: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes, *The Journal of Experimental Medicine*, 1993; 178 (2): 449 – 460

- 191 Newman P. J.: The biology of PECAM-1, *The Journal of Clinical Investigation*, 1997; 99 (1): 3 – 8
- 192 Wada S, Fukawa T, Kamiya S: Osteocalcin and bone, *Clinical Calcium*, 2007; 17 (11): 1673 – 1677
- 193 Cepelak I, Cvoriscec D.: Biochemical markers of bone remodeling - review, *Biochemia Medica*, 2009 (1): 17 – 35
- 194 *Science Cell Research Laboratories*: Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, im Internet: <http://www.sciencellonline.com/human-bone-marrow-derived-mesenchymal-stem-cells.html>
- 195 Funk J. F., Matziolis G., Krockner D.; Perka, C.: Klinische Anwendung von autologen Periostzellen zur Förderung der Knochenheilung bei atropher Pseudarthrose - Kasuistik / Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union, *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2007; 145 (6): 790 – 794
- 196 Liechty K. W., MacKenzie T. C., Shaaban A. F.; Radu, A.; Moseley, A. M.; Deans, R.; Marshak, D. R.; Flake, A. W.: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, *Nature Medicine*, 2000; 6 (11): 1282 – 1286
- 197 Ohgushi H., Goldberg V. M., Caplan A. I.: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1989; 60 (3): 334 – 339
- 198 Bruder S. P., Fink D. J., Caplan A. I.: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1994; 56 (3): 283 – 294
- 199 Bruder S. P., Jaiswal N., Riccalton N. S.; Mosca, J. D.; Kraus, K. H.; Kadiyala, S.: Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998 (355): 247 – 256
- 200 Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kon, E.; Marcacci, M.: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, *The New England Journal of Medicine*, 2001; 344 (5): 385 – 386
- 201 Bertram H: Untersuchung zur Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen, Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2002.
- 202 Feng D., Nagy J. A., Pyne K.; Dvorak, H. F.; Dvorak, A. M.: Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium, *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2004; 52 (1): 87 – 101
- 203 Gade T. P., Motley M. W., Beattie B. J.; Bhakta, R.; Boskey, A. L.; Koutcher, J. A.; Mayer-Kuckuk, P.: Imaging of alkaline phosphatase activity in bone tissue, *PloS one*, 2011; 6 (7): e22608

- 204 Duarte P. M., Goncalves P. F., Sallum A. W.; Sallum, E. A.; Casati, M. Z.; Humberto Nociti, F., JR: Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats, *Journal of Periodontal Research*, 2004; 39 (2): 107 – 110
- 205 Prins H.-J., Braat A. K., Gawlitta D.; Dhert, W. J.; Egan, D. A.; Tijssen-Slump, E.; Yuan, H.; Coffey, P. J.; Rozemuller, H.; Martens, A. C.: In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells, *Stem Cell Research*, 2014; 12 (2): 428 – 440
- 206 Long F.: Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage, *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2012; 13 (1): 27 – 38
- 207 Soicher M. A., Christiansen B. A., Stover S. M.; Leach, J. K.; Yellowley, C. E.; Griffiths, L. G.; Fyhrie, D. P.: Remineralized bone matrix as a scaffold for bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2014; 102 (12): 4480 – 4490
- 208 Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I.; Bruder, S. P.: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997; 64 (2): 295 – 312
- 209 Jørgensen N. R., Henriksen Z., Sørensen O. H.; Civitelli, R.: Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts, *Steroids*, 2004; 69 (4): 219 – 226
- 210 Cheng S. L., Yang J. W., Rifas L.; Zhang, S. F.; Avioli, L. V.: Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone, *Endocrinology*, 1994; 134 (1): 277 – 286
- 211 Chen T. L.: Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment, *Bone*, 2004; 35 (1): 83 – 95
- 212 Eijken M., Koedam M., van Driel M.; Buurman, C. J.; Pols, H. A.; van Leeuwen, J P T M: The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006; 248 (1): 87 – 93
- 213 Liu Y., Porta A., Peng X.; Gengaro, K.; Cunningham, E. B.; Li, H.; Dominguez, L. A.; Bellido, T.; Christakos, S.: Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k, *Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2004; 19 (3): 479 – 490
- 214 Coelho M.J., Fernandes M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II / Effect of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials*, 2000; 21 (11): 1095 – 1102
- 215 Langenbach F., Handschel J.: Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro, *Stem cell research & therapy*, 2013; 4 (5): 117

