

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**In vivo Analyse von
Biokompatibilität und Gewebeintegration
des synthetischen Knochenersatzstoffes NanoBone®**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Inken Schrodi

aus Wolfenbüttel

Rostock 2009

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Reinhard Schnettler, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universität Giessen

Tag der Verteidigung: 25.05.2010

für Sarah

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.

Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.

Wer nichts prüft, entdeckt nichts.

Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Tissue Engineering.....	8
1.2 Knochenersatzmaterialien.....	10
1.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien.....	13
1.3.1 Neoangiogenese.....	13
1.3.2 Biokompatibilität.....	16
1.3.3 Osteokonduktion und Osteoinduktion.....	17
1.4 NanoBone®.....	18
1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Studie.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Versuchstiere.....	21
2.2 Modell.....	21
2.2.1 Modell der Rückenhautkammer.....	21
2.2.2 Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer.....	22
2.2.3 Isolierung von Spongiosa als natürliches Knochenersatzmaterial.....	23
2.2.4 Implantation der Knochenersatzmaterialien.....	24
2.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe.....	25
2.3.2 Bildaufnahme.....	26
2.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter.....	27
2.3.3.1 Angiogenese-positive Regionen.....	27
2.3.3.2 Funktionelle Kapillardichte.....	27
2.3.3.3 Gefäßdurchmesser.....	28
2.3.3.4 Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	28
2.3.3.5 Blutvolumenfluss.....	29
2.3.3.6 Leukozyten-Fließverhalten.....	29
2.4 Histomorphologie.....	29
2.4.1 Haematoxin- und Eosin-Färbung.....	29
2.4.2 CD31-Immunhistochemie.....	30

2.4.3	F4/80-Immunhistochemie.....	30
2.4.4	PAS-Färbung.....	30
2.4.5	Polarisationsmikroskopie.....	31
2.4.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	31
2.5	Experimentelles Protokoll.....	32
2.5.1	Versuchsgruppen.....	32
2.5.2	Versuchsablauf.....	32
2.6	Statistik.....	33
3.	Ergebnisse.....	34
3.1	Physiologische Mikrozirkulation der Rückenhautkammer.....	34
3.2	Neovaskularisation.....	35
3.2.1	Angiogenese-positive Regionen.....	35
3.2.2	Funktionelle Kapillardichte.....	36
3.3	Biokompatibilität.....	42
3.3.1	Mikrohämodynamik.....	42
3.3.2	Leukozyten-Fließverhalten.....	43
3.4	Histomorphologie.....	44
3.4.1	Haematoxilin- und Eosin-Färbung / CD31-Immunhistochemie.....	44
3.4.2	F4/80-Immunhistochemie.....	46
3.4.3	PAS-Färbung.....	47
3.4.4	Polarisationsmikroskopie.....	48
3.4.5	Rasterelektronenmikroskopie.....	49
4.	Diskussion.....	51
4.1	Diskussion von Material und Methode.....	51
4.1.1	Modell der Rückenhautkammer.....	51
4.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	53
5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Thesen.....	61
7.	Literaturverzeichnis.....	63

8. Publikationen	77
9. Danksagung	78
10. Lebenslauf	79
11. Eidesstattliche Erklärung	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ang-1	Angiotensin-1
Ang-2	Angiopoetin-2
Au	Gold
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
C	Kohlenstoff
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszein-Iso-Thiocyanat
HE	Haematoxilin-Eosin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
keV	Kiloelektronenvolt
KG	Körpergewicht
MMP	Matrixmetalloprotease
O	Sauerstoff
PAS	Periodic-acid-Schiff
PDGF	platelet-derived growth factor
RBC	red blood cell velocity
ROI	region of interest
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TGF- β 2	transforming growth factor- β 2
TRAP	Tartat resistente saure Phosphatase
two-way ANOVA	two-way analysis of variance
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
VE-cadherin	vascular endothelial - cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cell

1. EINLEITUNG

1.1 Tissue Engineering

Der Verlust eines Gewebes oder eines ganzen Organs stellt für das Gesundheitssystem nicht nur wissenschaftlich, sondern auch finanziell ein großes Problem dar (Laschke et al., 2006). Die Möglichkeiten der Geweberekonstruktion stehen deshalb im Fokus der intensiven medizinischen Forschung. Unter Tissue Engineering wird die Nachzüchtung von natürlichen Geweben unter Laborbedingungen verstanden. Mit diesem gezüchteten Gewebe sollen Heilungsprozesse unterstützt, funktionsuntauglich gewordenes Gewebe regeneriert sowie zerstörte Gewebe ersetzt werden (Langer & Vacanti, 1993).

Der Begriff Tissue Engineering wurde 1987 von der National Science Foundation (USA) als interdisziplinäres Feld definiert, bestehend aus Zellbiologie, Materialwissenschaften und klinischer Forschung. Ziel ist der biologische Gewebe- bzw. Organersatz (Langer & Vacanti, 1993). Mit dem Anwachsen der älteren Bevölkerungsgruppe in unserer Gesellschaft steigt der Bedarf an modernen Therapien und Implantaten, um weiterhin eine hohe Lebensqualität zu gewährleisten (Atala, 2008). Speziell der medizinische Fortschritt bei der Transplantation von Organen ermöglicht heute das Überleben vieler Patienten. Das Angebot an Spenderorganen hingegen stagniert, sodass der wachsende Bedarf an Ersatzgeweben und -organen nicht allein durch das Spenderangebot gedeckt werden kann (Kulkarni & Cronin, 2006; Tenailon, 2007). Diese Diskrepanz zwischen Angebot und Nachfrage erklärt die rasche Entwicklung des jungen Forschungszweiges Tissue Engineering.

Obwohl der gleichwertige Ersatz eines Gewebes oder einer komplexen Struktur wie die eines kompletten Organs nach wie vor eine kaum zu bewältigende Herausforderung darstellt, ist es in den letzten Jahren gelungen, in einigen Bereichen einen bioartifiziellen Gewebe- und Organersatz zu entwickeln, der sowohl anatomisch als auch funktionell dem Original sehr ähnelt. Die Entwicklungsstadien reichen von der Grundlagenforschung (z.B. Pankreas) über vorklinische Studien (z.B. Herzklappen (Migneco et al., 2008)) bis hin zum klinischen Einsatz (z.B. Haut (Priya et al., 2008) und Knorpel (Randolph et al., 2003; Chung & Burdick, 2008)). Bisher gelten Implantate für den Haut-, Gefäß- oder Knorpelersatz, Implantate für den Bewegungsapparat sowie Implantate im Mund-, Kiefer-, und Gesichtsbereich als Hauptanwendungsgebiete.

Um von einer erfolgreichen Geweberekonstruktion sprechen zu können, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein: Das Prinzip des Tissue Engineering beruht auf

der extrakorporalen Kultivierung und Vermehrung lebender Zellen mit anschließender Reimplantation des künstlichen Gewebekonstruktes in den Organismus. Die Zellen für das Züchten der Gewebe werden optimalerweise aus körpereigenem Material des Patienten gewonnen, um eine immunologische Abstoßungsreaktion zu vermeiden bzw. im Vergleich zu Fremdgewebe deutlich zu verringern (Ikada, 2006). Die Verfügbarkeit von autologen Zellen ist generell begrenzt, wobei die Schwere der Erkrankung und das Alter des Patienten zusätzlich limitierend wirken. Die Isolierung ausdifferenzierter Zellen ist aufwendig und die Kultivierbarkeit eingeschränkt. Die Langzeitkultivierungsbedingungen beeinträchtigen zudem das Wachstum der Zellen und sind somit für die Gewinnung großer Zellmengen nur bedingt geeignet. Allogene und xenogene Zellen stehen dagegen in ausreichenden Mengen zur Verfügung, ihr Einsatz ist aber mit einer lebenslangen Immunsuppression des Patienten verbunden (Ikada, 2006).

Inzwischen rückt der Einsatz von Stammzellen immer stärker in den Fokus der Forschung (Polak & Bishop, 2006; Atala, 2007). Die Verwendung von Stammzellen als Ausgangsmaterial hätte den Vorteil, dass in kurzer Zeit große Mengen gleichartiger Zellen zur Verfügung stünden, die in die unterschiedlichsten Zelltypen ausdifferenziert werden könnten. An der Aufklärung des komplexen Mechanismus zur Differenzierung der unreifen Zellen in einen speziellen Zelltypus wird intensiv geforscht (Lalan et al., 2001).

Die für das Tissue Engineering verwendeten Zellen werden auf verschiedenen Biomaterialien gezüchtet, die als sogenanntes Trägergerüst dienen, bis die Gewebezellen zu einem zusammenhängenden Verbund gewachsen sind (Yarlagadda et al., 2005). Ein großes Problem ist in diesem Zusammenhang das Nachahmen der dreidimensionalen Organform (Lee et al., 2008). Das Biomaterial muss entsprechend flexibel sein, um in jede dreidimensionale Form gebracht werden zu können und gleichzeitig auch ein ausreichendes Maß an Stabilität aufweisen, um als dreidimensionale Matrix die gewünschte Form zu halten. Der Erfolg der Gewebezüchtung wird also maßgeblich von der Wahl des Biomaterials beeinflusst.

Die Trägermaterialien bestehen vorwiegend aus Kollagen, Fibrin oder anderen Bestandteilen der natürlichen extrazellulären Matrix (Silver & Pins, 1992) und sie sind meist als poröse Netzwerke oder Schwämme verfügbar. Aber auch Kunststoffe (z.B. Polytetrafluorethylen, Polyethylenterephthalat) finden bei der Herstellung von Zell- und Gewebeträgern Anwendung. Hierbei ist eine gute Biokompatibilität neben einer adäquaten Gewebeintegration unerlässlich. Bei den meisten Tissue Engineering-Konzepten wird die Resorption durch die Zellen sowie deren Stoffwechselprodukte angestrebt, sodass die neu gebildeten Gewebe die Biomaterialien im Laufe der Zeit ersetzen können. Ihre Abbauprodukte dürfen nicht toxisch oder mutagen sein (Stock & Vacanti, 2001).

Die unzureichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen stellt einen weiteren limitierenden Faktor für die Herstellung komplexer Gewebe und Organsysteme dar. Ohne eine Versorgung des Gewebes mit einem Kapillarnetz zum Austausch von Sauerstoff ist dessen Überleben nach Implantation nicht gewährleistet (Laschke et al., 2006).

Am Beispiel der Leber lassen sich die grundlegenden Methoden des Gewebeersatzes - nämlich allogene, xenogene und synthetisch - aufzeigen (Thalheimer & Capra, 2002). Die Leber ist aufgrund ihrer Funktion im Intermediärstoffwechsel aber auch als Immunorgan für den Verlauf und die Kontrolle kritisch kranker Patienten ein Organsystem von zentraler Bedeutung (Löffler & Petrides, 2003). Bei Verlust der Leberfunktion hat sich die allogene Lebertransplantation als lebenserhaltende Therapiemöglichkeit für Patienten mit akutem Leberversagen oder im Endstadium einer chronischen Lebererkrankung etabliert (Wall, 1988; Verdonk et al., 2007). Die maschinellen Leberersatzverfahren sollen entweder die Entgiftungsfunktion der Leber im Sinne einer „Leberdialyse“ imitieren (molecular absorbents recirculating system (MARS)) (Boyle et al., 2004) oder im Sinne von „Bioreaktoren“ mit Hilfe von Zellkulturen (humane oder porcine Hepatozyten) (Ito et al., 2008) die gesamte Leberzellfunktion ersetzen. Trotz intensiver Forschung stellen diese Methoden bisher keine vollwertige Leberersatztherapie dar. Die beeinträchtigte Synthese- und Stoffwechselfunktion der Leber wird nicht ausreichend ersetzt (Adham, 2003; Gerlach et al., 2008).

Ein weiteres klassisches Feld des Tissue Engineering ist der Knochenersatz. Bis heute wird autologer Knochen und dessen biologische Aktivität nach der Transplantation im Vergleich zu anderen Verfahren der Defektrekonstruktion als Goldstandard gewertet (Giannoudis et al., 2005). Obgleich die grundlegenden Abläufe sowohl von Knochenbildung als auch von Knochenheilung bekannt sind und auf dem Biomaterialsektor intensiv geforscht wird, gibt es bis heute noch keinen vollwertigen Ersatz für die autologe Spongiosa (Betz, 2002).

Inzwischen werden die Methoden des Tissue Engineering zur Entwicklung künstlicher Ersatzgewebe in vielen medizinischen Fachrichtungen eingesetzt. Trotz einer Vielzahl etablierter Gewebeersatzverfahren besteht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, verbesserter Konzepte, die auf den Methoden des Tissue Engineerings basieren.

1.2 Knochenersatzmaterialien

Die Tatsache, dass Knochendefekte ab einer „kritischen Größe“ ($> 5 \text{ cm}^3$) nicht wieder spontan heilen können, stellt ein wesentliches klinisches Problem dar (Aaboe et al., 1995). Solche ossären Defekte können beispielsweise durch Frakturen, Tumore oder Zysten

verursacht werden (Hak, 2007; Myoui & Yoshikawa, 2008; Pogoda et al., 2004). Zur Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens und seiner mechanischen Belastbarkeit müssen diese Defekte aufgefüllt werden. Hierbei gilt die autologe Knochentransplantation bis heute als Goldstandard (Laurencin et al., 2006). Die Möglichkeit der Übertragung vitaler, zur Knochenbildung (Osteogenese) befähigter Zellen ist ein entscheidender Vorteil dieses Verfahrens zur Defektrekonstruktion. Der autologe Knochen stellt eine Matrix für das Einwandern osteogener Vorläuferzellen zur Verfügung (Osteokonduktion) und enthält Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel die bone morphogenetic proteins (BMPs), welche die Knochenbildung fördern (Osteoinduktion). Immunreaktionen sowie die Übertragung von Krankheitserregern bleiben aus (Bauer & Muschler, 2000; Parikh, 2002; Laurencin et al., 2006).

Die Gewinnung autologer Spongiosa erfordert allerdings einen Zweiteingriff, der mit zahlreichen Nachteilen wie Nerven- und Gefäßverletzungen, Wundheilungsstörungen und Infektionen verbunden ist (Fowler et al., 1995). Zudem ist die Verfügbarkeit von autologen Knochentransplantaten begrenzt (Silber et al., 2003). Als Entnahmestellen für Spongiosa eignen sich lediglich die dorsalen und ventralen Beckenkämme (Seiler & Johnson, 2000) sowie für kleinere Spongiosamengen Tibiakopf, distale Tibia (Gerressen et al., 2008), Trochantermassiv (Lindberg et al., 1996) und distaler Radius (Bruno et al., 2001). Nicht zuletzt gilt die initial geringe Belastbarkeit autologer Spongiosa als Nachteil (Ignatius et al., 2000).

Eine Alternative zur autologen Spongiosatransplantation stellt der Einsatz von allogenen Knochen dar (Sammarco & Chang, 2002). Seine bessere Verfügbarkeit und die Vermeidung der Entnahmemorbidity beim Patienten sind von Vorteil (Deutsch et al., 2007). Die Verwendung von allogenen Transplantaten birgt aber neben dem Risiko einer potentiellen Übertragung infektiöser Erreger (Friedlaender, 1983) auch die Gefahr einer immunologischen Abwehrreaktion (Bauer & Muschler, 2000). Hieraus erklärt sich die Gründung von Knochenbanken, die für die Qualität der Transplantate und die Dokumentation der Transplantation verantwortlich sind (Tomford & Mankin, 1999). In Deutschland werden überwiegend allogene Transplantate (Hüftköpfe oder Knochen von Organ- oder Gewebespendern) aus klinikeigenen Knochenbanken verwendet, für die seit 1990 verbindliche Richtlinien seitens der Bundesärztekammer bestehen (von Garrel & Gotzen, 1998). Unter den allogenen Knochentransplantaten finden mittlerweile weltweit am häufigsten kältekonservierte oder lyophilisierte Transplantate Verwendung (Kübler, 1997). Die Konservierungs- und Desinfektionsverfahren verringern aber neben dem Übertragungsrisiko von Krankheitserregern und der Antigenität allogenen Knochens durch Zerstörung der Zellen und Wachstumsfaktoren auch die biologische Wertigkeit des

Transplantates. Durch diese Devitalisierung kann eine Knochenstimulation nur durch die osteoinduktive Wirkung der endogenen BMPs und die osteokonduktive Struktur vermittelt werden (Schweiberer et al., 1986; Hallfeldt et al., 1995).

Im Prinzip gelten für die ebenfalls zur Defektrekonstruktion geeigneten xenogenen Knochentransplantate die gleichen Probleme wie für die Verwendung allogenen Knochenmaterials. Allerdings besteht hier zusätzlich die Gefahr einer Übertragung von Krankheitserregern über Speziesbarrieren hinweg (Boneva et al., 2001).

Die Beschränkungen autologer und allogener (bzw. xenogener) Knochentransplantate erklären die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Natur, Struktur, Zusammensetzung und biologischem Verhalten. Unter dem Begriff Knochenersatzmaterialien werden Implantatmaterialien verstanden, die die Knochenbildung anregen, den körpereigenen Knochen nur vorübergehend ersetzen und am physiologischen Knochenremodelling teilnehmen (Katthagen, 1986). Zu den alloplastischen Materialien werden bioaktive Keramiken, Biogläser sowie kalziumbeschichtete Polymere gezählt.

Die überwiegend in der Medizin verwendeten Keramiken bestehen in der Regel aus Kalziumphosphaten (Jarcho, 1986). Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Hydroxylapatitkeramiken corallinen, bovinen oder synthetischen Ursprungs und Trikalziumphosphatkeramiken, wobei insbesondere Hydroxylapatit seit Jahren klinischen Einsatz findet. Hydroxylapatitkeramiken unterscheiden sich in Dichte und Porosität und sind in Granulatform oder als mechanisch belastbarer Formkörper erhältlich (LeGeros, 2002). Die großen Erwartungen und Hoffnungen, die in den 80er Jahren in dieses Material gesetzt worden waren, erfüllten sich trotz sehr guter Gewebeverträglichkeit und knochenbildender Eigenschaften nur teilweise (Jarcho, 1981): So konnte im engeren Kontaktbereich zwischen Hydroxylapatit und Knochen zwar ein randständiges Einwachsen von Knochengewebe in die porösen Strukturen der Hydroxylapatitkeramik beobachtet werden, eine aktive Knochenregeneration durch neugebildete Osteoblasten blieb jedoch aus (Holmes et al, 1986). Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Einsatz entsprechender Keramiken zum Knochenersatz stellt deren biologische Ab- und Umbaubarkeit dar. Hydroxylapatit wird generell nicht oder nur stark verzögert resorbiert. Im günstigsten Fall findet also eine knöcherne Durchbauung der Implantate statt, aber wie bei allen nicht resorbierbaren Knochenersatzmaterialien, die als Fremdkörper im Empfängerorganismus verbleiben, kann langfristig weder eine Implantatdislokation noch eine entzündliche Gewebereaktion bzw. Implantatabstoßung ausgeschlossen werden. Das persistierende Knochenersatzmaterial gilt als biomechanische Schwachstelle des rekonstruierten Knochendefektes (Kübler, 1997).

Auch für Trikalziumphosphatkeramiken konnte trotz seiner ausgezeichneten generellen Gewebeverträglichkeit bisher keine Osteostimulation nachgewiesen werden.

Trikalziumphosphat weist, verglichen mit Hydroxylapatit, ein schnelleres und somit günstigeres Resorptionsverhalten auf (Kamitakahara et al., 2008). Die chemisch physikalische Auflösung des Trikalziumphosphates erfolgt jedoch teilweise so schnell, dass die Platzhalterfunktion des Knochenersatzmaterials nicht mehr erfüllt wird und auch die Phagozytosekapazität der resorbierenden Zellen entsprechend schnell erschöpft ist. Nach dem Absterben der Zellen kommt es zur Freisetzung des aufgenommenen Materials im Gewebe (Claes & Ignatius, 1998; Reif et al., 1998).

Kalziumphosphatkeramiken zeichnet ein interkonnektierendes Porensystem aus, welches dem Knochen strukturell ähnelt und die Penetration durch Gefäße und Gewebe erleichtert (Barrère et al., 2006). Mit zunehmendem Porositätsgrad sinkt aber auch die mechanische Stabilität (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

Alle bisherigen Knochenersatzverfahren müssen sich an der Transplantation körpereigenen Knochens messen lassen. Ein ideales Knochensubstitut gibt es aufgrund der komplexen Anforderungen, die an einen Knochenersatzstoff gestellt werden, noch nicht. Deshalb liegt es nahe, hier besondere Forschungsaktivität zu investieren.

1.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

1.3.1 Neoangiogenese

Neoangiogenese ist neben einer adäquaten Biokompatibilität essentielle Grundvoraussetzung für alle Knochenersatzmaterialien, um eine dauerhafte Vitalität und Funktionalität des Implantats zu gewährleisten. Das durch die neugebildeten Blutgefäße geschaffene physiologische Milieu garantiert neben der Nutrition des Implantats sowohl die Einwanderung von Knochenzellen als auch deren Differenzierung.

Die physiologische Gefäßneubildung während der Embryogenese erfolgt durch Vaskulogenese – ein Prozess, bei dem neue Blutgefäße aus undifferenzierten Vorläuferzellen, den sogenannten Angioblasten, geformt werden (Risau, 1997). Während der Vaskulogenese proliferieren die Angioblasten und schließen sich zu einem primitiven Gefäßnetzwerk zusammen, welches als primärer Kapillarplexus bezeichnet wird. Dieser durch Vaskulogenese entstandene unreife und funktionell nicht ausreichende endotheliale Zellverband dient als Gerüst für die Angiogenese. Durch Gefäßsprossung sowie Gefäßabzweigungen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen erfolgt eine Umgestaltung des primären Kapillarplexus (Papetti & Herman, 2002).

Der Prozess der Angiogenese findet sowohl bei pathologischen Vorgängen wie Tumorwachstum (Folkman, 1985; Folkman, 1995) und Entzündung (Jones et al., 1999) als auch im Rahmen von Gewebereparation (Polverini et al., 1977) und Gewebeersatz durch Tissue Engineering (Laschke et al., 2006) statt.

Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus Endothelzellen bereits vorhandener Blutgefäße. Die Koordination dieses komplexen Vorgangs erfolgt sowohl durch pro-angiogene als auch durch anti-angiogene Faktoren. Überwiegen die Angiogenese-stimulierenden Faktoren, wird die Angiogenese (Abb. 1) induziert.

