

Aus der Elisabeth-Klinik Bigge
Fachklinik für Orthopädie und Rheumatologie
Leiter: Professor Dr. Dr. Axel Wilke
In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg



**Tierexperimentelle Biokompatibilitätsuntersuchung von
PLGA/CaP - Scaffolds unter besonderer
Berücksichtigung der Raman – Spektroskopie –
Eine Pilotstudie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

Dr. med.

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Rainer Beltzer

aus Marburg

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 16.12.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof Dr. Dr. Axel Wilke

Korreferent: Prof. Dr. S. Ruchholtz

Meinen Eltern

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens

endet nicht mit einem Schlusspunkt,

sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse (dt. Nobelpreisträger für Literatur, 1877-1962)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Thematische Einführung	1
1.2 Tissue Engineering	2
1.3 Der kritische Knochendefekt	2
1.4 Die Heilung von Knochendefekten	3
1.4.1 Die endossäre Wundheilung, Osteokon- und Osteoinduktion	3
1.4.2 Primäre Knochenheilung	4
1.4.3 Sekundäre Knochenheilung.....	5
1.5 Scaffolds	6
1.5.1 Grundlegende Eigenschaften eines Scaffolds	7
1.5.1.1 Biokompatibilität.....	7
1.5.1.2 Porosität	7
1.5.1.3 Porengröße.....	7
1.5.1.4 Oberflächenbeschaffenheit.....	8
1.5.1.5 Osteoinduktivität	8
1.5.1.6 Mechanische Eigenschaften und biologische Abbaubarkeit	9
1.5.2 Geeignete Biomaterialien für Bone Tissue Engineering	9
1.5.3 Zellbesiedlung von Scaffolds	10
1.6 Einführung in die Raman-Spektroskopie	11
2 Zielsetzung und Fragestellung	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Vorversuchsreihe und Versuchsgruppen	17
3.2 Scaffolds	18
3.2.1 Herstellung des Grundgerüsts der Scaffolds	19
3.2.1.1 Coating	20
3.2.1.2 Loading	20
3.2.1.3 Sterilisation der Scaffolds	21
3.3 Osteosynthesematerialien	22
3.4 Operation	23
3.4.1 Vorbereitung und Narkoseverfahren.....	23
3.4.2 Operationsverfahren	24

3.4.3 Knochenmarkentnahme.....	29
3.4.4 Aufbereitung und Kultur der Stammzellen	29
3.4.5 Besiedlung der Scaffolds im Bioreaktor	29
3.5 Postoperative Diagnostik.....	30
3.5.1 Klinische Untersuchung.....	30
3.5.2 Nativröntgen-Untersuchungen	30
3.6 Euthanasie der Versuchstiere	31
3.7 Aufarbeitung der Femurknochen	32
3.7.1 Entwässerung und Entfettung des Knochens	32
3.7.2 Einbettung	33
3.8 Auswertung mit dem μ- CT	34
3.9 Herstellung und Untersuchung histologischer Präparate	35
3.9.1 Das Trenn-Dünnschliff-System	36
3.9.1.1 Die Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung.....	36
3.9.1.2 Die Exakt-Präzisions-Klebepresse.....	37
3.9.1.3 Das Exakt – MCP – Trenn – Schleifsystem	39
3.9.2 Färbung des Dünnschliffs	40
3.9.3 Histologische Untersuchung	40
3.10 Auswertung mit der Raman-Spektroskopie	41
3.10.1 Vorbereitung der Präparate für die Raman-Spektroskopie	41
3.10.2 Durchführung der Untersuchung.....	41
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen	42
4.1.1 Osteosyntheseversagen	42
4.1.2 Knochenwachstum	43
4.1.3 Lage des Scaffolds im Osteotomiespalt.....	45
4.1.4 Zusammenfassung	45
4.2 Ergebnisse der μ- CT – Untersuchung.....	45
4.2.1 Knochenwachstum	46
4.2.2 Abbau des Scaffolds.....	48
4.2.3 Vaskularisierung	51
4.2.4 Zusammenfassung	51
4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchung	51
4.3.1 Abbau des Scaffolds.....	52

4.3.2 Zelluläre Besiedlung	52
4.3.3 Knochenwachstum	54
4.3.4 Vaskularisierung	56
4.3.5 Zusammenfassung	57
4.4 Ergebnisse der Raman-Spektroskopie	58
4.4.1 Raman–Spektren der Scaffolds vor Implantation	58
4.4.2 Raman–Spektrum eines unbehandelten Femurknochens	60
4.4.3 Raman-Spektrum Scaffold 4 Wochen postoperativ	61
4.4.4 Raman-Spektrum Scaffold 20 Wochen postoperativ	62
4.4.5 Raman-Spektrum des Einbettmediums	63
4.4.6 Zusammenfassung	64
5 Diskussion	66
5.1 Betrachtung der angewandten diagnostischen Verfahren	66
5.1.1 Raman-Spektroskopie	66
5.1.1.1 Interpretation der erhaltenen Raman-Spektren	66
5.1.1.2 Beurteilung der Raman-Spektroskopie	67
5.1.2 Vor- und Nachteile der bildgebenden diagnostischen Verfahren	69
5.1.2.1 Nativröntgen-Untersuchungen	69
5.1.2.2 μ - CT – Untersuchungen.....	70
5.1.3 Wertigkeit der histologischen Untersuchung.....	70
5.2 Auswahl des Versuchstieres „ChinChilla - Bastard“	71
5.3 Auswahl des Osteosyntheseverfahrens	74
5.4 Biokompatibilität der Scaffolds	77
5.4.1 Knochenwachstum und Osteokonduktivität.....	77
5.4.2 Abbauverhalten der Scaffolds.....	78
5.4.3 Gefäßversorgung.....	79
5.5 „Scaffolds unbesiedelt“ vs. „Scaffolds mit MSCs besiedelt“	80
6 Zusammenfassung	81
7 Abbildungsverzeichnis	84
8 Tabellenverzeichnis	86
9 Abkürzungsverzeichnis	87

10 Literaturverzeichnis	88
11 Danksagung.....	103
12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	105
13 Verzeichnis der akademischen Lehrer	106
14 Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

Die Versorgung großer Knochendefekte, bedingt durch Traumata, degenerative oder maligne Prozesse, stellt eine besondere Herausforderung für operativ tätige Ärzte verschiedener Fachdisziplinen dar. Eine erhebliche Anzahl an Knochendefekten kann gegenwärtig nicht mit einem zufrieden stellenden Ergebnis behandelt werden:

Die Versorgung eines Knochendefektes mit autologem Knochengewebe („*autograft*“), bei welchem dem Patienten selbst, meistens am Beckenkamm, Knochen entnommen und an benötigter Stelle eingesetzt wird, gilt derzeit als Goldstandard des Knochenersatzes [26]. Autologes Knochengewebe hat den Vorteil, dass es zum einen osteogene Faktoren, das heißt Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenwachstums, zum anderen osteoinduktive Faktoren, welche die Proliferation undifferenzierter Zellen und ihre Differenzierung zu Osteoblasten veranlassen, bereit stellt [4, 70]. Jedoch ist das Einsatzspektrum des autologen Knochenersatzes eingeschränkt, zum einen quantitativ bedingt durch die limitierte absolut verfügbare Knochenmasse des Patienten, zum anderen durch die an der Knochenentnahmestelle auftretenden Komplikationen wie Schmerz und Morbidität, „*donor site morbidity*“ [79, 83].

Die Behandlung eines Defektes mit allogenem Knochengewebe („*allograft*“), das heißt mit Knochen, welcher von einem anderen Menschen bereitgestellt wird, stellt eine mögliche Alternative dar. Allerdings sind die Heilungsergebnisse der allogenen denen der autologen Substitution unterlegen. Zudem kann eine allogene Knochenspende Komplikationen in Form einer Immunantwort gegen das körperfremde Gewebe sowie Infektionen beim Empfänger hervorrufen [97]. Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von Metallen oder Keramiken [100]. Metalle geben einem Knochendefekt die für die Heilung notwendige mechanische Stabilität, werden aber schlecht in das umgebende Gewebe integriert und nutzen sich im Verlauf der Zeit ab. Keramiken sind zerbrechlich und können daher in Regionen starker mechanischer Belastung nicht zum Einsatz kommen.

Die dargelegten Schwierigkeiten der genannten Therapieverfahren erklären die

Bestrebungen der Forschung, ein neuartiges, synthetisch herstellbares Knochensubstitutionsmaterial zu entwickeln [27, 43, 58, 63, 75, 76, 96]. Ein aussichtsreicher Ansatz liegt im Feld des „*Bone Tissue Engineering*“.

1.2 Tissue Engineering

Tissue Engineering, eine Gewebezüchtung außerhalb des Organismus, ist „ein interdisziplinäres wissenschaftliches Feld, welches technische sowie bio- und naturwissenschaftliche Grundsätze und Kenntnisse zur Entwicklung biologischer Substitute anwendet, welche die Funktion von Gewebe wiederherstellen, erhalten oder verbessern sollen“ [54]. In Abgrenzung zum klassischen Ansatz der Versorgung von Geweben mit Biomaterialien basiert es auf dem genauen Verständnis von Funktion und Regeneration des betreffenden Gewebes. Ziel des Tissue Engineering ist nicht die Implantation von Ersatzteilen, sondern vielmehr die Induktion eines neuen und funktionell gleichwertigen Gewebes [48]. Dieses Ziel soll durch die Zusammenführung der Kenntnisse aus Physik, Chemie, Biologie, Ingenieur- und Materialwissenschaften erreicht werden [54, 55].

Tissue Engineering ist somit ein viel versprechender Therapieansatz und daher auch Gegenstand lebhafter Forschung verschiedener medizinischer Disziplinen zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, welche gemeinsam haben, dass sie mit Substanz- oder Funktionsverlust von Gewebe einhergehen.

Im Bereich des „*Bone Tissue Engineering*“ liegt der Schwerpunkt auf dem Ersatz von Knochengewebe. Klinische Relevanz hat dies insbesondere bei der Behandlung von „kritischen Knochendefekten“.

1.3 Der kritische Knochendefekt

Ein kritischer Knochendefekt, „*critical sized defect, CSD*“, ist dadurch gekennzeichnet, dass Knochengewebe bei der Defektheilung maximal 10% zum gesamten Regeneratgewebe beiträgt [40]. Das heißt, das jeweilige Individuum ist nicht in der Lage, den vorhandenen Defekt auch nur annähernd knöchern zu schließen. Drei Ursachen werden bei der Entstehung eines kritischen Knochendefektes als entscheidend angesehen:

1. ein ungleichmäßiger Gradient an löslichen ossären Wachstumsfaktoren in der Wunde, welche das Zentrum des Defektes nicht erreichen und daher die Osteogenese nicht gleichmäßig stimulieren können
 2. ungleiche biomechanische Belastung, speziell zum Defektzentrum hin, was eine gleichmäßige Zellmigration und –adhäsion behindert
 3. die im Vergleich zu Osteoblasten schnellere Migration von Fibroblasten zur Wunde, was in einem größerem Vorkommen an Bindegewebe im Defektzentrum resultiert [62, 74]. Folglich schlägt die Knochenheilung in einem CSD fehl, weil sie die Fähigkeiten des Körpers zur genügend schnellen Regeneration an adäquatem Knochengewebe übersteigt.
- Kritische Knochendefekte stellen ein hervorragendes Modell zur Testung von Knochenersatzmaterialien („*bone replacement materials, BRMs*“) und deren Eignung zum „*Bone Tissue Engineering*“ dar [40, 74].

1.4 Die Heilung von Knochendefekten

1.4.1 Die endossäre Wundheilung, Osteokon- und Osteoinduktion

Der Vorgang der endossären Wundheilung mit Neubildung von Knochengewebe, unabhängig davon, ob dieser während einer Fraktur- oder einer periimplantären Heilung abläuft, findet histodynamisch nach demselben Prinzip statt. Dabei wird neuer Knochen jeweils aus zuvor undifferenzierten Zellen gebildet, wobei im Ergebnis Geflechtknochen entsteht. Dieser wird im Anschluss zu lamellärem Knochen umgebaut. Knochengewebe hat nicht die Eigenschaft, sich expansiv auszubreiten. Folglich ist es nicht der Knochen selbst, welcher in einen knöchernen Defektbereich eindringt und diesen ausfüllt. Vielmehr handelt es sich um zuvor undifferenzierte, rekrutierte, wandernde Zellen mit osteogenem Potential [19]. Haben sich diese osteogenen Zellen einmal zu Osteoblasten differenziert und folgend mit der Ausbildung einer Knochenmatrix begonnen, beenden sie ihre Migration. Diese verläuft zumeist entlang einer vorübergehend existierenden, dreidimensionalen, biologischen extrazellulären Matrix, beispielsweise entlang des Periosts, des Endosts oder einem sich im Frakturspalt organisierenden Hämatom. Diese Wanderung kann

selbstverständlich auch, wie beim „*Bone Tissue Engineering*“, entlang einer soliden Implantatoberfläche ablaufen.

Die Rekrutierung und Migration dieser osteogenen Zellen entlang einer solchen Leitstruktur wird unter dem Begriff „*Osteokonduktion*“ zusammengefasst. Ein Implantat bzw. ein Scaffold kann also immer dann gut knöchern integriert werden, wenn es hinreichende osteokonduktive Eigenschaften besitzt.

Die Fähigkeit, die ektope Knochenneubildung anzuregen, indem die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten gefördert wird, bezeichnet man als „*Osteoinduktion*“.

Dieses Phänomen der beschriebenen Zellmigration und –differenzierung lässt sich auch beim „*Bone Remodeling*“ beobachten. Der Unterschied zu den hier beschriebenen Heilungsprozessen besteht dabei darin, dass die osteogenen Zellen beim „*Bone Remodeling*“ aus dem perivaskulären Gewebe rekrutiert werden. Bei der Heilung knöcherner Defekte hingegen wandern sie aus dem Knochenmark ein.

Bereits zuvor wurde der Begriff „*Osteokonduktion*“ von anderen Autoren benutzt. Thomas Einhorn [26] verwendete ihn zur Beschreibung des Einwachsens von Kapillaren zusammen mit neu gebildetem Knochengewebe in einen Frakturspalt, was die Migration von osteogenen Zellen jedoch schon impliziert.

1.4.2 Primäre Knochenheilung

Dieser auch als direkte- oder Kontaktheilung bezeichnete Prozess findet immer dann statt, wenn die Fraktarenden durch eine Osteosynthese, beispielsweise in Form einer Metallplatte, ruhiggestellt werden. Dabei entsteht ein enger Kontakt der Kortikalisflächen beider Fraktarenden. Die Heilung des Defektes soll dadurch erfolgen, dass Osteone direkt vom einen ins andere Frakturfragment hinüberwachsen und so die Fraktur stabilisieren. Die Zwischenschritte der bindegewebigen Organisation und des chondralen Frakturkallus, wie sie bei der sekundären Knochenheilung vorkommen, werden übersprungen oder in nur sehr geringem Maße ausgebildet. Eine Kallusbrücke zwischen den Fraktarenden bleibt aus. Durch das Fehlen einer bindegewebigen Frakturstabilisierung in Form von Bindegewebe und Kallus erhält diese Form

der Heilung den Namen primäre Knochenheilung.

In der Erstbeschreibung durch Lane 1914 („The operative Treatment of fractures“) und Danis 1949 („Theorie et Pratique de l’Osteosynthese“) war das Ausbleiben einer radiologisch sichtbaren Kallusbrücke das wichtigste Kriterium, einen Knochenheilungsprozess der primären Knochenheilung zuzuordnen.

Die Struktur des im Frakturspalt neu gebildeten Knochengewebes hängt dabei von der Größe des Defektspaltes ab, welcher nach Osteosynthese zwischen den Frakturrenden bestehen bleibt. Ist der verbleibende Defekt kleiner als 200µm, wird dieser direkt durch lamellären Knochen überbrückt. Bei größeren Spalten bis zu einem Millimeter zeigt der neugebildete Knochen zwar ein uneinheitlicheres Muster, ein chondrales Heilungsstadium bleibt unter rigider Stabilisation jedoch auch in diesem Fall aus. Man spricht hierbei von einer so genannten Spaltheilung.

1.4.3 Sekundäre Knochenheilung

Diese Form der Frakturheilung zeichnet sich durch den Ablauf von aufeinander folgenden Ereignissen aus, durch welche nach bindegewebiger Erststabilisation der Fraktur *sekundär* Knochen im Frakturspalt entsteht.

Man kann die Heilungskaskade in vier Hauptereignisse unterteilen [59], die in einem charakteristischen zeitlichen Ablauf stattfinden. Sie gehen jedoch fließend ineinander über, wodurch bei einer natürlichen Knochenheilung niemals eine Heilungsphase separat abläuft.

In der ersten Phase, die vornehmlich in den ersten zwei Wochen nach dem Trauma stattfindet, wird das Frakturhämatom durch einspriessende Gefäße resorbiert und dann bindegewebig organisiert („*primary callus response*“).

Ein von Endost und Periost gebildetes chondro- und osteoblastäres Gewebe, welches als Kallusbrücke die Frakturrenden miteinander verbindet („*external bridging callus*“), bildet sich nun aus. Hierdurch wird die erste Stabilisierung der Frakturzone erreicht.

Das Vorhandensein von umgebendem Weichteilgewebe, welches Blutgefäße für das Ersatzgewebe bereitstellt, ist für seine Ausbildung unabdingbar. Wie oben erläutert, wird es bei sehr rigider Fixation der Fraktur in Form einer

Plattenosteosynthese nicht ausgebildet. Es ist aber bei Ruhigstellung im Gips oder bei Marknagelung der vielleicht wichtigste Heilungsschritt [52].

Es schließt sich der Schritt der medullären Kallusbildung („*late medullary callus*“) an, welcher weniger von einem intakten Weichteilgewebe als vielmehr von der intramedullären Blutversorgung abhängt. Dieser Prozess kann sowohl geringe interfragmentäre Bewegung tolerieren und findet auch unter den Umständen einer sehr rigiden Fixation der Frakturrenden statt [64].

Der gebildete Kallus wird nach und nach mehr mineralisiert, wodurch er an Festigkeit und Härte gewinnt. Osteoklastäre Zellen resorbieren chondrale Anteile, die im weiteren Verlauf durch Fasernkochen ersetzt werden.

In einem letzten Schritt wird unter den funktionellen Beanspruchungen an den Knochen Faserknochen schließlich zu lamellärem Knochen umgebaut, seine kollagene Ausrichtung wird gemäß mechanischen Anforderungen angepasst.

Die Bildung von Knochenkallus vollzieht sich in einem Zeitraum von einigen Wochen, wohingegen die anschließenden Umbau- und Adaptionsvorgänge mehrere Monate benötigen.

1.5 Scaffolds

Ein Scaffold, wörtlich übersetzt ein Gerüst, stellt im Wesentlichen eine temporäre Matrix für neues Knochenwachstum dar.

Jegliches Gewebe besteht aus einer Matrix und mehreren Zelltypen. Die Matrix ist in vivo ein dreidimensionales Gerüst für Zellen und stellt für diese eine gewebsspezifische Umgebung und Architektur dar [48]. Sie dient als Reservoir für Wasser, Nährstoffe, Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Um die Funktion eines Gewebes wiederherstellen oder regenerieren zu können, benötigt man eine Vorlage, ein eben solches Gerüst, welches der Zellproliferation als temporäre Leit- und der extrazellulären Matrix als Ablagestruktur dient, bis sich das Knochengewebe durch das Einwachsen von neuem Knochen vollständig regeneriert hat [43, 48, 55].

Dazu sollte es ebenso der Neovaskularisation, also einsprießenden Gefäßen, als Leitstruktur dienen [43, 48, 54] und durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, welche es beinhaltet, aktiv an den regenerativen Heilungsprozessen teilhaben [1].

Ein geeignetes dreidimensionales Scaffold stellt demzufolge eine wesentliche Komponente für eine Erfolg versprechende Strategie beim Tissue Engineering dar. Die meisten derzeit verwendeten Trägermaterialien sind Biomaterialien, die so konstruiert sind, dass sie die Form und Architektur des Empfängergewebes bestmöglich nachahmen [98]. Diese Scaffolds sollten einige oben genannte Eigenschaften besitzen, um im Feld des Tissue Engineering eingesetzt werden zu können.

1.5.1 Grundlegende Eigenschaften eines Scaffolds

1.5.1.1 Biokompatibilität

Hiermit wird die Fähigkeit des verwendeten Materials verstanden, bei Erfüllung der erforderlichen klinischen Funktion eine möglichst physiologische Reaktion im Empfängergewebe hervorzurufen [86].

Ein Scaffold sollte insbesondere ohne das Verursachen einer Immunantwort in das Empfängergewebe integrierbar sein [1, 43, 48, 57].

1.5.1.2 Porosität

Scaffolds sollten eine porige, voll miteinander verbundene Struktur mit einer sehr großen Oberfläche besitzen, um ein zelluläres Einwachsen, eine korrekte Verteilung der Zellen innerhalb ihres Gerüsts und eine Neovaskularisation , ausgehend vom umgebenden Gewebe, zu ermöglichen.

Porosität und Interkonnektivität sind für eine gleichmäßige Verteilung von Nährstoffen und Gasen und den Abtransport von metabolischen Abfallstoffen durch Diffusion wichtig. Der Grad der Porosität beeinflusst dabei natürlich die ebenfalls benötigte mechanische Stabilität eines Scaffolds, was es selbstverständlich zu berücksichtigen gilt.

1.5.1.3 Porengröße

Der Porengröße kommt bei der Herstellung und Auswahl eines Scaffolds ebenfalls eine entscheidende Bedeutung zu: sind die Poren zu klein, wird es zu

deren Verschluss durch die einwachsenden Zellen kommen. Ein solcher Verschluss wird wiederum die Produktion einer extrazellulären Matrix und das Vordringen von Zellen und Gefäßen in zentrale Bereiche des Scaffolds verhindern. Zu große Poren gehen mit einem Verlust mechanischer Stabilität einher und können daher in Gebieten hoher mechanischer Beanspruchung nicht eingesetzt werden.

Für Scaffolds, die beim „*Bone Tissue Engineering*“ zur Anwendung kommen sollen, haben sich Porengrößen zwischen 200-900 µm etabliert [12, 99].

1.5.1.4 Oberflächenbeschaffenheit

Sowohl chemische als auch topographische Oberflächeneigenschaften haben einen Effekt auf die zelluläre Proliferation und Adhäsion [15, 53]. Bestimmte chemische Eigenschaften sollen die Zellen und ihre Proteine zur Anhaftung befähigen.

Die topographischen Gegebenheiten spielen vor allem bei der „*Osteokonduktion*“ eine Rolle: mit dem Begriff Osteokonduktion ist der Vorgang gemeint, bei welchem Zellen mit osteogenem Potential durch ein fibrinöses Gerinnsel zur Oberfläche des Scaffolds gelangen, welches sich unmittelbar nach der Implantation bildet (Begriffserklärung siehe auch Kapitel 1.4.1.).

Diese Wanderung von osteogenen Zellen durch die Gerinnsel verursacht dabei Einziehungen in der temporäreren fibrinösen Matrix. Daher sollte die fibrinöse Matrix in der Oberfläche des Scaffolds gut geschützt liegen, anderenfalls wird sie sich infolge der Einziehungen während der Zellmigration von seiner Oberfläche ablösen.

Es hat sich bereits gezeigt, dass insbesondere raue Oberflächen die fibrinöse Matrix gut einkerkern und somit die Migration der osteogenen Zellen an das Scaffold, also die Osteokonduktion, gegenüber glatten Oberflächen, erleichtern [2, 20].

1.5.1.5 Osteoinduktivität

Die „*Osteoinduktion*“ bezeichnet den Vorgang, bei welchem Stamm- und Progenitorzellen zur osteogenen Differenzierung stimuliert werden (siehe auch

Kapitel 1.4.1.). Somit findet eine Anregung der ektopen Knochenneubildung statt. Dieses geschieht über verschiedene Differenzierungsfaktoren.

Bei sehr großen Knochendefekten ist die natürliche Osteoinduktion in Verbindung mit einem biologisch abbaubaren Scaffold manchmal nicht ausreichend um eine adäquate Heilung zu erreichen. Folglich sollte das Scaffold im Idealfall selbst osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Dieses wird durch zusätzliche Besiedlung der Trägergerüste entweder durch Proteine, insbesondere Differenzierungsfaktoren wie „*Bone Morphogenic Proteins, BMPs*“ [49], oder durch Besiedlung mit mesenchymalen Stammzellen („*MSCs*“), welche aus dem Knochenmark gewonnen werden, erreicht (siehe Kapitel 1.5.3.).

1.5.1.6 Mechanische Eigenschaften und biologische Abbaubarkeit

In vitro sollte ein Scaffold vor allem eine ausreichende mechanische Belastbarkeit gegenüber hydrostatischen Drücken aufweisen um seine Topographie, also seine Poren, für das Einwachsen von Zellen und Gefäßen und zur Matrixproduktion zu erhalten [57].