- 216 Yuasa M., Yamada T., Taniyama T.; Masaoka, T.; Xuetao, W.; Yoshii, T.; Horie, M.; Yasuda, H.; Uemura, T.; Okawa, A.; Sotome, S.: Dexamethasone enhances osteogenic differentiation of bone marrow- and muscle-derived stromal cells and augments ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2, *PloS one*, 2015; 10 (2): e0116462
- 217 Rickard D. J., Sullivan T. A., Shenker B. J.; Leboy, P. S.; Kazhdan, I.: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2, *Developmental Biology*, 1994; 161 (1): 218 – 228
- 218 Owen T. A., Aronow M., Shalhoub V.; Barone, L. M.; Wilming, L.; Tassinari, M. S.; Kennedy, M. B.; Pockwinse, S.; Lian, J. B.; Stein, G. S.: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix, *Journal of Cellular Physiology*, 1990; 143 (3): 420 – 430
- 219 Lin C.-Y., Chang Y.-H., Lin K.-J.; Yen, T.-C.; Tai, C.-L.; Chen, C.-Y.; Lo, W.-H.; Hsiao, I.-T.; Hu, Y.-C.: The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 2010; 31 (12): 3222 – 3230
- 220 Peng H., Usas A., Olshanski A.; Ho, A. M.; Gearhart, B.; Cooper, G. M.; Huard, J.: VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis, *Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2005; 20 (11): 2017 – 2027
- 221 Zhang W., Wang X., Wang S.; Zhao, J.; Xu, L.; Zhu, C.; Zeng, D.; Chen, J.; Zhang, Z.; Kaplan, D. L.; Jiang, X.: The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF(165) and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor, *Biomaterials*, 2011; 32 (35): 9415 – 9424
- 222 Keramaris N. C., Calori G. M., Nikolaou V. S.; Schemitsch, E. H.; Giannoudis, P. V.: Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF, *Injury*, 2008; 39 Suppl 2: 57
- 223 Colter D. C., Sekiya I., Prockop D. J.: Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001; 98 (14): 7841 – 7845
- 224 Zohar R., Sodek J., McCulloch C. A.: Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry, *Blood*, 1997; 90 (9): 3471 – 3481
- 225 Ducey P., Schinke T., Karsenty G.: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance, *Science*, 2000; 289 (5484): 1501 – 1504
- 226 Ilan N., Madri J. A.: PECAM-1: old friend, new partners, *Current Opinion in Cell Biology*, 2003; 15 (5): 515 – 524
- 227 Carpenter R. S., Goodrich L. R., Frisbie D. D.; Kisiday, J. D.; Carbone, B.; McIlwraith, C. W.; Centeno, C. J.; Hidaka, C.: Osteoblastic differentiation of human and equine adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells when BMP-2 or BMP-7 homodimer genetic modification is compared to BMP-2/7 heterodimer