Der Initiation der Angiogenese geht stets eine Stickstoffmonoxid-induzierte Vasodilatation voraus (Carmeliet, 2000). Der Verlust gefäßstützender Perizyten und die daraus resultierende Destabilisierung der Gefäßwand durch Angiopoietin-2 (Ang-2) bewirken in den Endothelzellen einen Wechsel vom stabilen Wachstums-arretierten Ruhe-Phänotyp in den proliferativen Phänotyp. Der Wachstumsfaktor vascular endothelial growth factor (VEGF) vermittelt durch Permeabilitätssteigerung die Extravasation von Plasmaproteinen. Auf diese Weise wird die extravasale Gerinnung ermöglicht und Leitstrukturen für die später auswandernden Endothelzellen gebildet. Dieser Prozess geht durch Umverteilung von CD31 und Vascular Endothelial (VE)-Cadherin mit einer Auflockerung der interendothelialen Zellkontakte einher. VEGF führt somit zu einer Induktion der Endothelzell-Migration und deren Proliferation, ist jedoch allein für die Bildung neuer Blutgefäße mit einer intakten Mikrozirkulation nicht ausreichend. Charakteristisch für eine primär durch VEGF induzierte Angiogenese (Tumorangiogenese) ist ein für die Sauerstoffversorgung unzureichendes, unstrukturiertes Gefäßnetzwerk aus Kurzschlussverbindungen und langen Kapillarschleifen (Carmeliet & Jain, 2000).

Eine weitere Voraussetzung für die Angiogenese stellt die Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch spezifische Proteasen wie Matrixmetalloproteasen (MMP) (Nelson et al., 2000), Heparanasen (Nakajima et al., 1988) und den Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) dar. Auf diese Weise wird Raum für die migrierenden Endothelzellen geschaffen. Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung pro-angiogener Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF), VEGF und insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Coussens et al., 1999), deren Verfügbarkeit durch proteolytische Aktivierung erhöht wird. Die Migration der Endothelzellen erfolgt unter Vermittlung von Angiotensin-1 (Ang-1), bFGF sowie verschiedener Isoformen von VEGF. Ang-1 wirkt als Chemotaxin für Endothelzellen und induziert zum einen die Gefäßaussprossung und zum anderen die Interaktion zwischen Endothelzellen und periendothelialen Zellen. Der Faktor bFGF stimuliert das Endothelzellwachstum und rekrutiert mesenchymale Zellen und Leukozyten, die eine Freisetzung weiterer pro-angiogener Faktoren bewirken. Durch

Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung des pro-angiogenen Stimulus kommt es zur Ausbildung sogenannter Gefäßsprossen. Im Verlauf werden neue Zellkontakte zwischen den Endothelzellen geknüpft, die durch Gap-Junctions und VE-Cadherin stabilisiert werden. Die daraus resultierenden Ligand-Rezeptorbindungen verschiedenster Adhäsionsmoleküle sind hierbei Voraussetzung für die Aktivierung der damit verbundenen Signalwege. Integrine wie $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ (Eliceiri & Cheresh, 1999), CD31 und Ephrine (Wilkinson, 2000) stehen nicht nur mit der Extrazellulärmatrrix in Wechselwirkung, sondern sind auch an der Lumenbildung der Kapillarsprossen beteiligt. PDGF vermittelt die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMC), die das neugebildete Gefäßnetz stabilisieren und weitere Migration und Proliferation der Endothelzellen inhibieren. Die Gewährleistung einer regulären Form der Gefäße sowie eine Reduktion des Gefäßdurchmessers ist von entscheidender Bedeutung. Falls eine Ummantelung von Perizyten bzw. in größeren Gefäßen zusätzlich von glatten Muskelzellen fehlt, kommt es zu einer raschen Rückbildung des neugebildeten Gefäßes (Benjamin et al., 1998).

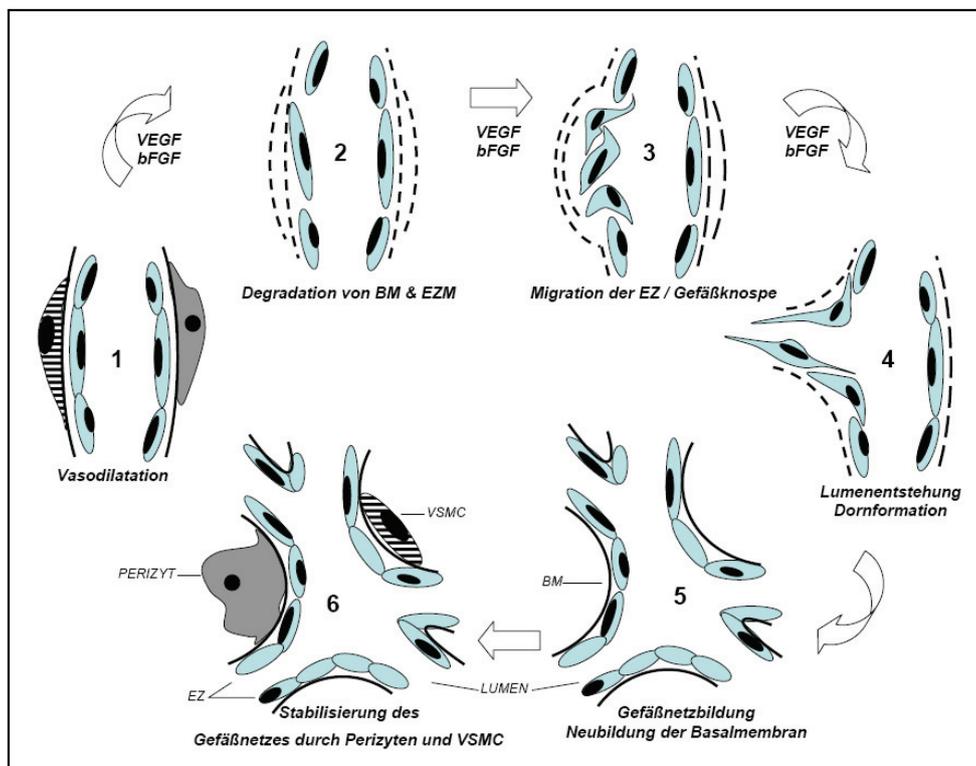


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Angiogenese (Zimmermann et al., 1999)

1.3.2. Biokompatibilität

Eine adäquate Biokompatibilität ist eine unabdingbare Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von Biomaterialien (Abshagen et al., 2008). Der Begriff Biokompatibilität wurde 1986 von Williams als „*the ability of a material to perform with an appropriate host response in an specific application*“ definiert (Williams, 1986). Die körperfremden Materialien sollten vom Organismus angenommen werden, d.h. die Gewebeverträglichkeit der Biomaterialien muss gewährleistet sein. Das Biomaterial sollte weiterhin seine Funktion im biologischen Milieu über einen gewünschten Zeitraum erfüllen, ohne dabei das umliegende Gewebe zu schädigen (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2005). Die Biokompatibilität berücksichtigt also die Wechselwirkungen zwischen dem körperfremden Material und dem biologischen Gewebe. Diese können sowohl am Material selbst als auch im Gewebe auftreten (Wintermantel & Ha, 2002). Unmittelbar nach Kontakt kommt es an der Grenzfläche zwischen Materialoberfläche und Gewebe zu einer Erstreaktion. Da es sich bei dem umliegenden Gewebe meist um Blut handelt, findet initial eine Adsorption von Blutproteinen an der Oberfläche des Biomaterials statt (Park et al., 1991; Bailly et al., 1996). Grundsätzlich stellen die Implantate aus körperfremden Materialien Fremdkörper und somit Störfaktoren des natürlichen Gewebes dar - in Abhängigkeit vom Werkstoff sind entsprechende Gewebereaktionen zu erwarten (Ignatius & Claes, 1996). Hierbei wird generell zwischen lokaler Abwehrreaktion, die theoretisch jederzeit auftreten kann, und systemischer Langzeitreaktion unterschieden. Die Biomaterialien an sich unterliegen Korrosions- und/oder Abbauprozessen (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2005).

Ein entscheidendes Kriterium bei der Beurteilung der Biokompatibilität von Implantaten im Knochen sind dementsprechend die Reaktionen an der Grenzschicht zwischen Implantat und Knochengewebe. Für den Knochenersatz stehen bio-inerte oder bio-aktive Materialien zur Verfügung (Navarro et al., 2008). Bio-inerte Materialien wie Titanimplantate üben praktisch keinen Effekt - weder im positiven noch im negativen Sinn - auf den Knochen aus. Es findet eine direkte knöcherne Integration des Materials statt (Nebe et al., 2008). Bio-aktive Materialien, zu denen Hydroxylapatitkeramiken gehören, induzieren zusätzlich die Knochenneubildung durch das angrenzende Knochengewebe (Kokubo et al., 2004).

Da die Akzeptanz oder Abstoßung des Knochenersatzmaterials entscheidend von seiner Biokompatibilität abhängt, ist eine Prüfung der Materialien auf ihre Zell- und Gewebeverträglichkeit Voraussetzung, um schädliche Auswirkungen des Materials auf den Organismus oder das Versagen der Materialfunktion zu vermeiden.

1.3.3 Osteokonduktion und Osteoinduktion

Knochenersatzmaterialien, die eine geeignete, passive Leitstruktur besitzen, welche umliegendem Lagerknochengewebe das Einwachsen ermöglicht, werden als osteokonduktiv bezeichnet (Burchardt, 1983). Die porösen Strukturen simulieren im Sinne des sogenannten Leitschieneneffektes eine vom Lagerknochen ausgehende Knochenneubildung. Im Anschluss an entsprechende zelluläre Differenzierungsvorgänge und dem Einsprossen von Gefäßen kommt es über eine Vaskularisation zu einer Knochenregeneration ohne vorherige Resorption des Knochenersatzstoffes (Katthagen & Mittelmeier, 1984). Für die Osteokonduktion wesentliche Parameter eines Knochenersatzmaterials sind Porendurchmesser sowie das Vorhandensein und der Durchmesser interkonnektierender Poren (Cornell & Lane, 1998). Als Idealstruktur in Bezug auf Architektur und Dimensionierung gilt die autologe Spongiosa (Schenk, 1991). Perivaskuläres Gewebe, Blutgefäße und undifferenzierte Mesenchymzellen wandern ausschließlich vom knöchernen Anteil des Lagergewebes aus in die Defektregion ein. Das Transplantat sollte dementsprechend angepasst sein und dem Lagerknochen möglichst dicht aufliegen. Das erfolgreiche Einheilen von Knochentransplantaten hängt maßgeblich von der Beschaffenheit des Knochenlagers ab. Noch heute erfolgt die Einteilung in ersatzstarkes, ersatzschwaches und ersatzunfähiges Lagergewebe (Lexer, 1911). Ein ersatzstarkes Lager ist von sich aus fähig, einen Knochendefekt weitgehend oder sogar vollständig zu reparieren; bei ersatzschwachem bzw. ersatzunfähigem Knochenlager fallen die Reparationsprozesse gering aus und sind auf den Defektrand begrenzt.

Als Osteoinduktion wird der Prozess bezeichnet, der die Osteogenese, d.h. die grundlegende, lebenslang funktionierende Eigenschaft des Knochens zur Regeneration, stimuliert (Albrektsson & Johansson, 2001). Bei adäquater Reizsetzung (Trauma) wird die Knocheninduktionskaskade gestartet (Bolander, 1992). Es handelt sich hierbei um einen klassischen Regenerationsprozess, bei dem es zu einer vollständigen Gewebeneubildung kommt, wobei Narben- oder Ersatzgewebsbildung ausbleiben. Der osteostimulative Effekt beruht auf der Freisetzung lokal wirksamer Wachstumsfaktoren, die in der organischen Matrix des Transplantates vorhanden sind (Mohan & Baylink, 1991). Hier kommt den BMPs eine wesentliche Bedeutung zu, da sie die Differenzierung unreifer Osteoprogenitorzellen in zur Knochenbildung befähigte Osteoblasten fördern. Aber auch lokal wirksame Wachstumsfaktoren (transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2), IGF, bFGF, PDGF) sowie systemische Faktoren wie Parathormon, Vitamin D₃ und Calcitonin führen intrazellulär über autokrine, parakrine und endokrine Bahnen zu einer Modulation der Osteogenese (Hollinger & Leong, 1996). Die Mediatoren sind angiokinetisch

wirksam und bewirken ein Einsprossen perivaskulären Bindegewebes mit Ausbildung von Kapillarschlingen. Osteokonduktion und Osteoinduktion laufen also gleichzeitig ab (Kempen et al., 2009). Via Chemotaxis wird in der Transplantatregion ein reagibler Zellpool pluripotenter Zellen angereichert, die sich nach Proliferation zu knochenbildenden Zellen differenzieren. Diesem stimulativen Effekt unterliegen nicht nur antransportierte Zellen, sondern auch bereits im Transplantat vorhandene Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten und wahrscheinlich auch Osteoklasten (Rueger, 1992).

1.4 NanoBone®

NanoBone® (Artoss GmbH, Rostock, Deutschland, Abb. 2) ist ein rein synthetisches, biokompatibles und biodegradierbares Material zum Auffüllen von Knochendefekten. Es besteht aus nanokristallinem Hydroxylapatit, das in eine hochporöse Kieselgelmatrix eingebettet ist (Abb. 3A). Das Knochenersatzmaterial wird in einem Sol-Gel-Verfahren hergestellt, wobei Temperaturen,

bei denen die Gelmatrix bzw. die Hydroxylapatitkristallite zusammensintern, nicht überschritten werden. Das Kalziumphosphat wird in ein Siliziumdioxid-Sol auf der Basis von Alkoxiden gegeben. Während des Gelübergangs kann ein beliebiger Körper mit makroskopischen Poren geformt werden. Das Entweichen des Lösungsmittels beim Trocknen führt zu Porenbildung in einer Größenordnung im Nanometerbereich, die sich sowohl durch entsprechende Wahl der Pulverkörnung als auch durch die Wahl des Verhältnisses von Granulat zu Lösungsmittel und Gelpräkursor beeinflussen lässt. Durch Anordnung der Hydroxylapatitkristallite als lockeres Gefüge entstehen interkonnektierende Nanoporen in einer Größenordnung von 20 nm.

Der Feststoffgehalt von NanoBone® beträgt aufgrund der hohen Porosität und der lockeren Packung des Granulats („Tannenzapfenstruktur“, Abb. 3B) nur ca. 20 Vol.%. In Kontakt mit Patientenblut werden etwa 80 Vol.% durch körpereigenes Material eingenommen. NanoBone® besteht durch die Porosität bis in den Nanometerbereich praktisch nur aus Oberfläche, an welche Blutplasma und körpereigene Proteine binden können. Dadurch kommt es zu einer „Tarnung“ des Knochenersatzmaterials und der Körper sieht NanoBone® als körpereigen an. Das intraoperativ mit Patientenblut angemischte Präparat ist von



Abbildung 2: NanoBone®-Granulat

Spongiosa ähnlicher Konsistenz und garantiert eine gute Ortsständigkeit. Eine Übertragung von Infektionen bzw. Erkrankungen tierischen Ursprungs ist aufgrund der vollständig synthetischen Herstellung des Knochenersatzstoffes ausgeschlossen.

NanoBone[®] nimmt am physiologischen Knochenremodelling teil und koppelt den Abbau des Knochenersatzmaterials an den neuen Knochenaufbau. Die nanokristallinen Hydroxylapatitkristallite gehen nicht ionisiert in Lösung, sondern werden im Rahmen der Umwandlung von Kallus in Knochen schrittweise osteoklastär biodegradiert, wobei die freiwerdenden Kalzium- und Phosphationen in den neugebildeten Lamellenknochen eingebaut werden. Die Kieselgelmatrix wird innerhalb kurzer Zeit (ca. 10 Tage) in eine organische Matrix umgewandelt, ohne dass die Granulatkörnchen ihre eigene Form verlieren. Neben diesem die Knochenbildung stimulierenden Effekt stellt die Osteoinduktion eine weitere wichtige Eigenschaft von NanoBone[®] dar. Nach Implantation des Knochenersatzmaterials in das Subkutangewebe von Minipigs (Henkel et al., 2004) konnte Knochenbildung nachgewiesen werden, sodass bei klinischer Anwendung auf den adjuvanten Einsatz kostenintensiver Wachstumsfaktoren verzichtet werden kann.

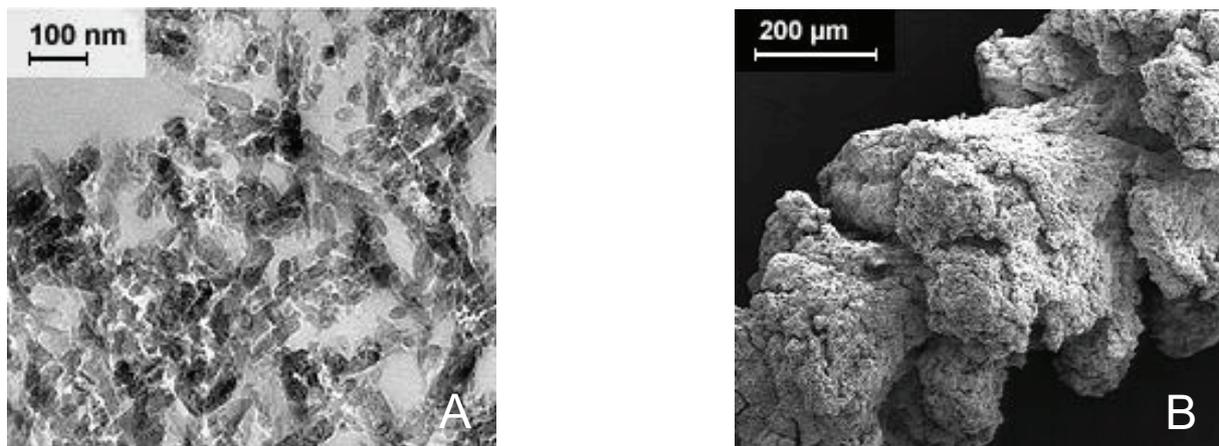


Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung (A) und rasterelektronenmikroskopische Darstellung (B) von NanoBone[®] (Artoss GmbH). NanoBone[®] besteht aus nanokristallinem Hydroxylapatit, das in eine hochporöse Kieselgelmatrix eingebettet ist (A). Der niedrige Feststoffgehalt und der hohe Grad an Porosität von NanoBone[®] bedingen seine typische Tannenzapfenstruktur (B).

Im Rahmen bisheriger Anwendungsgebiete von NanoBone[®] liegt der Schwerpunkt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zur Knochendefektauffüllung nach Exstirpation von Knochenzysten, Zahnextraktionen oder Korrekturosteotomien. In der Unfallchirurgie und Orthopädie wird NanoBone[®] zur Füllung bzw. Rekonstruktion aseptischer, artifizieller oder degenerativer Knochendefekte eingesetzt.

NanoBone®-Granulat wird in zwei verschiedenen Größen (mittlerer Durchmesser der Granulatkörnchen: 0,6 mm bzw. 1 mm) hergestellt. Die Länge eines einzelnen Granulatkörnchens beträgt einheitlich 2-3 mm. In der vorliegenden Studie wurden unter Berücksichtigung des entsprechenden Modells Granulatkörnchen mit einem mittleren Durchmesser von ~0,2 mm sowie eigens für die Studie angefertigte NanoBone®-Plättchen mit einer Fläche von ~1,3 mm² und einer Dicke von 0,2-0,3 mm verwendet.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

Bei der Anwendung von Knochenersatzstoffen stellt die fehlende Vaskularisierung und schlechte Biokompatibilität des Implantats ein großes Problem dar. Als ein Vertreter aus der Gruppe der synthetischen Knochenersatzstoffe steht NanoBone® bereits im klinischen Alltag zur Verfügung und bildet die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit. Ersten Studien zufolge darf ein osteokonduktives sowie osteoinduktives Potential von NanoBone® angenommen werden. Osteokonduktion und Osteoinduktion sind generell Grundvoraussetzungen für alle Knochenersatzmaterialien, um eine dauerhafte Vitalität und Funktionalität des Implantats zu gewährleisten.

Außer einer guten Biokompatibilität ist für den erfolgreichen Knochenersatz auch eine adäquate Gewebeintegration unerlässlich. Das Fehlen einer inflammatorischen Antwort des Empfängergewebes sowie die Ausbildung von Gefäßnetzwerken sind von entscheidender Bedeutung. Das durch die neugebildeten Blutgefäße geschaffene physiologische Milieu garantiert neben der Nutrition des Implantats sowohl die Einwanderung von Knochenzellen als auch deren Differenzierung. Weil diese wichtigen Aspekte für NanoBone® bisher noch nicht detailliert untersucht worden sind, wurden sie zum Gegenstand der vorliegenden Studie.

Im Modell der Rückenhautkammer der Maus wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen mittels der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie Angiogenese, Mikrohämodynamik und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion des Empfängergewebes quantitativ analysiert. NanoBone® wurde sowohl als Plättchen als auch in Granulatform implantiert. Isogen transplantiertes Spongiosamaterial diente als Standard. Zur weiteren Charakterisierung der Biointegrität von NanoBone® diente die histologische Bewertung des Gewebes (HE-Färbung, CD31-Immunhistochemie, F4/80-Immunhistochemie, PAS-Färbung, Polarisationsmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie) an Tag 15 nach Implantation.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Studie wurden C57BL/6J Tyr Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet (Abb. 4), welche in klimatisierten Räumen des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock, gehalten wurden. Die Kammerpräparation erfolgte an gesunden, geschlechtsreifen männlichen Tieren im Alter von 10-12



Abbildung 4: Männliche C57BL/6J Tyr Maus

Wochen mit einem Körpergewicht (KG) von 28-35 g. Zur Isolierung autologer Spongiosa dienten 10-12 Wochen alte, gesunde, geschlechtsreife weibliche Tiere mit einem KG von 20-24 g. Während des Versuchs wurden die Tiere bei einem 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus unter Bereitstellung von Standardlaborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten.

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die örtliche Tierschutzbehörde gemäß dem Tierschutzgesetz §8 Abs.1 durchgeführt.

2.2 Modell

2.2.1 Modell der Rückenhautkammer

Das Modell der Rückenhautkammer gilt als etabliertes Modell für standardisierte *in vivo* Mikrozirkulationsstudien. Erstbeschreiber des Kammermodells an der Maus waren Algire et al. (Algire et al., 1943). Die Adaption dieses Modells für Untersuchungen an Ratten (Papenfuss et al., 1979), immunkompetenten (Cardon et al., 1970) und immuninkompetenten Mäusen (Lehr et al., 1993) sowie an Hamstern (Endrich et al., 1980) gelang durch Modifizierung der Kammer sowie der mikrochirurgischen Präparationstechnik. Aufgrund der Tatsache, dass das Deckglas der Kammer zu jedem Zeitpunkt abgenommen werden kann, eignet sich die Rückenhautkammer besonders für Implantations- und Transplantationsstudien am wachen Tier über einen Versuchszeitraum von 2-3 Wochen. Nach intravenöser Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist sowohl die Beurteilung der Mikrozirkulation der freipräparierten Rückenhautmuskulatur als auch die Entstehung neuer Gefäße, die in die

Biomaterialien einsprossen, möglich. Eine genaue Quantifizierung erfolgt anschließend mit Hilfe eines computergestützten Bildverarbeitungssystems (CapImage, Version 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland).