Da Knochen unter einer dauernden Belastung steht, sollten die mechanischen Eigenschaften des Scaffolds *in vivo* denen des vitalen Knochens entsprechen, insbesondere um eine frühe Mobilisation zu ermöglichen [1, 43, 57].

Des Weiteren sollte die biologische Abbaubarkeit („*biodegradability*“) in ihrem zeitlichen Verlauf möglichst dem der Neubildungsrate des einwachsenden Knochengewebes entsprechen. Bei vollständig eingewachsenem Knochen, also vollzogener Heilung, sollte das Scaffold bereits komplett abgebaut worden sein [54].

1.5.2 Geeignete Biomaterialien für Bone Tissue Engineering

Materialeigenschaften bestimmen in herausragendem Maße auch die spezifischen Eigenschaften des Scaffolds. Folglich ist die Auswahl des Materials mitentscheidend für den Erfolg oder Misserfolg beim „*Bone Tissue Engineering*“ [36].

Da Metalle und die meisten Keramiken nicht biologisch abbaubar sind,

beschränkt sich das Interesse weitestgehend auf Polymere [43, 99]. Diese können wiederum in natürliche und synthetische Polymere unterteilt werden. Natürliche Polymere sind solche, welche sich aus natürlichen Quellen gewinnen lassen, also entweder aus Tieren oder Pflanzen. Zu diesen zählen unter anderem Kollagen [72, 90], Fibrinogen [41] Stärke [29] und Hyaluronsäure [82]. Der große Vorteil dieser Materialien liegt in ihrem geringen immunogenen Potential, ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit dem Empfängergewebe und ihrer guten Verfügbarkeit.

Synthetische Polymere sind die im Bereich des „*Bone Tissue Engineering*“ am häufigsten zur Anwendung kommenden Materialien, da ihre chemischen und mechanischen Eigenschaften über die Auswahl des Materials und das Herstellungsverfahren gezielt gesteuert werden können. So werden sie entsprechend verändert, um als resorbierbare Knochen- oder Knorpelgrundgerüste eingesetzt werden zu können. Besonders oft werden Poly- α -hydroxysäuren [60], Poly-Carbonate und Polyanhydride [91] sowie PLGA (Poly-D/L-Lactit-Co-Glykolsäure) verwendet [21].

Die Polymere zeigen großes Potential für die Anwendungen im Bereich des „*Bone Tissue Engineering*“. Untersuchungen belegen, dass knochenbildende Zellen innerhalb dieser Trägermaterialien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wachsen können [45].

1.5.3 Zellbesiedlung von Scaffolds

Wie oben erläutert, ist der Erfolg beim „*Bone Tissue Engineering*“ nicht ausschließlich vom verwendeten Material abhängig.

Zuletzt experimentieren immer mehr Arbeitsgruppen mit einer zusätzlichen zellulären Besiedlung der Scaffolds, um ihre Osteoinduktivität und somit ihre osteogene Potenz zu steigern. Es werden in der Regel aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymale Stammzellen („*mesenchymal stem cells, MSCs*“) verwendet.

Die Heilungsergebnisse von zellbesiedelten Scaffolds sind denen zellunbesiedelter Vergleichsgruppen im Tierversuch überlegen [101]. Daher

wurden in diesem Versuch neben den verschiedenartigen Scaffolds auch zellbe- und zellunbesiedelte Implantate miteinander verglichen.

1.6 Einführung in die Raman-Spektroskopie

Bei der Raman - Spektroskopie handelt es sich um die spektroskopische Analyse von inelastisch an intramolekularen Schwingungen gestreutem, monochromatischem Licht.

Aus einem so erhaltenen Spektrum (Abbildung 1) lassen sich sehr exakte Rückschlüsse auf die chemische Struktur der untersuchten Probe ableiten, da die im Spektrum detektierten Frequenzverschiebungen von den spezifischen Schwingungen der Atome oder Atomgruppen innerhalb eines Probenkörpers abhängen und somit für diesen charakteristisch sind (Abbildung 2).

Der Raman - Effekt wurde, nachdem er 1923 von Smekal vorausgesagt wurde, 1928 vom indischen Physiker Chandrasekhara Venkata Raman experimentell nachgewiesen [69, 80].

Während der Analyse des Frequenzspektrums monochromatischer Strahlung, welche durch Benzol gestreut wurde, entdeckte Raman nahe der Frequenz der einfallenden Strahlung auch andere Frequenzen, welche jeweils charakteristisch für die streuende Substanz waren. Zudem schienen die Frequenzen unabhängig von der Frequenz der einfallenden Strahlung zu sein.

Diese Linien, „*Raman-Linien*“ genannt, wurden sowohl mit niedrigerer als auch höherer Frequenz als die der einfallenden Strahlung beobachtet. Theoretisch kann man dieses Phänomen wie folgt erklären: bestrahlt man eine Flüssigkeit oder eine konzentrierte Lösung mit monochromatischem Licht (z.B. mit einem Laser der Wellenlänge λ), so tritt der größte Teil des Lichtes ungehindert als „Durchstrahlung“ durch die Probe. Ein anderer Teil des Lichtes wird mit gleicher Frequenz als sogenannte „*Rayleigh-Strahlung*“ in alle Raumrichtungen gestreut. Ein noch geringerer Teil des eingestrahnten Lichtes tritt ebenfalls als Streustrahlung in alle Raumrichtungen aus, besitzt jedoch eine für die bestrahlte Substanz spezifische Frequenzverteilung. Sie entsteht durch Absorption und Reemission verbunden mit Schwingungsanregung oder – lösung. Diese Streustrahlung lässt sich spektral zerlegen und durch einen photoelektronischen Detektor registrieren. Die Differenz zwischen der Frequenz

der eingestrahlten Linie und einer Raman - Linie ist die Frequenz der dazugehörigen Schwingung.

Somit ist der Raman - Effekt Folge von Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Strahlung, wie z.B. monochromatischem Licht.

Die Raman - Linien oder –Banden können größer oder kleiner sein als die Anregungsfrequenz ν_0 . Größere Banden werden dabei als „*Stokes-Banden*“ bezeichnet, kleinere als „*anti-Stokes-Banden*“. Die Frequenzverschiebungen hängen dabei mit den Schwingungen der Atome oder Atomgruppen innerhalb des Probenkörpers zusammen.

Für ein Molekül sind also die Differenzen der Raman - Frequenzen von der Anregungsfrequenz ν_0 („*Raman - shift*“) jeweils charakteristisch.

Die Raman - Spektroskopie ist gegenwärtig eine der gebräuchlichsten und genauesten Untersuchungsmethoden im Bereich der Materialcharakterisierung. Vermehrt wird sie auch zur Untersuchung molekularer Strukturen im biologischen Bereich, auch zur Analyse von Beschichtungen von CaP - beschichteten Polymeren, angewandt [9, 10, 11, 23, 87]. Weiterhin findet die Raman – Spektroskopie Verwendung zur Untersuchung von Zähnen [95], Beschichtungen von Knochenimplantaten [37], sowie neuerdings auch als *in vivo* – Untersuchungsmethode im Tierversuch [67].

Eine Besonderheit spektroskopischer gegenüber radiologischen Untersuchungsverfahren besteht insbesondere darin, dass sowohl die anorganischen als auch die organischen Bestandteile des Knochens differenziert werden können. Somit kann Knochengewebe qualitativ in seiner gesamten Komplexität dargestellt werden, was mit einer radiologischen Diagnostik nicht möglich ist.

Die Raman – Spektroskopie besitzt, im Vergleich zur Infrarot (IR) – Spektroskopie, den Vorteil, dass relativ dicke Proben untersucht werden können und keine extradünnen Schnitte angefertigt werden müssen. Außerdem kann mit der Raman – Spektroskopie eine höhere Auflösung erreicht werden.

Die Raman – Spektren werden durch das Vorkommen von Wasser in den Proben kaum gestört, was vor allem bei der Untersuchung von biologischen Proben einen weiteren Vorteil gegenüber der IR – Spektroskopie darstellt.

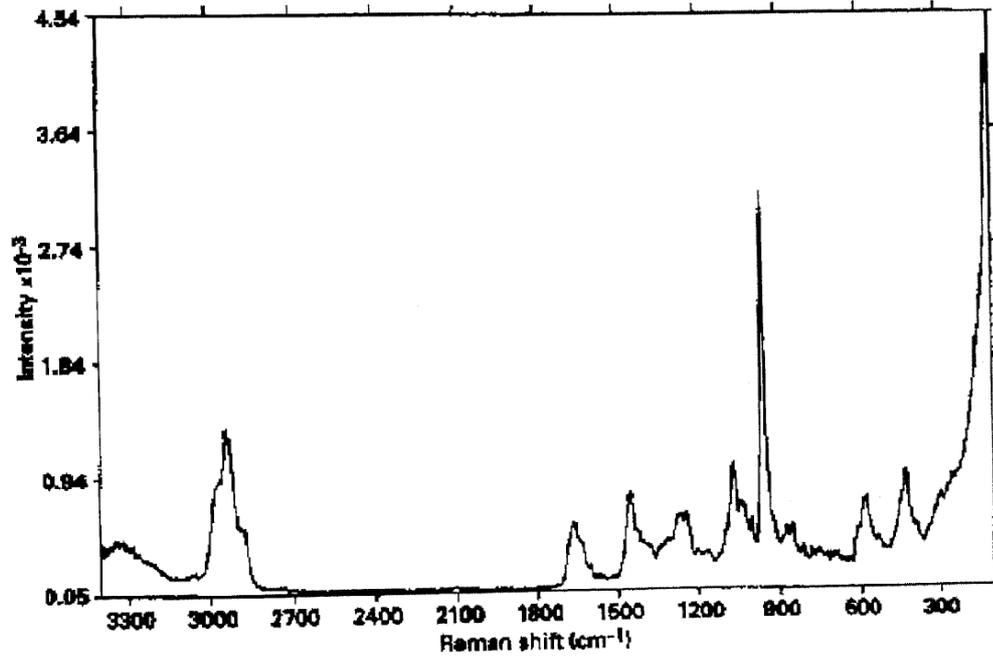


Abbildung 1: Charakteristisches Raman-Spektrum von Knochengewebe [81].

Assignment	Wave number range (cm ⁻¹)	Observed in
PO ₄ ³⁻ ν ₂	422–454	Raman
PO ₄ ³⁻ ν ₄	578–617	Raman/IR
C–C stretching	815–921	Raman
CO ₃ ²⁻ ν ₂	860–890	IR
PO ₄ ³⁻ ν ₁	957–962	Raman
HPO ₄ ²⁻ ν ₃	1003–1005	Raman
PO ₄ ³⁻ ν ₃	1006–1055	Raman
CO ₃ ²⁻ ν ₁	1065–1071	Raman
Amide III	1243–1269	Raman
CH ₂ wag	1447–1452	Raman/IR
Amide II	1540–1580	IR
Amide I	1595–1720	Raman/IR
CH ₂ stretching	2840–2986	Raman
OH stretch	3572–3575	Raman

Abbildung 2: Raman- und IR-spektroskopische Bandenverteilung in Knochengewebe [14].

Die Abbildungen 1 und 2 stellen die für den Knochen charakteristischen Spektren und deren Zuordnung zu chemischen Gruppen als Bestandteile des Knochengewebes dar:

die größte Signalintensität tritt um 960 rel. 1/cm auf. Hier befinden sich die im Hydroxylapatit enthaltenen Phosphatgruppen. Dieser Bereich wird daher auch als ein Indikator für den Mineralisationsgrad des Knochengewebes angesehen [37].

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die Osteokonduktivität von Calciumphosphatgerüsten und die Osteoinduktivität von mesenchymalen Stammzellen ist bereits in der Vergangenheit im Tierversuch nachgewiesen worden [78]. PLGA- (Poly-D/L-Lactit-Co-Glykolsäure) und andere Trägergerüste werden schon heute klinisch bei der Behandlung knöcherner Defekte eingesetzt [62].

In dieser Arbeit soll die Biokompatibilität von PLGA/CaP-Trägergerüsten mit ein- und aufgelagertem, nanostrukturiertem Hydroxylapatit erstmalig in einem kritischen Knochendefekt im Tierversuch untersucht werden. Diese Scaffolds haben anderen Arbeitsgruppen bisher nicht zur Verfügung gestanden.

Zudem soll erstmalig die Raman-Spektroskopie zur tierexperimentellen Biokompatibilitätsuntersuchung eines Scaffolds im kritischen Knochendefekt („*critical sized defect, CSD*“) zur Anwendung kommen.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Fragen:

- Ist es möglich, durch den Einsatz synthetisch hergestellter, körperfremder Materialien einen knöchernen Füllungsdefekt, der die Kriterien des kritischen Knochendefektes erfüllt, suffizient zu schließen?
- Von welchen Strukturen (Endost? Periost?) nimmt das knöcherne Regeneratgewebe seinen Ursprung?
- Kommt es innerhalb der implantierten Scaffolds zu einer Migration und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen?
- Bleibt die Interkonnektivität der verwendeten Scaffolds im Versuchszeitraum erhalten?
- Findet eine zentrale Neovaskularisation statt?
- Tritt eine zentrale Nekrose auf?

-
- Welches Osteosynthese – Verfahren sollte in einer solchen Untersuchung zur Anwendung kommen?
 - Kann anhand der Raman-Spektren eine qualitative Differenzierung der sich im Osteotomiespalt befindenden Strukturen (Scaffold? Organisches/mineralisiertes Knochengewebe?) vorgenommen werden und welche neuen Erkenntnisse lassen sich über den Ablauf des Degradationsprozesses der Scaffolds im zeitlichen Verlauf gewinnen?
 - Erscheint es aufgrund der durch die Raman-Spektroskopie gewonnenen Ergebnisse sinnvoll, diese als diagnostisches Verfahren für zukünftige Versuche im Bereich des „*Bone Tissue Engineering*“ zu etablieren?

3 Material und Methoden

3.1 Vorversuchsreihe und Versuchsgruppen

Zunächst wurde zur Testung der Operationsmethode mit Einbringen des Scaffolds in das Femur der Tiere sowie der Osteosynthese eine Vorversuchsreihe durchgeführt. Insgesamt wurden hierzu 14 männliche Kaninchen der Rasse „*New Zealand White*“ operiert.

Die Operationen und Narkosen gestalteten sich komplikationslos. Jedoch kam es im Verlauf der ersten beiden postoperativen Wochen bei 10 Tieren zu Schrauben- und Plattenausrisen, in den meisten Fällen waren hier die drei distal des Osteotomiespaltes gelegenen Schrauben betroffen. Während der Vorversuchsreihe wurde noch kein winkelstabiles Osteosynthese – System benutzt.

Um die Ausfallquote der Vorversuchsreihe zu verkleinern, kam in der Hauptversuchsreihe ein winkelstabiles Osteosynthese – System zum Einsatz. Zudem wurde nach der Vorversuchsreihe der Entschluss gefasst, die Hauptversuchsreihe nicht mit für ihre weichen Knochen bekannten „*New Zealand White*“ – Kaninchen fortzusetzen.

Somit wurden Tiere der Rasse „*ChinChilla-Bastard*“, männlichen Geschlechts, der Firma Behring verwendet. Das Alter betrug bei der Operation durchschnittlich 6 Monate (zwischen 5 und 7 Monaten), das Gewicht der Tiere lag bei 4.2 kg (zwischen 3.7 und 4.7 kg).

Die Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraumes in Einzelkäfigen mit einer Fläche von 1.5 m² im Tierhaus der Uniklinik Marburg untergebracht. Sie wurden bei einer Temperatur von 21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50% und in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus entsprechend den europäischen Richtlinien zur Haltung von Versuchstieren gehalten.

Futter stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Tiere mindestens eine Woche unter den genannten Bedingungen untergebracht, um eine ausgeglichene Homöostase zu gewährleisten. Zur Identifikation wurden sie mit einem nummerierten Clip im Ohr versehen.

Von den in der Hauptversuchsreihe 29 operierten Tieren kam es bei insgesamt 6 Tieren zu einem Schraubenausris. Des Weiteren fiel ein Tier unmittelbar

postoperativ durch eine Paraplegie auf. Zwei Tiere starben während des Versuchszeitraumes ohne ersichtlichen Grund und bei einem weiteren Tier kam es zu einem Materialversagen durch Abknicken der Osteosynthese – Platte. Somit kam es zu einem Ausfall von insgesamt 10 Tieren, so dass folglich 19 Tiere in die Versuchsauswertung aufgenommen werden konnten und sich die Gruppeneinteilung wie folgt darstellte:

Versuchsgruppe	Versuchszeitraum	
	4 Wochen	20 Wochen
„coated, unbesiedelt“	n = 3	n = 3
„coated and loaded, unbesiedelt“	n = 3	n = 3
„coated, mit MCSs besiedelt“	n = 1	n = 1
“coated and loaded, mit MSCs besiedelt”	n = 1	n = 1
Leerdefekt (= ohne Scaffold)	n = 1	n = 2

Tabelle 1: Versuchstiere und Gruppeneinteilung

3.2 Scaffolds

Während der gesamten Versuchsreihe wurden biologisch abbaubare, makroporöse PLGA- (Poly-DL-Lactit-co-Glycolsäure) Scaffolds verwendet. Ihr Gerüst war zusätzlich mit Calciumphosphat-Partikeln (CaP) beschichtet („coated“) und teilweise zusätzlich noch mit porösen Calciumphosphat-Partikeln beladen („coated and loaded“).

Sowohl Architektur als auch Porengröße der Scaffolds ist dem Aufbau von humanem, trabekulärem Knochen nachempfunden (Abbildung 4).

Die Scaffolds wurden von der Firma BoneTec Corporation (Toronto, Kanada) bezogen. Seine Kenngrößen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Form des Scaffolds	zylindrisch
Durchmesser des Scaffolds	10 mm
Länge des Scaffolds	12 mm
Verhältnis Milchsäure/Glykolsäure im PLGA-Gerüst	75/25
Verhältnis PLGA/CaP	1/2
Porengröße	800 – 1800 μm
Porosität	81-91%

Tabelle 2: Kenngrößen der verwendeten Scaffolds

3.2.1 Herstellung des Grundgerüsts der Scaffolds

PLGA, bezogen von der Firma Birmingham Polymers (Birmingham, AL, USA), wurde in 15%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und mit Calciumphosphat (CaP)-Partikeln im Verhältnis 1:2 gemischt (PLGA: CaP). Das so entstandene, klebrige DMSO-PLGA/CaP - Gemisch wurde nun in eine mit Zuckerkrallen (Firma Redpath Sugar, Toronto, Kanada, Durchmesser zwischen 0.85-1.18 mm) gefüllte Form gegossen. Diese wurde für eine Stunde in einem Eisfach bei einer Temperatur von -18°C gekühlt, wodurch es zur Ausfällung des PLGA/CaP – Gemisches kam. Anschließend konnten die Zuckerkrallen bei Raumtemperatur (20°C) über einen Zeitraum von drei Tagen in destilliertem Wasser ausgewaschen werden. Das destillierte Wasser wurde dabei viermal täglich gewechselt [20]. Aus dem resultierenden, $10 \times 10 \times 1.5 \text{ cm}^3$ messenden Scaffold-Block konnten nun unter Verwendung einer Säge Scaffolds der gewünschten Größe gesägt werden [47].

3.2.1.1 Coating

Zusätzlich zur bereits in der Polymerstruktur des Scaffolds enthaltenen Calciumphosphatphase wurde darauf mittels einer biomimetischen Methode eine dünne Oberflächenschicht aus Calciumphosphat aufgelagert („*coating*“). Die Scaffolds wurden danach in 70%iges Ethanol getaucht und folgend mit Aq. dest. gespült. Nun wurden sie in eine konzentrierte (x 1.5), simulierte Körperflüssigkeit („*simulated body fluid, SBF*“: Na^+ 142.0 mmol, K^+ 5.0 mmol, Mg^{2+} 1.5 mmol, Ca^{2+} 2.5 mmol, Cl^- 147.8 mmol, HCO_3^- 4.4 mmol, HPO_4^{2-} 1.0 mmol, SO_4^{2-} 0.5 mmol) gelegt und in dieser bei einer Temperatur von 37° C für zwei Tage belassen.

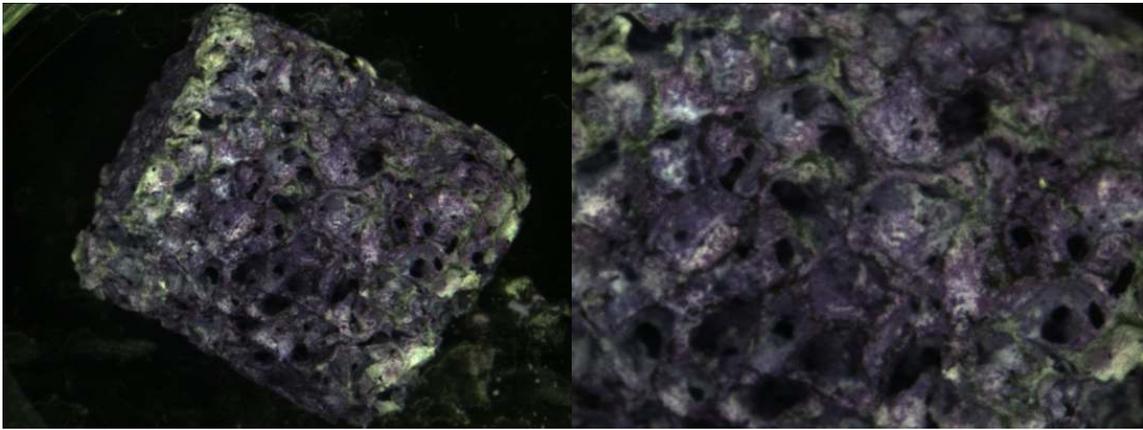


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Scaffold „*coated*“.

3.2.1.2 Loading

Um das PLGA/CaP-Scaffold zusätzlich mit porösen Calciumphosphat-Partikeln (Hydroxylapatit) zu beladen („*loading*“), wurde eine Methode benutzt, welche auf Filtrationstechnik beruht:

Eine Suspension, die poröse CaP - Partikel in konzentrierter (1.5-fach), simulierter Körperflüssigkeit enthielt, wurde durch die Scaffold - Struktur gefiltert. Im Anschluss an die Filtration wurden die Scaffolds über einen Zeitraum von 24 Stunden in konzentrierter SBF belassen, um die Bindung der Partikel an die Calciumphosphatschicht zu fördern. Nun wurden die mit Hydroxylapatit - Partikeln beladenen Scaffolds mehrfach mit Aq. dest.

gewaschen und folgend im Trockenapparat getrocknet.

Somit ist Calciumphosphat in einem solchen Scaffold in drei Phasen enthalten: im Grundgerüst des PLGA/CaP-Scaffolds, in der CaP-Beschichtung („*coating*“) und zuletzt als poröse CaP-Partikel auf der Beschichtung („*loading*“).

Untersuchungen der Scaffold - Oberfläche mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) zeigten dabei eine Hydroxylapatit - Partikelgröße zwischen 20 und 40nm.

Die Oberflächengröße nahm, folgend aus der Partikelgröße im Nanometer-Bereich, sehr hohe Werte im Bereich von 170m²/g an.



Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Scaffold „*coated and loaded*“.

Deutlich ist hier die dem trabekulären Knochengewebe nachempfundene Struktur zu erkennen.

3.2.1.3 Sterilisation der Scaffolds

Die Sterilisation der Scaffolds erfolgte in Äthylenoxid. Der Vorgang dauerte 2 Stunden bei 94% CO₂, 6% C₂H₄O, einem Druck von 1,7 bar und einer Temperatur von 46°C. Die sich anschließende Desorptionszeit betrug 14 Stunden. Danach wurden Trägergerüste unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert.

Die Gewebekompatibilität und die Toxizität wurden in einem vorherigen Projekt getestet (EU-Projekt G5RD-CT-200-00282 „Tissue Reactor“).

3.3 Osteosynthesematerialien

Zur Osteosynthese wurde in diesem Versuch das winkelstabile Universal – Unterkiefer -Implantatsystem der Firma Stryker Leibinger verwendet. Dieses findet beim Menschen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Anwendung und setzt sich aus einer Mandibulaplatte, Verblockungsschrauben und dazugehörigem Instrumentarium zusammen.