- genetic modification in the presence and absence of dexamethasone, *Journal of Orthopaedic Research*, 2010; 28 (10): 1330 – 1337
- 228 *Barradas A. M., Fernandes H. A., Groen N.; Chai, Y. C.; Schrooten, J.; van de Peppel, J.; van Leeuwen, Johannes P T M; van Blitterswijk, C. A.; Boer, J. de: A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells, Biomaterials*, 2012; 33 (11): 3205 – 3215
- 229 *Dvorak M. M., Siddiqua A., Ward D. T.; Carter, D. H.; Dallas, S. L.; Nemeth, E. F.; Riccardi, D.: Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004; 101 (14): 5140 – 5145
- 230 *Zhang W., He H., Tian Y.; Gan, Q.; Zhang, J.; Yuan, Y.; Liu, C.: Calcium ion-induced formation of  $\beta$ -sheet/-turn structure leading to alteration of osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2, Scientific Reports*, 2015; 5 (12694): 1 – 15
- 231 *Holmes K., Roberts O. L., Thomas A. M.; Cross, M. J.: Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition, Cellular Signalling*, 2007; 19 (10): 2003 – 2012
- 232 *Caliari S. R., Burdick J. A.: A practical guide to hydrogels for cell culture, Nature Methods*, 2016; 13 (5): 405 – 414
- 233 *Bolle T., Meyer F., Walcher F.; Lohmann, C.; Jockenhövel, S.; Gries, T.; Hoffmann, W.: Werkstoffe/Biomaterialien in der interventionellen und operativen Medizin / Eine kurze Übersicht und aktuelle Trends = Materials/biomaterials in clinical practice ; a short review and current trends, Zentralblatt für Chirurgie: Zeitschrift für allgemeine, viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 2017; 142 (2): 216 – 225
- 234 *Idowu B., Cama G., Deb S.; Di Silvio, L.: In vitro osteoinductive potential of porous monetite for bone tissue engineering, Journal of Tissue Engineering*, 2014; 5: 1 – 14
- 235 *Lamallice L., Le Boeuf F., Huot J.: Endothelial cell migration during angiogenesis, Circulation Research*, 2007; 100 (6): 782 – 794
- 236 *Hollister S. J., Maddox R. D., Taboas J. M.: Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints, Biomaterials*, 2002; 23 (20): 4095 – 4103
- 237 *Langer R., Tirrell D. A.: Designing materials for biology and medicine, Nature*, 2004; 428 (6982): 487 – 492
- 238 *Hanein D., Sabanay H., Addadi L.; Geiger, B.: Selective interactions of cells with crystal surfaces. Implications for the mechanism of cell adhesion, Journal of Cell Science*, 1993; 104 (2): 275 – 288
- 239 *Beederman M., Lamplot J. D., Nan G.; Wang, J.; Liu, X.; Yin, L.; Li, R.; Shui, W.; Zhang, H.; Kim, S. H.; Zhang, W.; Zhang, J.; Kong, Y.; Denduluri, S.; Rogers, M. R.; Pratt, A.; Haydon, R. C.; Luu, H. H.; Angeles, J.; Shi, L. L.; He, T.-C.: BMP*

- signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013; 06 (08): 32 – 52
- 240 *Kraski B*: Zytokompatibilität von Bruschi Ein im 3D-Pulverdruckverfahren hergestelltes Zellkulturträgermaterial, Dissertation, Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2012.
- 241 *Ince A, Schütze N, Hendrich C, Thull R, Eulert J, Löhr JF*: Biokompatibilität der zementfreien LINK-HX-CaP-Endoprothesenoberflächen mit lokalem Infektschutz in: Peters K. M., König D. P., Hrsg., Fortbildung Osteologie 2, Darmstadt, Steinkopff, (2008: 116 – 122
- 242 *Haleem A. A., Rouse M. S., Lewallen D. G.; Hanssen, A. D.; Steckelberg, J. M.; Patel, R.*: Gentamicin and Vancomycin Do Not Impair Experimental Fracture Healing, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2004; 427 (1): 22 – 24

## Danksagung

Mein tiefster und aufrichtiger Dank gilt den Menschen, die mir diese Promotion ermöglicht haben:

Herrn Prof. Uwe Gbureck, Plattformleiter bioaktive anorganische Scaffolds am Institut für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die allzeitige Unterstützung.

Frau Dr. Andrea Ewald gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung und Anleitung im Rahmen der Versuche und die vielen lieben und motivierenden Gespräche. Des Weiteren danke ich ihr für die Bereitstellung von Fachliteratur und die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler danke ich für die hilfsbereite Übernahme des Zweitgutachens und die hervorragende Ausbildung während meines Studiums.

Dem ganzen Laborteam für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meinem guten Freund Raimund als Ratgeber und Zuhörer. Deine Freundschaft bedeutet mir viel.

Mein größter Dank gilt meiner lieben Mutter Eva für ihre immerwährende und allumfassende Unterstützung. Ihr widme ich diese Promotion.