2.2.2 Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer

Vor der mikrochirurgischen Präparation wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneal injizierte Mischung aus Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin (8 mg/kg KG) anästhesiert. Die Enthaarung der Rückenhaut erfolgte mittels Elektrorasur (Favorita 2, Aesculap, Suhl, Deutschland) und anschließender chemischer Depilation (Pilca, GalaxoSmithKline, Bühl, Deutschland), um mechanische Irritationen und Mikroverletzungen der Haut zu vermeiden. Vor Beginn der eigentlichen Kammerpräparation wurde die enthaarte Rückenhaut mit warmen Wasser gereinigt und desinfiziert (Braunoderm[®], Braun, Melsungen, Deutschland) (Abb. 5A).

Das Versuchstier wurde zunächst in Bauchlage auf einer Wärmeplatte zur Aufrechterhaltung einer Körpertemperatur von 37°C positioniert, die gut dehbare Rückenhautfalte angehoben und entlang ihrer Mittellinie mittels zweier Haltefäden (Dermafil 4/0, Smi AG, St.Vith, Belgien) aufgespannt (Abb. 5B). Die Rückseite der aus zwei symmetrischen Titanrahmen bestehenden Rückenhautkammer wurde unter Gegenlichtkontrolle an ihrem Oberrand mit Nahtfäden (6-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Gefäße fixiert. Im weiteren Verlauf wurden mit Hilfe einer Präparierschere zwei transkutane Inzisionen für die beiden Schrauben des vorderen Titanrahmens geschaffen, ohne die beiden Hauptgefäßstämme der Rückenhaut zu verletzen. Jetzt wurde die Kammerrückseite unter Gegenlichtkontrolle fixiert (Abb. 5C) und das spätere Beobachtungsfenster mit einem Durchmesser von 15 mm auf die Haut gezeichnet (Abb. 5D). Nach Entfernung der Haltefäden wurde das Tier umpositioniert, so dass die fixierte Hautfalte über dem Kammerrahmen zu liegen kam. Unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651 MSD, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden nun Cutis, Subcutis mit dem quergestreiften Hautmuskel sowie die beiden Schichten des Retraktormuskels mittels mikrochirurgischem Operationsbesteck entfernt (Abb. 5E). Die Größe der kreisrunden Fläche wurde mit 15 mm etwas größer gewählt als das eigentliche Beobachtungsfenster, um eine Komprimierung des Gewebes zu vermeiden und eine adäquate Gefäßversorgung zu garantieren. Außerdem wird dadurch das periphere Einwachsen von Granulationsgewebe in das Beobachtungsfenster während des Zeitraumes nach der Implantation der Biomaterialien limitiert. Mikroblutungen an den Schnittändern wurden durch Kompression mittels einer feinen Pinzette gestillt. Vom Einsatz elektrischer

Kauter wurde abgesehen, um Koagulationsverletzungen zu vermeiden. Nach Spülung der verbliebenen Hautschicht, bestehend aus Cutis, Subcutis sowie Hautmuskel mit steriler Kochsalzlösung, wurde der vordere Titanrahmen mittels zweier Schraubenmutter auf den Verbindungsschrauben positioniert. Der Abstand zwischen den beiden Titanrahmen beträgt 400-500 μm . Das Beobachtungsfenster wurde mit einem Deckglas, das sich durch Adhäsion der verbliebenden Hautschicht luftabschlussfrei anlegt, und einem Sprengring abgedeckt (Abb. 5F).

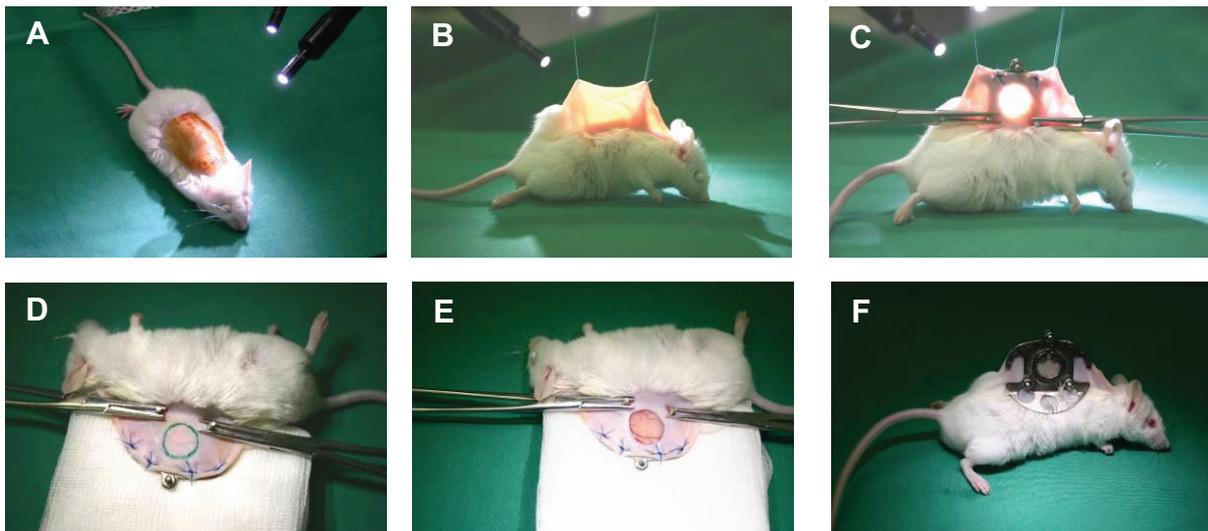


Abbildung 5: Chirurgische Präparation der Rückenhautkammer der Maus

Die Abnahme von Sprengring und Deckglas garantiert während des gesamten Versuchs den Zugang zum Beobachtungsfenster. Nach einer dreitägigen Erholungsphase der Tiere von Narkose und chirurgischem Trauma wurden die Knochenersatzmaterialien in das Beobachtungsfenster implantiert. Die Versuchstiere tolerierten die Rückenhautkammer sehr gut, was u.a. ihr normales Fress- und Putzverhalten belegte.

2.2.3 Isolierung von Spongiosa als natürliches Knochenersatzmaterial

Zur Gewinnung autologer Spongiosa wurden weibliche C57BL/6J *Tyr* Mäuse mit Ketamin und Xylazin (100 bzw. 8 mg/kg KG) anästhesiert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte positioniert. Nach der Freipräparation beider Femura erfolgte die Knochenisolierung auf Höhe der beidseits angrenzenden Gelenkspalte (Abb. 6A und B). Weichteilgewebsreste an den Femura wurden mit Hilfe Kochsalzlösung-getränkter steriler Kompressen (ES

Kompressen, Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) entfernt. Zur Gewinnung der Spongiosa wurden die Femurkondylen mit einem Skalpell abgetrennt und das Material mittels eines dünnen K-Drahtes herausgelöst (Abb. 6C). Es erfolgte umgehend die Implantation der autologen Spongiosa in die Rückenhautkammer des Versuchstieres. Nach Isolierung der autologen Spongiosa wurde das Spendertier mit einer Überdosis an Ketamin-Xylazin-Narkoselösung getötet.



Abbildung 6: Chirurgische Isolierung autologer Spongiosa aus dem Femur einer weiblichen C57BL/6J Tyr Maus

2.2.4 Implantation der Knochenersatzmaterialien

Für die Implantation der Knochenersatzmaterialien wurden die Versuchstiere auf einer Wärmeplatte positioniert, um eine Körpertemperatur von 37° C zu gewährleisten. Sowohl der Sprengring als auch das Deckglas wurden entfernt und vergleichbare Mengen von ~1,3-1,8 mm² der NanoBone[®]-Plättchen (Abb. 7A), des NanoBone[®]-Granulats (Abb. 7B) oder der frisch isolierten Spongiosa (Abb. 7C) des Femurs eines Spendertieres zentral auf das Muskelgewebe aufgebracht. Im Anschluss wurde das Beobachtungsfenster wieder luftabschlussfrei mittels Deckglas und Sprengring abgedeckt. Nach dieser initialen Implantation der Knochenersatzstoffe erfolgte im weiteren Versuchsablauf keine erneute Manipulation der Rückenhautkammer.

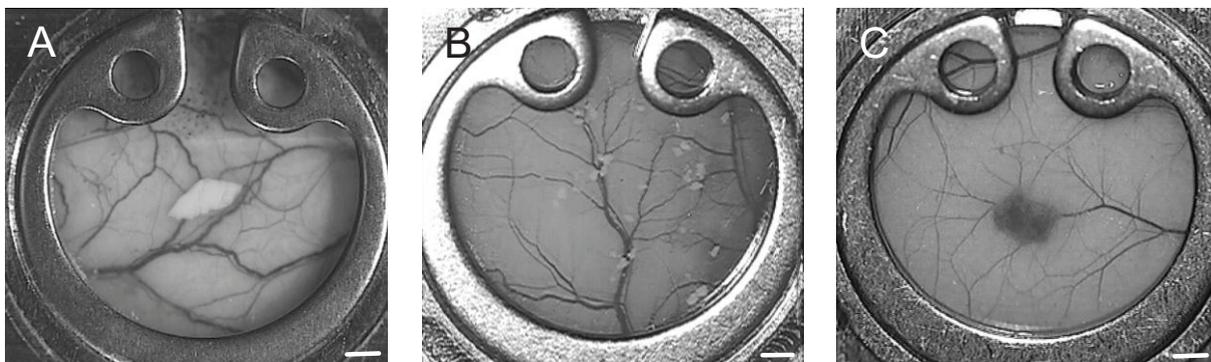


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen von NanoBone[®]-Plättchen (A), NanoBone[®]-Granulat (B) sowie autologer Spongiosa (C) unmittelbar nach Implantation in die Rückenhautkammer (Balken = 1 mm).

2.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe sind Substanzen, die durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden und durch das Emittieren von Photonen für sie spezifischer Wellenlängen sichtbar werden. Die Elektronen werden auf eine höhere Energieebene gehoben, indem die Energie des anregenden Lichts absorbiert wird. Die aufgenommene Energie wird bei der Rückkehr zum Grundzustand in Form von Fluoreszenz abgegeben (Sinitsina, 1999). Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Kontrastierung zwischen Intra- und Extravasalraum sowie bestimmter Zellen. Dies erhöht die Bildqualität und macht mikrozirkulatorische Untersuchungen möglich. In der vorliegenden Studie wurden 2%-iges Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) gekoppelt an Dextran (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 1%-iges Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

FITC-Dextran

Wird FITC-Dextran mit einem Licht angeregt, das eine Wellenlänge unter 500 nm hat, emittiert es ein gelblichweißes Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525 nm. Diese Anhebung des Kontrastes zwischen Intra- und Extravasalraum ermöglicht die Messung mikrozirkulatorischer Parameter, wie Angiogenese-positive Regionen, funktionelle Kapillardichte, Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Blutvolumenfluss und Leukozytenfließverhalten (Bonney et al., 1977). Der Fluoreszenzmarker

bindet weder an individuelle Blutzellen noch an Endothelzellen, sondern färbt lediglich das Blutplasma. FITC-Dextran besteht aus dem eigentlichen Plasmamarker FITC und dem Polymer Dextran (Molekulargewicht (MG) 150000 Da), das durch enzymatische Spaltung von Saccharose gebildet wird (Sinitsina, 1999) (Abb. 8). Durch eine Thiocamoylbindung sind diese beiden Moleküle praktisch irreversibel miteinander verbunden. Dextran besitzt ein relativ großes MG, wodurch eine ausreichend lange intravasale Verweildauer erreicht und eine Extravasation unter physiologischen Bedingungen verhindert wird. Aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit und der nicht bzw. kaum vorhandenen Interaktionen mit körpereigenen Proteinen eignet sich FITC-Dextran in besonderem Maße für die Intravitalmikroskopie (Schröder et al., 1976).

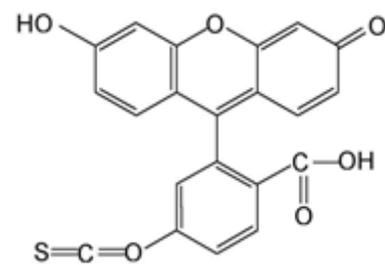


Abbildung 8: Chemische Strukturformel von FITC-Dextran

Rhodamin 6G

Zur Darstellung der Leukozyten wurde der erstmals 1943 beschriebene, nicht selektive Leukozytenmarker Rhodamin 6G (Abb. 9) eingesetzt, der bei intravasaler Gabe zu einer Anfärbung von

Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten führt (Batz et al.,

1995). Bei physiologischem pH-Wert liegt das leicht lipophile Rhodamin 6G positiv geladen vor und reichert sich in den Mitochondrienmembranen der Leukozyten an.

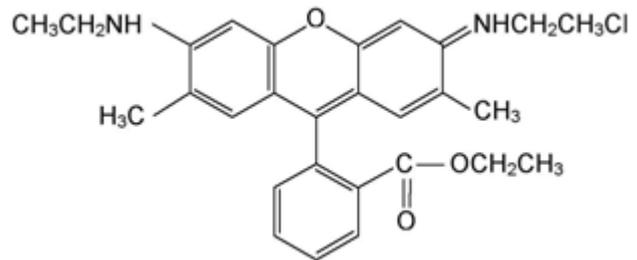


Abbildung 9: Chemische Strukturformel von Rhodamin 6G

2.3.2 Bildaufnahme

Anhand der Intravitalmikroskopie wurde die Gewebeintegration und die Biokompatibilität der Knochenersatzmaterialien untersucht. Die intravitale Mikroskopie ermöglicht sowohl eine repetitive Untersuchung mikrozirkulatorischer Parameter als auch die Darstellung dynamischer Prozesse, wie der Angiogenese mit anschließender quantitativer Auswertung.

Vor jeder intravitalem Mikroskopie (20 min sowie 3, 5, 7, 10 und 15 Tage nach Implantation der Materialien) wurde das Versuchstier mit Ketamin-Xylazin narkotisiert. Anschließend erfolgte die retrobulbäre Injektion von 0,08 ml 2%-igem FITC-Dextran MG 150000 (Sigma) sowie 0,08 ml 1%-igem Rhodamin 6G (Sigma).

Die Rückenhautkammer kam durch Fixation des Tieres in Seitenlage auf einer speziellen Plexiglasbühne in horizontaler Position zu liegen. Die Mikrozirkulation des quergestreiften Skelettmuskels wurde nun mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Das Intravitalmikroskop beinhaltet eine 100W Quecksilberlampe sowie einen zwischengeschalteten blauen Filterblock (Exzitation: Wellenlänge = 450-490 nm; Emission: Wellenlänge > 515 nm) und einen grünen Filterblock (Exzitation: Wellenlänge = 530-560 nm; Emission: Wellenlänge > 520 nm). Die Bilder wurden mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) aufgenommen und über Zwischenschaltung von Echtzeitgenerator und Monitor an ein Videosystem (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokyo, Japan) weitergeleitet. Durch den Einsatz von 5x, 10x und 20x Objektiven konnten Vergrößerungen von x94, x212 und x424 erzielt werden. Dies ermöglichte sowohl Übersichtsaufnahmen als auch eine detaillierte Bilderfassung für die später Computer-assistierte off-line Auswertung. Auf diese Weise gelang es Untersuchungszeitraum und Belastung für das Versuchstier auf ein Minimum zu reduzieren.

Um einen Überblick über den Zustand der Kammer und der implantierten Knochenersatzmaterialien zu gewinnen, wurden zusätzlich Übersichtsaufnahmen des gesamten Kammergewebes mit einem Operationsstereomikroskop (M651 MSD, Leica) gemacht.

2.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Anhand der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie konnten nachfolgend beschriebene Mikrozirkulationsparameter bestimmt werden, die offline, d.h. im Anschluss an die Mikroskopie mit Hilfe des Computer-assistierte Analyseprogramm CapImage (Version 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) quantitativ ausgewertet wurden.

2.3.3.1 Angiogenese-positive Regionen

Die Angiogenese wurde anhand sogenannter ROIs (regions of interest) im Randbereich und im Zentrum des Implantats untersucht. Es wurden 15-20 repräsentative Beobachtungsfelder im Randbereich des Implantats standardisiert an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten mit dem 10x Objektiv aufgenommen. Unterschieden wurde zwischen Angiogenese-positiven und Angiogenese-negativen Feldern. Felder, die zum Untersuchungszeitpunkt Zeichen von Angiogenese, wie Kapillarsprossen oder neu gebildete, perfundierte Blutgefäße aufwiesen, wurden als Angiogenese-positiv bewertet. Der Prozentsatz Angiogenese-positiver Felder wurde aus den analysierten Beobachtungsfeldern ermittelt.

2.3.3.2 Funktionelle Kapillardichte

Zur Charakterisierung der Integration der Biomaterialien wurde sowohl die funktionelle Kapillardichte in den peripheren Kammerabschnitten als auch im Randbereich und im Zentrum der Implantate dokumentiert, wobei in letzterem Fall lediglich die neu gebildeten Gefäße berücksichtigt wurden, die zum Untersuchungszeitpunkt mit Blutplasma perfundiert waren. Die kapillare Dichte wurde in den peripheren Kammerabschnitten sowie im Randbereich der Implantate als Länge der Kapillaren pro Beobachtungsfeld in cm/cm^2 bzw. im Zentrum der Implantate als Länge der neu gebildeten Kapillaren pro Beobachtungsfeld in cm/cm^2 definiert.

2.3.3.3 Gefäßdurchmesser

In der vorliegenden Studie wurden ebenso die Gefäßdurchmesser von Arteriolen und Venolen bestimmt. Hierzu wurden bei jedem Versuchstier zum ersten Untersuchungszeitpunkt, d.h. 20min nach Implantation vier Gesichtsfelder festgelegt, um eine repetitive Untersuchung zu ermöglichen. Der Durchmesser [μm] konnte im Standbildmodus durch Verbindung zweier senkrecht zum Gefäßverlauf liegenden Randpunkte des zu messenden Gefäßes bestimmt werden. Die Tatsache, dass FITC-Dextran auch den Erythrozyten-freien Plasmasaum darstellt, ermöglichte eine eindeutige Festlegung der Gefäßgrenzen.

2.3.3.4 Erythrozytengeschwindigkeit

Die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit (Red Blood Cell Velocity (RBC)) erfolgte an den Gefäßen, an denen bereits der Gefäßdurchmesser bestimmt worden war. Mit Hilfe der computerassistierten Line-Shift-Diagramm-Methode (Klyscz et al., 1997) konnte die Blutzellgeschwindigkeit ermittelt werden. Es wurde eine zentral im Gefäßlumen entlang der Flussrichtung ausgerichtete Messlinie definiert (Abb. 10A) und anschließend das Videoband für 10 Sekunden abgespielt. Während dieses Zeitraumes wurde für jedes Halbbild ein Grauwertprofil entlang der Messlinie erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinandergereihten Grauwertprofilen erzeugte das Computerprogramm ein sogenanntes Line-Shift-Diagramm (Abb. 10B), in dem helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen sind, die auf Erythrozytenbewegungen bzw. Plasmalücken schließen lassen. Aus der Steigung dieser Linien konnte die Blutzellgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$] errechnet werden.

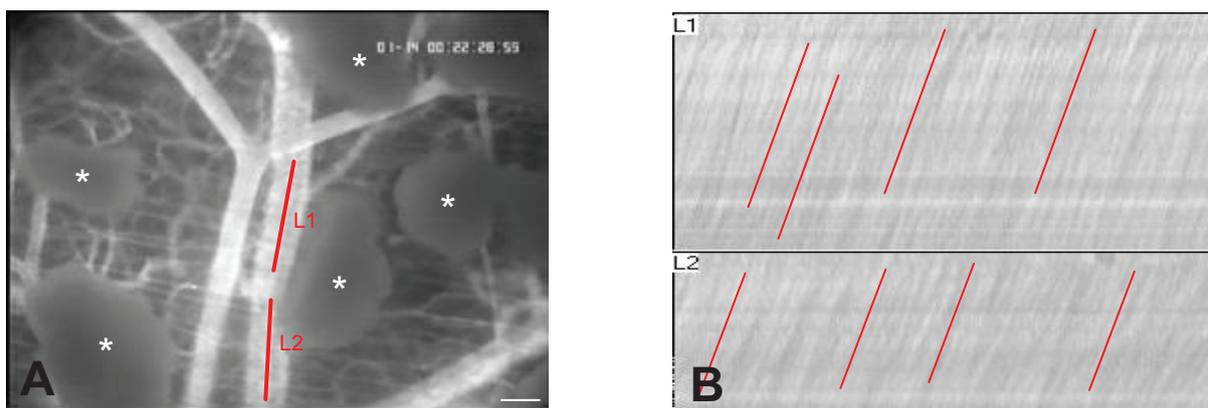


Abbildung 10: (A) Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Venole (mit begleitender Arteriole) in der Rückenhautkammer der Maus mit zwei definierten Messlinien zur Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit. Nach Abspielen des Videobandes für etwa 10 Sekunden entsteht das Line-Shift-Diagramm (B) für jede der einzelnen Messlinien (L1/L2), anhand derer die Geschwindigkeit des Blutflusses aus der Steigung der Linien der aneinandergereihten Grauwertprofile errechnet werden kann. In der Umgebung der Gefäße liegen NanoBone®-Granulatkörner (Sternchen) (Balken = 100 μm).

2.3.3.5 Blutvolumenfluss

In den untersuchten Gefäßen herrscht ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil mit geringeren Geschwindigkeiten im Randbereich als im Zentralstrom. Zum Ausgleich des Unterschiedes zwischen der gemessenen Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit wurde zur Berechnung des Blutvolumenflusses (VQ) der Baker-Wayland-Faktor von 1,6 verwendet. Hieraus ergibt sich folgende Formel:

$$VQ \text{ (}\mu\text{L/s)} = \pi(d/2)^2(v_{\text{RBC}}/1,6)$$

Hier stellt d den Durchmesser des Einzelgefäßes und v die gemessene Erythrozytengeschwindigkeit dar.

2.3.3.6 Leukozyten-Fließverhalten

Die Leukozyten wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G angefärbt und intravitalmikroskopisch dargestellt. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in denselben Venolen beurteilt, in denen auch bereits Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit gemessen worden waren. Grundsätzlich wird zwischen frei fließenden, rollenden und adhärennten Leukozyten unterschieden.