Nr. in Abbildung 5	Artikel Nr.	Bezeichnung
1	55-28917	Mandibularekonstruktionsplatte mit Schablone
2	64-00230	Schränkeisen links und rechts
3	62-20130	Schraubendreherklinge für 2,0/2,3/2,7 mm Schrauben
4	62-20295	Arretierbarer Handgriff
5	2296003115	Sägeblatt schmal (10 mm), lang
6	2296-234	Command 2 Sag Saw
7	62-00238	Bohrbuchse zentrisch
8	60-19435	Bohrer 1,9 mm x 115 mm
9	2296-88	Microdriver
nicht abgebildet	52-27510	Verblockungsschrauben, Cross-Pin, 10/12/14/16 mm

Tabelle 3: Verwendetes Osteosynthesematerial der Firma Stryker Leibinger

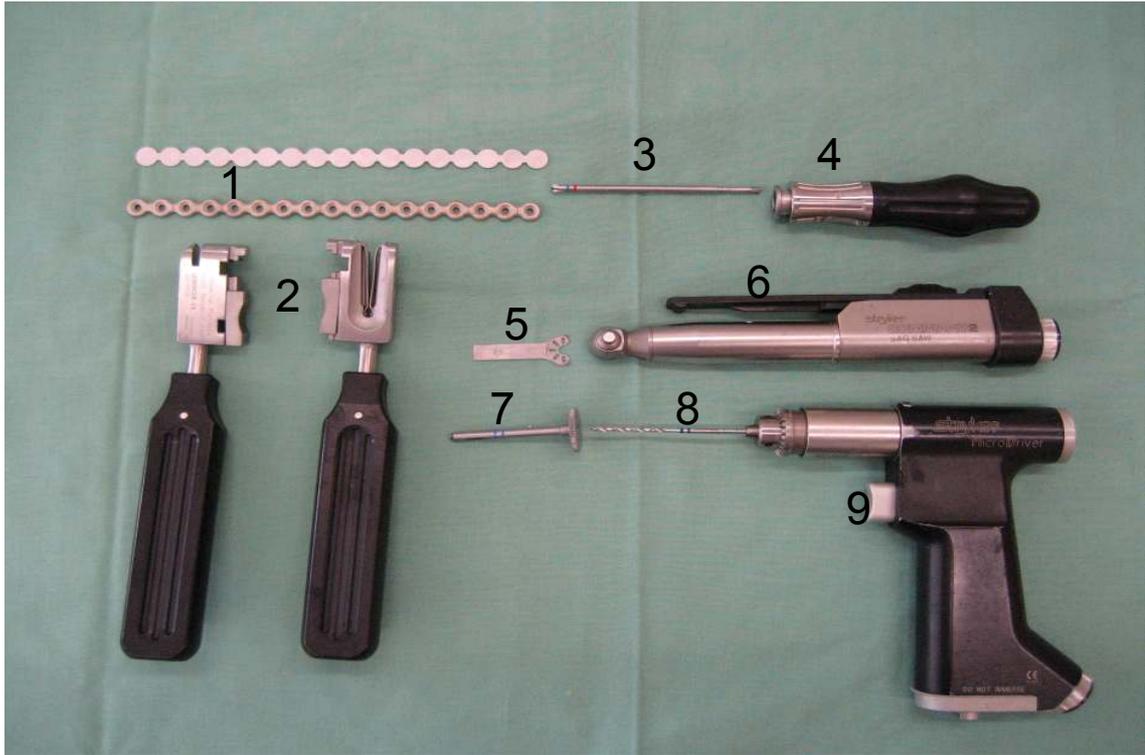


Abbildung 5: Osteosynthese – System der Firma Stryker Leibinger

3.4 Operation

Die Operationen wurden in einem zur Universität Marburg gehörenden Tier-Operationssaal durchgeführt. Alle Operationen wurden am linken Femurknochen der Tiere vorgenommen.

3.4.1 Vorbereitung und Narkoseverfahren

Das Tier wurde anhand seines Ohrclips identifiziert, aus dem Käfig genommen und gewogen. Alle relevanten Daten wie Identifikationsnummer, Gewicht und Alter wurden in das Operationsprotokoll aufgenommen. Nun wurde Atropin zur Prämedikation in die rechte Oberschenkelmuskulatur injiziert. Nach etwa zehn Minuten folgte die intramuskuläre Gabe von Ketamin® und Rompun® zur Narkoseeinleitung ebenfalls in den rechten Oberschenkel.

Medikament	Wirkstoff	Konzentration	Dosierung
Atropin®	Atropinsulfat	0,5 mg/ml	0,2 mg/kg KG
Rompun®	Xylazinhydrochlorid	20 mg/ml	0,2 mg/kg KG
Ketamin®	Ketaminhydrochlorid	100 mg/ml	10-20 mg/kg KG
Narcoren®	Pentobarbital-Natrium	160 mg/ml	3,2 mg (bei Bedarf)

Tabelle 4: verwendete Narkosemedikamente

Nach Narkoseeintritt wurde zunächst eine Augensalbe verabreicht um das Auge vor Austrocknung zu schützen. Dann wurde der zu operierende linke Oberschenkel rasiert.

Als letzter Vorbereitungsschritt folgte das Platzieren eines intravenösen Zuganges in eine Ohrvene des Tieres, um während der Operation bei Bedarf Pentobarbital (Narcoren®) oder Volumen in Form von NaCl 0.9% verabreichen zu können. Der Operations-Situs wurde mit Jod - Polyvidon (Firma Braun®) desinfiziert und die angrenzenden Regionen mit sterilen Tüchern überklebt.

3.4.2 Operationsverfahren

Nach Eintreten der Narkose erfolgte ein lateralseitiger Hautschnitt entlang des linken Femurs (Abbildung 6). Die Muskelfaszie der Quadrizepsmuskulatur wurde durch Stichinzision und Präparierschere eröffnet und scharfe Haken eingesetzt. Folglich wurde stumpf bis auf den linken Femurknochen weiterpräpariert. Dieser wurde mit zwei Hohmannhaken etwas aus den umgebenden Weichteilen hervorgehoben, um das Periost und die Muskelansätze gut vom Knochen lösen zu können (Abbildung 7). Das Periost wurde nun mittels Rasparatorium vom mittleren Diaphysenbereich nach proximal und distal abgeschoben, bis die mittleren 50% des Femurknochens frei von Periost waren.

Als nächster Schritt folgte das lateralseitige Anpassen der Osteosyntheseplatte an den anatomischen Verlauf des Femurknochens. Hierzu wurde eine Schablone an den Knochen angelegt und so gebogen, dass sie dem Knochenverlauf entsprach. Dann konnte die Osteosyntheseplatte durch die

dazugehörigen Schränkeisen der Schablone angeglichen werden.

Die gebogene Osteosyntheseplatte wurde dem Femurknochen lateralseitig angelegt und dort mit einer Zange stabilisiert (Abbildung 8), so dass als nächster Schritt das Einbringen der Verblockungsschrauben erfolgen konnte. Hierzu wurde die Bohrbuchse an ein Loch der Osteosyntheseplatte angelegt, um mit dem Bohrer in deren Führung einen Kanal durch den Knochen anlegen zu können. Dieser wurde darauf folgend ausgemessen. So konnte die Länge der Schraube exakt an die Anatomie des Knochens angepasst werden.

Nach Einbringen der passenden, durch ihr Gewinde selbst schneidenden Verblockungsschraube wurde der beschriebene Ablauf für weitere fünf Löcher wiederholt. Ausschließlich das Loch in der Mitte blieb frei, so dass die Osteosyntheseplatte letztendlich durch drei Schrauben proximal und drei Schrauben distal des mittleren Loches angebracht wurde (Abbildung 9).

Unter dem verbleibenden mittleren Loch der Osteosyntheseplatte konnte anschließend das Sägen des Osteotomiespalt mit einer oszillierenden Säge unter Weichteilprotektion durch einen gegenüber platzierten Hohmannhaken erfolgen (Abbildung 10).

Da die Länge der Scaffolds um wenige Millimeter variieren konnte, wurde das für die jeweilige Operation einzusetzende Scaffold ausgemessen, um den Osteotomiespalt exakt auf die Länge des Implantates ausrichten zu können. Dies war insbesondere deshalb wichtig, da das Scaffold nicht gesondert befestigt wurde, sondern einzig durch Einpressen im Osteotomiespalt verbleiben sollte (Abbildung 11).

Das Sägen des Osteotomiespalt erfolgte mit einer oszillierenden Säge der Firma Stryker Leibinger. Um einem Überhitzen des Knochens und des Sägeblattes entgegen zu wirken, erfolgte der Sägevorgang unter ständiger Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung.

Nach Entnahme des knöchernen Segmentes wurde das Operationsgebiet mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde das Scaffold in den Osteotomiespalt eingesetzt. Ausgenommen waren hierbei die Tiere der Versuchsgruppe mit Leerdefekt, bei welchen der Osteotomiespalt frei blieb und kein Scaffold eingesetzt wurde.

Die Muskelfaszien, das subkutane Gewebe und die Haut wurden mit

resorbierbarem Nahtmaterial vernäht.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren Carprofen (Rimadyl®) 4mg/kg Körpergewicht (KG) subkutan verabreicht. In den folgenden drei Tagen wurde den Tieren zweimal täglich eine Schmerzmedikation in Form von Carprofen (Rimadyl®) 4mg/kg KG subkutan gegeben.

Folgend sind die Operationsschritte anhand intraoperativer Fotoaufnahmen bildlich dargestellt:

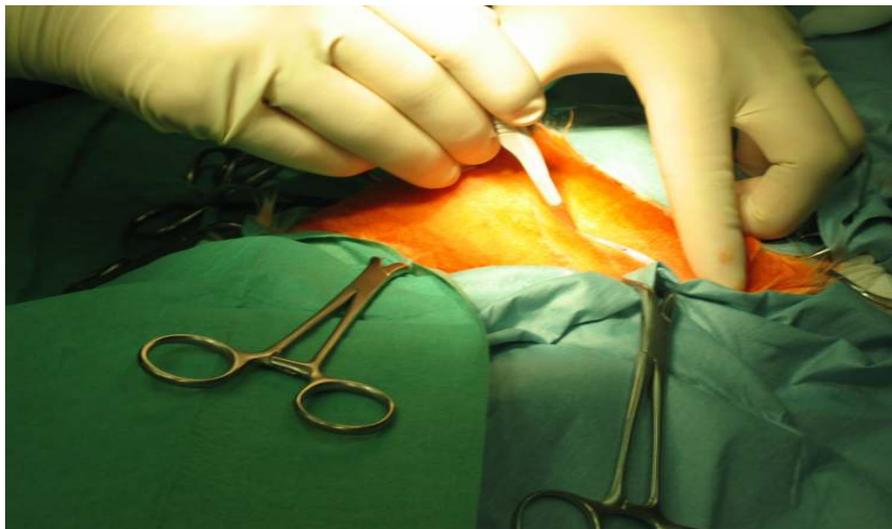


Abbildung 6: Hautschnitt lateralseitig über dem linken Femurknochen

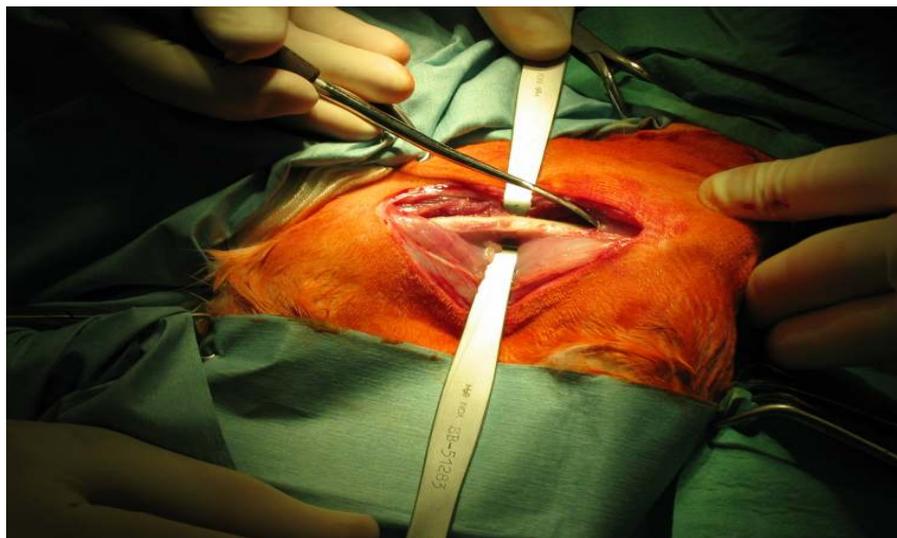


Abbildung 7: Hervorheben des Femurknochens mittels Hohmannhaken und Ablösen von Muskelansätzen und Periost mit dem Rasparatorium

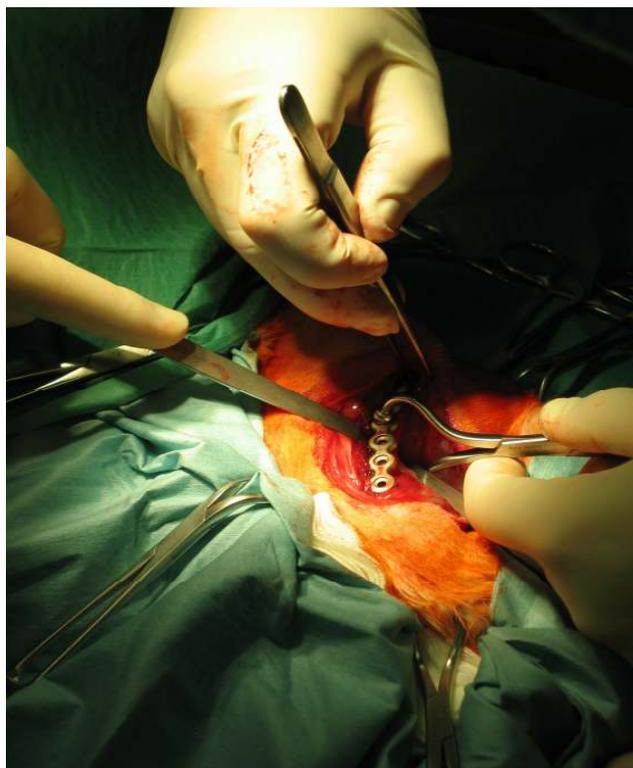


Abbildung 8: Stabilisierung der Osteosyntheseplatte mit Zange am Knochen

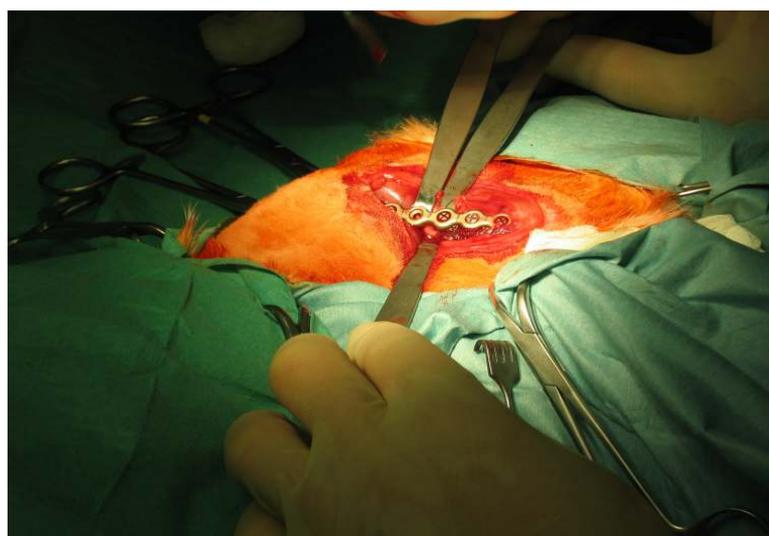


Abbildung 9: Freibleibendes mittleres Bohrloch über dem Osteotomiespalt

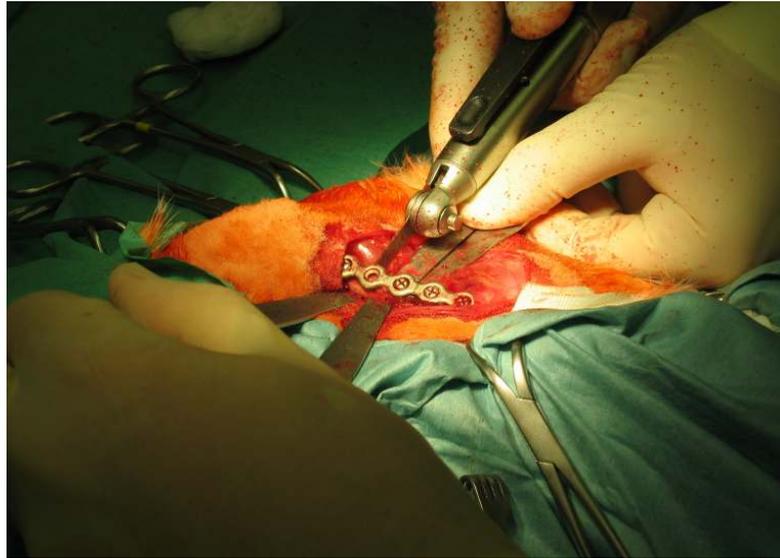


Abbildung 10: Sägen des Osteotomiespaltes mit Weichteilprotektion

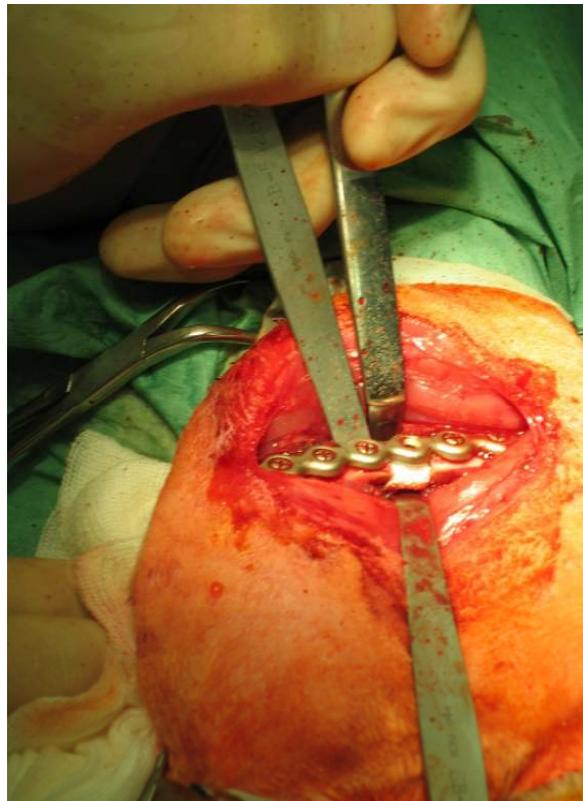


Abbildung 11: Im Osteotomiespalt platziertes Scaffold

3.4.3 Knochenmarkentnahme

Um einige der Scaffolds mit „MSCs“ zu besiedeln, musste zunächst eine Knochenmarkentnahme durchgeführt werden. Hierzu wurden ausschließlich Versuchstiere verwendet, welchen anschließend kein Scaffold eingesetzt wurde und somit nicht in die Versuchsauswertung aufgenommen wurden.

Das jeweilige Tier erhielt eine intramuskuläre Gabe von Atropin zur Prämedikation. Nach etwa zehn Minuten wurde durch intramuskuläre Gabe von Ketamin und Xylazin (Rompun®) die Narkose eingeleitet. Nun wurde die Crista iliaca, welche als Entnahmestelle benutzt wurde, palpatorisch aufgesucht und der Bereich um die zu punktierende Stelle rasiert. Der rasierte Bereich wurde mit Jod - Polyvidon desinfiziert und die angrenzenden Regionen mit sterilen Tüchern überklebt. Folgend wurde der Beckenkamm des Tieres mit einer 18 G Spinal-Nadel punktiert und 3 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert, bevor schließlich 2-6 ml Knochenmark aspiriert wurden.

3.4.4 Aufbereitung und Kultur der Stammzellen

Zunächst mussten die für die Zellkultur benötigten Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert werden. Dies wurde durch die Anwendung der Ficoll - Histopaque – Dichtegradienten -Zentrifugation erreicht (Volumenrelation = 2:1, Dichte = 1077 g/ml). Die Vorläuferzellen wurden nun zweimal in phosphatgepufferte Salzlösung und schließlich in eine Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden sie bei 95%iger Luftfeuchtigkeit, $5,0 \pm 0,5\%$ CO₂ und $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ in ZKT-1 Medium (Biochrom) kultiviert. Dem ZKT-1 Medium wurden 10%ige Penicillin/Streptomycin- Lösung, 10%iges FCS (Invitrogen), 0,2 mmol L-Ascorbat, 10 mmol β -Glycerophosphat und 10^{-8} mol Dexamethason (Sigma) zugegeben (genaue Verfahrensanweisung: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF, Braunschweig). Zuletzt erfolgte, kurz vor Erreichen der Zellkonfluenz, die Besiedlung der Trägergerüste.

3.4.5 Besiedlung der Scaffolds im Bioreaktor

Nach Kultivierung der Zellen mussten diese auf den zu implantierenden

Scaffolds angesiedelt werden. Die Besiedlung der Trägergerüste fand in der GBF in Braunschweig statt.

Hierzu wurde gemäß dem von Barthold beschriebenen Verfahren vorgegangen [7], womit die Zellen auf den Scaffolds ausgesät werden konnten (10^7 Zellen/cm³). Diese wurden in einem Bioreaktorsystem weiter kultiviert [8, 31].

Im Bioreaktorsystem betrug die Temperatur konstant 37°C, der Sauerstoffpartialdruck 20%, die Durchflussrate 0,2 ml/min und die Rotationsgeschwindigkeit des Mediumrührers 120 Umdrehungen/Minute.

Durch das beschriebene Verfahren im Bioreaktor war es möglich, zentrale Bereiche des Scaffolds mit Zellen zu besiedeln.

Nach abgeschlossener Kultivierung der Zellen auf den Scaffolds wurden diese in gekühlten Behältern im Kulturmedium nach Marburg transportiert und noch am selben Tag den entsprechenden Versuchstieren eingesetzt.

3.5 Postoperative Diagnostik

3.5.1 Klinische Untersuchung

Postoperativ wurden die Operationswunde und die Beweglichkeit des linken Beines täglich klinisch kontrolliert, um eventuell auftretende Komplikationen wie Infektionen oder Plattenausrisse frühzeitig erkennen zu können.

Dazu wurde das Tier aus dem Käfig genommen, um die Wundverhältnisse zu begutachten und das Bein funktionell zu untersuchen.

3.5.2 Nativröntgen-Untersuchungen

Der Zweck der unmittelbaren postoperativen Nativröntgen - Untersuchungen lag zum einen darin, die korrekte Platzierung des Scaffolds im Osteotomiespalt zu überprüfen, zum anderen um postoperative Komplikationen wie Ausrisse des Osteosynthesematerials und Frakturen frühzeitig erkennen zu können.

Die Röntgenuntersuchungen wurden in der radiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Marburg von einem Facharzt für Radiologie durchgeführt.

Es wurden von jedem Kaninchen eine AP- sowie eine laterale Aufnahme je

Untersuchungstermin des operierten linken Femurs angefertigt.

Dabei fand die erste Röntgenuntersuchung zwischen Tag eins und Tag fünf nach der Operation statt.

Für die Tiere des 4 - wöchigen Versuchszeitraumes schloss sich zwei Wochen später eine weitere radiologische Kontrolle an.

Die Tiere des 20 - wöchigen Versuchszeitraumes wurden nach der zweiten Röntgenuntersuchung in monatlichen Abständen radiologisch kontrolliert.



Abbildung 12: Röntgenbild linker Femurknochen.
AP-Strahlengang, unmittelbar postoperativ.

3.6 Euthanasie der Versuchstiere

Vor Versuchsbeginn wurde ein Euthanasie-Zeitpunkt auf 4 Wochen *post operationem* festgelegt. Ein weiterer Euthanasie-Zeitpunkt sollte dann erfolgen, wenn bei einem Tier ohne eingesetztes Scaffold („Leerddefekt“) röntgenologisch eine knöcherne Durchbauung des Osteotomiespaltes zu erkennen ist. Dies schien radiologisch nach 20 Wochen der Fall zu sein, so dass die Tiere in 4- und 20-wöchige Versuchszeiträume eingeteilt wurden.

Die Durchführung der Euthanasie verlief in der Vorbereitung analog zu den Operationen: einer Prämedikation mit Atropin folgte die Narkose in Form von intramuskulärer Gabe von Ketamin® und Rompun®. Über einen intravenösen

Zugang in der Ohrvene konnte bei Bedarf die Narkose durch erneute Medikamentengabe vertieft und verlängert werden.

Für die spätere histologische Auswertung der Knochenschnitte war es besonders wichtig, die bei der Auswertung störenden Zellen wie Erythrozyten aus dem Femurknochen zu entfernen. Das Abdomen der Tiere wurde durch eine mediane Laparotomie eröffnet und bis zur *Vena cava inferior* präpariert.

Die *Vena cava inferior* wurde nun mit einer an physiologische Kochsalzlösung angeschlossene, großlumigen Flexüle punktiert, so dass möglichst viel Volumen pro Zeiteinheit in die untere Hohlvene fließen konnte. Etwa zwei Zentimeter distal dieser Punktion wurde die *Vena cava inferior* mit einem Messer eröffnet und das auslaufende Blut mit einem Sauger aufgenommen. Die fortschreitende Perfundierung konnte an der Farbe der Organe beurteilt werden: im Verlauf nahm die Leber ein sandfarbenes und der Magen ein fast weißes Aussehen an.

Schließlich stellte das Herz des narkotisierten Tieres seine Funktion aufgrund der herbeigeführten Anämie und der daraus resultierenden Sauerstoffmangelversorgung ein.