Rollende Leukozyten sind durch eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit aufgrund von kurzen, vorübergehenden Kontakten zum Gefäßendothel definiert. Sie werden als Fraktion aller Zellen (%) angegeben, die ein definiertes Gefäßsegment passieren und im Verlauf von 20 Sekunden an einer durch den betreffenden Gefäßabschnitt gesetzten Linie gezählt.

Adhärennte Leukozyten haften fest am Gefäßendothel und lösen sich während des gesamten Untersuchungszeitraumes von 20 Sekunden nicht von der inneren Gefäßwand. Sie werden als Zellen pro mm^2 Endotheloberfläche angegeben.

2.4 Histomorphologie

2.4.1 Haematoxylin- und Eosin-Färbung

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der implantierten Knochenersatzmaterialien wurden von den Empfängertieren exzidierte Rückenhautkammer-Präparationen am Ende des Beobachtungszeitraumes in 4%iger Formaldehydlösung bei 4°C für 2-3 Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebepblock

wurden Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 5µm angefertigt und anschließend in Xylol entparaffiniert (1x 5 Minuten und 2x 0,5 Minuten). Es folgte eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (1 Minute in 100%igem Ethanol und je 0,5 Minuten in 100%, 96% und 70% Ethanol), eine Spülung in Aqua dest. für 2 Minuten, die 5-minütige Färbung mit Haematoxin nach Ehrlich, gefolgt von einer Aqua dest.-Spülung sowie der Differenzierung mit 50%igem Ethanol für 2 Minuten. Die Gegenfärbung erfolgte für 3 Minuten in 0,4%iger alkoholischer Eosinlösung. Es schlossen sich die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (20 Sekunden in 80%, 1 Minute in 96% und 2 Minuten in 100% Ethanol) und die Überführung in Xylol an. Nach Eindecken der Präparate konnten diese lichtmikroskopisch beurteilt werden.

2.4.2 CD31-Immunhistochemie

Zum histologischen Nachweis des Endothelzellmarkers CD31 erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C die Inkubation mit einem polyklonalem anti-CD31-Antikörper (Ziege; 1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Als Sekundärantikörper schloss sich ein alkalische-Phosphatase (AP)-anti-Ziege-Immunglobulin (Hase; LSAB kit plus; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) an. Die AP-Bindungsstellen ließen sich durch Fuchsin nachweisen (Dako Cytomation).

2.4.3 F4/80-Immunhistochemie

Der histologische Nachweis von Makrophagen erfolgte durch die Detektion des F4/80-Antigens (1:10, Serotec, Oxford, UK) über Nacht bei einer Temperatur von 4°C durch Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper anti-F4/80 (Ratte; 1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Als Sekundärantikörper schloss sich ein AP-gekoppelter-anti-Ratte-Immunglobulin (Maus; 1:200; Santa Cruz) an. Die AP-Bindungsstellen ließen sich durch Fuchsin nachweisen (Dako Cytomation).

2.4.4 PAS-Färbung

Die Periodic-acid-Schiff (PAS)- oder auch Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung dient dem histologischen Nachweis von Glykogen, Cellulose, Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glykoproteinen. Durch 5%ige Periodsäure kommt es über Oxidation von Glykolgruppen zu Aldehydgruppen, die reduzierend wirken. Nach Spülung mit Aqua dest. erfolgt die Zugabe des Schiff'schen Reagenz, deren Bindung an Aldehydgruppen zu einem molekularen

Umbau mit daraus resultierender Chromogenität (magenta-rot) führt. Im nachfolgenden Schritt wird überschüssige fuchsin-schwefelige Säure entfernt und die Farbe stabilisiert. Die kontrastreiche Kernfärbung erfolgt mittels Haematoxylin.

2.4.5 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie (Axioskop 40, Zeiss, Jena, Deutschland) beruht auf dem Prinzip der Doppelbrechung, die von der Anordnung der Moleküle bzw. Atome des zu untersuchenden Gewebes abhängt. Ein Polarisator (auch Primärfilter genannt) zerlegt das diffus in alle Richtungen schwingende, natürliche Licht in einen sogenannten außerordentlichen und einen ordentlichen Lichtstrahl. Während der in alle Richtungen schwingende ordentliche Lichtstrahl absorbiert wird, kann der außerordentliche Strahl aufgrund seiner Schwingung auf einer definierten Ebene durch den Polarisator hindurchtreten und linear polarisiertes Licht erzeugen. Trifft dieses Licht auf eine doppelbrechende Struktur, wie beispielsweise Kollagen, wird das Licht in zwei Komponenten aufgespalten und gedreht. Ein nachgeschalteter Analysator lässt dann das Licht wiederum nur in Abhängigkeit seiner Schwingungsrichtung hindurchtreten und stellt somit Strukturen, die aufgrund ihrer Ausrichtung das Licht gleich drehen, leuchtend dar.

2.4.6 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung der Materialarchitektur von NanoBone[®] wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) eingesetzt. Hierfür wurden die exzidierten Rückenhautkammer-Proben entkalkt und auf Plexiglasträger aufgebracht. Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM DSM 960, Zeiss, Jena, Deutschland) erhielt das NanoBone[®] nach Befestigung auf Aluminiumplatten einen Goldüberzug. Durch den Silicium (Si)-EDX-Detektor des Rasterelektronenmikroskops gelang die exakte Darstellung der Mikroarchitektur des Knochenersatzstoffes.

2.5 Experimentelles Protokoll

2.5.1 Versuchsgruppen

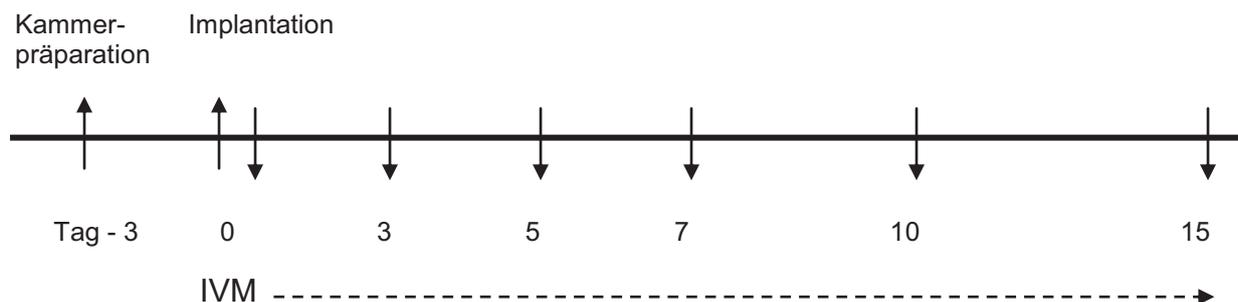
Für die Untersuchungen wurden die Tiere randomisiert drei Gruppen zugeteilt:

- NanoBone[®]-Plättchen (n=7)
- NanoBone[®]-Granulat (n=7)
- Autologe Spongiosa (n=6)

2.5.2 Versuchsablauf

Die Knochenersatzmaterialien wurden unter Vermeidung von Kontamination, mechanischer Irritation oder Beschädigung der Kammer nach einer postoperativen Erholungsphase von 3 Tagen auf die quergestreifte Skelettmuskulatur in das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer implantiert. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Kammer und die implantierten Knochenersatzstoffe täglich makroskopisch kontrolliert und dokumentiert. Tiere mit entzündlich verändertem Gewebe oder Zeichen einer Einblutung konnten so rechtzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Desweiteren wurde auf normales Fress- und Putzverhalten der Tiere geachtet. Die Versuchstiere, die eine intakte Mikrozirkulation aufwiesen, wurden an Tag 3 nach der Kammerpräparation randomisiert den Versuchsgruppen zugewiesen.

Die Versuche erfolgten nach folgendem Zeitschema:



An Tag -3 erfolgte die Präparation der Rückenhautkammer, an Tag 0 die Implantation von NanoBone[®] bzw. autologer Spongiosa. Die mikrozirkulatorischen Parameter wurden 20min, 3, 5, 7, 10 und 15 Tage nach Implantation der Materialien mittels Intravitalmikroskopie

untersucht. Am Ende der *in vivo* Experimente wurden die Tiere durch eine Überdosis an Ketamin-Xylazin getötet und histologische Untersuchungen durchgeführt.

2.6 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen in Abhängigkeit der entsprechenden Zeitpunkte mittels „two way analysis of variance (two-way ANOVA) for multiple comparisons“ gefolgt vom Holm-Sidak-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und der Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

Falls eine Normalverteilung der Messwerte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mit der Kruskal Wallis Varianzanalyse und der paarweise Vergleich mit dem Mann-Whithney-U-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni.

Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung des Softwarepakets SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, SanRafael, CA, USA). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde bei der Prüfung als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Physiologische Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Das physiologische Gefäßsystem des Hautmuskels der Rückenhautkammer umfasst terminale Arteriolen, nutritive Kapillaren, postkapillare Venolen und Sammelvenolen. Das einschichtige nutritive Kapillarnetz des quergestreiften Muskels wird über die sich innerhalb der Rückenhautkammer verzweigenden terminalen Arteriolen mit oxygeniertem Blut versorgt. Die Kapillaren sind typischerweise in Abständen von ca. 40-60 μm parallel angeordnet, wobei strickleiterartige Quervernetzungen eine Verbindung der Gefäße untereinander gewährleisten (Abb. 11). Nach dem Sauerstoffaustausch wird das sauerstoff- und nährstoffarme Blut über postkapillare Venolen und Sammelvenolen drainiert. Intravitalmikroskopisch unterscheiden sich Venolen aufgrund der umgekehrten Flussrichtung, dem langsameren Blutfluss und der unregelmäßigeren Wandstruktur von Arteriolen.

In der vorliegenden Studie wurden die Gefäße des quergestreiften Hautmuskels an den einzelnen Untersuchungstagen während des gesamten Beobachtungszeitraums kontrastreich mit FITC-Dextran dargestellt. Der Prozess der Angiogenese konnte anhand charakteristischer Entwicklungsstufen verfolgt werden, da sich neugebildete Gefäße wegen des Fehlens der typischen Mikroarchitektur gut als solche identifizieren ließen.

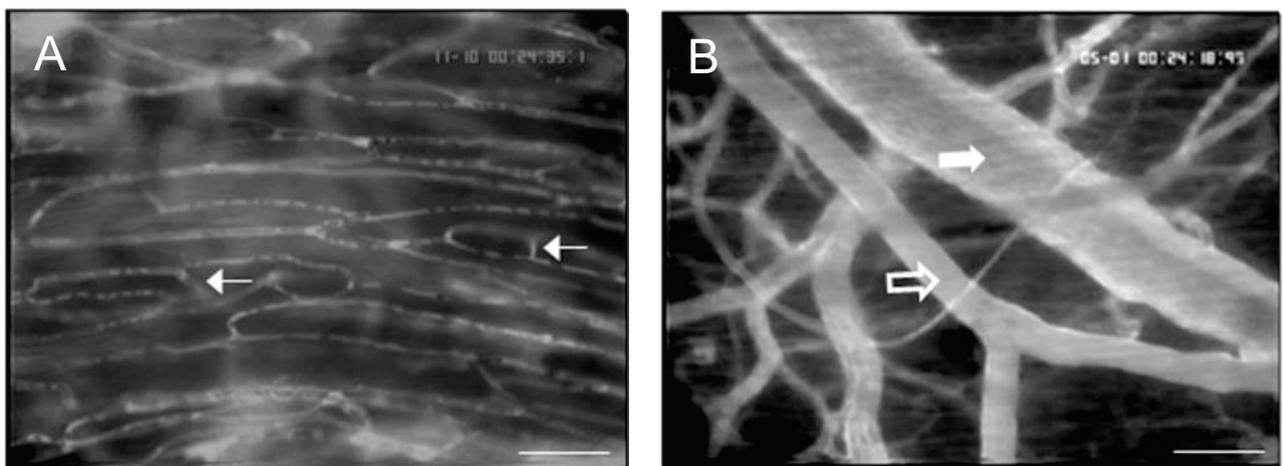


Abbildung 11: Intravitalmikroskopische Aufnahme zur Darstellung der Gefäßarchitektur des quergestreiften Hautmuskels innerhalb der Rückenhautkammer. Typisch sind die parallel verlaufenden Kapillaren mit den strickleiterartigen Querverbindungen (Pfeile) (A). Eine Arteriole (Pfeil ungefüllt) wird klassischerweise von der dazugehörigen Venole (Pfeil gefüllt) begleitet (B) (Balken = 100 μm).

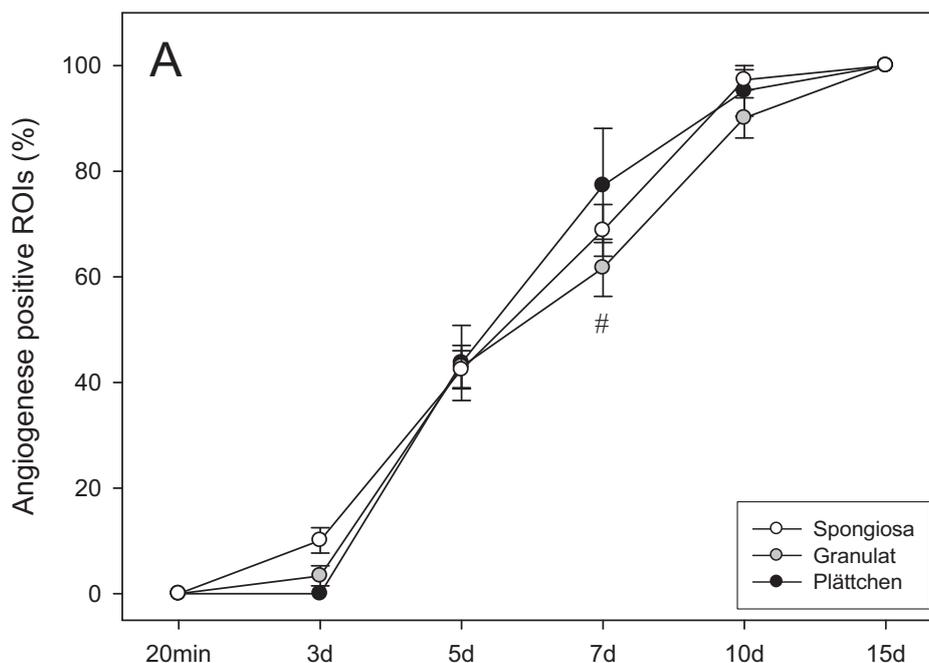
3.2. Neovaskularisation

3.2.1 Angiogenese-positive Regionen

Die intravitalmikroskopische Analyse der Implantate erfolgte entsprechend den festgelegten Untersuchungszeitpunkten in der Randzone und im Zentrum der Implantate. Bereits am 5. Tag nach Implantation der Materialien wurden kapillare Gefäßausprossungen - größtenteils von den Kapillaren und teilweise von den postkapillaren Venolen ausgehend - als erste Zeichen einer angiogenen Reaktion des umgebenden Empfängergewebes beobachtet. Bis zum Tag 15 entwickelte sich ein von diesen Gefäßsprossen ausgehendes dichtes mikrovaskuläres Netzwerk. Hierbei war die Gefäßneubildung im Randbereich der Implantate schneller als im Zentrum. Im Versuchsverlauf zeigten alle drei Versuchsgruppen im Randbereich ein ähnliches Verhalten der Angiogenese mit 100% ROIs an Tag 15 (Abb. 12A).

Im Zentrum der Implantate stellte sich die Angiogenese der Knochenersatzmaterialien anders dar. Das stark angiogene Potential der autologen Spongiosa als Goldstandard spiegelte sich in einer hohen Anzahl Angiogenese-positiver Felder wider (90% ROIs an Tag 15) (Abb. 12B). NanoBone[®] dagegen zeigte im Zentrumsbereich ein deutliches Defizit: Während beim Granulat mit 60% ROIs an Tag 15 noch eine schwache angiogene Antwort beobachtet worden ist, war diese für NanoBone[®]-Plättchen mit lediglich 40% Angiogenese-positiver Felder vernachlässigbar klein.

Randzone



Zentrum

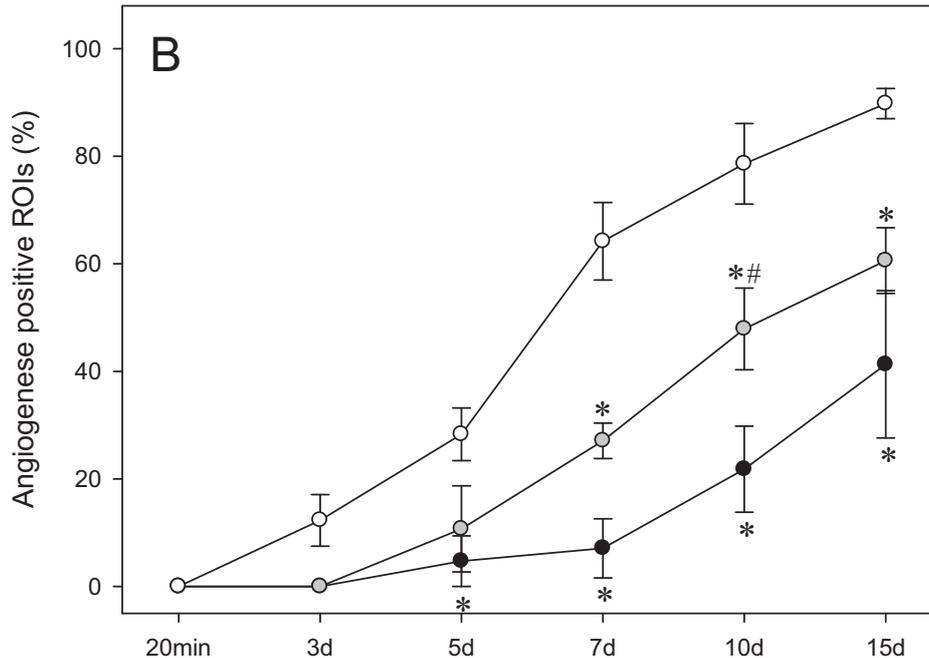
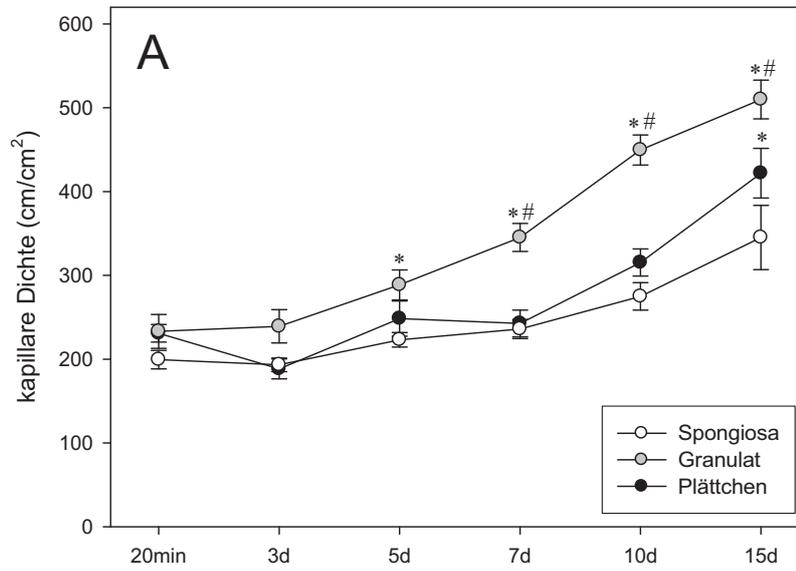


Abbildung 12: Angiogenese-positive Felder (%) im Randbereich (A) und im Zentrum (B) der Knochenersatzmaterialien. Two-way ANOVA. * $p < 0,05$ vs autologer Spongiosa, # $p < 0,05$ vs NanoBone®-Plättchen.

3.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Die quantitative Auswertung der Kapillardichte der neugebildeten Gefäßnetzwerke erfolgte ebenfalls im Randbereich und im Zentrum der Implantate und diente der genaueren Charakterisierung der Angiogenese. Das Ausmaß der angiogenen Antwort fiel zwischen den NanoBone®-Gruppen und der autologen Spongiosa deutlich unterschiedlich aus. Auffällig war, dass die funktionelle Kapillardichte der Gefäßnetzwerke im Randbereich des Granulats an Tag 15 mit Werten von über 500 cm/cm^2 deutlich über denen der anderen beiden Versuchsgruppen (NanoBone®-Plättchen $\sim 400 \text{ cm/cm}^2$, autologe Spongiosa $\sim 300 \text{ cm/cm}^2$) lag (Abb.13A). Im Gegensatz dazu dominierte im Zentrum der Implantate die autologe Spongiosa mit Werten von $\sim 300 \text{ cm/cm}^2$ (Abb.13B). Die funktionelle Kapillardichte fiel hier für die beiden NanoBone®-Versuchsgruppen mit Werten von 75 cm/cm^2 für das Granulat bzw. 40 cm/cm^2 für das Plättchen deutlich geringer aus (Abb. 13B). In den peripheren Kammerabschnitten der Gruppen NanoBone®-Plättchen und autologe Spongiosa blieb die funktionelle Kapillardichte der Kapillaren im Versuchsverlauf mit Werten von ca. 200 cm/cm^2 weitgehend unverändert. Die funktionelle Kapillardichte der Gruppe mit NanoBone®-Granulat stieg dagegen auf Werte von 300 cm/cm^2 an (Abb. 14).

Randzone



Zentrum

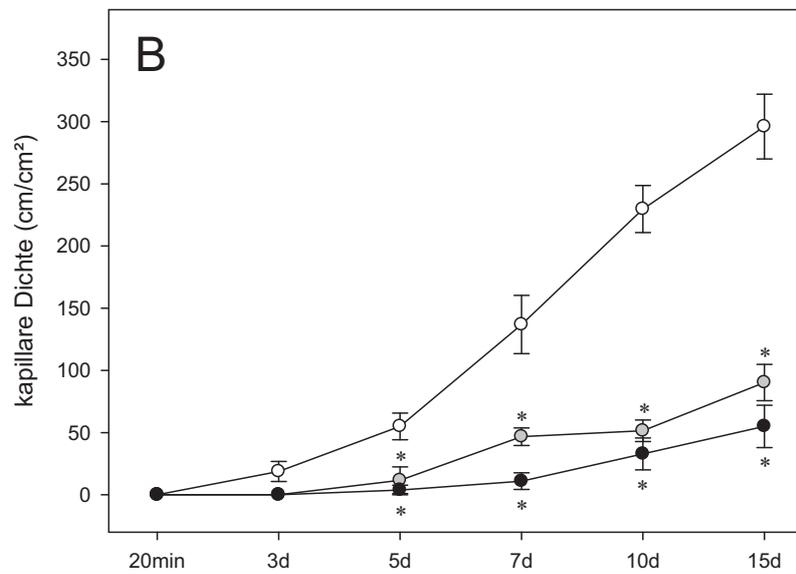


Abbildung 13: Funktionelle Kapillardichte der neu gebildeten Gefäßnetzwerke im Randbereich (A) und Zentrum (B) der Implantate über den Versuchszeitraum von 15 Tagen. Two-way ANOVA. * $p < 0,05$ vs autologer Spongiosa, # $p < 0,05$ vs NanoBone®-Plättchen.

Peripherie

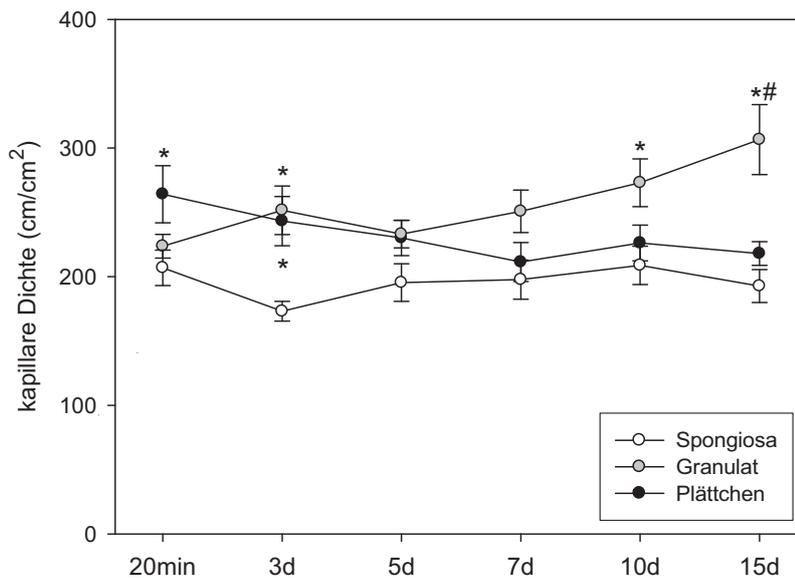


Abbildung 14: Funktionelle Kapillardichte der neu gebildeten Gefäßnetzwerke in den peripheren Kammerabschnitten über den Versuchszeitraum von 15 Tagen. Two-way ANOVA. * $p < 0,05$ vs autologer Spongiosa, # $p < 0,05$ vs NanoBone®-Plättchen.

In der Gruppe der autologen Spongiosa wurde die angiogene Antwort mit Tag 3 zu einem früheren Zeitpunkt als in den beiden NanoBone®-Versuchsgruppen induziert (Abb. 13A). Im Randbereich der beiden NanoBone®-Gruppen wurden Gefäßaussprossungen als erste Zeichen einer angiogenen Antwort des Empfängergewebes an Tag 5 nach Implantation beobachtet (Abb. 15B, Abb. 16B). An Tag 10 war der Randbereich der NanoBone®-Implantate bereits gut vaskularisiert, während im Zentrum nur vereinzelt neugeformte Blutgefäße nachweisbar waren (Abb. 15C, Abb. 16C). Bis zum Tag 15 entwickelte sich ein von den Gefäßaussprossungen ausgehendes dichtes mikrovaskuläres Netzwerk (Abb. 15D, Abb. 16D). Während der Prozess der Angiogenese in den NanoBone®-Gruppen vorrangig im Randbereich zu beobachten war, begann er bei der autologen Spongiosa vor allem im Zentrum des Implantats (Abb. 17B und C).

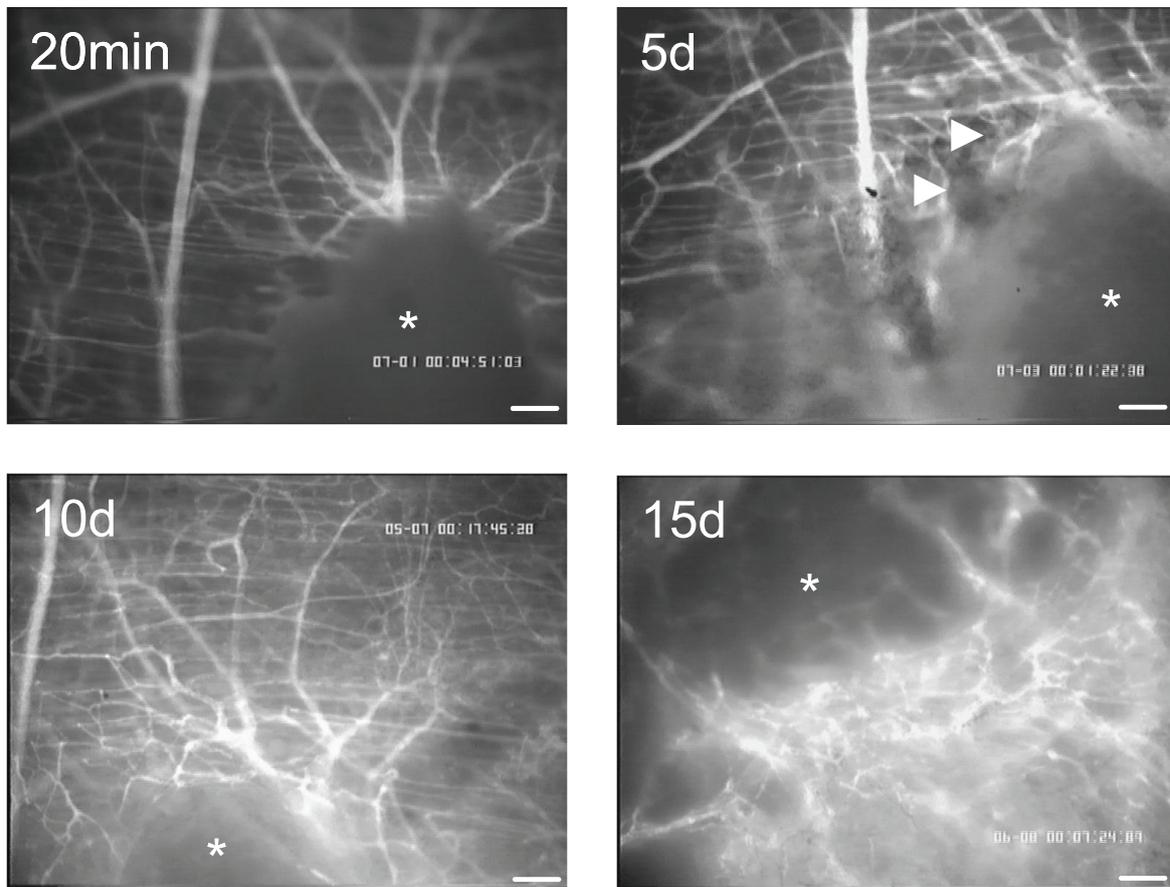


Abbildung 15: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der Angiogenese von NanoBone[®]-Plättchen 20 Minuten sowie 5, 10 und 15 Tage nach Implantation. Bereits am 5. Tag nach Implantation wurden im Randbereich des NanoBone[®]-Plättchens Gefäßausprossungen (Pfeilspitzen) als erste Zeichen einer angiogenen Reaktion des Empfängergewebes beobachtet. An Tag 10 ist der Randbereich des Implantats bereits gut vaskularisiert; im Zentrum (Sternchen) sind nur vereinzelt neugeformte Blutgefäße nachweisbar. Der Prozess der Angiogenese setzt sich bis zum Tag 15 vorrangig im Randzonenbereich fort (Balken = 100 μ m).

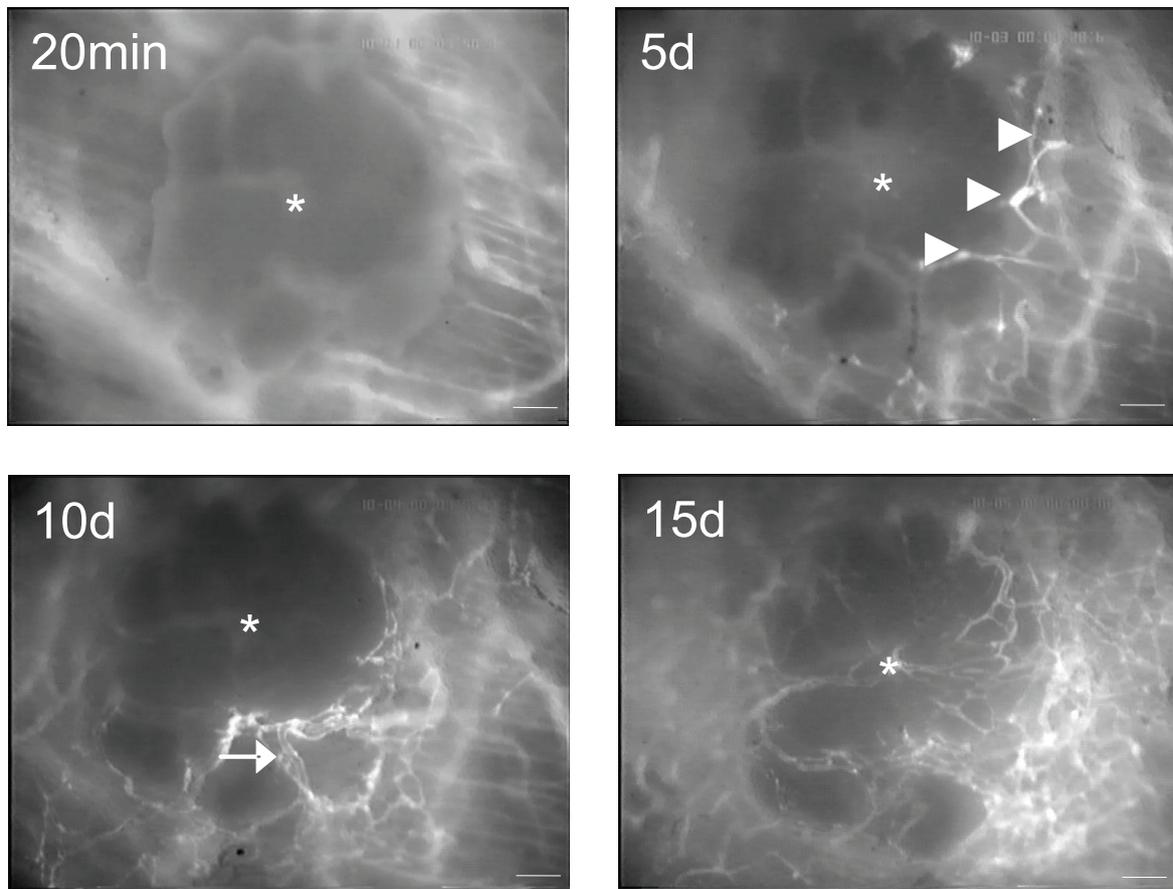


Abbildung 16: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der Angiogenese von NanoBone[®]-Granulat 20 Minuten sowie 5, 10 und 15 Tage nach Implantation. Bereits am 5. Tag nach Implantation wurden im Randbereich von NanoBone[®]-Granulat Gefäßausprossungen (Pfeilspitzen) als erste Zeichen einer angiogenen Reaktion des Empfängergewebes beobachtet. An Tag 10 ist der Randbereich des Implantats bereits gut vaskularisiert, im Zentrum (Sternchen) sind nur wenige neugeformte Blutgefäße nachweisbar. Das sauerstoff- und nährstoffarme Blut der neugebildeten Gefäße wird über postkapillare Venolen und Sammelvenolen drainiert (Pfeil). An Tag 15 ist das Implantat von einem z.T. sehr dichten mikrovaskulären Netzwerk umgeben bzw. überzogen (Balken = 100 μ m).

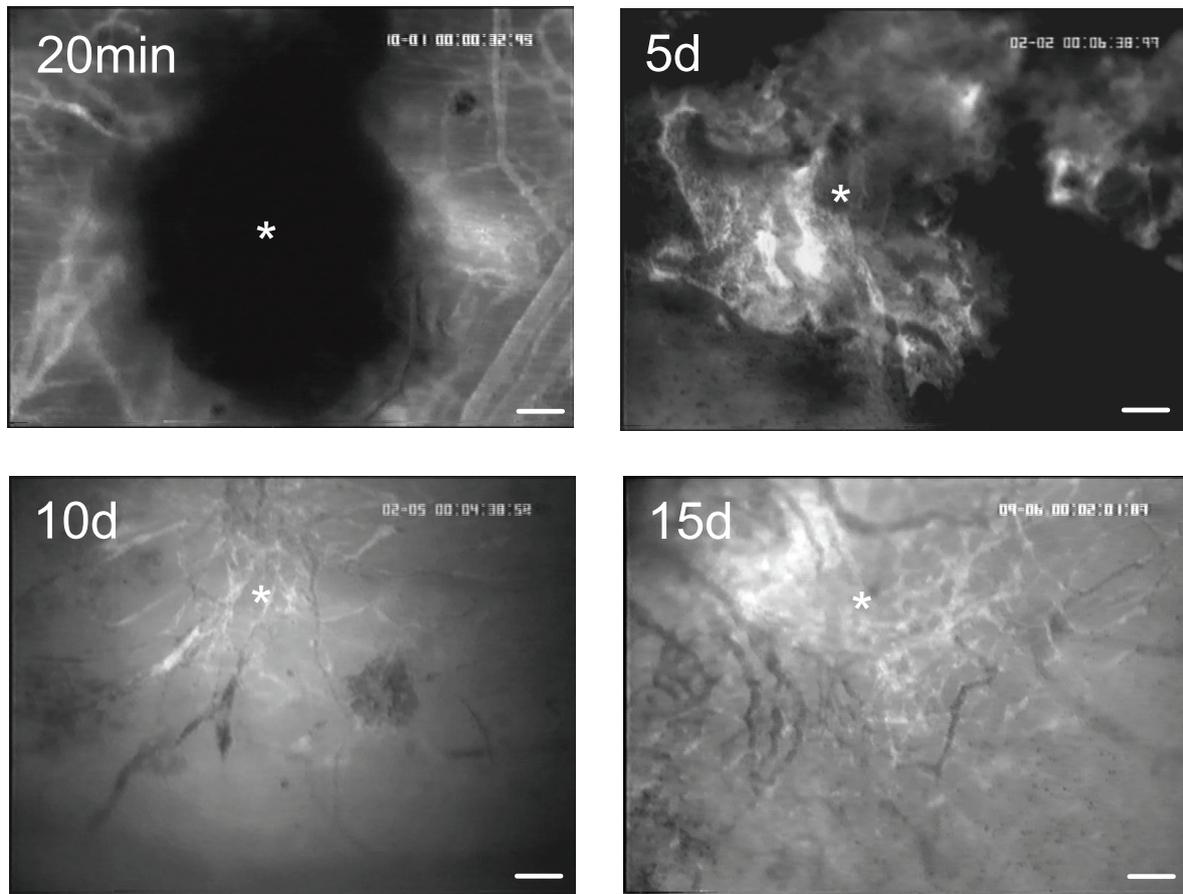


Abbildung 17: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der Angiogenese von autologer Spongiosa 20 Minuten sowie 5, 10 und 15 Tage nach Implantation. Die in der autologen Spongiosa enthaltenen Erythrozyten lassen das Implantat dunkel erscheinen. Der Prozess der Angiogenese beginnt hier vor allem im Zentrum des Implantats (Sternchen). An Tag 15 erstreckt sich ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk um bzw. über das Implantat (Balken = 100 μm).

3.3 Biokompatibilität

3.3.1 Mikrohämodynamik

Die mikrohämodynamischen Parameter Gefäßdurchmesser, Erythrozytengeschwindigkeit sowie Blutvolumenfluss dienten zur Analyse des Blutflusses in den Mikrogefäßen (Kapillaren, Arteriolen und Venolen). Über den gesamten Versuchszeitraum blieben die venolären Gefäßdurchmesser innerhalb der drei Versuchsgruppen (NanoBone®-Plättchen, NanoBone®-Granulat, autologe Spongiosa) weitgehend konstant. Es ergaben sich lediglich kleine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Tab. 1).

Auch die Erythrozytengeschwindigkeit mit etwa 1200 µm/s und der Volumenfluss mit etwa 11000 pl/s waren in allen Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant, wobei die Implantation der Knochenersatzmaterialien mit einem initialen Anstieg der Erythrozytengeschwindigkeit in allen Versuchsgruppen verbunden war (Tab. 1). Insgesamt ergab sich durch die Implantation der Knochenersatzmaterialien keine wesentliche Beeinflussung der mikrohämodynamischen Parameter. Daher kann von einer guten Biokompatibilität aller drei Knochenersatzmaterialien ausgegangen werden.

		20 min	3d	5d	7d	10d	15d
Durchmesser (µm)	NanoBone® -Plättchen	154 ± 9	167 ± 16*	154 ± 17	152 ± 19	143 ± 20	149 ± 15
	NanoBone® -Granulat	121 ± 12	138 ± 12	134 ± 12	133 ± 12	143 ± 14	163 ± 18
	autologe Spongiosa	122 ± 7	111 ± 12	117 ± 11	145 ± 18	134 ± 19	135 ± 20
Erythrozyten- geschwindigkeit (µm/s)	NanoBone® -Plättchen	703 ± 89	1019 ± 121	940 ± 85	1306 ± 216	1024 ± 109	995 ± 97
	NanoBone® -Granulat	885 ± 146	860 ± 171	970 ± 149	1230 ± 189	1126 ± 264	1200 ± 228
	autologe Spongiosa	1567 ± 295	2031 ± 381	1514 ± 393	2100 ± 245	2027 ± 278	1939 ± 170
Blutvolumenfluss (pl/s)	NanoBone® -Plättchen	9074 ± 1842	13091 ± 2692	11750 ± 2773	13494 ± 3856	11811 ± 3259	10391 ± 2336
	NanoBone® -Granulat	6299 ± 1846	8761 ± 1796	10009 ± 1720	11611 ± 2954*	11580 ± 3545	13318 ± 2977
	autologe Spongiosa	10167 ± 1245	11548 ± 2111	10682 ± 3052	18584 ± 4700	13169 ± 1570	13042 ± 2880

Tabelle 1: Darstellung von venolärem Gefäßdurchmesser, Erythrozytengeschwindigkeit und Blutvolumenfluss von NanoBone®-Plättchen, NanoBone®-Granulat und autologer Spongiosa entsprechend den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Two-way ANOVA. * p < 0,05 vs autologer Spongiosa.

3.3.2 Leukozyten-Fließverhalten

Die Implantation der Knochenersatzmaterialien führte in den postkapillaren Venolen und Sammelvenolen aller drei Versuchsgruppen zu einer moderaten Aktivierung von Leukozyten mit einer Fraktion rollender Leukozyten von 10 bis 20% innerhalb der ersten 20 Minuten (Abb. 18A). Während des 15-tägigen Versuchszeitraums wurde aber keine weitere Zunahme der leukozytären Aktivierung beobachtet (Abb. 18A). Die Anzahl fest adhärenter Leukozyten war über den gesamten Versuchszeitraum weitgehend konstant (Abb. 18B).

Die Initiierung eines akuten Entzündungsprozesses im Gewebe ist wesentlich von der Rekrutierung leukozytärer Zellen abhängig. Das Fehlen einer venulären Leukozyten-Akkumulation zeigt (Abb. 18D), dass die Biokompatibilität von NanoBone[®] vergleichbar der autologen Spongiosa ist.

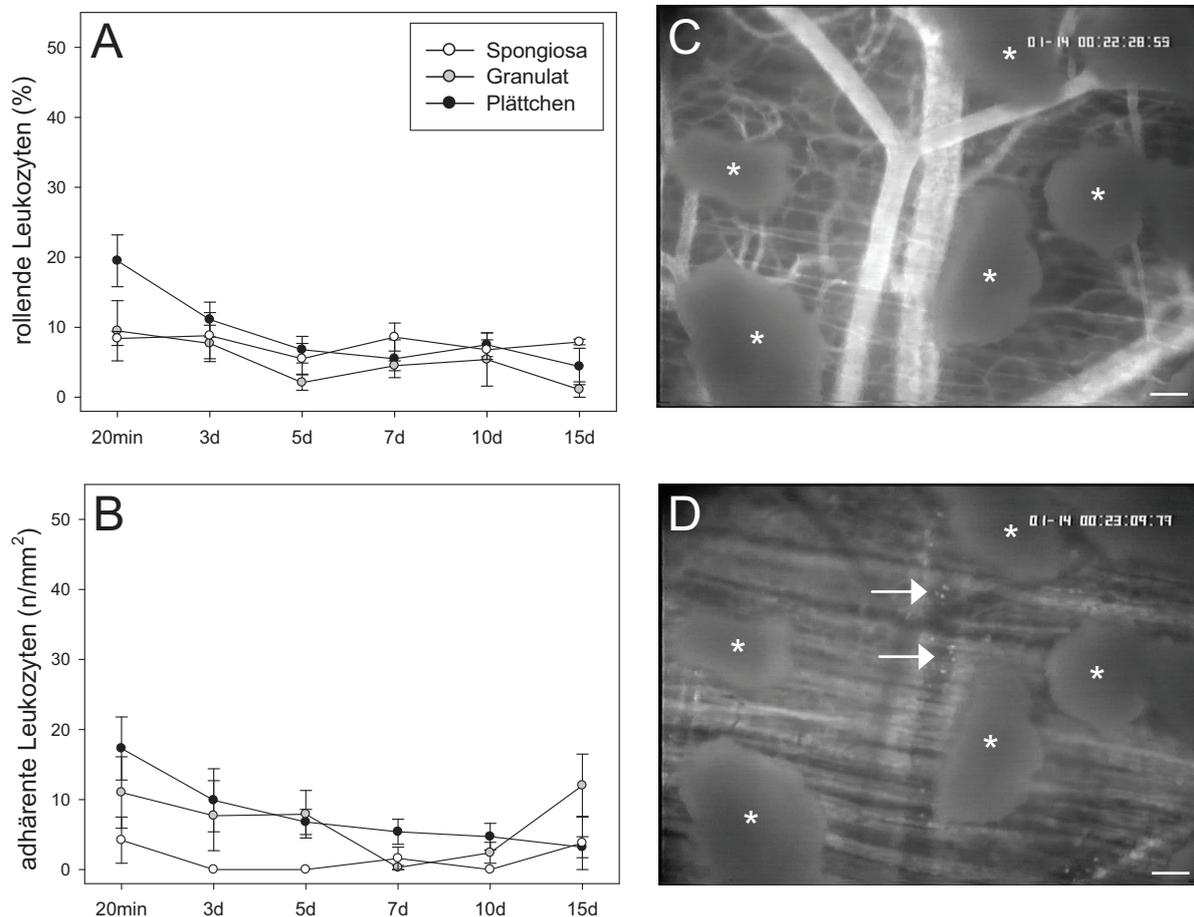


Abbildung 18: Quantitative Analyse rollender Leukozyten (%) (A) und adhärenter Leukozyten (Zellen/mm²) (B) in postkapillaren Venolen und Sammelvenolen über den Versuchszeitraum von 15 Tagen. Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer Venole in Blaulicht-Epi-Illumination (C) und Grünlicht-Epi-Illumination (D) zur Darstellung von Leukozyten (Pfeile). In der Umgebung befinden sich NanoBone[®]-Granulatkörnchen (Sternchen). Lediglich wenige Leukozyten interagieren mit dem Endothel der Sammelvenolen. Das Fehlen einer venulären Leukozyten-Akkumulation weist auf eine gute Biokompatibilität von NanoBone[®] hin (Balken = 100 µm).