Nach Naht der eröffneten Bauchdecke wurde der linke Femurknochen entnommen und sogleich in eine zehnprozentige Formalinlösung eingelegt. Diese wurde folgend täglich gewechselt.

3.7 Aufarbeitung der Femurknochen

3.7.1 Entwässerung und Entfettung des Knochens

Bevor die entnommenen Knochen am Ende der Fixationszeit entwässert und entfettet werden konnten, wurden sie zunächst mit der „Exakt-Kreissäge“ mit Vakuumvorrichtung auf den zu untersuchenden diaphysären Teil um die Stelle der Osteotomie und des Implantateinsatzes zurechtgeschnitten.

Nun wurden die Knochenproben 12 Stunden mit fließendem Wasser gespült, um sie von dem bei der Fixation verwendeten Formaldehyd zu reinigen. Anschließend wurden die Knochenproben mit einer aufsteigenden Alkoholverdünnungsreihe entwässert, für 48 Stunden in Xylol entfettet und danach zur Vorbereitung auf die Einbettung für 48 Stunden in Xylol/Technovit®

eingelegt (Tabelle 5). Alle beschriebenen Medien wurden in regelmäßigen Abständen neu angesetzt, gewechselt und unter Agitation auf einem Schüttler verwendet.

1.	Ethanol 70%	24 Stunden
2	Ethanol 80%	24 Stunden
3	Ethanol 90%	24 Stunden
4	Ethanol 100%	24 Stunden
5	Ethanol 100%	24 Stunden
6	Xylol	24 Stunden
7	Xylol	24 Stunden
8	Xylol/Technovit® 1:1	24 Stunden
9	Xylol/Technovit® 1:1	24 Stunden

Tabelle 5: Entwässerung und Entfettung der Knochenproben

3.7.2 Einbettung

Nachdem die zu untersuchenden Knochenproben fixiert, entwässert und entfettet waren, konnte deren Einbettung in „Technovit 9100 Neu®“ (Firma Kulzer) beginnen.

Der erste Schritt bestand in der Entstabilisierung der Basislösung von „Technovit 9100“. Hierzu wurden 50g Aluminiumoxid in eine Chromatographiesäule gefüllt, durch die man die „Technovit 9100®“ Basis laufen ließ. Auf diese Weise konnten 3 – 4 Liter Basislösung entstabilisiert werden.

Die entstabilisierte Basislösung wurde direkt weiterverarbeitet und im Kühlschrank bei 4° C gelagert oder bei –20° C auf Vorrat gelegt. Aus der gewonnenen Basislösung konnte durch Verbindung mit den anderen Komponenten alle benötigten Gebrauchslösungen hergestellt werden (Tabelle 6).

Bevor die Knochenproben eingebettet wurden, durchliefen sie noch für jeweils 24 Stunden das Präinfiltrations- sowie das Infiltrationsmedium. Nun wurde die Polymerisationslösungen aus den Stammlösungen A und B (A:B = 9:1)

angesetzt und mit einem Magnetrührer vermischt. Die fertige Polymerisationslösung konnte nun über die sich bereits in verschließbaren Plastikgefäßen befindenden Knochenproben gegeben werden. Es folgte eine zehninütige Behandlung der gefüllten Plastikgefäße mit einem Exsikator im Vakuum, um die in der Polymerisationslösung vorhandenen Luftblasen zu beseitigen. Anschließend wurden die Plastikgefäße mit Polyethylenfolie (Firma Kobe, Marburg) und Deckel luftdicht verschlossen und bis zum Erreichen des endgültigen Polymerisationsgrades bei -20°C für mehrere Tage im Eisschrank gelagert.

Bezeichnung	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Regler
Präinfiltration	200 ml		1g		
Infiltration	ad 250 ml	20g	1g		
Stammlösung A	ad 500 ml	3g			
Stammlösung B	ad 50 ml			4 ml	2 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung verschiedener Gebrauchslösungen aus „Technovit 9100® Neu“

3.8 Auswertung mit dem μ - CT

Im Unterschied zu Computertomographen (CT), die sich in klinischem Gebrauch befinden, sind mit einem μ - CT – Scanner qualitativ hochwertigere Ortsauflösungen zu erzielen. Mit einem gewöhnlichen CT lassen sich Ortsauflösungen von 0,5 bis 1 mm, mit dem μ - CT zwischen 5 und 50 μm erzielen.

Bei dem verwendeten μ - CT handelt es sich um ein Gerät mit der Typenbezeichnung „Skyscan-1072 High-Resolution desktop μ - CT system“ (Firma Skyscan, Belgien, Abbildung 13). Dieses setzt sich aus einem Scanner, der in einem für Röntgenstrahlen undurchlässigen Gehäuse eingebracht ist, sowie zwei PC - Einheiten zur Gerätesteuerung und Bildrekonstruktion, zusammen.

Der Probenschlitten befindet sich im Scanner auf einer drehbaren Achse

zwischen einer Mikrofokusröntgenröhre und einem CCD (Charge – Coupled - Device) – Detektor (Detektorengröße 1024 x 1024, 12 bit). Dieser kann Rotationsbewegungen in frei wählbaren Schritten durchführen und entlang der Längsachse zwischen Röntgenröhre und CCD - Detektor bewegt werden. Somit ist es möglich, den Objekt-Fokusabstand je nach gewünschter Vergrößerung zu verschieben. Der maximale Durchmesser einer zu untersuchenden Probe beträgt 2 cm. Daher musste zunächst die überstehende Einbettungsmasse der Knochenproben durch die diamantbeschichtete Kreissäge des Trennsystems (Firma Exakt) entfernt werden, bevor sie im μ -CT untersucht werden konnten. Die resultierenden Knochenblöcke hatten eine von Größe 1 x 1 x 1,5 cm. Die Bildrekonstruktion fand unter Verwendung eines „Cone-Beam-Algorithmus“ statt [30].



Abbildung 13: Das „Skyscan-1072 High-Resolution desktop μ -CT system“

3.9 Herstellung und Untersuchung histologischer Präparate

Mittlerweile ist es durch die Verwendung geeigneter Kunststoffe möglich, histologische Präparate aus unentkalktem Knochen herzustellen.

Liegt der unentkalkte Knochen in eingebetteter Form vor, gibt es im Wesentlichen zwei Methoden zur weiteren Verarbeitung: zum einen kann man mit einem Mikrotom Schnitte oder mit dem Trenn-Dünnschliff-System Schriffe anfertigen. Letzteres Verfahren besitzt gegenüber dem Mikrotom den Vorteil der

besseren Struktur- und Mineralerhaltung [68].

In diesem Fall wurde die von Donath [22] etablierte Methode zur Herstellung von Schliffen aus Hartmaterialien verwendet. Allerdings wurde statt des Einbettkunststoffes „Technovit 7200“ das neuere „Technovit 9100 Neu“ benutzt.

3.9.1 Das Trenn-Dünnschliff-System

Das Trenn-Dünnschliff System setzt sich aus einer Vakuum-Klebevorrichtung zur planparallelen Aufblockung, einer Präzisions-Klebepresse und einem Trenn-Schleifsystem zusammen (Firma Exakt).

3.9.1.1 Die Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung

Die Klebevorrichtung besteht aus zwei parallelen Platten: einer oberen Deckplatte mit Anschluss an eine Vakuumpumpe zur Befestigung von Objektträgern sowie einer unteren Bodenplatte. Beide Platten sind über einen Stab miteinander verbunden, durch welchen der Abstand der Platten zueinander regulierbar ist und über den sie gegeneinander auf der x-Achse verschiebbar sind.

Ein vorgeschliffener Objektträger wurde mit der nach unten zeigenden angeschliffenen Seite mithilfe der Vakuumpumpe an die Deckplatte angesaugt. Der Knochenblock wurde nun mit der später zu untersuchenden Seite nach unten auf die Bodenplatte gelegt. Jetzt musste der zur Aufblockung notwendige Drei-Komponenten-Kunststoff „Technovit 4000“ (Firma Kulzer) angemischt werden (Tabelle 7):

Materialnummer	1	2	3
Bezeichnung	Sirup 1	Sirup 2	Pulver
Nach Gewicht	2 Teile	1 Teil	2 Teile
Nach Volumen	2 Teile	1 Teil	2 Teile

Tabelle 7: Herstellung des Drei-Komponenten-Kunststoffes „Technovit 4000“

Dieser wurde dann auf der zur Deckplatte zeigenden Oberfläche des Knochenblockes verstrichen.

Nun konnte die Deckplatte langsam abgesenkt werden, bis sie mit dem Objektträger auf dem mit drei Komponenten Kunststoff bedeckten Knochenblock zu liegen kam.

Nach einer zehnmütigen Aushärtezeit wurde der Objektträger mit dem an ihm fixierten Knochenblock entnommen. Durch weitere Bearbeitung im Exakt Mikroschleifsystem konnte schließlich vollständige Planparallelität erreicht werden.

3.9.1.2 Die Exakt-Präzisions-Klebepresse

Mit der „Exakt Präzisions – Klebepresse“ (Abbildung 14) wurde nach der oben beschriebenen planparallelen Aufblockung ein Objektträger auf der zu untersuchenden Seite des Knochenblockes angebracht.

Die Klebepresse besteht, analog zur Klebevorrichtung zur planparallelen Aufblockung, aus einer Deckplatte mit Vakuumanschluss sowie einer Bodenplatte.

Da zum Kleben UV - polymerisierender Kleber („Technovit 7210 VLC“, Firma Kulzer) verwendet wird, besteht die Deckplatte aus Plexiglas. Dieses kann von den UV - Strahlen der über der Deckplatte angebrachten Lampe durchdrungen werden.

Zunächst wurden mit einer Mikrometerschraube mit Digitalanzeige (Firma Mitutoyo) die Dicke des Knochenblockes inklusive Objektträger und die des anzubringenden Objektträgers bestimmt.

Nun wurde der endgültige Objektträger durch die Vakuumeinrichtung an die Deckplatte gezogen und der andere Objektträger mit Knochenblock darunter auf die Bodenplatte gestellt.

Der Knochenblock wurde jetzt mit dem lichthärtenden Kleber „Technovit 7210 VLC“ bestrichen. Wieder wurden die Platten langsam aneinander genähert, bis Kontakt zwischen dem Knochenblock und seiner Klebeschicht mit dem endgültigen Objektträger entstand. War diese Position erreicht, wurde die Lampe zur Polymerisation des Klebers eingeschaltet und der fertige „Sandwich-Block“ (Abbildung 15) konnte nach zehn Minuten entnommen werden.

Schließlich musste mit der Mikrometerschraube noch die Gesamtdicke dieses Blockes bestimmt werden. So war es möglich, die Dicke der Klebeschicht zu berechnen:

$$d = (c) - (a + b)$$

a = Dicke Knochenblock inklusive Objektträger; b = Dicke endgültiger Objektträger;

c = Dicke des Sandwichblockes; d = Klebeschichtdicke



Abbildung 14: Die Exakt – Präzisions – Klebepresse



Abbildung 15: „Sandwichblock“ nach Anfertigung

3.9.1.3 Das Exakt – MCP – Trenn – Schleifsystem

Der Trennschnitt durch den zwischen den beiden Objektträgern liegenden Knochenblock erfolgte mit der diamantbeschichteten Kreissäge des Exakt – MCP – Trenn – Schleifsystems. Dazu wurde der Sandwich-Block mit dem Objektträger der zu untersuchenden Seite über ein Vakuumsystem an einer der Kreissäge benachbarten Platte angebracht. Die Platte wurde dann der Kreissäge genähert, bis der zu untersuchende Objektträger Kontakt zu dieser bekam. Von diesem Punkt aus wurde die Platte mit dem Sandwich-Block wieder 200 µm von der Kreissäge entfernt, was der gewünschten Sägeschichtdicke entsprach. Bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit und unter ständiger Wasserkühlung erfolgte dann der Schnitt durch den Knochenblock. Am Ende des Vorgangs wurde der Trennschnitt von der Platte mit der Vakuumeinrichtung gelöst und seine Dicke bestimmt. Nun konnte wiederum die Dicke des auf dem endgültigen Objektträger verbliebenen Präparates ermittelt werden:

$$d = (c) - (a + b)$$

a = Dicke endgültiger Objektträger; b = Dicke Klebeschicht;

c = Dicke Trennschnitt inklusive Objektträger; d = Präparatdicke

Anschließend wurde das Präparat mit dem Objektträger durch ein Vakuumsystem an einer Platte des Exakt-Mikroschleifsystems befestigt und auf die Zieldicke von 80µm geschliffen. Dabei wurde mit grobkörnigem Schleifpapier begonnen und, je mehr man sich der Zieldicke näherte, feinkörnigeres Schleifpapier verwendet. Nach Erreichen der Zieldicke von 80µm, was über die Mikrometerschraube kontrolliert wurde, konnte das Präparat abschließend mit einem speziellen Schleifpapier poliert werden.

3.9.2 Färbung des Dünnschliffs

Zur histologischen Auswertung wurden die endgültigen Knochenschliffe nach dem Protokoll von Donath [22] Toluidinblau gefärbt.

Lösung A:

- 800 ml Aq. dest.
- 8 g Na-Tetraborat (Firma Merck)
- 8 g Toluidinblau
- Mischen für 15 Minuten mit dem Magnetprüher

Lösung B:

- 200 ml Aq. dest.
- 2 g Pyronin G (Waldeck)
- Mischen für 15 Minuten mit dem Magnetprüher
-

Die Lösungen A und B wurden mit dem Magnetprüher miteinander vermischt und anschließend zweimal filtriert.

Das besondere an der Färbemethode nach Donath sind die metachromatischen Farbeffekte. Es kann sehr gut zwischen blass gefärbtem Knochen, blau gefärbten Zellen, Zellkernen, Kollagenfasern und Osteoidsäumen und rotviolett gefärbten Mastzellgranula, Wundheilungsarealen und Knorpelmatrix differenziert werden.

Die Schliffpräparate werden für zehn Minuten in 30%ige Wasserstoffperoxid (H_2O_2) - Lösung gelegt und anschließend mit Aq. dest. gespült. Dann werden sie für 15 Minuten in der Toluidinblau - Färbelösung belassen und danach mit fließendem Leitungswasser abgespült.

3.9.3 Histologische Untersuchung

Die Untersuchungen der histologischen Präparate erfolgte mit einem „Leica DMRX – Mikroskop“ (Durchlicht- mit Auflichtoptik und polarisiertem Licht).

3.10 Auswertung mit der Raman-Spektroskopie

3.10.1 Vorbereitung der Präparate für die Raman-Spektroskopie

Die Knochenblöcke mussten zunächst entplastet werden, bevor sie für die Raman - spektroskopische Untersuchung verwendet werden konnten.

Dabei kam das von der Firma „Heraeus Kulzer GmbH“ beschriebene Verfahren zur Entplastung von in Technovit eingebetteten Schnitten zur Anwendung:

1. Xylol (Merck)	3x20min	RT (Raumtemperatur)
2. 2-Methoxyethylacetat (Merck)	2x20min	RT
3. Aceton reinst (Merck)	2x5min	RT
4. Aq. dest.	4x2min	RT

3.10.2 Durchführung der Untersuchung

Alle Untersuchungen wurden mit einem „*WITec confocal Raman microscope*“ der Serie „*alpha 300*“ in Ulm durchgeführt.

Es handelt sich um ein konfokales Gerät hoher Sensitivität und Auflösung, durch welches molekulare Aussagen über einen einstellbaren, definierten Bereich einer beliebigen Probe möglich sind. Bisher wurde es insbesondere für geologische Fragestellungen verwendet [71, 84, 88].

Insgesamt wurden durch die Raman-Spektroskopie Oberflächenanalysen von folgenden 6 Präparaten vorgenommen:

- Scaffold „*coated*“
- Scaffold „*coated and loaded*“
- Femurknochen unbehandelt
- Scaffold 4 Wochen postoperativ
- Scaffold 20 Wochen postoperativ
- Einbettmedium der Knochenblöcke

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen

Die unmittelbar postoperativ durchgeführten Röntgenuntersuchungen dienten hauptsächlich der Überprüfung der korrekten Lage des Osteosynthesematerials sowie der frühen Diagnose von Plattenausrisen (Abbildung 16).

Des Weiteren sollte die regelrechte Lage des Scaffolds im Osteotomiespalt dargestellt werden. Ein Abbruchkriterium des Versuches, nämlich die knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt bei einem Tier ohne eingesetztes Scaffold („Leerdeft“), sollte zudem anhand der Röntgendiagnostik überprüft werden.

4.1.1 Osteosyntheseversagen

Eine Osteosyntheseinsuffizienz (Abbildung 16) wurde bei insgesamt vier Tieren beobachtet: bei drei Versuchstieren kam es zu einem Ausriss der Schrauben, bei einem weiteren Tier trat ein Abknicken der Osteosyntheseplatte über dem Osteotomiespalt auf.

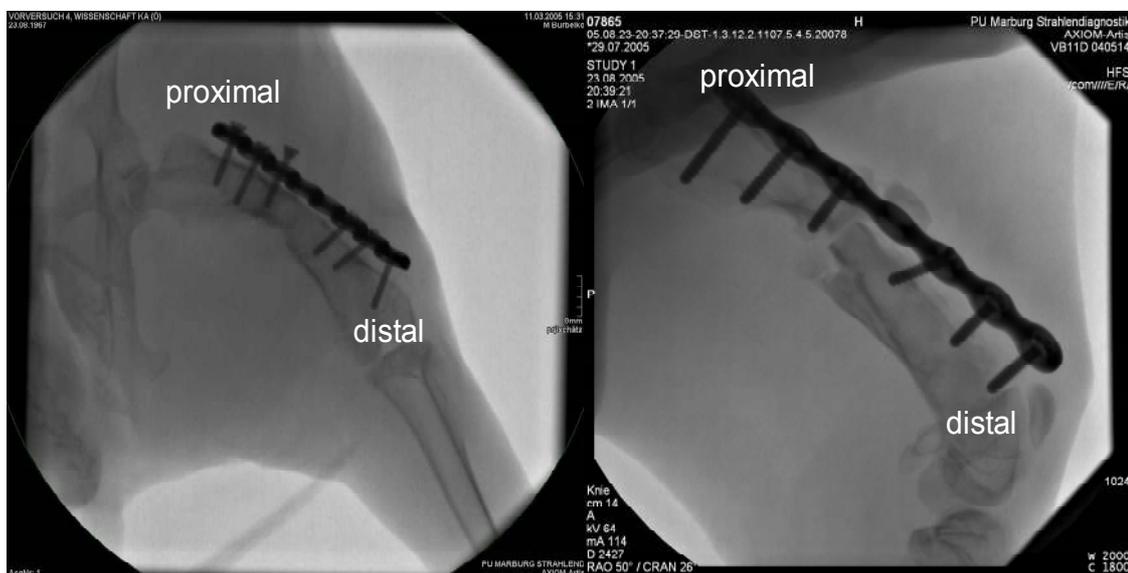


Abbildung 16: Osteosyntheseversagen in Form eines Plattenausrisse.
Auf diesen Aufnahmen zweier unterschiedlicher Versuchstiere zeigen sich
ausgerissene Schrauben

4.1.2 Knochenwachstum

Bei keinem der Versuchstiere ließ sich nach 4 Wochen ein sichtbares Knochenwachstum im Osteotomiespalt auf den Röntgenaufnahmen erkennen. Jedoch war schon zu diesem Zeitpunkt eine beginnende knöcherne Spangenbildung, welche ihren Ursprung vom distalen Femur von der dem Osteosynthesematerial gegenüberliegenden Seite nahm, nachzuweisen (oberes und mittleres Bild Abbildung 18). Ausgangspunkt dieser knöchernen Spangenbildung waren die Durchtrittsstellen der distal liegenden Schrauben. Im weiteren Verlauf reichte diese bis über den Osteotomiespalt an den proximalen Femur heran. Ob sich hier jedoch eine knöcherne Anastomose ausbildete, konnte anhand der Röntgenaufnahmen nicht sicher dargestellt werden.

Nach 8 Wochen war bei allen Versuchstieren ein Knochenwachstum im Osteotomiespalt sichtbar (unteres Bild Abbildung 18).

Bei einem der Versuchstiere mit Leerdefekt wurde nach 20 Wochen eine knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalt angenommen, es schien eine durchgehende Kortikalis vom distalen bis zum proximalen Spaltbereich zu bestehen (Abbildung 17).

Daraufhin wurden 20 Wochen als Ende des Versuchszeitraumes festgelegt, da hiermit das vor Versuchsbeginn definierte Abbruchkriterium erfüllt war.

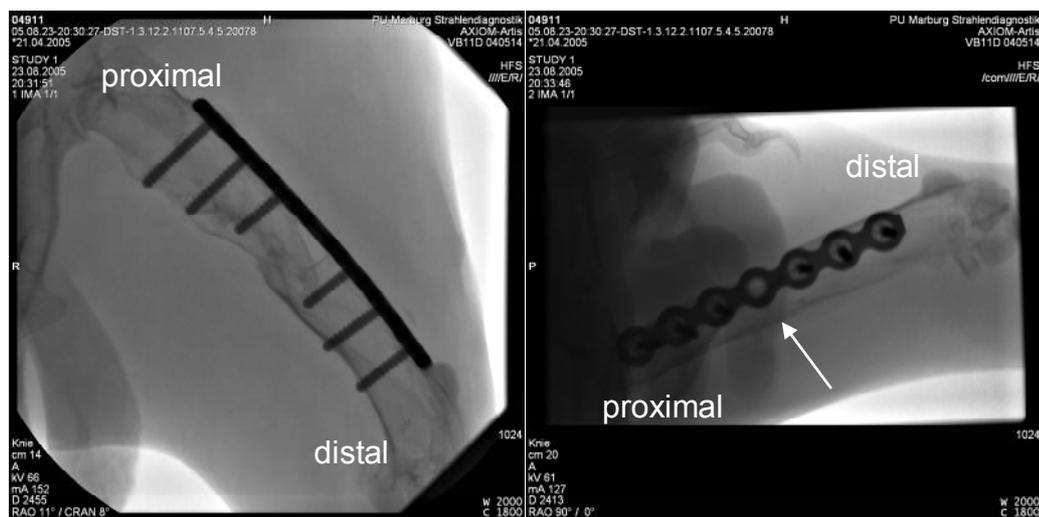


Abbildung 17: Versuchstier mit Leerdefekt, 20 Wochen postoperativ:

Der Osteotomiespalt scheint vollständig überbrückt. In der zweiten Ebene (rechtes Bild) kommt eine vermeintlich durchgehende Kortikalis zur Darstellung (Pfeil).

Insgesamt zeigte sich 20 Wochen postoperativ bei wiederum allen Versuchstieren eine weitere Zunahme der Knochenneubildung bis in zentrale Bereiche des Osteotomiespalt hinein (Abbildung 18).

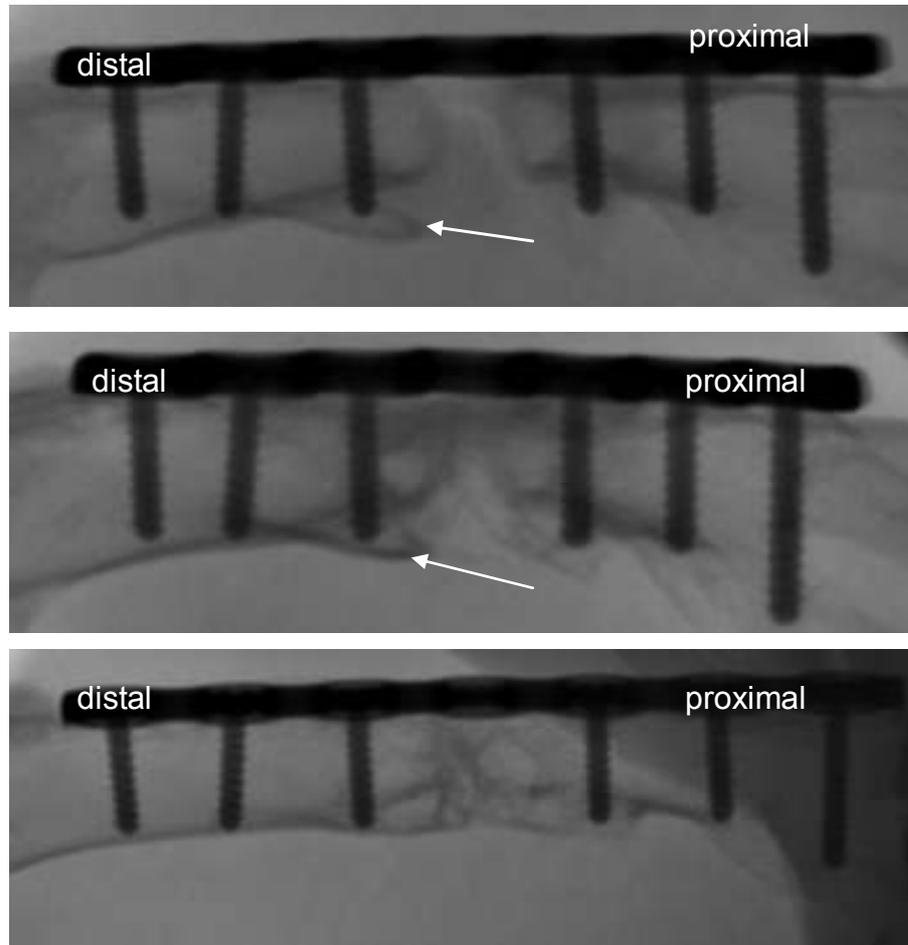


Abbildung 18: Verlaufskontrolle des knöchernen Wachstums.