3.4 Histomorphologie

3.4.1 Haematoxilin- und Eosin-Färbung / CD31-Immunhistochemie

Die adäquate Biokompatibilität mit entsprechender Integration in das Kammergewebe bestätigte sich auch histologisch:

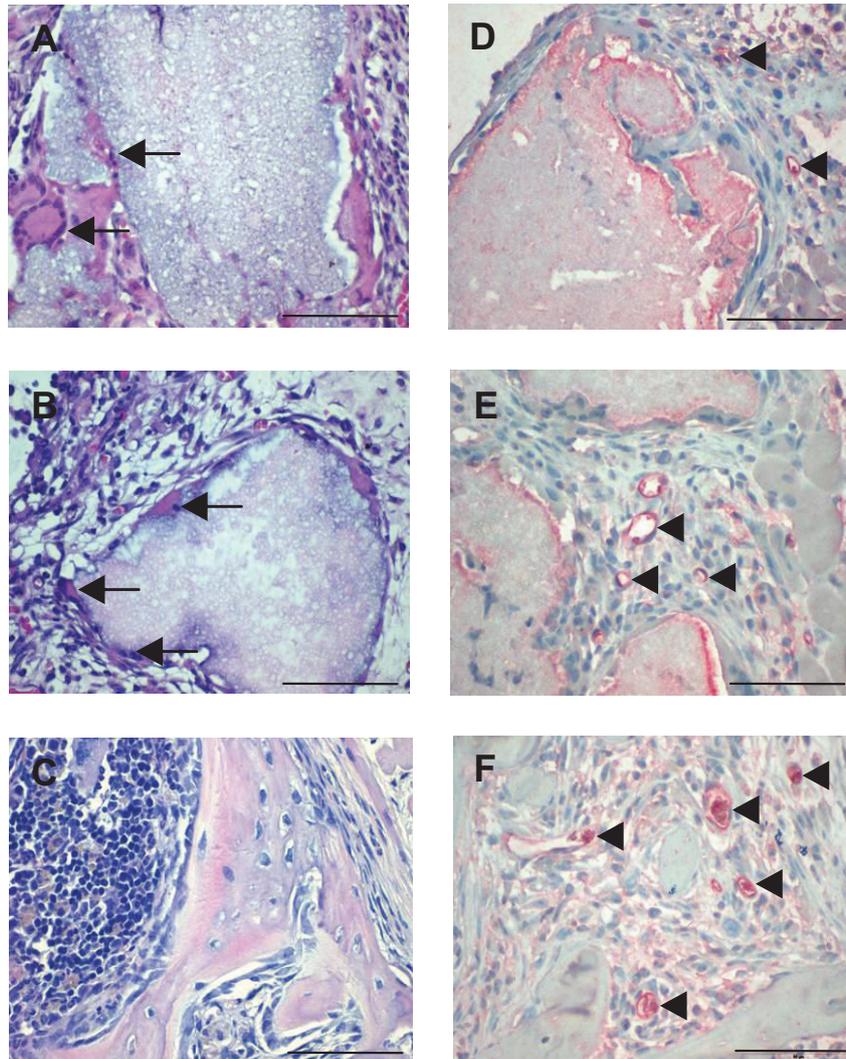


Abbildung 19: Haematoxilin- und Eosin-Färbung von NanoBone[®]-Plättchen (A), NanoBone[®]-Granulat (B) und autologer Spongiosa (C) sowie CD31-Immunhistochemie von NanoBone[®]-Plättchen (D), NanoBone[®]-Granulat (E) und autologer Spongiosa (F) an Tag 15 nach Implantation in die Rückenhautkammer der Maus. Es befinden sich mononukleäre und multinukleäre Riesenzellen (Pfeile) in der direkten Umgebung von NanoBone[®] (A und B). Das Gewebe um die autologe Spongiosa (C) zeigt dagegen keine Infiltration von mono- oder multinukleären Zellen. Insgesamt lässt sich - wie anhand der CD31-positiven Gefäßlumina sichtbar (Pfeilspitzen) - ein gefäßreiches Granulationsgewebe nachweisen. Die kapillare Dichte für NanoBone[®]-Granulat (E) ist dabei höher als für NanoBone[®]-Plättchen (D) (Balken = 100 µm).

Als Basisfärbung sowie zur Hintergrundfärbung immunhistochemischer Schnitte wurden Hämatoxilin- und Eosin-Färbungen durchgeführt. Diese Methode läßt die den blauen Farbstoff Hämatoxilin aufnehmenden Zellkerne deutlich gegen das mit Eosin rötlich gefärbte Zytoplasma hervortreten. Die lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen Rückenhautkammerpräparate an Tag 15 nach Implantation der Knochenersatzmaterialien bestätigte die intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Mittels Haematoxilin- und Eosin-Färbung ließ sich für alle drei Versuchsgruppen ein gut vaskularisiertes Bindegewebe, das zu einer guten Inkorporation der Knochenersatzmaterialien führte, nachweisen. In unmittelbarer Umgebung der NanoBone[®]-Implantate fand sich eine erhöhte Anzahl mononukleärer Zellen sowie mehrkerniger Riesenzellen (Abb. 19A und B). Das Gewebe um die autologe Spongiosa zeigte dagegen keine Infiltration von mono- oder multinukleären Riesenzellen (Abb. 19C).

Endothelzellen sind konstitutive Bestandteile aller Blutgefäße und kleiden das Gefäßsystem aus. CD31 ist ein Adhäsionsmolekül (membrangebundene Glykoproteine) humaner Endothelzellen und wird histologisch zum Nachweis von Endothelzellen eingesetzt. Die CD31-Immunhistochemie bestätigte die hohe kapillare Dichte von autologer Spongiosa und NanoBone[®]-Granulat im Gegensatz zum NanoBone[®]-Plättchen, für das eine deutlich geringere Anzahl CD31-positiver Gefäßlumina nachweisbar war (Abb. 19D-F). Diese Beobachtung stimmt mit den intravitalmikroskopischen Ergebnissen überein, welche für NanoBone[®]-Plättchen im Vergleich zu NanoBone[®]-Granulat und autologer Spongiosa eine geringere angiogene Gewebereaktion gezeigt hatten.

3.4.2 F4/80-Immunhistochemie

Zur näheren Charakterisierung der mononukleären Zellen sowie der mehrkernigen Riesenzellen wurden spezifische immunhistochemische Analysen durchgeführt. Während der Nachweis des Osteoklastenmarkers TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) als auch von Kathepsin K negativ ausfiel, erwiesen sich die mononukleären Zellen sowie einige mehrkernige Riesenzellen als F4/80-positiv (Makrophagenmarker) (Abb. 20A und B). Somit handelt es sich um Zellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie, aus der sich auch Osteoklasten differenzieren. Das Gewebe um die autologe Spongiosa zeigte keine Infiltration von mononukleären Zellen oder Riesenzellen, sodass sich auch keine F4/80-positiven Zellen detektieren ließen.

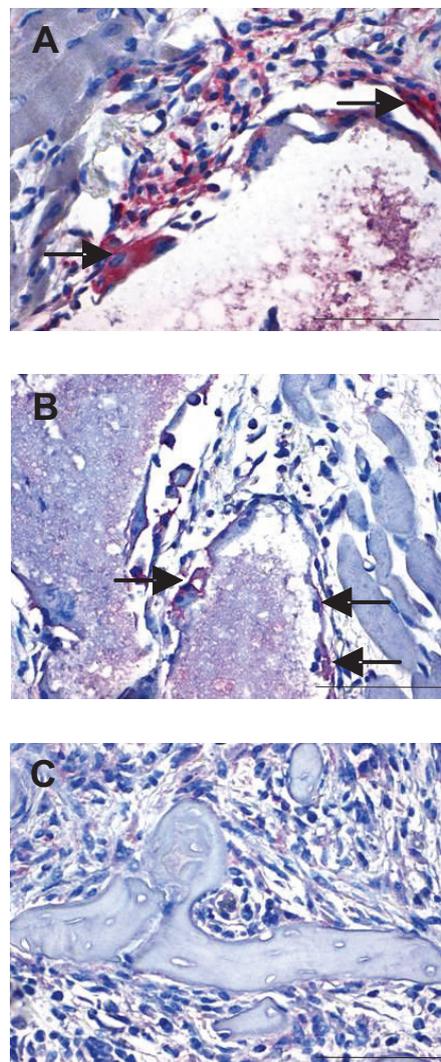


Abbildung 20: F4/80-Immunhistochemie von NanoBone®-Plättchen (A), NanoBone®-Granulat (B) und autologer Spongiosa (C) zur näheren Charakterisierung der mononukleären und multinukleären Riesenzellen. In der unmittelbaren Umgebung von NanoBone® zeigen sich einige Zellen F4/80-positiv (Pfeile) (Balken = 100 µm).

3.4.3 Periodic-acid-Schiff (PAS)-Färbung

Die Periodic-acid-Schiff (PAS)-Färbung dient dem histologischen Nachweis von Glykogen, Cellulose, Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glykoproteinen. Glykoproteine gehören neben Kollagen, Proteoglykanen, Phospholipiden, Osteonektin und Osteopontin zum organischen Anteil der nicht zellulären Knochenmatrix.

Sowohl NanoBone[®] als auch autologe Spongiosa zeigten sich PAS-positiv (magenta-rot) (Abb. 21). Dies kann für NanoBone[®] als möglicher Hinweis auf einen Matrixwechsel, d.h. eine Umwandlung der anorganischen Kieselgelmatrix in ein organisches Gewebe, gewertet werden.

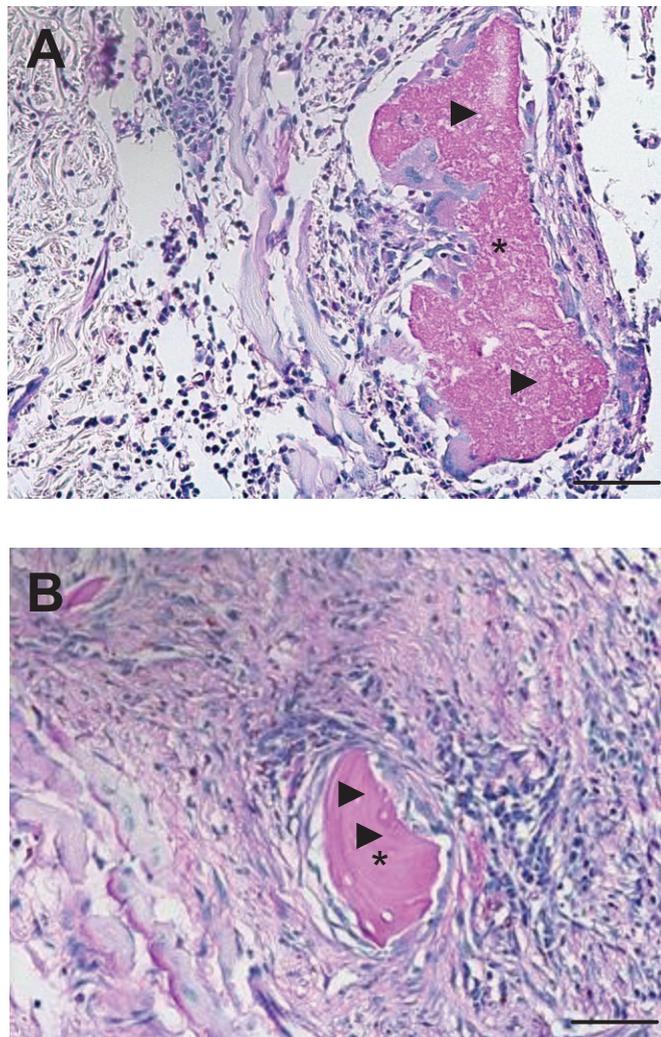


Abbildung 21: Periodic-acid-Schiff (PAS)-Färbung von NanoBone[®]-Granulat (A, Sternchen) und autologer Spongiosa (B, Sternchen). Sowohl NanoBone[®]-Granulat und autologe Spongiosa zeigen sich PAS-positiv (Pfeilspitzen) (Balken = 100 µm).

3.4.4 Polarisationsmikroskopie

Zur Quantifizierung des organischen Durchbaus der Implantate wurden einige histologische Präparate exemplarisch polarisationsmikroskopisch analysiert. Prinzipiell konnten Kollagenfasern (bläulich bzw. rötlich) und somit Granulationsgewebe nachgewiesen werden (Abb. 22).

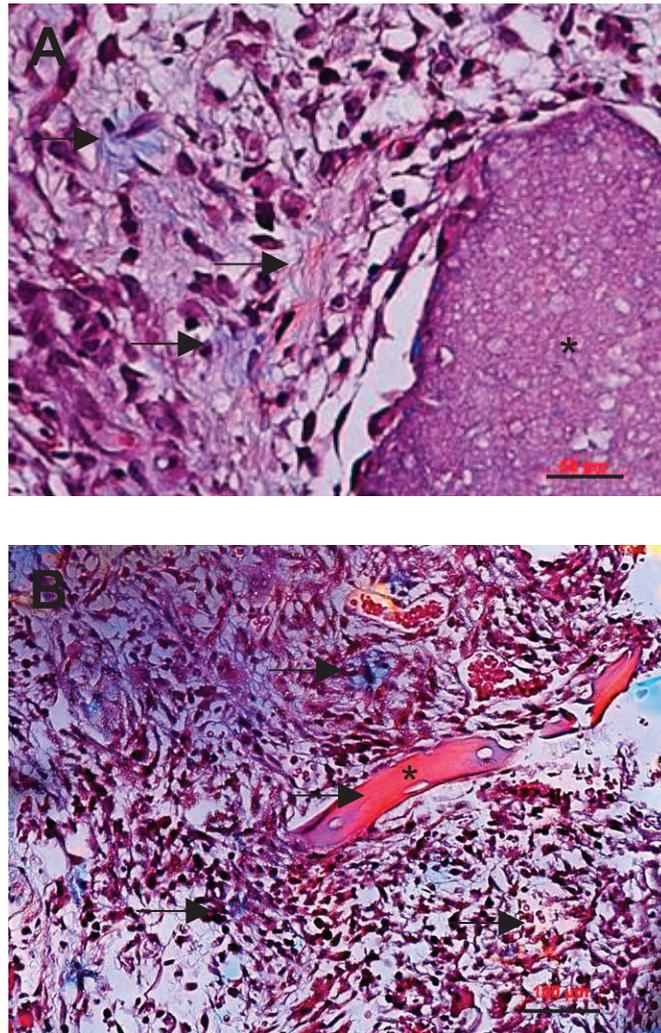


Abbildung 22: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von NanoBone[®]-Granulat (A, Sternchen) und autologer Spongiosa (B, Sternchen). Es konnten sowohl für NanoBone[®]-Granulat als auch für die autologe Spongiosa Kollagenfasern (Pfeile) nachgewiesen werden. Die Kollagenfasern stellen sich entsprechend ihrer Ausrichtung bläulich oder rötlich dar (Balken = 50 µm in A bzw. 100 µm in B).

3.4.5 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Veranschaulichung sowie zur Analyse möglicher Veränderungen der chemischen Zusammensetzung von NanoBone[®] wurden exemplarisch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Es konnte ein gut vaskularisiertes Granulationsgewebe in der unmittelbaren Umgebung von NanoBone[®] nachgewiesen werden (Abb. 23 und Abb. 24).

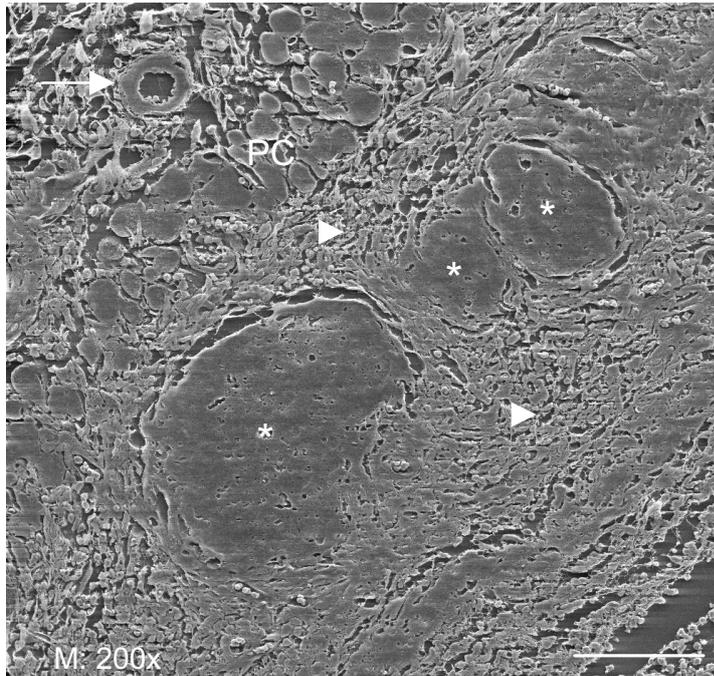


Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von NanoBone-Granulat[®] (Sterne) an Tag 15 nach Implantation in die Rückenhautkammer. In der Übersichtsaufnahme (200-fache Vergrößerung) sind der Musculus panniculus carnosus (PC) sowie der Querschnitt einer Arteriole (Pfeil) zu erkennen. Die NanoBone[®]-Granulat-körnchen sind von Granulationsgewebe umgeben (Pfeilspitzen) (Balken = 100 µm).

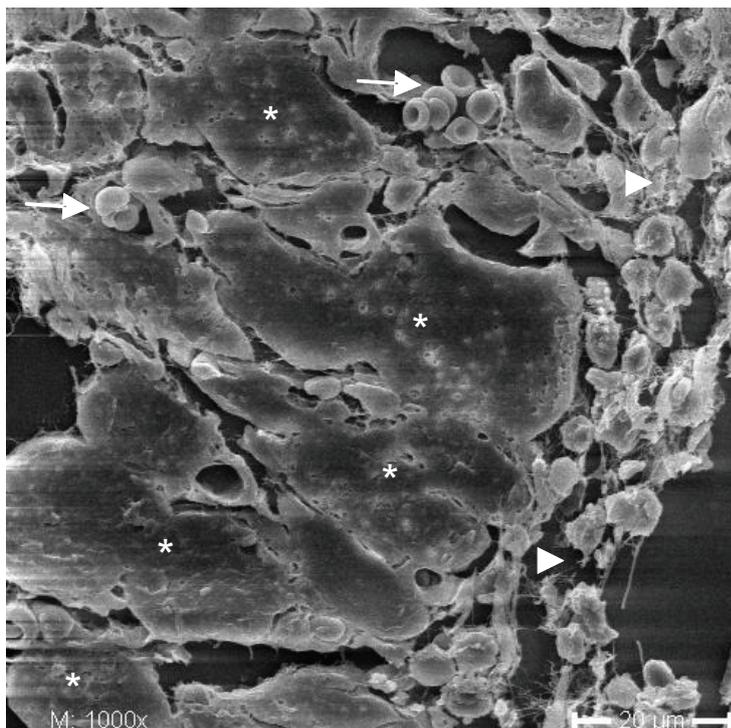


Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von NanoBone[®]-Granulat (Sternchen) an Tag 15 nach Implantation in die Rückenhautkammer. In der 1000-fachen Vergrößerung sind in dem das Granulat umgebenden Granulationsgewebe (Pfeilspitzen) Erythrozyten-gefüllte Gefäßlumina (Pfeile) zu erkennen (Balken = 20 µm).

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray spectroscopy (EDX)) in Kombination mit Rasterelektronenmikroskopie ist ein Verfahren aus der Materialanalytik und nutzt die von einer Probe emittierte Röntgenstrahlung zur Untersuchung ihrer spezifischen Elementarzusammensetzung. Die Atome der Probe werden dazu mithilfe eines Elektronenstrahls angeregt und erzeugen ein für jedes in der Probe enthaltene Element charakteristisches Röntgenspektrum (elementspezifische Energie).

Im EDX-Spektrum ist die Signalintensität in Abhängigkeit von der Energie (Kiloelektronenvolt (keV)) der Röntgenquanten aufgetragen. Das EDX-Spektrum besteht aus element-spezifischen Peaks und einer breiten unspezifischen Basis, die durch Bremsstrahlung erzeugt wird.

Die Analyse des EDX-Spektrums der NanoBone[®]-Granulatprobe (Abb. 25) ergab, dass das anorganische Siliziumdioxid als ein Hauptbestandteil von NanoBone[®] nicht mehr vorhanden ist. Es konnten lediglich organische Komponenten wie Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) nachgewiesen werden. Der Gold (Au)-Peak ist auf die zur Rasterelektronenmikroskopie benötigte Goldbeschichtung zurückzuführen.

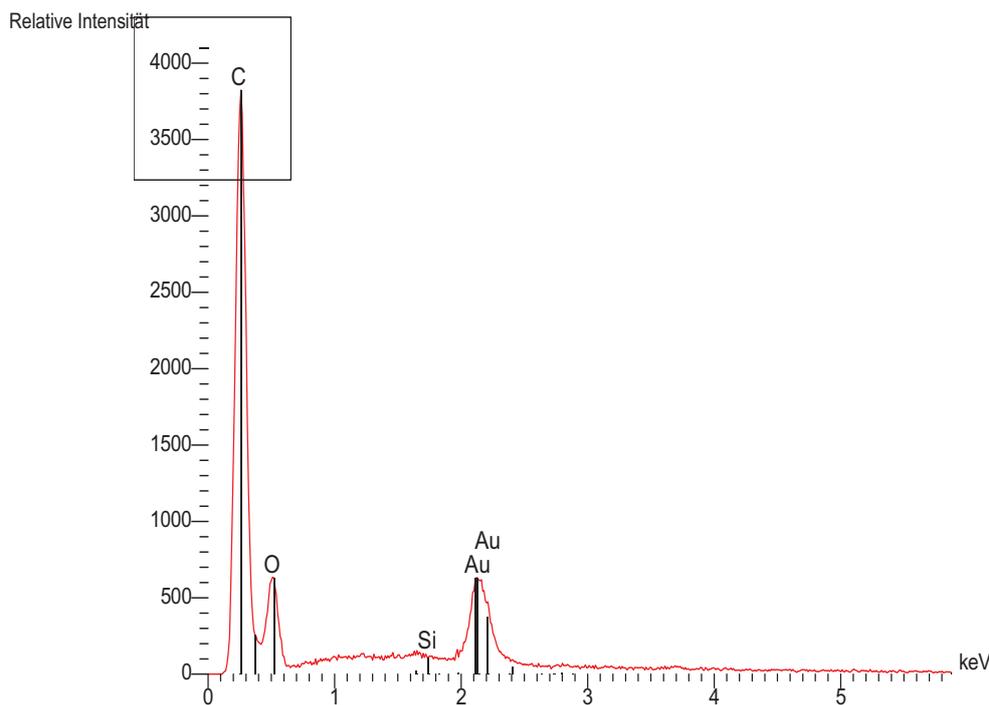


Abbildung 25: EDX-Spektrum der NanoBone[®]-Granulat-Probe. Das anorganische Siliziumdioxid (Si) ist nicht mehr vorhanden. Lediglich organische Komponenten wie Kohlenstoff (C) und Sauerstoff (O) können nachgewiesen werden. Der Gold (Au)-Peak begründet sich auf der zur Rasterelektronenmikroskopie nötigen Goldbeschichtung der Probe.

4. Diskussion

4.1. Diskussion von Material und Methode

4.1.1 Modell der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer der Maus gilt als etabliertes Modell zur Analyse der Mikrozirkulation myokutanen Gewebes unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen (Sckell & Leunig, 2009). Die Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die repetitive Visualisierung der gesamten Mikrozirkulation, bestehend aus terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen über einen Versuchszeitraum von 2 - 3 Wochen (Lehr et al., 1993). Hämodynamische Prozesse, wie Angiogenese und Revaskularisierung, können somit an ein und demselben Tier während des gesamten Versuchszeitraumes sequentiell erfasst und quantifiziert werden. Für diese repetitiven Analysen sind keine erneuten mikrochirurgischen Eingriffe notwendig (Nolte et al., 1995).

Die Implantation der Rückenhautkammer erfolgt 72 Stunden vor Versuchsbeginn, um das chirurgische Trauma sowie dessen Folgen für das Gewebe (arterioläre Konstriktion, Verminderung der nutritiven Perfusion, inflammatorische Antwort des Gewebes auf die mechanische Reizung) und ihren Einfluss auf die Versuchsergebnisse so gering wie möglich zu halten (Menger et al., 2002).

Aufgrund der Tatsache, dass das Deckglas der Kammer zu jedem Zeitpunkt abgenommen werden kann, eignet sich die Rückenhautkammer besonders für Implantations- und Transplantationsstudien zur Untersuchung der entzündlichen und angiogenen Gewebereaktion auf die implantierten Biomaterialien bzw. transplantierten Gewebe (Laschke et al., 2009; Funk et al., 1986). Ein Nachteil der Rückenhautkammer ist neben dem relativ kleinen Beobachtungsfeld (Durchmesser 15 mm) die insgesamt dünne Kammer, die die Größe und Dicke der Implantate limitiert. In der vorliegenden Studie konnten deshalb nur Implantate mit einer Fläche von 1,3-1,8 cm² und einer Dicke von 1 mm verwendet werden.

Das Modell der Rückenhautkammer wurde bereits für unterschiedlichste Gewebe wie z.B. Milz (Funk et al., 1986), Langerhans-Inseln (Menger et al., 1990), Fettgewebe (Langer et al., 2002) und Ovarialfollikel (Vollmar et al., 2001) vor allem an Hamstern und Mäusen angewandt.

Die Verwendung von Hamstern bietet insbesondere präparatorische Vorteile: Die zu präparierenden Muskelschichten lassen sich aufgrund der geringen intermuskulären Gefäßversorgung leicht voneinander lösen und der dünne Musculus panniculus carnosus

bedingt durch die gute Transluzenz die ausgezeichneten optischen Verhältnisse bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung des Hamsters (Menger et al., 2002). Die Verwendung der Maus ist trotz einer etwas schwierigeren Rückenhautkammerpräparation doch insgesamt von Vorteil. Die Maus besitzt nämlich ein gut charakterisiertes Genom, sodass im Rahmen von weiterführenden Studien zahlreiche Antikörper gegen Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsrezeptoren zur weiteren Charakterisierung und Optimierung von Biomaterialien zur Verfügung stehen (Menger & Lehr, 1993).

4.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Mikrozirkulation stehen verschiedene indirekte Methoden wie beispielsweise die Laser-Doppler Flowmetrie (Arvidsson et al., 1988), die Elektronen-Spin-Resonanz-Messung (Kunz et al., 1991; Connor et al., 1992) oder die Mikrosphären-Technik (Vollmar et al., 1992) zur Verfügung. Die Visualisierung und Quantifizierung individueller Mikrogefäße gelingt mit diesen Methoden jedoch nicht. Sie lassen lediglich indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation zu. Für eine detaillierte Untersuchung dynamischer mikrovaskulärer Prozesse über einen längeren Zeitraum eignet sich die intravitalmikroskopische Fluoreszenzmikroskopie als direkte Technik am besten. Die Methode der intravitalmikroskopischen Fluoreszenzmikroskopie gilt als etabliert und wurde bereits an verschiedenen Tiermodellen, wie Mäusen (Rappaport, 1977), Ratten und Hamstern (Menger et al., 1991), Kaninchen (McCuskey, 1966) sowie einigen Großtieren (Bloch, 1955) durchgeführt. Mit ihrer Hilfe können die Durchblutung von Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen dargestellt und funktionelle Parameter wie beispielsweise die funktionelle Kapillardichte und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion analysiert werden. Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen eine bessere Darstellung von Zellen und Plasma durch Kontrastanhebung. Die intravenöse Applikation von FITC-Dextran 15 Minuten vor Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen diente daher zur Darstellung des mikrovaskulären Netzwerkes und zur Charakterisierung der nutritiven Perfusion. Eine Markierung der Leukozyten erfolgte mittels Rhodamin 6G. Trotzdem ist der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen auch mit Nachteilen verbunden. Der Farbstoff per se (Higuti et al., 1980; Dietzmann et al., 1987) als auch die Kombination mit Licht führen zu phototoxischen Reaktionen, welche die Mikrozirkulation im Gewebe beeinflussen können (Celi et al., 2003; Sorg et al., 2006). Bei der Verwendung von FITC-Dextran ließen sich phototoxische Reaktionen in Form von Plättchenaggregation (Herrmann, 1983), für Rhodamin 6G eine gewisse Zelltoxizität sowie eine mögliche Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung (Saetzler et al., 1997) nachweisen. Um dies zu vermeiden, wurde die Belichtung eines

Gesichtsfeldes auf maximal 50 Sekunden begrenzt und die Gesamtdauer der Mikroskopie pro Untersuchungszeitpunkt auf 7-10 Minuten beschränkt (Menger & Lehr, 1993).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Für den Gewebeersatz durch Tissue Engineering gilt die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke (Neoangiogenese) als limitierender Faktor (Kannan et al., 2005; Lokmic & Mitchell, 2008). Da der Prozess der Angiogenese das Zusammenspiel einer Vielzahl sowohl pro- als auch anti-angiogener Faktoren erfordert, scheitert er oft aufgrund dieser komplexen, wechselseitigen Abhängigkeiten (Moon & West, 2008).

Die erfolgreiche Integration von Knochenersatzmaterialien in den menschlichen Organismus setzt die Bildung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen voraus. Ohne aktive Blutversorgung mit einem Kapillarnetz ist ein Überleben des Implantats nicht gewährleistet. Eine schnelle initiale Vaskularisierung aus dem umgebenden Empfängergewebe ist somit unverzichtbar (Rouwkema et al., 2008). Um die Produktqualität verbessern und letztendlich den klinischen Einsatz eines Knochenersatzmaterials garantieren zu können, sind genaue Kenntnisse über das angiogene Potential und die Gewebeverträglichkeit des entsprechenden Ersatzmaterials nötig.

Bisherige Studien konnten zeigen, dass der Prozess der Angiogenese hauptsächlich von Kapillaren und zu einem geringeren Teil von postkapillaren Venolen des umgebenden Empfängergewebes ausgeht (Yamauchi et al., 1998). Das durch die neu gebildeten Blutgefäße geschaffene physiologische Milieu garantiert neben der Nutrition des Implantats mit Sauerstoff und Nährstoffen (Carmeliet, 2000) die Einwanderung von Knochenzellen sowie die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen (Cypher & Grossman, 1996). Nach dem Sauerstoffaustausch wird das sauerstoff- und nährstoffarme Blut ebenfalls über die neugebildeten Gefäße drainiert.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Studie sowohl für NanoBone[®]-Plättchen als auch für NanoBone[®]-Granulat ein gutes angiogenes Potential aufgezeigt werden. Auffallend war, dass die funktionelle Kapillardichte der Gefäßnetzwerke in unmittelbarer Umgebung von NanoBone[®]-Granulat gegenüber den NanoBone[®]-Plättchen signifikant höher war. Im Zentrumsbereich der Implantate ist beim NanoBone[®]-Granulat eine schwache angiogene Antwort beobachtet worden, für NanoBone[®]-Plättchen war diese vernachlässigbar klein. Die signifikant höhere Dichte der neugebildeten Gefäßnetzwerke von NanoBone[®]-Granulat lässt sich auf eine im Vergleich mit NanoBone[®]-Plättchen deutlich größere Oberfläche der

Granulatkörnchen zurückführen. So bietet NanoBone[®]-Granulat - nicht zuletzt auch aufgrund der großen Kontaktfläche zwischen Implantat und Empfängergewebe - neugeformten Blutgefäßen eine größere Fläche zum Einsprossen, während der Prozess der Angiogenese beim Plättchen durch dessen geringere Oberfläche limitiert ist. Eine große poröse Oberfläche verbessert die mechanische Verzahnung zwischen Implantat und umgebenden Knochengewebe und sorgt so für eine höhere mechanische Stabilität an dieser kritischen Grenzfläche (Karageorgiu & Kaplan, 2005). Die große Oberfläche von NanoBone[®]-Granulat erklärt auch die gegenüber NanoBone[®]-Plättchen und autologer Spongiosa höhere funktionelle Kapillardichte in den peripheren Kammerabschnitten. Die Granulatkörnchen sind nahezu über die gesamte Kammerfläche verteilt und bedingen dadurch den sichtbaren Anstieg der kapillaren Dichte in der Peripherie. Eine kompaktere Anordnung des Granulats würde eine höhere funktionelle Kapillardichte in der unmittelbaren Implantatumgebung nach sich ziehen. In der Peripherie wären jedoch ähnliche Werte wie für NanoBone[®]-Plättchen und autologe Spongiosa zu erwarten.

Die Angiogenese konnte vorrangig im Randbereich von NanoBone[®] anhand charakteristischer Entwicklungsstufen verfolgt werden. Neu gebildete Blutgefäße zeichneten sich insgesamt durch ein ungeordnetes Wachstum aus und ließen sich sowohl intravitalmikroskopisch als auch histologisch (HE-Färbung) und immunhistochemisch (CD31-Färbung) gut als solche identifizieren. Der geringe Porendurchmesser des Knochenersatzmaterials erklärt die Abwesenheit eines dichten Gefäßnetzwerkes im Zentrum der Implantate. Neu gebildete Kapillaren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 10-30 µm können die interkonnektierenden Nanoporen in einer Größenordnung von 20 nm nicht penetrieren. Die Gefäße, die im Zentrum der Implantate beobachtet wurden, können somit nicht innerhalb der Nanoporen des Knochenersatzmaterials liegen, sondern wachsen über das Implantat hinweg. Poren sind für die Knochenneubildung essentiell, da sie die Migration und Proliferation von Osteoblasten sowie mesenchymalen Zellen aus dem umgebenden Knochengewebe in das Implantat fördern und Angiogenese ermöglichen (Kuboki et al., 1998). Porosität und Porengröße sind wichtige Eigenschaften jedes Knochenersatzstoffes (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Zahlreiche Arbeitsgruppen haben den Einfluss unterschiedlicher Porengrößen auf diesen osteokonduktiven Effekt untersucht. Eine optimale Osteokonduktion wird bei einer Porengröße zwischen 300 bis 400 µm erreicht (Kuboki et al., 2001). Ein minimales osteokonduktives Potential erfordert eine Mindestporengröße von 50 µm (Bobyne et al., 1980; Chang et al., 2000; Itälä et al., 2001). Allerdings beeinflussen Porengröße und Porositätsgrad die mechanische Stabilität des Knochenersatzmaterials gegensätzlich. Großporige Knochenersatzstoffe sind mechanisch weniger stabil als kleinporige (Zhang et al., 2002; Bignon et al., 2003; Borden et al., 2003). Trotz dieses

erschwerenden Effektes der Porengröße auf die biologischen bzw. mechanischen Eigenschaften sollte ein Kompromiss zwischen Vaskularisation und Knochenbildung auf der einen und der Abnahme der mechanischen Stabilität auf der anderen Seite bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien gefunden werden. Hier sind vor allem das Biomaterial per se, der Herstellungsprozess und die spezifische Porengröße des zu ersetzenden Knochens von Bedeutung.

Im Vergleich mit autologer Spongiosa zeigte NanoBone® im Zentrumsbereich der Implantate eine schwächere angiogene Reaktion, die durch das Fehlen der regenerativen Eigenschaft von synthetischem Hydroxylapatit erklärt werden kann. Mit der autologen Spongiosa werden gleichzeitig lebende Zellen mit Stammzellcharakter sowie verschiedenste Wachstumsfaktoren transplantiert (Schilephake et al., 2002), während NanoBone® keine vitalen Zellen enthält. Die Tatsache, dass die Angiogenese der autologen Spongiosa vorrangig im Zentrum der Implantate zu beobachten war, deckt sich mit den Ergebnissen von Laschke et al. (Laschke et al., 2007). Diese beschreiben, dass osteoinduktiv wirksame Wachstumsfaktoren und Osteoprogenitorzellen in der frisch isolierten autologen Spongiosa enthalten sind und somit den Angiogeneseprozess aus dem Zentrumsbereich heraus induzieren. In der Randzone der NanoBone®-Implantate müssen die pro-angiogenen Faktoren hingegen erst aus dem umgebenden Empfängergewebe einwandern (Laschke et al., 2007).

Die Akzeptanz oder Abstoßung eines Knochenersatzmaterials hängt entscheidend von seiner Biokompatibilität ab und setzt somit die Prüfung der Zell- und Gewebeverträglichkeit voraus. In der vorliegenden Studie führte die Implantation der Knochenersatzmaterialien in den postkapillaren Venolen und Sammelvenolen aller drei Versuchsgruppen zwar zu einer moderat hohen Fraktion rollender Leukozyten, die aber während des 15-tägigen Versuchsablaufs nicht weiter anstieg. Die zelluläre Antwort auf die Implantation von NanoBone® und autologer Spongiosa kann als Teil des physiologischen Wundheilungsprozesses gewertet werden (Ziats et al., 1988). Auch andere Studien zeigten, dass die Implantation von Fremdmaterialien häufig mit einer akuten temporären Entzündungsreaktion und somit einer leicht erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion verbunden ist (Laschke et al., 2006). Da Blutvolumenfluss und Erythrozytenfließgeschwindigkeit über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant und zwischen den Versuchsgruppen vergleichbar waren, kann aufgrund der ähnlichen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Implantation von NanoBone® und autologer Spongiosa von vergleichbar guten Gewebeverträglichkeiten ausgegangen werden. Hier ist der Aufbau des synthetischen Knochenersatzmaterials von großer Bedeutung. Hydroxylapatit stellt in diesem

Zusammenhang als Bestandteil der anorganischen Matrix des natürlichen Knochens die wichtige naturidentische Komponente von NanoBone[®] dar (Posner, 1969; Du et al., 1998).

Idealerweise sollten Knochenersatzmaterialien am physiologischen Knochenremodelling teilnehmen und den Abbau des Knochenersatzmaterials an den neuen Knochenaufbau koppeln. Die dafür benötigten Zelltypen - nämlich Osteoblasten und Osteoklasten - gelangen auf vaskulärem Wege in den Knochen und erklären somit die Notwendigkeit neu gebildeter Blutgefäße (Suda et al., 1995). Der angiogene Prozess im Empfängergewebe selbst wird wiederum durch die Freisetzung pro-angiogener Faktoren, insbesondere von Makrophagen, die mit den Implantaten interagieren, gefördert (Carmeliet & Jain, 2000). Knochenremodelling und Angiogenese bedingen sich also gegenseitig.

Osteoblasten sind differenzierte postproliferativ aktive Zellen, welche die Knochenmatrix synthetisieren (Escarot-Charrier et al., 1983). Osteoklasten sind große, mehrkernige Riesenzellen, die Knochen resorbieren (Marks, 1983). Zahlreiche Studien konnten belegen, dass verschiedene synthetische Knochenersatzmaterialien - NanoBone[®] eingeschlossen - von Osteoklasten abgebaut werden, sofern eine vom Empfängergewebe ausgehende adäquate Vaskularisierung der Implantate gewährleistet wird (Ogose et al., 2006; Takeshita et al., 1992).

In der vorliegenden Studie wurde histologisch eine Infiltration von mono- bzw. mehrkernigen Riesenzellen in der unmittelbaren Umgebung von NanoBone[®] beobachtet. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um osteoklastäre Zellen handeln könnte (Takeshita et al., 1992; Franz-Odenaal et al., 2006). Da Osteoklasten reich an Tartar resistenten saurer Phosphatase (TRAP) und Kathepsinen sind (Addison, 1976), erfolgte die Kontrolle durch den Nachweis von TRAP bzw. Kathepsin K. Jedoch waren weder TRAP noch Kathepsin K vorhanden. Osteoklasten gehen aus der Fusion mononukleärer Vorläufer der Monozyten-Makrophagen-Linie aus verschiedenen hämatopoetischen Geweben (Knochenmark, peripheres Blut) hervor (Osdoby et al., 1982). Diese gelangen dann auf vaskulärem Weg in den Knochen und differenzieren sich mit Hilfe der Osteoblasten zu Osteoklasten (Suda et al., 1995). Auch mononukleäre Zellen mit osteoklastärem Phänotyp sind bereits in der Lage, Knochengewebe abzubauen, bevor sie zu multinukleären Osteoklasten herangereift sind, wobei in der Regel größere Zellen effektiver sind als kleinere (Prallet et al., 1992).

Die nachfolgende F4/80-Immunhistochemie zeigte, dass es sich bei den mono- bzw. mehrkernigen Riesenzellen in der Umgebung von NanoBone[®] um Zellen aus der Monozyten-Makrophagen-Reihe und somit um präosteoklastäre Zellen handelt. Der relativ kurze Versuchszeitraum von 15 Tagen könnte ein Grund für die noch nicht vollständig abgeschlossene Differenzierung zu Osteoklasten sein. Die osteoklastäre Funktion wird durch Osteoblasten beeinflusst, welche Faktoren produzieren, die entweder in die Knochenmatrix

eingebaut oder lediglich lokal sezerniert werden (Martin & Ng, 1994). Die Knochenmatrix besteht aus Mineralien, Kollagen sowie nichtkollagenen Proteinen (Poser, 1969). Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen lieferten erste Anzeichen für den Beginn eines Matrixwechsels von NanoBone[®]. Da sich im EDX- Spektrum kein Siliziumdioxid mehr nachweisen ließ, kann von einem Austausch des anorganischen Kieselgels in eine organische körpereigene Matrix ausgegangen werden. Dieser Matrixwechsel ist für NanoBone[®] aktuell von Xu et al. (Xu et al., 2008) detailliert beschrieben worden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen: NanoBone[®] eignet sich aufgrund seiner starken angiogenen Wirkung und seines geringen inflammatorischen Potentials optimal als Knochenersatzmaterial und stellt eine gute Alternative zur autologen Spongiosa dar. Die histologischen Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass NanoBone[®] am physiologischen Knochenremodelling teilnimmt und somit vollständig biodegradiert wird. Dies stellt gegenüber vielen anderen Knochenersatzstoffen einen weiteren Vorteil dar, weil keine zurückbleibenden Fremdstoffe die natürliche Biomechanik beeinflussen können.

Die Porengröße von NanoBone[®] ist bei der Verwendung des Modells der Rückenhautkammer von Nachteil. Neu gebildete Kapillaren schaffen es aufgrund ihres Durchmessers nicht, die Nanoporen zu penetrieren, sondern ziehen lediglich vom Randbereich beginnend über das Implantat hinweg. Möglicherweise wird bei Vorhandensein größerer Poren eine vollständige Penetration der Implantate mit neu gebildeten Blutgefäßen auch mit einer insgesamt höheren funktionellen Kapillardichte einhergehen und somit den Remodelling-Prozess durch ein schnelleres Einwandern von Osteoblasten und Osteoklasten beschleunigen.

Diese Ergebnisse sind - bezogen auf die klinische Anwendung beim Patienten - von eher untergeordneter Bedeutung, da Knochendefekte mit entsprechenden Mengen NanoBone[®]-Granulat aufgefüllt werden. Neu gebildete Blutgefäße können zwischen den dicht gepackten Granulat Körnchen einwachsen und auf diese Weise ein adäquates Gefäßnetzwerk ausbilden.

Der Aspekt einer Beschichtung von Knochenersatzmaterialien mit Angiogenese und / oder Osteogenese fördernden Wachstumsfaktoren rückt zunehmend in den Fokus der Biomaterialforschung und könnte in der klinischen Anwendung von NanoBone[®] zukünftig von Interesse sein. Entsprechende Wachstumsfaktoren sollen den angiogenen bzw. osteogenen Prozess verbessern und beschleunigen. Bisher eingesetzt werden vor allem VEGF als Angiogenese fördernder Wachstumsfaktor (Kempen et al., 2009) sowie BMP-2 und BMP-7, deren osteogene Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Cowan et al., 2005). Aktuell haben Kempen et al. den positiven Effekt einer VEGF- und

BMP-2- Beschichtung von Kompositen auf die ektope Knochenregeneration gezeigt. In der frühen angiogenen Phase kam es zu einer besonders starken Freisetzung von VEGF, das osteogen wirkende BMP-2 wurde dagegen während des gesamten Versuchszeitraumes kontinuierlich abgegeben. Demnach muss die Dosis der eingesetzten Wachstumsfaktoren suffizient gewählt sein, um den Angiogenese- bzw. Osteogenese-fördernden Effekt zu gewährleisten (King & Cochran, 2002). Als Trägermaterialien für die Wachstumsfaktoren können inzwischen Polymere natürlichen oder synthetischen Ursprungs, anorganische Materialien und Komposite genutzt werden (Bessa et al., 2008).