Osteotomiespalt eines mit einem unbesiedelten Scaffold versorgten Versuchstieres:

4 Wochen postoperativ (oberes und mittleres Bild) zeigt sich ein von distal ausgehendes Wachstum einer Knochenspange (Pfeile), 8 Wochen postoperativ (mittleres Bild) ist erkennbar Knochengewebe in den Spalt eingewachsen, 20 Wochen postoperativ (unteres Bild) scheint der Defekt vollständig von neu gebildetem Knochengewebe ausgefüllt.

4.1.3 Lage des Scaffolds im Osteotomiespalt

Unmittelbar postoperativ war eine Struktur, welche als Scaffold angenommen werden konnte, nicht nachzuweisen. Auch im Verlauf war teilweise lediglich eine verminderte Strahlentransparenz im Osteotomiespalt zu sehen.

Die korrekte Lage der Scaffolds im Osteotomiespalt sowie eine Verlaufskontrolle derselben sowie ihrer Degradation ließen sich somit mit den durchgeführten Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen nicht verifizieren.

4.1.4 Zusammenfassung

Durch die unmittelbar postoperativen sowie im Verlauf durchgeführten Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen war lediglich die korrekte Lage des Osteosynthesematerials hinreichend zu beurteilen.

Zur Lage- und Degradationskontrolle der platzierten Scaffolds erwiesen sich die Nativröntgenaufnahmen als ungeeignet, da sich diese auf keiner der Aufnahmen identifizieren ließen.

Ein knöchernes Wachstum und seine Progredienz im Osteotomiespalt konnte anhand der Röntgenaufnahmen gezeigt werden. Außerdem wurde bei einem Tier ohne eingesetztes Scaffold („Leerdekt“) 20 Wochen postoperativ eine durchgehende Kortikalis angenommen (Abbildung 17). Zur exakten Darstellung von Details des Knochenwachstums ist die Röntgendiagnostik in 2 Ebenen jedoch insgesamt allenfalls als eingeschränkt geeignet zu beurteilen, insbesondere da sich durch das Osteosynthesematerial die zweite Ebene nur unzureichend beurteilen ließ.

4.2 Ergebnisse der μ -CT – Untersuchung

Eine μ -CT – Untersuchung wurde bei allen Versuchstieren *post mortem* durchgeführt. Hierdurch konnten alle Gruppen untereinander bezüglich der unterschiedlichen Fragestellungen miteinander verglichen werden.

Vor der Untersuchung war es notwendig das Osteosynthesematerial, also die Osteosyntheseplatte und die eingebrachten Schrauben, zu entfernen, um eine störende Artefaktbildung bei der Auswertung zu vermeiden. Somit war eine

Beurteilung der knöchernen Reaktionen unmittelbar um das Osteosynthesematerial herum nicht möglich. Jedoch konnte der Bereich des hauptsächlichen Interesses, also der Osteotomiespalt mit eingebrachtem Scaffold komplett dargestellt und ausgewertet werden.

4.2.1 Knochenwachstum

Ausgangsstellen eines Knochenwachstums in den Osteotomiespalt waren insbesondere das End- und Periost. Am deutlichsten trat diese end- und periostale Knochenbildung im Bereich der proximalen Anastomose (Kontaktbereich zwischen proximalem Ende des Osteotomiespaltes und eingebrachtem Scaffold, Abbildung 19) auf.

Bei vielen Tieren war eine von distal des Osteotomiespaltes ausgehende und in proximale Richtung wachsende, knöchernen Spangenbildung zu beobachten (Abbildung 19). Jedoch entstand bei keinem Tier eine Verbindung, das heißt eine knöchernen Kontinuität, zwischen der Knochenspange und dem proximal des Osteotomiespaltes liegenden Femurknochen. Eine minimale Spaltbildung, „*Non-Union*“, blieb bei allen Tieren bestehen (Abbildung 20).

Es konnte bei allen Versuchstieren ein deutlich erkennbares Einwachsen von Knochengewebe in den Bereich des mit dem Scaffold versorgten Osteotomiespaltes hinein gesehen werden. Insbesondere in dem der Osteosyntheseplatte ursprünglich unmittelbar benachbarten Bereich zeigte sich die größte Annäherung der von proximal und distal ausgehenden Knochenneubildung. Ein vollständiger knöcherner Schluss des Defektes konnte auch hier nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde im Bereich der dem Osteotomiespalt benachbarten Schrauben ein starkes Knochenwachstum beobachtet. Hier kam es teilweise auch zu einer endostalen Reaktion, es bildete sich mehrschichtig zirkulär aufgebauter Knochen (Abbildung 19), bei einigen Tieren von dort ausgehend und bis zum Osteotomiespalt reichend.

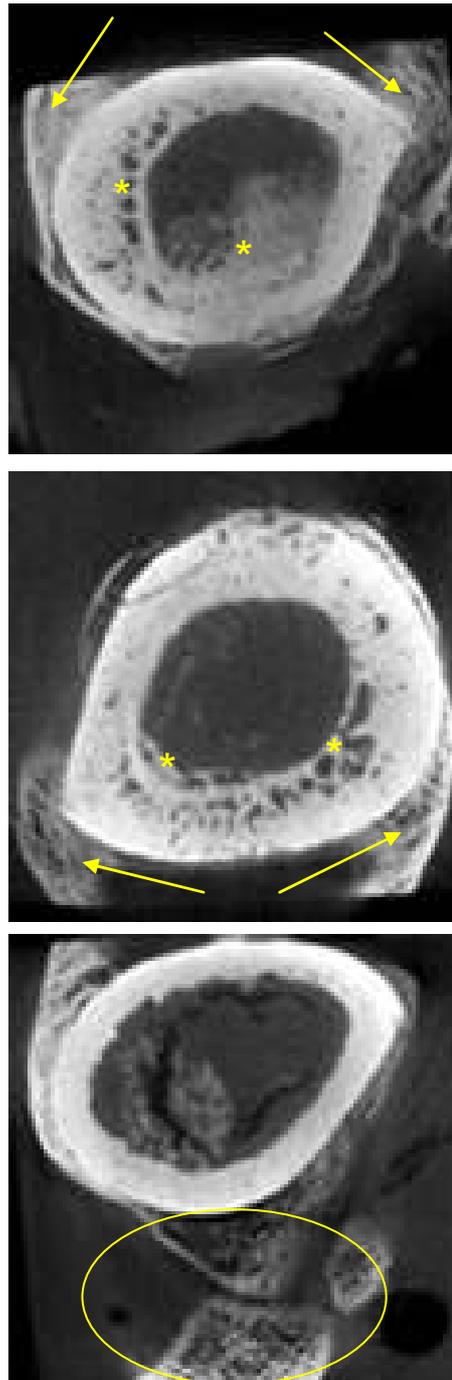


Abbildung 19: Axiale Schnitte durch den Knochen.

Proximal (oberes und mittleres Bild) und distal (unteres Bild) des Osteotomiespaltes, Scaffold „*coated and loaded mit MSCs besiedelt*“, 4 Wochen postoperativ: auf dem oberen und mittleren Bild ist die vom End- (*) und Periost (Pfeile) ausgehende knöcherne Proliferation deutlich erkennbar. Auf dem unteren Bild zeigt sich die von distal ausgehende, knöcherne Spangenbildung (Ellipse). Die endostale Proliferation ist hier viel schwächer ausgeprägt.

Der in den Röntgenaufnahmen in 2 Ebenen 20 Wochen postoperativ als knöchern konsolidiert vermutete Leerdefekt (Abbildung 17) war lediglich durch eine Knochenspange nach proximal überbrückt, eine durchgehende knöcherne Kontinuität konnte im μ -CT nicht verifiziert werden (Abbildung 20).

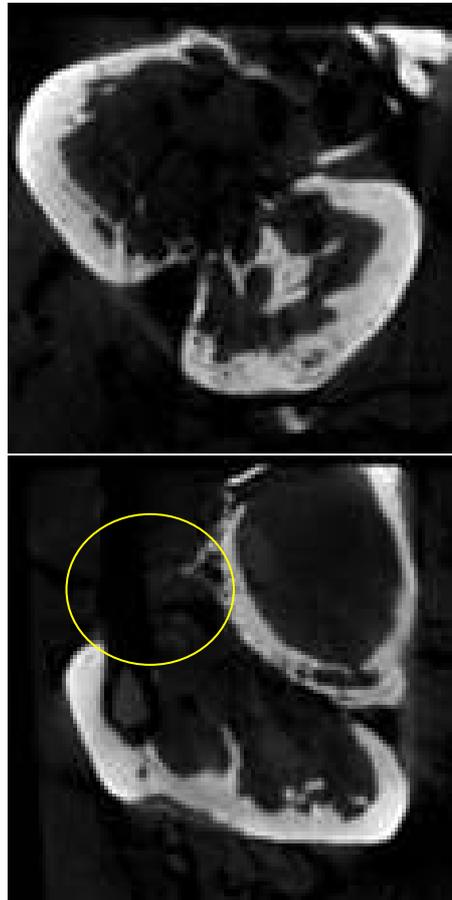


Abbildung 20: Axiale Schnitte durch den Osteotomiespalt.

20 Wochen postoperativ, Leerdefekt. Röntgenologisch war hier ein knöcherner Schluss des Defektes angenommen worden. Auf den dargestellten μ -CT – Bildern zeigt sich, dass zwischen den knöchernen Spangen weiterhin ein nicht überbrückter Spalt verblieb (Ellipse).

4.2.2 Abbau des Scaffolds

Mit dem μ -CT gelang vor allem durch seine hohe Auflösung eine gute Darstellbarkeit der Scaffolds zu allen Versuchszeiträumen.

4 Wochen postoperativ waren die Scaffolds noch deutlich in ihrer

ursprünglichen Struktur zu erkennen, ihre im axialen Schnitt rundliche Form war noch fast vollständig erhalten (Abbildung 21). Schon zu diesem Zeitpunkt konnten vermeintlich sklerosierte Areale im Bereich der Scaffolds gesehen werden.

Während der weiteren Untersuchungszeiträume nach 12 und 16 Wochen stellte sich ein Voranschreiten der Degradation der Scaffolds dar. Sie waren deutlich kleiner als zum ersten Untersuchungszeitpunkt, verloren ihre rundliche Form und erschienen insgesamt inhomogener. Auch nach 20 Wochen gelang der Nachweis eines im Osteotomiespalt verbliebenen Scaffolds aus der Gruppe „*coated and loaded, mit MSCs besiedelt*“ (Abbildung 22).

Bei den beschriebenen Sklerosezonen innerhalb der Scaffolds war anhand des μ -CT keine Unterscheidung zwischen dem Calciumphosphatanteil des Scaffolds und neu gebildeter Knochenmatrix vorzunehmen.

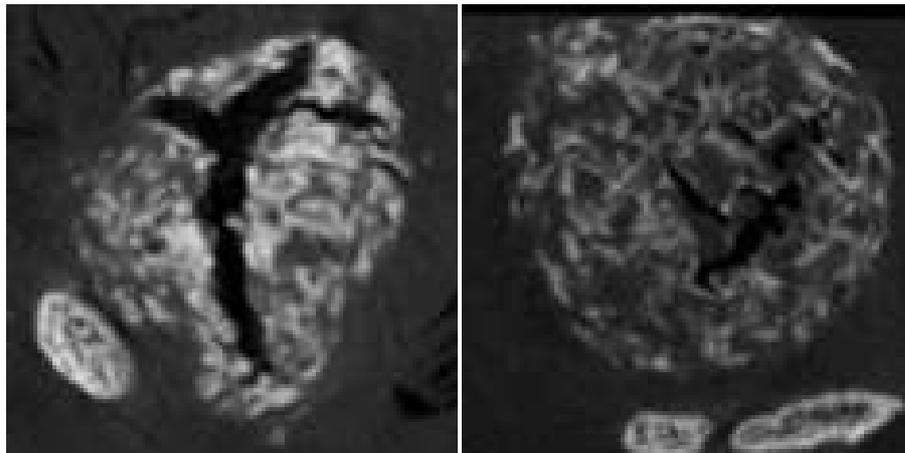


Abbildung 21: Scaffolds im Osteotomiespalt, 4 Wochen postoperativ. Auf diesen axialen Schnitten sind die Scaffolds „*coated and loaded*“ (links) und „*coated*“ in ihrer Struktur noch gut erhalten

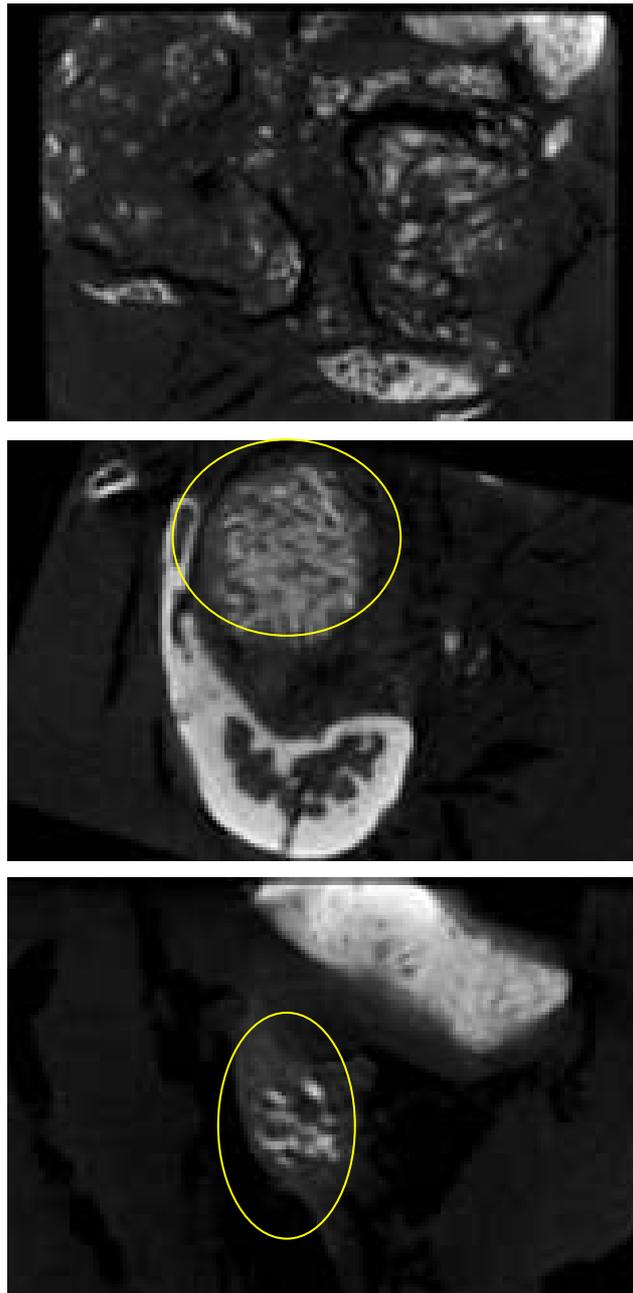


Abbildung 22: μ -CT-morphologische Degradation der Scaffolds im zeitlichen Verlauf.

Das Scaffold „*coated*“ ist 12 Wochen postoperativ auf dieser axialen Aufnahme nur noch in Resten erkennbar (oberes Bild), das Scaffold „*coated and loaded*“ ist 16 Wochen postoperativ noch in seiner rundlichen Struktur erhalten, wenn auch in etwas geschrumpfter Form (Ellipse, mittleres Bild). Selbst 20 Wochen postoperativ lässt sich das Scaffold „*coated*“ noch im Osteotomiespalt nachweisen (Ellipse im unteren Bild).

4.2.3 Vaskularisierung

Durch die Untersuchungen mit dem μ -CT konnte eine Vaskularisierung im Osteotomiespalt erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Jedoch kam es auch nicht zu einer sichtbaren zentralen Nekrose innerhalb des einwachsenden Knochens oder des Scaffolds, was eine stattgefundene Vaskularisierung indirekt bestätigt.

4.2.4 Zusammenfassung

Die μ -CT-Untersuchungen konnten das Einwachsen von Knochen in den Osteotomiespalt sowie die Degradation der Scaffolds hervorragend darstellen. Zudem waren die end- und periostalen Reaktionsmuster gut erkennbar. Ein vollständiger knöcherner Schluss des Defektes wurde nicht erreicht. Zentrale Nekrosen im Scaffold oder Knochen traten nicht auf.

4.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Folgende Fragen sollten durch die histologische Untersuchung beantwortet werden:

- Findet ein sichtbarer Abbau des Scaffolds statt?
- Lässt sich eine zentrale Nekrose im Scaffold oder neu gebildeten Knochen nachweisen?
- Kann eine zentrale Zellbesiedlung der Scaffolds gesehen werden und um welche Knochenzellen handelt es sich dabei?
- In welchem Ausmaß findet eine Knochenneubildung statt und von welchen Bereichen geht sie aus?

Die histologischen Schnitte wurden erst nach der μ -CT-Untersuchung angefertigt. Daher ist das Osteosynthesematerial nicht darauf erfasst und entgeht somit einer histologischen Beurteilung.

4.3.1 Abbau des Scaffolds

Bei allen Versuchstieren, unabhängig von der Versuchsgruppe, war das Scaffold in den histologischen Schnitten vier Wochen postoperativ noch vollständig strukturell erhalten (Abbildung 23). Wesentliche Implantatdegradationen kamen nicht vor.

20 Wochen postoperativ war hingegen ein schon deutlicher Abbau der Struktur der Scaffolds zu erkennen. Histologisch war der Prozess des Calciumphosphatabbaus des Scaffolds am Vorkommen von reichlich Detritus zu sehen (Abbildung 25). Eine vollständige Degradation des PLGA-Gerüsts trat auch in diesem Versuchszeitraum nicht auf.

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen stellten sich in den histologischen Untersuchungen hinsichtlich der Scaffold-Degradation keine Unterschiede dar.

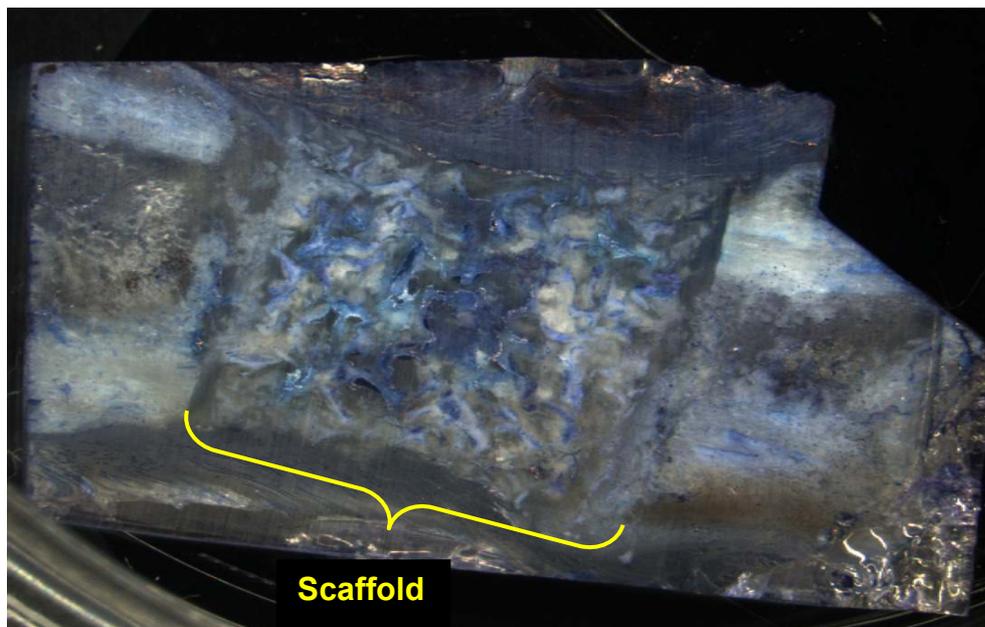


Abbildung 23: Scaffold „coated and loaded“, 4 Wochen postoperativ.

Es zeigt sich eine noch gut erhaltene Struktur des Scaffolds, ein relevanter Implantatabbau fand nicht statt. Lupenvergrößerung, Toluidinblau-Färbung.

4.3.2 Zelluläre Besiedlung

In allen histologischen Untersuchungen der Tiere des 4 - und 20 - wöchigen Versuchszeitraumes konnte eine Zellbesiedlung der Scaffolds gesehen werden.

Sowohl Osteoblasten (Abbildung 24) als auch Osteoklasten (Abbildung 25) zeigten sich gehäuft im Bereich der Scaffolds. Hier ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen: die mit „MSCs“ besiedelten Scaffolds wiesen insgesamt wesentlich höhere Zellzahlen auf. Zudem fanden sich Zellen im Vergleich zur unbesiedelten Versuchsgruppe auch signifikant häufiger in zentralen Bereichen der Scaffolds.

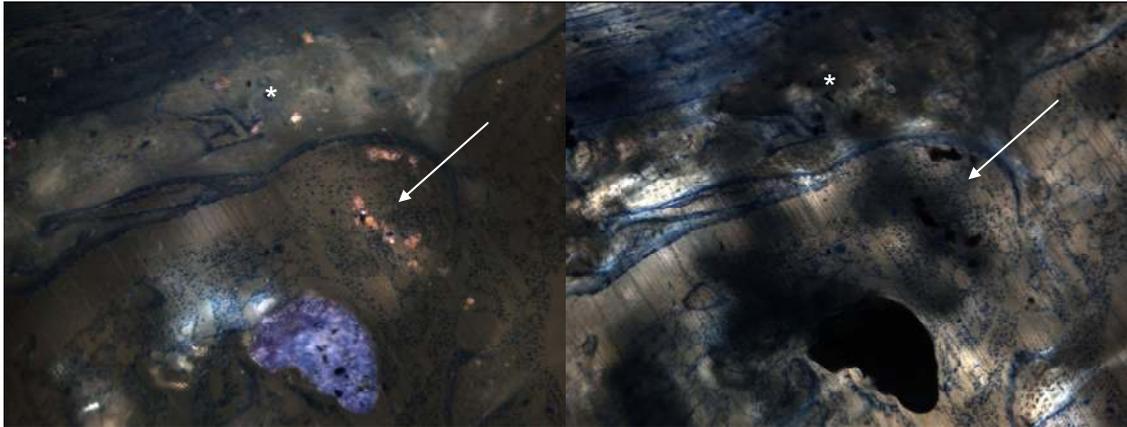


Abbildung 24: Scaffold „coated and loaded, mit MSCs besiedelt“.

4 Wochen postoperativ zeigt sich eine dichte osteoblastäre Besiedlung (Pfeile) sowie eine gut erkennbare Knochenneubildung (*), links Auflicht, rechts Durchlicht, Toluidinblau-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

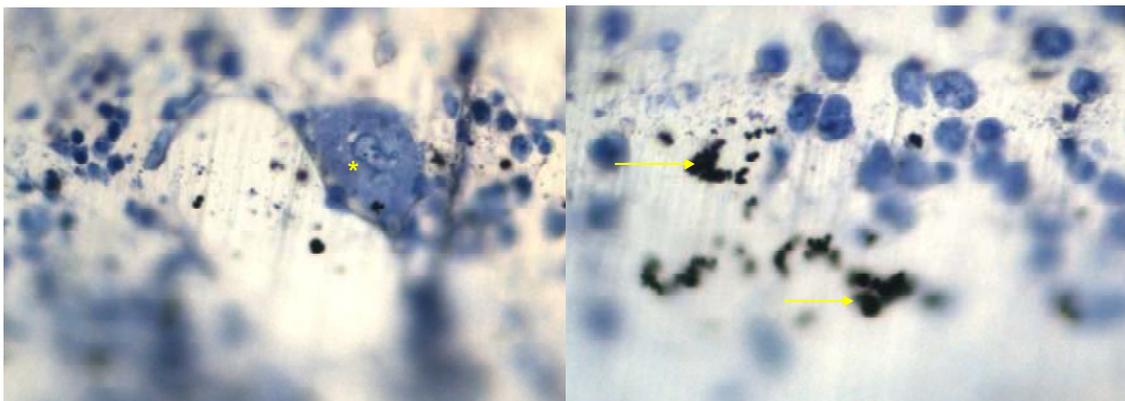


Abbildung 25: Scaffold „coated“ unbesiedelt, 4 Wochen postoperativ.

Ein Osteoklast (*) im linken Bild, Detritus im Bild (Pfeile) rechts, Toluidinblau-Färbung, 500-fache Vergrößerung.



Abbildung 26: Scaffold „coated, mit MSCs besiedelt“.