Der Vergleich von NanoBone[®] mit anderen Knochenersatzmaterialien ist generell schwierig, da der Markt eine Vielzahl an Produkten bietet und Aussagen zu den Materialeigenschaften sowie der klinischen Effizienz in den Produktprospekten häufig nicht wissenschaftlich belegt sind. Prinzipiell lässt sich jedoch feststellen, dass es trotz der enormen Fülle an Knochenersatzmaterialien noch kein ideales Knochensubstitut gibt. Die bisher vorliegenden Ergebnisse für NanoBone[®] sind jedoch vielversprechend.

5. Zusammenfassung

Die Tatsache, dass Knochendefekte ab einer „kritischen Größe“ nicht wieder spontan heilen können, stellt ein wichtiges klinisches Problem dar. Zur Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens und seiner mechanischen Belastbarkeit müssen diese Defekte aufgefüllt werden. Hierbei gilt die autologe Knochentransplantation bis heute als Goldstandard, obgleich der damit verbundene Zweiteingriff mit zahlreichen Nachteilen verbunden ist. Zudem ist die Verfügbarkeit von autologen Knochentransplantaten begrenzt.

Aus diesen Gründen werden, wenn möglich, alternative Knochenersatzmaterialien eingesetzt. Allerdings gibt es trotz der Transparenz der grundlegenden Abläufe des Knochenstoffwechsels und der intensiven Forschung auf dem Biomaterialsektor noch keinen vollwertigen Ersatz für die autologe Spongiosa. Als ein Vertreter aus der Gruppe der synthetischen Knochenersatzstoffe steht NanoBone[®] (nanokristallines Hydroxylapatit eingebettet in eine hochporöse Kieselgelmatrix) bereits im klinischen Alltag zur Verfügung und bildet die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit.

Um eine dauerhafte Vitalität und Funktionalität des Implantats zu gewährleisten, ist neben einer guten Biokompatibilität auch eine adäquate Gewebeintegration unerlässlich. Das Fehlen einer inflammatorischen Antwort des Empfängergewebes sowie die Ausbildung von Gefäßnetzwerken sind von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurde das Modell der Rückenhautkammer der Maus verwendet, das die *in vivo* Analyse der angiogenen und entzündlichen Gewebereaktion von NanoBone[®] über einen Versuchszeitraum von 15 Tagen ermöglicht. Hierzu wurde männlichen albino B6 Mäusen eine Rückenhautkammer präpariert, in die 3 Tage später die Materialien implantiert wurden. Es gab drei Versuchsgruppen: NanoBone[®] in Plättchen- als auch in Granulatform (je n=7) sowie isogen transplantiertes Spongiosagewebe (n=6) als Standard. Unmittelbar sowie 3, 5, 7, 10 und 15 Tage nach Implantation erfolgte repetitiv eine intravitalmikroskopische Untersuchung. Die Angiogenese ist anhand sogenannter regions of interest (ROIs) im Zentrum und im Randbereich des Implantats untersucht worden. Zur Charakterisierung der Integrität von NanoBone[®] und Spongiosa diente die Dokumentation sowohl der funktionellen Kapillardichte neu geformter Gefäßnetzwerke in den peripheren Kammerabschnitten als auch im Zentrum und Randbereich der Implantate. Im Versuchsverlauf zeigten alle 3 Gruppen im Randbereich ähnliches Verhalten der Angiogenese mit 100% ROIs an Tag 15. Auffällig hierbei war jedoch, dass die funktionelle Kapillardichte der Netzwerke im Randbereich des Granulats deutlich über denen der anderen beiden Versuchsgruppen lag.

Im Zentrum der Implantate stellte sich die Situation anders dar. Das stark angiogene Potential der autologen Spongiosa als Goldstandard spiegelte sich in einer hohen Anzahl Angiogenese-positiver Regionen und einer hohen Gefäßdichte wider. NanoBone[®] dagegen zeigte im Zentrumsbereich ein deutliches Defizit: Während beim Granulat noch eine schwache angiogene Antwort beobachtet worden ist, war diese für das NanoBone[®]-Plättchen vernachlässigbar klein. Die mikrohämodynamischen Parameter Erythrozyten-fließgeschwindigkeit und Blutvolumenfluss sowie das Leukozyten-Fließverhalten wurden zur Analyse der Biokompatibilität herangezogen. Das Fehlen einer venulären Leukozyten-Akkumulation sowie die über den gesamten Untersuchungszeitraum konstanten mikrohämodynamischen Parameter zeigen, dass die Biokompatibilität von NanoBone[®] vergleichbar gut ist wie die der autologen Spongiosa. Die abschließend an Tag 15 erfolgte histologische Bewertung der Hautkammer mittels Haematoxilin- und Eosin-Färbung sowie CD31-Immunhistochemie zeigte ein gut vaskularisiertes Granulationsgewebe und bestätigte somit die adäquate Biokompatibilität mit entsprechender Integration in das Kammergewebe. Zentrales Ergebnis der vorliegenden Studie ist, dass sich NanoBone[®] vor allem in Granulatform durch seine starke angiogene Wirkung und sein geringes inflammatorisches Potential optimal als Knochenersatzmaterial eignet.

Inwieweit die Makrostruktur die Inkorporation des implantierten Knochenersatzmaterials im Empfängergewebe beeinflusst, könnte zukünftig ebenso wie der Aspekt einer Beschichtung mit Angiogenese-fördernden Wachstumsfaktoren für die klinische Anwendung von NanoBone[®] von besonderem Interesse sein.

6. Thesen

Thema:

In vivo Analyse von Biokompatibilität und Gewebeintegration des synthetischen Knochenersatzstoffes NanoBone®

- Knochendefekte ab einer „kritischen Größe“ stellen ein wesentliches klinisches Problem dar und müssen zur Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens und seiner mechanischen Belastbarkeit aufgefüllt werden.
- Die Verfügbarkeit autologer Knochentransplantate als Goldstandard ist begrenzt. Daher kommen alternative Knochenersatzmaterialien zum Einsatz.
- Trotz intensiver Forschung auf dem Biomaterialsektor gibt es noch keinen vollwertigen Ersatz für die autologe Spongiosa.
- Eine gute Biokompatibilität sowie eine adäquate Gewebeintegration sind Grundvoraussetzungen für eine dauerhafte Vitalität und Funktionalität des Implantats.
- Die Untersuchung der angiogenen und inflammatorischen Gewebereaktion des synthetischen Knochenersatzstoffes NanoBone® erfolgt anhand des Rückenhautkammermodells der Maus.
- NanoBone® wird sowohl in Granulatform als auch als Plättchen implantiert. Isogen transplantiertes Spongiosagewebe gilt als Standard.
- Für NanoBone® lässt sich ein hohes angiogenes Potential mit Ausbildung dichter Gefäßnetzwerke in der unmittelbaren Umgebung der Implantate nachweisen.
- Die angiogene Antwort ist für NanoBone®-Granulat stärker ausgeprägt als für NanoBone®-Plättchen.
- Die autologe Spongiosa induziert besonders im Zentrum der Implantate eine starke angiogene Antwort.

- Die Biokompatibilität von NanoBone® ist genauso gut wie die der autologen Spongiosa.
- Die histologische Bewertung der Rückenhautkammern zeigt ein gut vaskularisiertes Granulationsgewebe und bestätigt die adäquate Biokompatibilität der Knochenersatzmaterialien mit entsprechender Integration in das Kammergewebe.
- NanoBone® eignet sich besonders in Granulatform optimal als Knochenersatzmaterial.

7. Literaturverzeichnis

Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E (1995) Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 33:312-318

Abshagen K, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B (2008) In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone[®]. *J Biomed Mater Res A* [Epub ahead of print]

Adham M (2003) Extracorporeal liver support: waiting for the deciding vote. *ASAIO J* 49:621-632

Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10:S96-110

Algire GH (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4:1-11

Arvidsson D, Svensson H, Haglund U (1988) Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 254:G471-476

Atala A (2008) Advances in tissue and organ replacement. *Curr Stem Cell Res Ther* 3:21-31

Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F (1995) Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15:85-91

Bailly AI, Laurent A, Lu H, Elalami I, Jacob P, Mundler O, Merland JJ, Lautier A, Soria J, Soria C (1996) Fibrinogen binding and platelet retention: relationship with the thrombogenicity of catheters. *J Biomed Mater Res* 30:101-108

Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K (2006) Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 1:317-332

Bauer TW, Muschler GF (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 371:10-27

Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, Part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2:81-96

Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125:1591-1598

Betz RR (2002) Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 25:s561-570

Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, Boivin G, Melin M, Hartmann D (2003) Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *J Mater Sci Mater Med* 14:1089-1097

Bloch EH (1955) The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology* 6:340-349

Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC (1980) The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop Relat Res* 150:263-270

Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:165-170

Boneva RS, Folks TM, Chapman LE (2001) Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiol Rev* 14:1-14

Bonney CH, Schmidt RE, Hunter DM, Conley GE (1977) Fluorescein angiography and light microscopy studies of retinas irradiated by oxygen nuclei. *Aviat Space Environ Med* 48:418-423

Borden M, El-Amin SF, Attawia M, Laurencin CT (2003) Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials* 24:597-609

Boyle M, Kurtovic J, Bihari D, Riordan S, Steiner C (2004) Equipment review: the molecular adsorbents recirculating system (MARS). *Crit Care* 8:280-286

Bruno RJ, Cohen MS, Berzins A, Sumner DR (2001) Bone graft harvesting from the distal radius, olecranon, and iliac crest: a quantitative analysis. *J Hand Surg Am* 26:135-141

Burchardt H (1983) The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 174:28-42

Cardon SZ, Ostermeyer CF, Bloch EH (1970) Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2:67-76

Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395

Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257

Celi A, Merrill-Skoloff G, Gross P, Falati S, Sim DS, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B (2003) Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and widefield intravital microscopy. *J Thromb Haemost* 1:60-68

Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW (2000) Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21:1291-1298

Chung C, Burdick JA (2008) Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 60:243-262

Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG (1992) Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54:199-204

Cornell CN, Lane JM (1998) Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 355:S267-273

Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B (2005) Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 66:239-285

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13:1382-1397

Cypher TJ, Grossman JP (1996) Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35:413-417

Deutsch H, Haid R, Rodts G Jr, Mummaneni PV (2007) The decision-making process: allograft versus autograft. *Neurosurgery* 60:S98-102

Dietzmann K, Letko G, Sokolowski A (1987) Mitochondrial membrane potential in living cells: evidence from studies with rhodamine 6G as fluorescent probe. *Exp Pathol* 31:47-51

Du C, Cui FZ, Feng QL, Zhu XD, de Groot K (1998) Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J Biomed Mater Res* 42:540-548

Eliceiri BP, Cheresh DA (1999) The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103:1227-1230

Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K (1980) Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177:125-134

Escarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G (1983) Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 96:639-643

Folkman J (1985) Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43:173-203

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31

Fowler BL, Dall BE, Rowe DE (1995) Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop* 24:895-903

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten BE (2006) Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235:176-190

Friedlaender GE (1983) Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res* 174:58-68

Funk W, Endrich B, Messmer K (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186:259-270

Gerlach JC, Zeilinger K, Patzer li JF (2008) Bioartificial systems: why, what, whither? *Regen Med* 3:575-595

Gerressen M, Prescher A, Riediger D, van der Ven D, Ghassemi A (2008) Tibial versus iliac bone grafts: a comparative examination in 15 freshly preserved adult cadavers. *Clin Oral Implants Res* 19:1270-1275

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: An update. *Injury* 36:S20-27

Hak DJ (2007) The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg* 15:525-536

Hallfeldt KK, Stütze H, Puhmann M, Kessler S, Schweiberer L (1995) Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 59:614-620

Henkel KO, Gerber T, Dietrich WH, Kundt G, Bienengräber V (2004) Im Sol-Gel-Verfahren hergestellte Kalziumphosphatkeramiken - Ein Durchbruch in der Therapie von Knochendefekten? Eine tierexperimentelle Studie. *Osteologie* 13:57-64

Herrmann KS (1983) Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26:238-249

Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, Yoshimura T (1980) Rhodamine 6G, inhibitor of both H⁺-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates. *Biochim Biophys Acta* 593:463-467

Hollinger JO, Leong K (1996) Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 17:187-194

Holmes RE, Buchholz RW, Mooney V (1986) Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. *J Bone Joint Surg Am* 68:904-911

Ignatius AA, Claes LE (1996) In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: Poly(L,DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17(8):831-839

Ikada Y (2006) Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 3:589-601

Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT (2001) Pore diameter of more than 100 microm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 58:679-683

Jarcho M (1981) Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res* 157: 259-278

Jarcho M (1986) Biomaterial aspects of calcium phosphates. Properties and applications. *Dent Clin North Am* 30:25-47

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS (1999) Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5:1418-1423

Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T (2008) Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl* 23:197-212

Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM (2005) The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of microvascular networks: a review. *Biomaterials* 26:1857-1875

Karageorgiou V, Kaplan D (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-5491

Katthagen BD, Mittelmeier H (1984) Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite. *Arch Orthop Trauma Surg* 103:291-302

Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJ (2009) Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30:2816-2825

King GN, Cochran DL (2002) Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 73:925-936

Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42:168-175

Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T (2004) Bioactive metals: preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med* 15:99-107

Kübler NR (1997) Osteoinduction und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1:2-25

Kuboki Y, Jin Q, Takita H (2001) Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Surg Am* 83A:S105-115

Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H (1998) BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 39:190-199

Kulkarni S, Cronin DC 2nd (2006) Ethical tensions in solid organ transplantation: the price of success. *World J Gastroenterol* 12:3259-3264

Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Beger HG (1991) Ischemia/reperfusion damage of the liver caused by free radicals - direct radical detection using electron spin resonance (ESR). *Langenbecks Arch Chir* 376:139-142

Lalan S, Pomerantseva I, Vacanti JP (2001) Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg* 25:1458-1466

Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920-926

Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K (2002) Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg* 48:53-59

Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD (2006) Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12:2093-2104

Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann T, Menger MD (2009) In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* [Epub ahead of print]

Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD (2007) Injectable nanocrystalline hydroxylapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82:494-505

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF (2006) Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3:49-57

Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA (2008) Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 14:61-86

Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062

Lexer E (1911) Über freie Knochentransplantationen Langenbecks. *Arch Klin Chir* 95:827-851

Lindberg EJ, Katchis SD, Smith RW (1996) Quantitative analysis of cancellous bone graft available from the greater trochanter. *Foot Ankle Int* 17:473-476

Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie, Springer Berlin Heidelberg New York 7:1103-1120

Lokmic Z, Mitchell GM (2008) Engineering the microcirculation. Tissue Eng Part B Rev 14:87-103

Marks SC Jr (1983) The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source. J Oral Pathol 12:226-256

Martin TJ, Ng KW (1994) Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. J Cell Biochem 56:357-366

McCuskey RS (1966) A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. Am J Anat 119:455-477

Menger MD, Jäger S, Walter P, Hammersen F, Messmer K (1990) A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. Int J Microcirc Clin Exp 9:103-117

Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. Eur Surg Res 34:83-91

Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo. Immunol Today 14:519-522

Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. Eur Surg Res 23:158-169

Migneco F, Hollister SJ, Birla RK (2008) Tissue-engineered heart valve prostheses: “state of the heart”. Regen Med 3:399-419

Mohan S, Baylink DJ (1991) Bone growth factors. Clin Orthop Relat Res 263:30-48

Moon JJ, West JL (2008) Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angio-genesis in biomaterials. Curr Top Med Chem 8:300-310

Myoui A, Yoshikawa H (2008) Regenerative medicine in bone tumor surgery. *Clin Calcium* 18:1767-1773

Nakajima M, Irimura T, Nicolson GL (1988) Heparanases and tumor metastasis. *J Cell Biochem* 36:157-167

Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA (2008) Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 5:1137-1158

Nebe JB, Müller L, Lüthen F, Ewald A, Bergemann C, Conforto E, Müller FA (2008) Osteoblast response to biomimetically altered titanium surfaces. *Acta Biomater* 4:1985-1995

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135-1149

Nolte D, Menger MD, Messmer K (1995) Microcirculatory models of ischaemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 15:9-16

Ogose A, Kondo N, Umezu H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kudo N, Hoshino M, Gu W, Endo N (2006) Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (Osferion) in human bones. *Biomaterials* 27:1542-1549

Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Mikrovasc Res* 18:311-318.

Papetti M, Herman IM (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C947-970

Parikh SN (2002) Bone graft substitutes: Past, present, future. *J Postgrad Med* 48:142-148

Park K, Mao FW, Park H (1991) The minimum surface fibrinogen concentration necessary for platelet activation on dimethyldichlorosilane-coated glass. *J Biomed Mater Res* 25:407-420

Pogoda P, Priemel M, Catalá-Lehnen P, Gebauer M, Rupprecht M, Adam G, Rueger JM, Amling M (2004) Simple bone cysts of the calcaneus. Differential diagnosis and therapy. *Unfallchirurg* 107: 680-684

Polak JM, Bishop AE (2006) Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 1068:352-366

Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER (1977) Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269:804-806

Poser AS (1969) Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 49:760-792

Prallet B, Male P, Neff L, Baron R (1992) Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 7:405-414

Priya SG, Jungvid H, Kumar A (2008) Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14:105-118

Randolph MA, Anseth K, Yaremchuck MJ (2003) Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg* 30:519-537

Rappaport AM (1977) Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat* 16:116-120

Reif D, Leuner B, Hotz G (1998) Temporäre Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Calciumphosphat. In: Claes L, Ignatius AA (Hrsg.) *Biodegradierbare Implantate und Materialien*. *Hefte zu Der Unfallchirurg* 265:270-277

Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674

Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA (2008) Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26:434-441

Rueger JM (1992) Knochenersatzmittel. *Hefte Unfallheilkunde* 312:32-35

Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45:505-513

Sammarco VJ, Chang L (2002) Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology. *Foot Ankle Clin* 7:19-41

Schenk RK (1991) Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. *Hefte Unfallheilkunde* 216:23-35

Schilephake H (2002) Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:469-484

Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (2005) Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Elsevier München, 1: 2-29

Schröder U, Arfors KE, Tangen O (1976) Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro. *Microvasc Res* 11:57-66

Schweiberer L, Hallfeldt K, Mandelkow H (1986) Osteoinduktion. *Orthopäde* 15:3-9

Sckell A, Leunig M (2009) The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods Mol Biol* 467:305-317

Seiler JG 3rd, Johnson J (2000) Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 9:91-97

Silber JS, Anderson GD, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, Albert TJ (2003) Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28:134-139

Silver FH, Pins G (1992) Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long Term Eff Med Implants* 2:67-80

Sinitsina I (1999) Der Einfluss von Fluoreszenzfarbstoffen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo. Med. Dissertation, LMU München

Sommer B, Felix R, Sprecher C, Leunig M, Ganz R, Hofstetter W (2005) Wear particles and surface topographies are modulators of osteoclastogenesis in vitro. *J Biomed Mater Res A* 72:67-76

Sorg H, Hoffmann JN, Menger MD, Lindenblatt N, Goehring P, Vollmar B (2006) Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. *Thromb Haemost* 96:371-377

Stock UA, Vacanti JP (2001) Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 52:443-451

Takehita N, Akagi T, Yamasaki M, Ozeki T, Nojima T, Hiramatsu Y, Nagai N (1992) Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *J Electron Microsc* (Tokyo) 41:141-146

Tenaillon A (2007) Organ donation: scarce and fragile resources. *Rev Prat* 57:251-261

Thalheimer U, Capra F (2002) Liver transplantation: making the best out of what we have. *Dig Dis Sci* 47:945-953

Tomford WW, Mankin HJ (1999) Bone banking. Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am* 30:565-570

Verdonk RC, van den Berg AP, Slooff MJ, Porte RJ, Haagsma EB (2007) Liver transplantation: an update. *Neth J Med* 65:372-380

Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K (1992) Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75:421-430

Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD (2001) In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159:1661-1670

von Garrel T, Gotzen L (1998) Allogenic bone transplantation and bone banking. Unfallchirurg 101:713-727

Wall WJ (1988) Liver transplantation: current concepts. CMAJ 139:21-28

Wilkinson DG (2000) Eph receptors and ephrins: Regulators of guidance and assembly. Int Rev Cytol 196:177-244

Williams DF (1986) Consensus and definitions in biomaterials. In: de Putter C, de Lange K, de Groot K, Lee AJC (1988) Advances in biomaterials. Elsevier Amsterdam 8:11-16

Wintermantel E, Ha SW (2002) Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Springer Berlin Heidelberg New York 3:8-10

Xu W, Holzhüter G, Sorg H, Wolter D, Lenz S, Gerber T, Vollmar B (2008) Matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. J Biomed Res B (in press)

Yamauchi J, Wolf B, Vollmar B, Menger MD (1998) In vivo analysis of the origin of capillary sprout formation in angiogenesis of freely transplanted islets of Langerhans. Adv Exp Med Biol 454:355-360

Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY (2005) Recent advances and current developments in tissue scaffolding. Biomed Mater Eng 15:159-177

Zhang Y, Zhang M (2002) Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. J Biomed Mater Res 61:1-8

Ziats NP, Miller KM, Anderson JM (1988) In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. Biomaterials 9:5-13

8. Publikationen

Abshagen K, **Schrodi I**, Gerber T, Vollmar B (2008) In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone[®]. J Biomed Mater Res A [Epub ahead of print]

I. Schrodi, K. Abshagen, T. Gerber, B. Vollmar (2008) In vivo Analyse der Biokompatibilität und Gewebeintegration des synthetischen Knochenersatzstoffes NanoBone[®]. Chirurgisches Forum 37:251-252

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität tätig sein zu dürfen. Durch ihre stete Unterstützung und konstruktive Kritik trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen für die schnelle und unkomplizierte Einarbeitung in das Tiermodell und die wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Gerber, Leiter des Instituts für Physik der Universität Rostock, sowie Herrn Dr. rer. nat. Gerd Holzhüter, die mir während der gesamten Arbeit bei Fragen hilfreich zur Seite standen und die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ermöglicht haben.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie, ohne deren Einsatz und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hier danke ich vor allem Dorothea Frenz sowie Daniel Wolter aus dem Institut für Physik der Universität Rostock für die Erstellung der histologischen Präparate. Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für die Arbeit notwendigen Tiere.

Ich möchte mich außerdem besonders herzlich bei Ionnis Stratos bedanken, der mir bei technischen Fragen mit Rat und (vor allem) Tat zur Seite stand und mich stets motivierte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, in besonderem Maße bei meinen Eltern bedanken, die durch ihre unermüdliche Motivation und Unterstützung am wesentlichsten zu dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Vielen Dank!

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Inken Schrodi
Geburtstag:	23. 06. 1983
Geburtsort:	Wolfenbüttel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung/Hochschulbildung

1989 – 1993	Grundschule Salzgitter-Thiede
1993 – 1995	Orientierungsstufe Salzgitter-Steterburg
1995 – 2002	Gymnasium im Schloss, Wolfenbüttel
2002	Abitur
Oktober 2002 - April 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Frühjahr 2006	Ärztliche Vorprüfung
April 2010	Ärztliche Prüfung, Erlangen der Approbation
Oktober 2006 - Mai 2010	Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 07.06.2009

Inken Schrodi