Zentraler Bereich, 4 Wochen postoperativ. Vermutlich bauen Zellen (Ellipse) das Implantat (Pfeile) zellparallel ab. Links Aufsicht, rechts Durchlicht, Toluidinblau-Färbung, 500-fache Vergrößerung.

4.3.3 Knochenwachstum

In den Versuchsgruppen, welche mit „MSCs“ besiedelten Scaffolds versorgt wurden, konnte schon nach 4 Wochen neues Knochenwachstum gesehen werden. Dies ließ sich am Vorkommen von Knochenmatrix auch in zentralen Bereichen der Scaffolds gut erkennen (Abbildung 24).

Nach 20 Wochen war das bis auf das PLGA - Gerüst abgebaute Scaffold teilweise durch neuen Knochen ersetzt (Abbildung 27). Erkennbare Unterschiede zu den Versuchsgruppen mit unbesiedelten Scaffolds traten vor allem beim Prozess der Zelleinwanderung auf: die Zellmigration ging in den unbesiedelten Versuchsgruppen ausschließlich von der Implantat-Knochen-Grenze aus, wohingegen die Knochenneubildung bei den allogenen besiedelten Versuchsgruppen auch zentral nachzuweisen war. Dadurch kam es bei den unbesiedelten auch absolut zu weniger Knochenneubildung als in den zellbesiedelten Versuchsgruppen. In allen histologischen Schnitten ließ sich von peripher nach zentral einwachsender Knochen nachweisen. Bei dieser Form der Knochenneubildung ergaben sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine erkennbaren Unterschiede. In den Präparaten der unbesiedelten Versuchsgruppe wurden im Vergleich zu den mit allogenen besiedelten Scaffolds versorgten Tieren weniger Abbauprodukte gesehen.



Abbildung 27: Scaffold „coated and loaded, mit MSCs besiedelt“.

20 Wochen postoperativ zeigt sich Knochenwachstum (K) in die PLGA-Waben des Scaffolds hinein. Toluidinblau-Färbung, links Auflicht, rechts Durchlicht, 10-fache Vergrößerung.

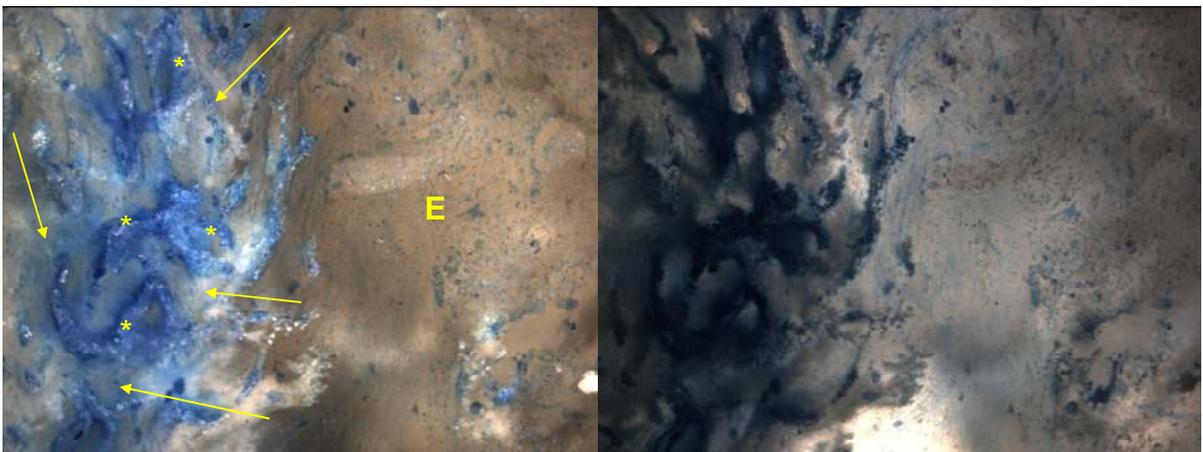


Abbildung 28: Scaffold „coated, unbesiedelt“.

4 Wochen postoperativ wächst vom Endost (E) Knochen (Pfeile) in das Scaffold (*) ein. Toluidinblau-Färbung, links Auflicht, rechts Durchlicht, 10-fache Vergrößerung.

Bezüglich des Vorganges des knöchernen Wachstumsmusters ließ sich ein besonderes Phänomen beobachten. Von periostal fand ein knöchernes Wachstum in den Osteotomiespalt hinein statt. Hierdurch wurden die

Markräume des Femurknochens sowohl proximal als auch distal des Osteotomiespaltes verschlossen, wie die folgende Abbildung veranschaulicht.

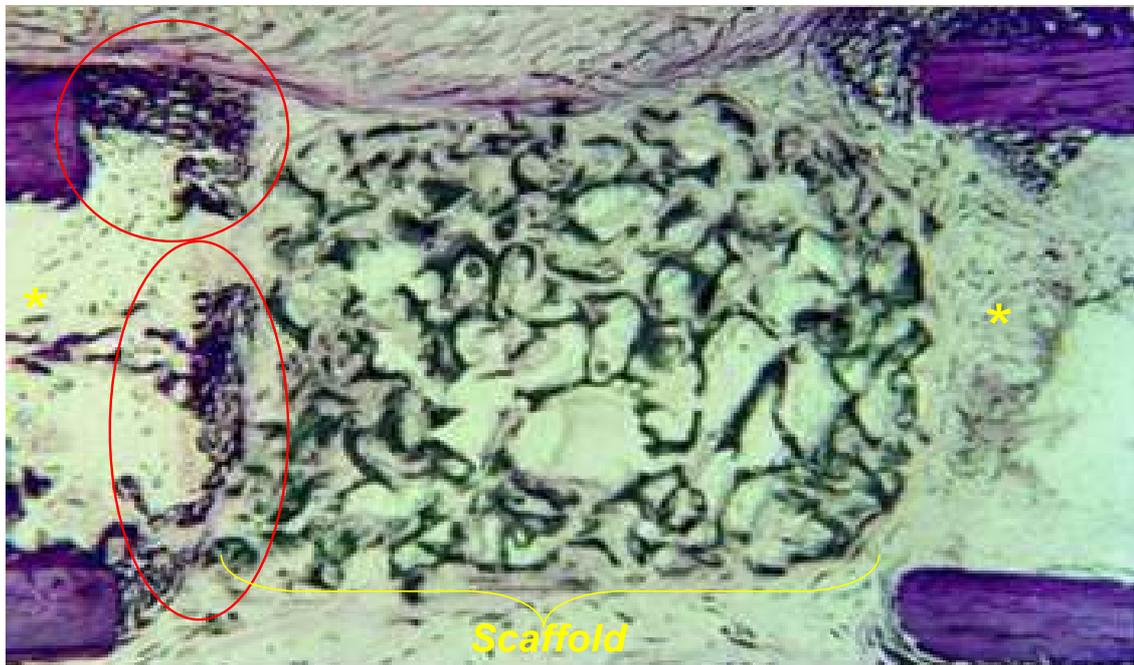


Abbildung 29: Verlegung der Markräume.

Die Markräume (*) werden durch von periostal einwachsendes Knochengewebe (Ellipsen) verschlossen. Hierdurch wird die Verbindung des Markraumes zum Scaffold beinahe vollständig unterbrochen. Toluidinblau-Färbung, 10-fache Vergrößerung.

4.3.4 Vaskularisierung

4 Wochen postoperativ waren in allen Präparaten Zeichen der Vaskularisierung, oftmals angeschnittene Gefäße mit Erythrozyten, zu erkennen (Abbildung 30). Es ergaben sich hierbei keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. In keinem Präparat wurde eine zentrale Nekrose im Scaffold beobachtet.

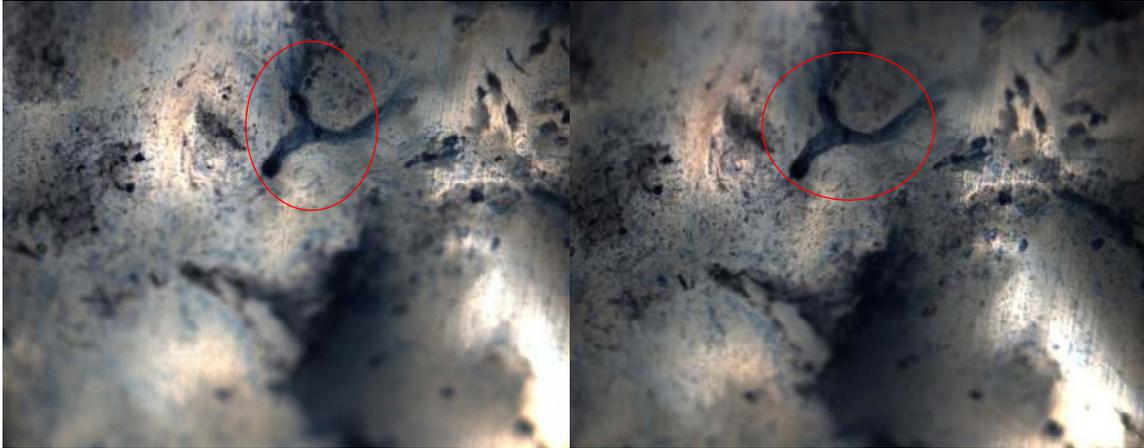


Abbildung 30: Scaffold „coated“, unbesiedelt, 4 Wochen postoperativ. Darstellung eines sich aufzweigenden Gefäßes (Ellipse). Links Auflicht, rechts Durchlicht, Toluidinblau-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

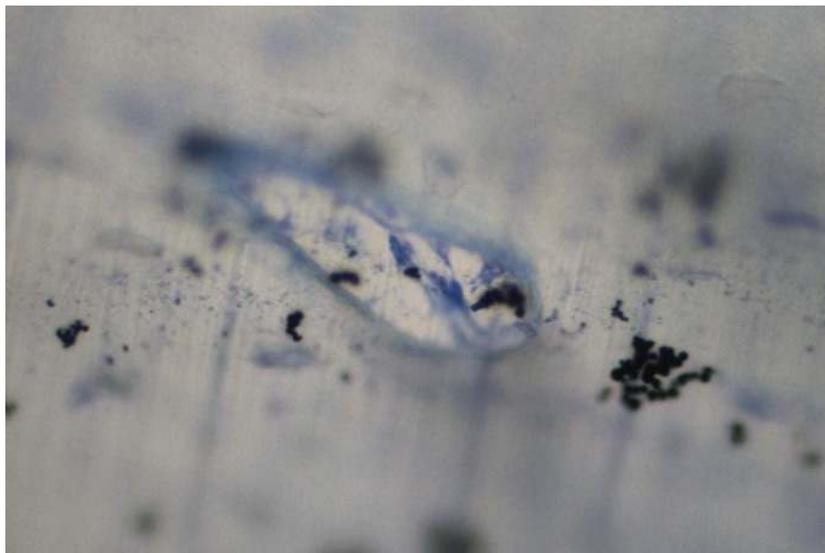


Abbildung 31: Intussuszeptionelle Gefäßbildung. Scaffold „coated“, 4 Wochen postoperativ. Toluidinblau-Färbung, 500-fache Vergrößerung.

4.3.5 Zusammenfassung

Es lassen sich einige wesentliche Erkenntnisse aus den histologischen Untersuchungen gewinnen: in allen Präparaten konnte ein Knochenwachstum in das Scaffold hinein gesehen werden. Dabei ging die Knochenbildung

vornehmlich vom End- und Periost aus. Durch das von periostal ausgehende Knochenwachstum in den Osteotomiespalt hinein kam es zu einer beinahe vollständigen Verlegung der Markräume. Nur in den Versuchsgruppen mit allogenen besiedelten Scaffolds trat eine Knochenneubildung auch in zentralen Bereichen des Implantates auf.

Die Scaffolds waren nach 4 Wochen noch weitgehend in ihrer Struktur erhalten, nach 20 Wochen war ihre Degradation bis auf das PLGA - Grundgerüst vorangeschritten.

Knochenzellen wie Osteoklasten und Osteoblasten wurden in allen Präparaten und zu allen Zeiträumen nachgewiesen, sie waren jedoch zahlreicher in den Versuchsgruppen mit allogenen zellbesiedelten Scaffolds vorhanden.

Als Zeichen der Vaskularisierung fanden sich Anschnitte von Gefäßen, teilweise mit endovaskulär befindlichen Erythrozyten, auch in zentralen Bereichen der Scaffolds. Des Weiteren konnte in keinem Präparat eine zentrale Nekrose, weder im Bereich des Scaffolds, noch im Bereich des neu gebildeten Knochens, nachgewiesen werden.

4.4 Ergebnisse der Raman-Spektroskopie

Insgesamt wurden sechs verschiedene Raman - Spektren zur Oberflächenanalyse folgender Proben angefertigt: ein Spektrum eines Scaffolds „coated“, ein Spektrum eines Scaffold „coated and loaded“, ein Spektrum eines unbehandelten Femurknochens, ein Spektrum eines Scaffolds 4 Wochen postoperativ, ein Scaffold 20 Wochen postoperativ sowie ein weiteres Spektrum des verwendeten Einbettmediums.

4.4.1 Raman-Spektren der Scaffolds vor Implantation

Erwartungsgemäß zeigten sich in den Spektren der verwendeten Scaffolds die größten Signalintensitäten im Bereich um 960 rel. 1/cm. Hier befinden sich die in der Struktur des Scaffolds enthaltenen Phosphatgruppen, insbesondere PO_4^{3-} (Abbildungen 32 und 33). Signalintensitäten, welche das Vorkommen organischer Verbindungen anzeigen, finden sich auf diesen Spektren nicht: diese sind durch die CH_2 - und Amidbindungen vor allem des Kollagen Typ I

bedingt, welches im synthetisch produzierten Scaffold nicht enthalten ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Spektren der verwendeten Scaffolds ergeben sich nicht.

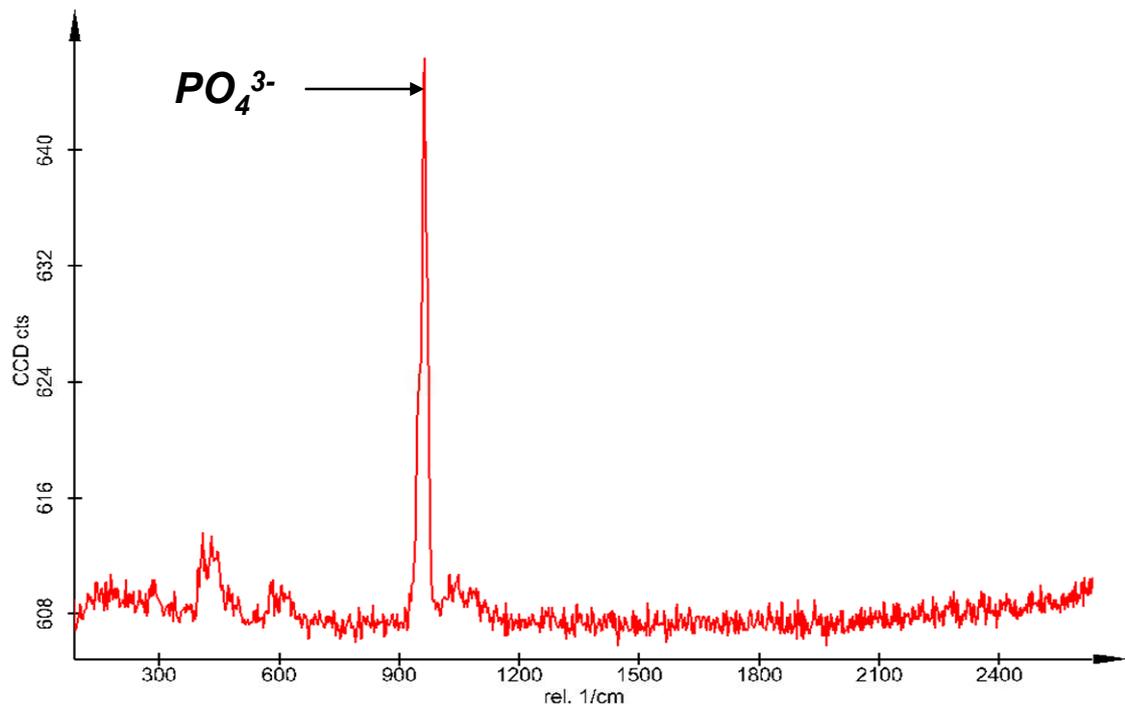


Abbildung 32: Raman-Spektrum Scaffold „coated“ vor Implantation.

Die größte Signalintensität liegt bei 960 rel. 1/cm.

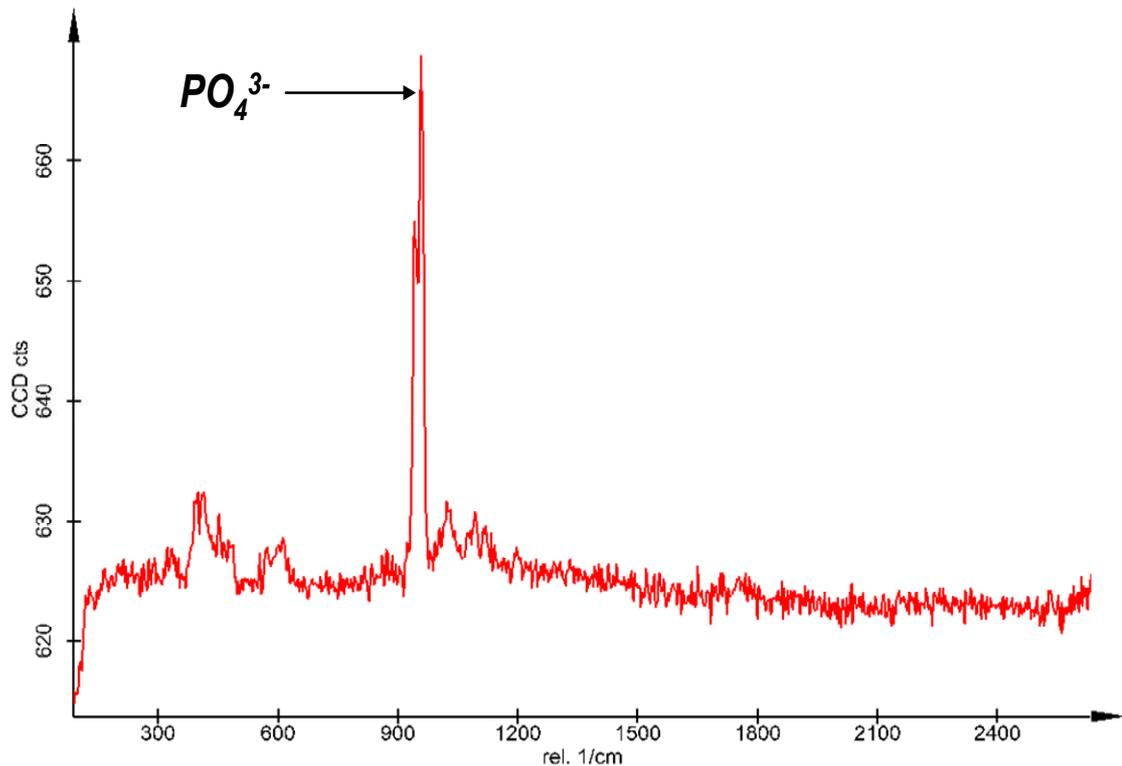


Abbildung 33: Raman–Spektrum Scaffold „coated and loaded“ vor Implantation. Die größte Signalintensität liegt wie beim Spektrum des Scaffold „coated“ bei 960 rel. 1/cm.

4.4.2 Raman–Spektrum eines unbehandelten Femurknochens

Zusätzlich zu der in den Spektren der Scaffolds bestehenden Signalintensität um 960 rel. 1/cm, welche durch das PO_4^{3-} der mineralisierten Knochensubstanz bedingt ist, treten weitere Ausschläge auf (Abbildung 34): deutlich erkennbar sind in dem erhaltenen Spektrum des unbehandelten Femurs Signalintensitäten zwischen 1200 und 1700 rel. 1/cm, welche vor allem durch verschiedene Amidgruppen organischer Knochensubstanz hervorgerufen werden.

Zudem erscheint eine weitere Signalintensität im Bereich 2900 rel. 1/cm. Hierbei handelt es sich um für organische Knochensubstanz charakteristische CH_2 – Gruppen, insbesondere des Kollagen Typ I.

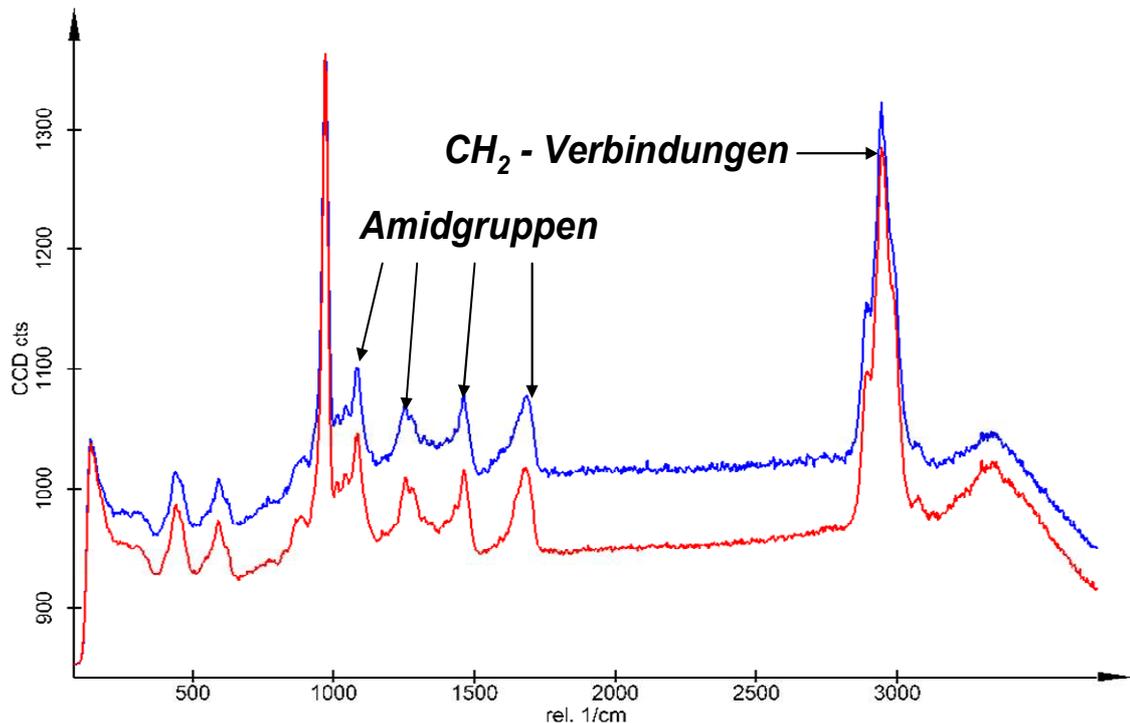


Abbildung 34: Raman-Spektrum Femurknochen unbehandelt.

Neben dem durch die Phosphatgruppen der anorganischen Knochensubstanz bedingten Peak bei 960 rel. 1/cm finden sich weitere Ausschläge zwischen 1200 und 1700 rel. 1/cm. Diese werden durch verschiedene Amidgruppen hervorgerufen. Ein weiterer Peak bei 2900 rel. 1/cm zeigt die CH₂ – Gruppen im Kollagen des Knochens an.

4.4.3 Raman-Spektrum Scaffold 4 Wochen postoperativ

Im Spektrum des Scaffolds nach vierwöchigem Versuchszeitraum treten deutliche Veränderungen sowohl gegenüber den Spektren der Scaffolds vor Implantation als auch gegenüber dem unbehandelten Femurknochen auf (Abbildung 35): der größte Peak befindet sich um 2900 rel. 1/cm, von der Intensität deutlich über der des unbehandelten Knochens liegend (y-Achse), was das Vorkommen von reichlich organischer Knochensubstanz, insbesondere CH₂ – Gruppen, anzeigt. Weiterhin treten die für die Amidgruppen typischen Ausschläge zwischen 1200 und 1700 rel. 1/cm auf.

Der deutlichste Unterschied lässt sich im Bereich um 960 rel. 1/cm erkennen, wo gegenüber den Spektren der Scaffolds vor Implantation als auch gegenüber dem Spektrum des unbehandelten Femurknochens praktisch kein Ausschlag

erkennbar ist. Dies bedeutet, dass sich zum Untersuchungszeitpunkt nur sehr wenig PO_4^{3-} , kennzeichnend für Mineralisation und somit möglicherweise anorganische Knochensubstanz, im untersuchten Bereich befand.

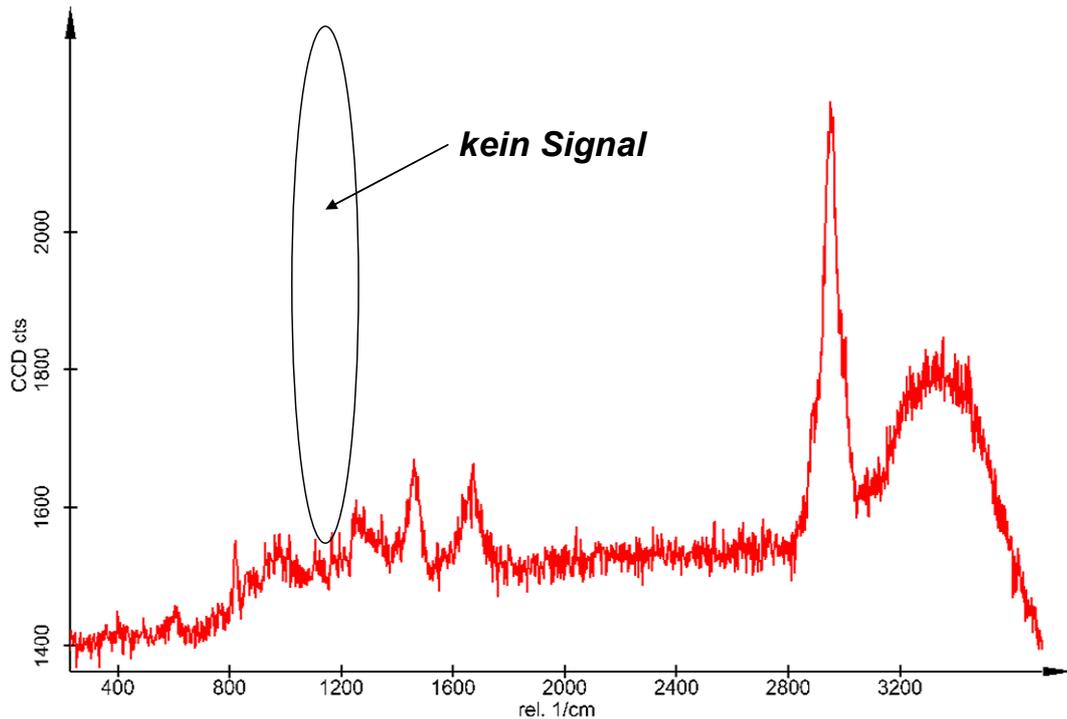


Abbildung 35: Raman-Spektrum Scaffold 4 Wochen postoperativ.

Die für mineralisierte Knochensubstanz, insbesondere PO_4^{3-} , charakteristische Signalintensität um 960 rel. 1/cm ist hier nicht vorhanden.

4.4.4 Raman-Spektrum Scaffold 20 Wochen postoperativ

Das Raman – Spektrum eines Scaffolds 20 Wochen postoperativ zeigt mit dem Spektrum des unbehandelten Femurknochens beinahe identische Signalintensitäten (Abbildung 36). Der die mineralisierte Knochensubstanz charakterisierende Ausschlag um 960 rel. 1/cm im Spektrum ist hier wieder deutlich ausgeprägt.

Gegenüber den Spektren der Scaffolds vor Implantation treten hier auch die die Amidgruppen kennzeichnenden Peaks im Bereich zwischen 1200 und 1700 rel. 1/cm .

1/cm auf. Weiterhin stellt sich ein deutlicher Ausschlag um 2900 rel. 1/cm dar, welcher das Vorkommen von CH_2 – Gruppen im Kollagen der organischen Knochensubstanz anzeigt.

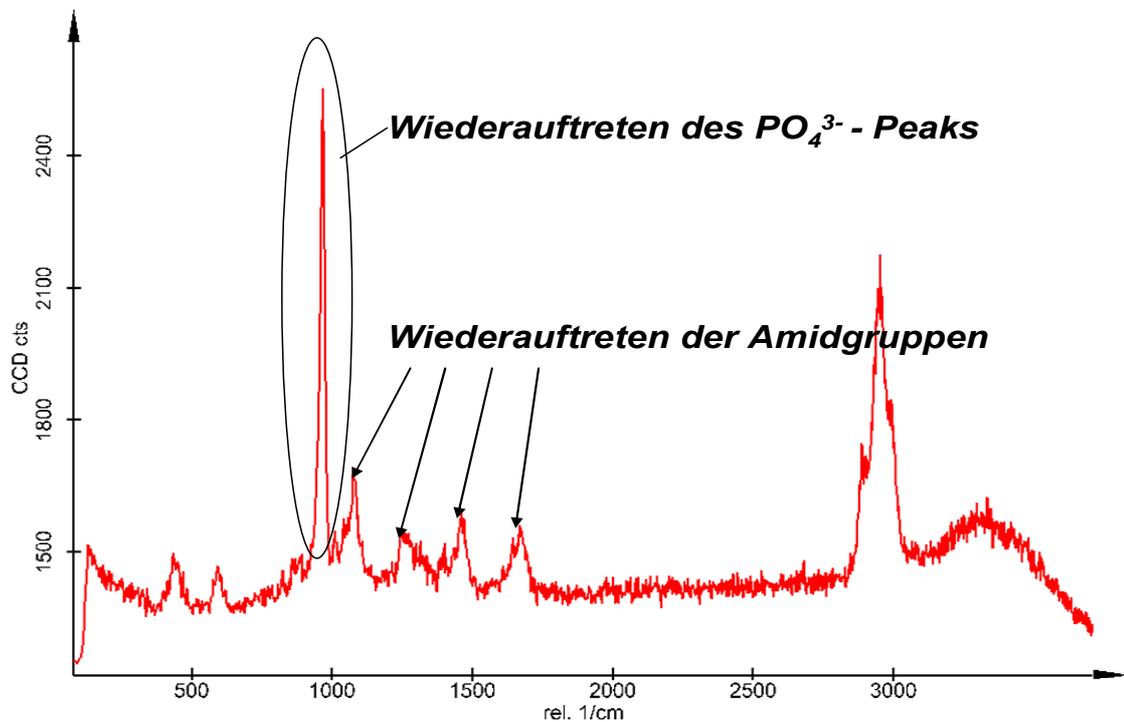


Abbildung 36: Raman-Spektrum Scaffold 20 Wochen postoperativ

Gegenüber dem Spektrum des Scaffold 4 Wochen postoperativ tritt hier der für mineralisierte Knochensubstanz charakteristische Peak um 960 rel. 1/cm wieder auf. Zudem erscheinen die vitales Knochengewebe kennzeichnenden Amidgruppen.

4.4.5 Raman-Spektrum des Einbettmediums

Diese Untersuchung wurde zum Ausschluss von durch das Einbettmedium entstehenden Artefakten auf den anderen Spektren durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass sich die das Einbettmedium kennzeichnenden Signalintensitäten auf den anderen Spektren nicht wieder finden (Abbildung 37). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des Einbettmediums auf die erhaltenen Spektren nach erfolgter Entplastung als minimal zu erachten ist und daher vernachlässigt werden kann.

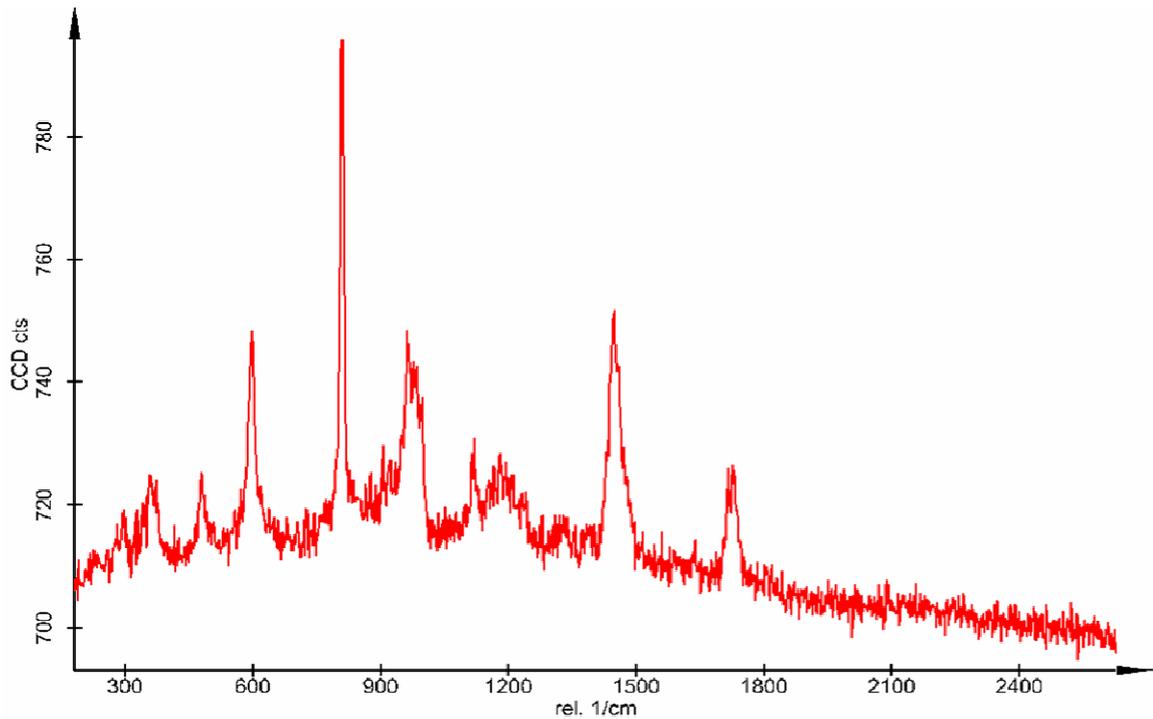


Abbildung 37: Raman-Spektrum des Einbettmediums.

Die hier erkennbaren Signalintensitäten treten auf den anderen Spektren nicht auf.

4.4.6 Zusammenfassung

Anhand der durchgeführten Raman – spektroskopischen Untersuchungen der Scaffolds 4 und 20 Wochen postoperativ ließen sich wertvolle, die radiologische Diagnostik ergänzende Informationen über die sich im Osteotomiespalt befindenden Strukturen und über die Degradations- bzw. Rekristallisationsdynamik der Scaffolds im Verlauf des Versuchszeitraumes gewinnen. Als Vergleichsspektren dienten hierzu zum einen die beiden verwendeten Scaffolds vor Implantation, zum anderen das Spektrum eines unbehandelten Femurknochens.

Die Degradation der Calciumphosphatphase stellte sich auf dem Spektrum des Scaffolds 4 Wochen postoperativ vor allem durch den Verlust der für mineralisierte Knochensubstanz charakteristischen Signalintensität von 960 rel. 1/cm dar.

Dieselbe Signalintensität trat beim Scaffold 20 Wochen postoperativ wieder auf. Zudem konnten hier auch die für den vitalen Knochen typischen, die

Amidgruppen kennzeichnenden Ausschläge zwischen 1200 und 1700 rel. 1/cm wieder beobachtet werden.

Ein weiterer Peak wurde im gleichen Spektrum um 2900 rel. 1/cm gemessen, wo sich die CH₂ – Gruppen der organischen Knochensubstanz, insbesondere des Kollagen Typ I, befinden.

5 Diskussion

5.1 Betrachtung der angewandten diagnostischen Verfahren

5.1.1 Raman-Spektroskopie

Die Raman – Spektroskopie wurde erstmalig zur Biokompatibilitätsuntersuchung von neuartigen PLGA/CaP – Scaffolds im kritischen Knochendefekt von „*ChinCilla–Bastarden*“ angewandt. Diese sollte vor allem eine qualitative Aussage über die sich im Osteotomiespalt befindenden Strukturen (Scaffold, organisches und mineralisiertes Knochengewebe) sowie Degradations- und Rekristallisationstendenzen der Scaffolds und ihre Dynamik im Versuchszeitraum erbringen.

Folgend werden die erhaltenen Spektren interpretiert und der Stellenwert der Raman – Spektroskopie als diagnostisches Verfahren bei der gegebenen Fragestellung bewertet.

5.1.1.1 Interpretation der erhaltenen Raman-Spektren

Aufschlussreich stellt sich insbesondere der Vergleich zwischen den Spektren „Scaffold 4 Wochen postoperativ“ und „Scaffold 20 Wochen postoperativ“ dar. Beim Raman – Spektrum des „Scaffolds 4 Wochen postoperativ“ wurde der Verlust der für mineralisierte Knochensubstanz, speziell Calciumphosphat, charakteristischen Signalintensität um 960 rel. 1/cm beobachtet (Abbildung 35). Dieses ist auch in der Calciumphosphatphase des Scaffolds enthalten. Am ehesten lässt sich dieses Phänomen mit einer zu diesem Zeitpunkt bereits weit fortgeschrittenen Degradation der Calciumphosphatphase des Scaffolds sowie aktiven „*Remodeling*“ - Vorgängen im Osteotomiespalt erklären. Der Calciumphosphatanteil des Scaffolds hat sich entweder bereits aufgelöst oder wurde durch Osteoklasten abgebaut. Diese lösen Calcium aus der Matrix, welche dann durch Kollagenasen weiter degradiert wird. Die im μ - CT zu diesem Zeitpunkt noch gut erkennbare Struktur des Scaffolds (Abbildung 22) bleibt demnach alleine durch das Bestehen des PLGA – Gerüstes erhalten. Die Calciumphosphatphase trägt nichts mehr zur Strukturhaltung bei. Dieses ist als ein wesentlicher Erkenntnisgewinn aus der Untersuchung durch die Raman-

Spektroskopie anzusehen.

Im Spektrum des „Scaffolds 20 Wochen postoperativ“ konnte wieder ein deutlicher Ausschlag im Bereich 960 rel. 1/cm gemessen werden (Abbildung 36). Hierdurch wird wiederum das Vorkommen von mineralisierter Knochensubstanz im untersuchten Bereich angezeigt.

Die den vitalen Knochen kennzeichnenden Peaks der Amidgruppen und CH_2 – Verbindungen des Kollagen Typ I in der organischen Substanz waren hier wieder zu sehen. Somit fand nach anfänglicher Degradation der Calciumphosphatphase des Scaffolds eine nachweisbare Knochenneubildung statt. Dies wird auch durch die Messung der übrigen Signalintensitäten, welche das Knochengewebe mitsamt seiner organischen Substanz charakterisieren (Abbildung 1 und 2), untermauert.

Damit ließ sich anhand des Raman - Spektrums des „Scaffolds 20 Wochen postoperativ“ und seinem Vergleich mit den Spektren der Scaffolds vor Implantation (Abbildung 32 und 33) sowie mit dem Spektrum des „Scaffolds 4 Wochen postoperativ“ zeigen, dass es sich bei der im Osteotomiespalt befindenden Struktur um echte, neu entstandene Knochensubstanz und nicht um Reste des eingebrachten Scaffolds handelt. Es konnte eine qualitative Beurteilung der Körper im Osteotomiespalt vorgenommen werden, welche durch eine alleinige bildgebende Diagnostik nicht möglich gewesen wäre.

Von den Knochenpräparaten wurden, um sie für die histologischen Schnitte vorzubereiten, zunächst Kunststoff - Blöcke angefertigt. Diese wurden anschließend mit dem Exakt-Trenn-Dünnschliff-System weiterverarbeitet. Vor der Spektroskopie war die oben beschriebene Entplastung notwendig. Diese gilt es natürlich als methodischen Störfaktor bei der Interpretation der Spektren zu berücksichtigen, wenngleich bei Betrachtung der gewonnenen Raman - Spektren ein Einfluss des Einbettmaterials als nicht wahrscheinlich erscheint, da die für das Einbettmedium charakteristischen Signalintensitäten (Abbildung 37) in keinem der weiteren untersuchten Spektren beobachtet wurden.

5.1.1.2 Beurteilung der Raman-Spektroskopie

Auch wenn durch bildgebende diagnostische Verfahren sowie eine histologische Auswertung bereits viele relevante Parameter, welche beim

Heilungsprozess des kritischen Knochendefektes von Interesse sind, abgebildet werden, sind sie insgesamt doch in einer wichtigen Dimension begrenzt. Durch ihre Anwendung kann nämlich keine Aussage über die molekulare beziehungsweise chemische Zusammensetzung von Strukturen getroffen werden. Somit kann bei sich in der Bildgebung ähnelnden Strukturen oder Materialien keine weitere Differenzierung erfolgen: Der Röntgen- und der μ -CT-Untersuchung ist die Verwendung von Röntgenstrahlung gemeinsam. Auf den angefertigten Aufnahmen wird im Wesentlichen die Abschwächung von Röntgenstrahlung durch anorganische Knochensubstanz, insbesondere Calcium, abgebildet. Dies trifft sowohl auf die Projektionsradiographie als auch auf computertomographische Untersuchungsverfahren zu.

Calcium kommt jedoch bekanntermaßen sowohl in neu gebildeter wie alter Knochensubstanz sowie als Calciumphosphat (CaP) als Bestandteil der verwendeten Scaffolds vor.

Mit den röntgenologischen Untersuchungsverfahren ist es also unter Umständen möglich, eine quantitative Aussage zu treffen: so kann beispielsweise je nach Auflösung beurteilt werden, ob ein Defekt vollständig überbrückt, das heißt eine knöcherne Kontinuität hergestellt ist oder nicht.

Jedoch kann keine hinreichende Aussage über die Qualität der im Defektbereich befindlichen Strukturen getroffen werden. Es lässt sich nicht differenzieren, ob sich neu gebildeter oder alter Knochen im ehemaligen Osteotomiespalt befindet. Oder ob es sich bei dem, was röntgenologisch als Knochensubstanz gedeutet wird, möglicherweise um Calcium als Bestandteil der Calciumphosphatphase des implantierten Scaffolds handelt, welches fälschlicherweise als Knochenneubildung interpretiert werden könnte.

Des Weiteren kann durch die Anwendung röntgenologischer Diagnostik keinerlei Aussage über die organischen Bestandteile des Knochengewebes getroffen werden. Deshalb wurden einige Proben mit der Raman - Spektroskopie untersucht, um zu prüfen, ob hierdurch neue Erkenntnisse, insbesondere über den chemischen Ablauf der Scaffold – Degradation im zeitlichen Verlauf, gewonnen werden können. Anhand der Spektren lässt sich ableiten, dass die Raman - Spektroskopie qualitativ sehr sensibel zwischen den verschiedenen Bestandteilen der untersuchten Proben zu unterscheiden

vermag. Somit konnte die erhoffte qualitative Aussagekraft dieser Methode in diesem Versuch bestätigt werden.

Natürlich müsste bei folgenden Versuchen eine sehr viel größere Anzahl an Proben untersucht werden, um besser beurteilen zu können, wie reproduzierbar und zuverlässig die jeweiligen Signalintensitäten in den erhaltenen Spektren wirklich sind.

Die Raman - Spektroskopie ist als diagnostisches Verfahren zur qualitativen Beurteilung der sich im Defektpalt befindenden Strukturen unbedingt als sinnvolle Ergänzung zu erachten. Dies wird nicht zuletzt durch ihre immer häufiger werdende Verwendung, insbesondere im Bereich der Analyse biologischer Materialien untermauert [24, 66].

5.1.2 Vor- und Nachteile der bildgebenden diagnostischen Verfahren

5.1.2.1 Nativröntgen-Untersuchungen

Analog zu anderen Arbeitsgruppen [32] erfolgte in unserem Versuch eine Verlaufs- und Erfolgskontrolle der knöchernen Heilung des Osteotomiespalt in Form von regelmäßigen Röntgenuntersuchungen in zwei Ebenen.

Es gilt zu berücksichtigen, dass eine Röntgenuntersuchung lediglich eine zweidimensionale Darstellung eines dreidimensionalen Heilungsprozesses darstellt. Dies kann selbstverständlich zur Annahme falsch positiver Ergebnisse führen. So wurde beispielsweise ein Osteotomiespalt mit darin platziertem Scaffold in beiden Ebenen der Projektionsradiographie fälschlicherweise als vollständig durchbaut angesehen, obwohl CT – morphologisch noch ein deutlicher zentraler Defekt bestand (siehe Abbildungen 17 und 20). Dieser war jedoch in der röntgenologischen Untersuchung in zwei Ebenen nicht erkennbar. Hieraus folgt, dass die Ergebnisse bisheriger Studien zum kritischen Knochendefekt, in welchen zur Erfolgskontrolle Röntgenuntersuchungen herangezogen wurden und daraus Scores abgeleitet wurden [32], äußerst kritisch zu bewerten sind. Der Nutzen regelmäßiger, postoperativer röntgenologischer Kontrollen scheint daher auf die Diagnostik von Osteosyntheseversagen oder Frakturen beschränkt.

5.1.2.2 μ - CT – Untersuchungen

Die μ - CT -Untersuchung von Knochenpräparaten ist in der Literatur im Tierversuch wie auch zur Erfolgskontrolle beim kritischen Knochendefekt sehr gut etabliert [13, 38, 39, 46, 84]. Daher lassen sich die gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können sehr hohe Bildauflösungen erzielt werden, so dass auch Details, wie die Integration eines Scaffolds in seine Umgebung durch regenerative Heilungsprozesse in seiner porösen Struktur, sichtbar gemacht werden können. Der zu untersuchende Bereich lässt sich in seiner Dreidimensionalität erfassen und beurteilen. Hierin besteht gegenüber der histologischen Untersuchung der wesentliche Vorteil als diagnostisches Verfahren post mortem und gegenüber der Projektionsradiographie *in vivo*.

Das Volumen, die Dicke, das Wachstum, der Abbau und die Dichte von Knochen lassen sich sehr sensitiv in der μ - CT darstellen [16, 94]. Daher ist die μ - CT als Goldstandard zur Quantifizierung von Volumen und Morphologie des Knochengewebes sowie zur Beurteilung der Biokompatibilität poröser Biomaterialien anzusehen.

Mit seit einiger Zeit durchführbaren μ - CT –Untersuchungen *in vivo* [56] könnte sich das Anwendungsspektrum zukünftig noch erweitern. Durch zusätzliche Gabe von geeigneten Kontrastmitteln könnten selbst Blutgefäße oder Knorpelgewebe sichtbar gemacht werden [38]. Zudem wären die dreidimensionalen Prozesse hierdurch auch in ihrer zeitlichen Dynamik zu erfassen.

5.1.3 Wertigkeit der histologischen Untersuchung

Die Histologie bleibt weiterhin unverzichtbarer Bestandteil der Diagnostik bei der Untersuchung des kritischen Knochendefektes. Einzig durch die histologische Untersuchung ist die Beurteilung zellulärer Strukturen möglich: Entzündungszellen wie Leukozyten, Makrophagen oder Lymphozyten deuten auf eine Infektion oder Abstoßungsreaktion hin. Osteoblasten und Osteoklasten kennzeichnen einen aktiven Knochenstoffwechsel, Chondrozyten können als

Vorstufe einer enchondralen Ossifikation betrachtet werden. So lassen sich aus dem Vorkommen spezifischer Zellen im histologischen Schnitt Rückschlüsse auf die biologische Aktivität im Bereich des implantierten Scaffolds sowie auf die Reaktion des Organismus gegenüber dem implantierten Fremdmaterial ziehen. Weiterhin kann durch Anschnitte von Gefäßen oder das Vorkommen von Erythrozyten im Defektbereich eine Aussage über die Vaskularisierung desselben getroffen werden.

Nachteil der histologischen Untersuchung ist neben der sehr zeitaufwändigen Proben – Aufarbeitung ihre Zweidimensionalität. Deshalb müssen, um eine adäquate Aussage treffen zu können, von einem Knochenblock jeweils sehr viele Schnitte angefertigt werden, um einen dreidimensionalen Eindruck zu erhalten. Ergänzend sollten deshalb dreidimensionale bildgebende Verfahren, wie in diesem Versuch die μ -CT, zur Anwendung kommen.

Selbstverständlich könnte auch die histologische Untersuchung in ihrer Aussagekraft durch ergänzende histologische Untersuchungsverfahren, wie die Anwendung von immunhistochemischen Methoden zur Darstellung spezifischer Strukturen, entsprechend erweitert werden.

Insgesamt ist die Histologie weiterhin als Goldstandard zur Evaluation der insbesondere zellulären Reaktion des Empfängergewebes auf ein Scaffold anzusehen.

5.2 Auswahl des Versuchstieres „ChinChilla - Bastard“

In diesem Versuch wurde die Biokompatibilität von neuartigen PLGA/CaP-Scaffolds am Femurknochen von „*ChinChilla-Bastarden*“ untersucht. Kaninchen wurden bereits häufig für ähnliche Fragestellungen als Versuchstier verwendet [17, 32, 44].

Allerdings handelte es sich dabei um „*New-Zealand-White*“-Kaninchen. In weiteren Untersuchungen zum kritischen Knochendefekt wurden zudem häufig Ratten verwendet.

Eine Vielzahl an grundlegenden Anforderungen sollte bei der Auswahl eines geeigneten Versuchstieres berücksichtigt werden [34, 40, 77]. Diese beinhalten:

1. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Spezies und insbesondere auf den Menschen
2. Zu erwartende experimentelle/operative Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit des Versuches
3. Für das Versuchstier verfügbare Daten bezüglich der skelettalen Anatomie, der Knochenphysiologie, der biomechanischen Eigenschaften des Knochens sowie der ossären Wundheilung
4. Kosten und Verfügbarkeit des Tiermodells
5. Adaptierbarkeit der Versuchstiere auf experimentelle und laboratorische Manipulationen und Gegebenheiten
6. Ethische Überlegungen

Prinzipiell lassen sich Modelle zur Testung von Scaffolds im „*Bone Tissue Engineering*“ in verschiedene Stufen einteilen:

1. Modelle *in vitro* (mit osteogenen Zellen verschiedener Spezies): Sie sind gekennzeichnet durch Manipulationen an Genen, Molekülen, Zellen und Geweben und werden als grundlegendste Ebene angesehen. Diese ermöglichen die Beobachtung elementarer biologischer Abläufe im Knochengewebe (Gen-Zell-, Faktor-Zell-, Zell-Zell-Interaktionen, Knochenstoffwechsel) und dienen des Weiteren als Hilfe zur Entwicklung geeigneter Verfahren zum „*Bone Tissue Engineering*“ [50, 92].
2. Modelle *in vivo*: Versuchsreihen mit Tieren, die mit dem Menschen phylogenetisch verwandt sind (ähnliche Anatomie und vergleichbare Knochenwundheilung). Diese Studien beinhalten in der Regel Manipulationen an skelettalen Strukturen, abgeleitet von klinischen Fragestellungen beim Menschen (Eingriffe an Röhrenknochen, Wirbelkörpern, onkologische Resektionen und andere). Dabei ergeben sich bereits größere Probleme bei der Auswahl geeigneter Versuchstiere. Denn viele Versuchstiere unterscheiden sich in ihrer knöchernen Mikroarchitektur und Biomechanik, Knochenanatomie und Heilung kritischer Knochendefekte sehr von anderen, dem Menschen phylogenetisch enger verwandten Tieren, wie zum Beispiel Primaten [5, 61, 89].

Es gibt verschiedene Variablen, welche die Wundheilung bei kritischen Knochendefekten beeinflussen können, und welche es deshalb auch bei der Auswahl des geeigneten Versuchstieres zu berücksichtigen gilt.

Diese beinhalten die für die jeweilige Spezies spezifische Knochenheilung, das Skeletalter des Individuums sowie den anatomischen Ort des kritischen Knochendefektes [33]. Es ist beschrieben, dass die Fähigkeit zur spontanen Knochenheilung abnimmt, je höher eine Spezies entwickelt ist [33, 40].

Zudem gibt es signifikante altersbezogene Unterschiede bei der Heilung von kritischen Knochendefekten: knöcherne Defekte in jungen, skelettal noch nicht ausgereiften Tieren heilen schneller als in erwachsenen Individuen. Werden also Knochenersatzmaterialien in noch unreifen Tieren getestet, könnten folglich zu hohe Erwartungen an die Biokompatibilität eines Materials gestellt werden.

Auch der anatomische Ort eines kritischen Knochendefektes kann die Heilungsrate beeinflussen. So sind die kraniofazialen Knochen reicher vaskularisiert und innerviert als die langen Röhrenknochen oder die Wirbelsäule. Demnach ist es von großer Bedeutung, sowohl das Alter als auch den anatomischen Ort des Defektes bei der Auswahl eines geeigneten Versuchstieres zu berücksichtigen. Der überwiegende Teil aller Studien zum kritischen Knochendefekt wurde bisher an Mandibula- und Femurknochen durchgeführt. Diese anatomischen Regionen sind für chirurgische Manipulationen leicht zugänglich und biomechanisch hohen Belastungen ausgesetzt.

Die Rasse „*ChinChilla-Bastard*“ besitzt gegenüber der üblicherweise verwendeten Rasse „*New Zealand White*“ den Vorteil, weniger stressanfällig zu sein. Daher weisen „*New Zealand White*“ - Kaninchen auch ein höheres Narkoserisiko auf. Unterschiede ergeben sich weiterhin bei der Anordnung der Knochenlamellen im ausgewachsenen Knochen beider Tiere. Diese sind bei „*ChinChilla-Bastarden*“ gegenüber „*New Zealand White*“ - Kaninchen auffallend unregelmäßiger angeordnet und sollen deshalb eine größere Knochenhärte aufweisen [25]. Die Knochenheilung läuft jedoch bei beiden Rassen sehr ähnlich ab, so dass Beobachtungen und Ergebnisse von Untersuchungen zum kritischen Knochendefekt durchaus aufeinander übertragbar sind.

„*ChinChilla–Bastarde*“ sind daher sehr gut zur Biokompatibilitätsuntersuchung von Scaffolds in einem CSD („*critical sized defect*“) geeignet.

5.3 Auswahl des Osteosyntheseverfahrens

In einer Biokompatibilitätsuntersuchung am kritischen Knochendefekt im Tiermodell ist eine adäquate Osteosynthese mit ausschlaggebend für das Ergebnis des Versuchs. Die Scaffolds, welche in diesem Versuch angewendet wurden, besitzen nur eine schwache mechanische Stabilität. Daher muss beinahe die komplette Kraft durch das Osteosynthese - Material über den Defektbereich übertragen werden („*weight bearing*“). Es ist jedoch nicht geklärt, ob eine solche mechanische Entlastung des Scaffolds durch das Osteosynthesematerial sein Einwachsen eher fördert oder hindert [6].

Bei Betrachtung der aktuellen Literatur zu ähnlichen Fragestellungen im Kaninchenmodell kam es wie in unserem Versuch zu Schwierigkeiten mit der Osteosynthese. Die Arbeitsgruppe um Holy [42] berichten über anfänglich große Probleme mit der in ihrem Versuch angewandten Osteosynthese. Hier wurde eine Acht – Loch -Platte verwendet, wobei die mittleren beiden Löcher frei von Schrauben blieben. Es kam insbesondere zu Osteosyntheseversagen im Sinne von Plattenverbiegungen. Folgend wurde von der Gruppe eine stärkere, 2.7 mm dicke 7 – Loch - Mandibulaplatte benutzt [32], wobei nur das mittlere Loch ohne Schraube blieb. Dieses besser funktionierende Modell diente als Vorlage für unseren Versuch.

Jedoch kam es während der Vorversuchsreihe zu einer bei etwas über 70% liegenden Ausfallquote durch Schraubenausrisse, vor allem aus dem distal des Osteotomiespaltes liegenden Bereich (siehe Kapitel 3.1.). Diese Beobachtung lässt sich vor allem aus der distal des Defektes sehr hohen mechanischen Belastung der Schrauben erklären [34]. Nicht winkelstabile Systeme kommen klinisch zum Einsatz, um eine Frakturheilung vor Rotationsbewegungen zu schützen. Die Kraftübertragung erfolgt hierbei jedoch nicht durch das Osteosynthesematerial alleine, sondern in Zusammenspiel mit dem Knochen. Aufgrund der mechanisch nicht ausreichenden Stabilität der Scaffolds und der Weichheit der Knochen der zunächst verwendeten „*New Zealand White*“ - Kaninchen, in deren Konsequenz das Osteosynthesematerial die gesamte

Kraftübertragung leisten muss, erwies sich dieses System als für den Versuch nicht geeignet. Folglich wurde ein winkelstabiles Osteosynthese – System, bestehend aus einer 7 - Loch - Platte und zugehörigen, bikortikalen Verblockungsschrauben, benutzt.

Durch die in der Platte verblockten Schrauben entsteht so ein eingliedriges Osteosynthese – System, wodurch an der Schrauben - Knochen - Grenzfläche anstelle einer Scher- eine Kompressionsbelastung entsteht. Gegenüber diesen ist der Knochen weniger anfällig, wodurch es insgesamt zu weniger Schrauben- und Plattenausrissen kam. Zudem bieten die bikortikalen Schrauben einen Schutz vor hohen Rotationskräften [51].

Trotz Anpassung des Osteosynthese – Systems kam es in der Hauptversuchsreihe weiterhin zu, wenn auch deutlich weniger, Schrauben- und Plattenausrissen, so dass einige Tiere nicht in die Versuchsauswertung eingehen konnten. In den Untersuchungen mit dem μ - CT konnten die dafür ursächlichen Risse im Knochen beobachtet werden. Diese nahmen in den meisten Fällen ihren Ausgang von den Schraubenlöchern und zogen zum Osteotomiespalt oder teilweise auch durch die gesamte Länge des Femurknochens. Wir vermuten, dass diese Risse weniger durch die postoperative Belastung der Tiere als vielmehr durch das intraoperative Einbringen der selbst schneidenden Schrauben entstanden. Vermutlich war der Bohrkanaal hierbei im Verhältnis zum Durchmesser der Schrauben zu eng. Die Schrauben des winkelstabilen Systems hatten nämlich gegenüber den im Vorversuch verwendeten Schrauben einen größeren Durchmesser, wohingegen weiterhin der gleiche Bohrer benutzt wurde. Im Verhältnis zum Osteosynthesematerial könnte der Femurknochen der Tiere zusätzlich zu dünn gewesen sein, wodurch sich die beim Eindrehen auftretende Spannung in Form dieser Risse im Knochen ausbreitete.

Während des zeitlichen Verlaufes konnten vor allem im μ - CT deutliche Knochenanbauprozesse um die Schraubenkanäle, auch im Bereich der Ein- und Austrittsstellen, vor allem im Sinne einer endostalen Reaktion gesehen werden (Abbildung 19). Dies lässt sich durch die dort stark wirkenden Kompressionskräfte auf den Knochen erklären, was einen mechanischen Stimulus zur Osteogenese beziehungsweise zum „*Remodeling*“ darstellt.

Den Einfluss der mechanischen Belastung auf die Knochenheilung und -struktur durch die Auswahl des Osteosynthese – Verfahrens und die Dauer seiner Anwendung im kritischen Knochendefekt wurde unter anderem durch die Arbeitsgruppe um Concannon [17] dargestellt. Diese untersuchten die Heilung eines kritischen Knochendefektes am Kaninchenfemur unter Verwendung von Knochen – Puder, welches sie in den Defekt einbrachten. Hier wurde zusätzlich zur osteosynthetischen Stabilisierung durch eine 5 - Loch - Mandibulaplatte eine umschließende Drahtkonstruktion zur Steigerung der Stabilität verwendet. Sie beließen das Osteosynthesematerial für eine unterschiedliche Dauer, 2 und 12 Monate, *in situ*. Sie fanden, dass der Knochen bei der Gruppe, bei welcher das Osteosynthesematerial für 12 Monate belassen wurde, insgesamt dünner und weniger belastbar war, was sich unter anderem in häufigeren Frakturen während der operativen Materialentfernung zeigte. In der Vergleichsgruppe traten die Frakturen bei Materialentfernung viel seltener auf und der Knochen war insgesamt dicker und belastbarer. Durch das vollständig vom Osteosynthesematerial übernommene, über diesen langen Zeitraum aufrechterhaltene „*weight bearing*“ entstand in der Folge eine verminderte Knochenqualität. Diese Beobachtung unterstreicht die enorme Bedeutung einer biomechanischen Belastung des Knochens und ihren Einfluss auf die Ausbildung hochwertigen, belastbaren Knochengewebes.

Auffällig in unserem Versuch, und vermutlich mit der Osteosynthese zusammenhängend, waren die meistens von distal des Osteotomiespaltes ausgehenden, über diesen nach proximal ziehenden, knöchernen Kallus – Spangen (Abbildungen 18 und 19). Wahrscheinlich werden diese ebenfalls durch das Einbringen der Schrauben in die Bohrkanäle verursacht: Hierdurch wird das Periost mit seinem hohen osteogenen Potential vom Knochen abgehoben.

Dieses scheint wiederum der Ursprung dieser knöchernen Kallus – Spangen zu sein, welche im weiteren Verlauf entlang der Leitschiene des Scaffolds (Osteokonduktion) weiter nach proximal wachsen und sich beinahe mit dem proximalen Bereich des Femurknochens vereinen (Abbildung 20). Dass letztlich keine knöcherne Vereinigung stattgefunden hat, lässt sich unter anderem mit einer bis zum Ende erhaltenen Restbeweglichkeit der knöchernen Fragmente

untereinander erklären.

Insgesamt wurde im Versuch gezeigt, dass ein winkelstabiles einem nicht winkelstabilen System bei der Implantation von einem Scaffold in einen kritischen Knochendefekt im Tiermodell überlegen ist.

Spezifische knöchernen Wachstumsmuster, wie die beobachteten Kallus – Spangen oder die endostalen Mehrschalenkörper (Abbildung 19), scheinen durch das verwendete Osteosynthese – Material und seine intraoperative Einbringung verursacht zu sein.

5.4 Biokompatibilität der Scaffolds

Eines der wichtigsten Anliegen dieses Versuches war es, eine Aussage über die Biokompatibilität der verwendeten PLGA/CaP – Scaffolds zu erhalten. Hierzu gilt es verschiedene Kriterien, die eine Bewertung der Biokompatibilität zulassen, genauer zu betrachten.

5.4.1 Knochenwachstum und Osteokonduktivität

Einen wichtigen Marker der Biokompatibilität im Bereich des „*Bone Tissue Engineering*“ stellt die knöcherne Integration des Scaffolds in das umgebende Knochengewebe dar. Diese ist nicht zuletzt von den osteokonduktiven Eigenschaften des verwendeten Materials des jeweiligen Scaffolds abhängig.

In der histologischen sowie den μ - CT - Untersuchungen konnte eine knöcherne Integration im Sinne eines Einwachsens von Knochen in die dreidimensionale Matrix des Scaffolds dargestellt werden (Abbildungen 24, 27 und 28).

Zudem zeigte sich eine bis in zentrale Bereiche des Scaffolds reichende Zellbesiedlung (Abbildungen 24 und 25), was eine Migration osteogener Zellen belegt und zusammen mit der ubiquitär vorkommenden Bildung von Knochenmatrix die Osteokonduktivität der verwendeten Scaffolds unterstreicht. Zu einer vollständigen knöchernen Kontinuität kam es, unabhängig vom verwendeten Scaffold, jedoch bei keinem der Versuchstiere. Zum einen wurde der Osteotomiespalt nicht vollständig durchbaut, zum anderen blieb auch immer ein Spalt zwischen den sich bildenden Kallus – Spangen bestehen. Für

Letzteres ist nach unserer Auffassung vermutlich die erhaltene Beweglichkeit der knöchernen Fragmente gegeneinander verantwortlich.

Vom Periost ausgehend fand ein knöchernes Wachstum in den Osteotomiespalt hinein statt (Abbildung 29). Dabei wurden die Markräume des Femurknochens durch diese knöcherne Proliferation sowohl proximal als auch distal des Osteotomiespaltes verschlossen. Bemerkenswerter Weise trat dies auf, obwohl das Periost intraoperativ mit dem Rasparatorium abgetragen wurde (Abbildung 7). Sind die Markräume erst einmal durch diese knöchernen Bänder verlegt, ist folglich auch die Verbindung desselben mit den Poren des Scaffolds unterbrochen. Dies beeinträchtigt die weitere knöcherne Integration des Scaffolds erheblich, sie kann praktisch nicht weiter stattfinden. Der Verschluss der Markräume durch die vom Periost ausgehende knöcherne Proliferation ist die wahrscheinlichste Erklärung dafür, dass der Osteotomiespalt bei keinem der Tiere vollständig durchbaut wurde. Außerdem wirft dieses Phänomen die Frage auf, ob die intraoperativ erfolgte Entfernung des Periosts ausreichend gewesen ist. Zum anderen zeigt sich hier die gewaltige osteogene Potenz des Periosts, welches man sich auch therapeutisch zu Nutzen machen könnte. Andere Arbeitsgruppen haben dies bereits erkannt und arbeiteten beim kritischen Knochendefekt im Tiermodell schon mit Periostlappen [93].

5.4.2 Abbauverhalten der Scaffolds

Wie in Kapitel 1.6.1.6. beschrieben, ist die biologische Abbaubarkeit („*biodegradability*“) insbesondere ihr zeitlicher Verlauf, mit entscheidend für den Erfolg einer Zellbesiedlung, knöchernen Integration und Gefäßeinsprossung beim „*Bone Tissue Engineering*“.

Sowohl in der Histologie wie auch den μ - CT - Untersuchungen konnte die Degradation der Scaffolds und ihr zeitlicher Verlauf gut dargestellt werden (Abbildungen 21, 22, 23 und 27). Darin war zu erkennen, dass das Scaffold in seiner Struktur noch lange erhalten war und die Gerüst-Struktur nur langsam abgebaut wurde. Anhand der Raman – Spektroskopie konnte der Degradationsprozess im zeitlichen Verlauf noch genauer differenziert werden: Es war zu erkennen, dass nach 4 Wochen die Calciumphosphatphase der Scaffolds bereits abgebaut war (vergleiche Abbildungen 32 und 33 mit 35) und

ihr Strukturerehalt nur durch das PLGA – Gerüst bedingt wurde.

Dieser Verlust der Calciumphosphatphase des Scaffolds, erkennbar an der fehlenden Signalintensität um 960 rel. 1/cm im Raman – Spektrum des Scaffolds 4 Wochen postoperativ, passt wiederum gut zu dem in der Histologie gefundenen Zelldetritus als Zeichen des Abbaus durch Osteoklasten (Abbildung 25).

Aus diesem gewonnenen Raman – Spektrum lässt sich weiterhin ableiten, dass zum Zeitpunkt des Abbaus der Calciumphosphatphase des Scaffolds noch kein neues Knochengewebe in diesem Bereich vorhanden war, da ein kompletter Signalverlust um 960 rel. 1/cm sonst nicht aufgetreten wäre.

Zu einer schnellen postoperativen Schrumpfung des Implantates kam es nicht. Damit blieb auch die Interkonnektivität der Poren entsprechend erhalten, was die Migration von Zellen und Gefäßen auch in zentrale Bereiche des Scaffolds selbstverständlich begünstigte. Erst nach mehr als 4 Wochen war eine Verkleinerung des Scaffolds zu erkennen. Hierdurch wurde ein weiteres entscheidendes Biokompatibilitäts – Kriterium der Scaffolds erfüllt.

Es lässt sich durch diese Ergebnisse annehmen, dass eine zu schnelle Degradation des Scaffolds nicht Ursache der nicht vollständig erfolgten knöchernen Kontinuität („*Non-Union*“) gewesen ist.

5.4.3 Gefäßversorgung

Ohne eine hinreichende Gefäßversorgung sind eine knöcherne Heilung und besonders die Integration eines Scaffolds in seine knöcherne Umgebung nicht vorstellbar. Die Gefäße versorgen die sich zentral befindenden Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, transportieren Abbauprodukte ab und erlauben die zelluläre Migration nach und von zentral.

Gerade bei knöchernen Defekten, die den Kriterien des kritischen Knochendefektes entsprechen, stellt die zentrale Nekrose eine häufige Beobachtung dar. Sowohl die histologischen als auch die μ - CT - Untersuchungen zeigten keine solche zentrale Nekrose. Vielmehr konnte eine gute Vaskularisierung bis in zentrale Bereiche des Scaffolds insbesondere durch die Histologie belegt werden (Abbildung 30). Diese wird zudem durch das

zusätzliche Vorkommen von vitalen Zellen in diesem Bereich unterstrichen (Abbildungen 24 und 25).

Diese Beobachtungen sprechen weiterhin für eine lang erhaltene Interkonnektivität des Scaffolds und seine hervorragende Biokompatibilität. Eine unzureichende Vaskularisierung scheint die oben genannte „*Non-Union*“ folglich ebenfalls nicht bedingt zu haben.

5.5 „Scaffolds unbesiedelt“ vs. „Scaffolds mit MSCs besiedelt“

Hier stellten sich insbesondere Unterschiede in der zentralen Zellbesiedlung der Scaffolds dar: diese war bei den unbesiedelten Scaffolds vor allem in der Peripherie zu erkennen, wenn auch in geringerer Zahl als bei den mit „*MSCs*“ besiedelten Scaffolds. Bei diesen wurden im Unterschied zu den unbesiedelten Scaffolds auch Zellen in zentralen Bereichen gefunden (Abbildungen 24 und 25).

In Verbindung dazu trat bei den mit „*MSCs*“ besiedelten Scaffolds gegenüber der unbesiedelten Gruppe auch ein stärkeres Knochenwachstum auf. Nur bei diesen kam es auch zu einer zentralen Bildung von Knochengewebe, wiewohl eine vollständige knöchernerne Durchbauung auch hier nicht erfolgte. Das osteogene Potential von Scaffolds scheint also mit einer Besiedlung mit „*MSCs*“ deutlich zu steigen, was in den gefundenen Beobachtungen wie schnellerem Knochenwachstum und erhöhter Zellbesiedlung gegenüber den unbesiedelten Scaffolds zum Ausdruck kommt.

6 Zusammenfassung

Die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe („CSD“) stellt eine besondere Herausforderung für Orthopäden und Unfallchirurgen dar. Derzeit können solche Defekte oftmals nicht mit einem befriedigenden Ergebnis versorgt werden.

Ziel dieser Pilotstudie war es, die Biokompatibilität von neuartigen PLGA/CaP - Scaffolds, welche anderen Arbeitsgruppen in dieser Form bisher nicht zur Verfügung standen, im kritischen Knochendefekt im Tiermodell zu untersuchen. Gleichzeitig sollten ein geeignetes Osteosynthese-System sowie eine aussagekräftige Auswertungsdiagnostik zur Durchführung eines solchen Projektes evaluiert werden. Hierzu kam bei der tierexperimentellen Biokompatibilitätsuntersuchung von Scaffolds im kritischen Knochendefekt erstmalig die Raman – Spektroskopie zur Anwendung, um genauere Erkenntnisse über den chemischen Ablauf des Degradationsprozesses der Scaffolds im zeitlichen Verlauf zu gewinnen.

Den Versuchstieren, „ChinChilla–Bastarden“, wurden PLGA/CaP - Scaffolds, welche zum einen mit Calciumphosphat – Partikeln beschichtet („coated“), und welche teilweise noch zusätzlich mit porösen CaP - Partikeln beladen waren („coated and loaded“), in einen durch Osteotomie (Länge = 1.2 cm) hervorgerufenen kritischen Knochendefekt im linken Femurknochen implantiert. Als Osteosynthese-System wurde, aufgrund einer hohen Ausfallquote in der Vorversuchsreihe unter Verwendung eines nicht winkelstabilen Systems, eine winkelstabile 7-Loch-Mandibulaplatte verwendet.

Die Scaffolds wurden zudem, je nach Versuchsgruppe, vor Implantation in einem Bioreaktorsystem mit zuvor durch Knochenmarkpunktion gewonnenen mesenchymalen Stammzellen besiedelt.

Die postoperativen Verlaufskontrollen fanden in Form von regelmäßigen klinischen sowie röntgenologischen Untersuchungen statt. Nach 4 und 20 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, der linke Femurknochen entnommen und dieser einer μ -CT- und histologischen Untersuchung, sowie einige Präparate auch einer Untersuchung durch die Raman – Spektroskopie, zugeführt.

In den röntgenologischen Untersuchungen konnte bei einer Vielzahl der

Versuchstiere eine knöchernen Durchbauung des Osteotomiespalt vermutet werden. Eine knöchernen Kontinuität im Sinne einer vollständigen Defekt - Überbrückung, wie sie nach Betrachtung der Röntgenbilder in 2 Ebenen zunächst angenommen wurde, ließ sich in der μ -CT - Untersuchung bei keinem der Tiere verifizieren. Die μ -CT - Untersuchungen konnten jedoch eine gute knöchernen Integration der Scaffolds in ihre Umgebung zeigen. Außerdem stellten sich, insbesondere von distal des Osteotomiespalt ausgehende, nach proximal wachsende Kallus - Spangen dar.

Die Scaffolds waren im Osteotomiespalt auch nach mehreren Wochen noch gut erhalten, zu einer schnellen Degradation kam es nicht, so dass folglich auch die Interkonnektivität der porösen Grundstruktur lange bestehen blieb. Die hervorragende Biokompatibilität der verwendeten PLGA/CaP - Scaffolds konnte durch die gewonnenen Ergebnisse der histologischen und μ - CT-Untersuchungen dargestellt werden. Kriterien hierfür waren die gute knöchernen Integration der Scaffolds, das Vorkommen von vitalen Zellen und Gefäßen selbst in zentralen Bereichen sowie das Fehlen einer zentralen Nekrose. Dazu trug die lange erhaltene Struktur und Interkonnektivität der Scaffolds bei.

Die Raman - Spektroskopie erbrachte wertvolle Informationen über den genauen Degradationsprozess der Scaffolds im zeitlichen Verlauf. Sie konnte die in den Spektren auftretenden Signalintensitäten und ihre zugehörigen chemischen Gruppen qualitativ einordnen. So konnte herausgestellt werden, dass bei der Degradation zunächst das im Scaffold vorhandene Calciumphosphat abgebaut wird, wohingegen das PLGA-Gerüst lange erhalten bleibt und maßgeblich zur Strukturhaltung beiträgt.

Die nicht erfolgte vollständige knöchernen Kontinuität lässt sich hauptsächlich durch die vom Periost ausgehenden, knöchernen Verschlüsse der Markräume erklären. Des Weiteren spielte hierbei sicherlich auch eine erhaltene Restbeweglichkeit der knöchernen Fragmente gegeneinander eine Rolle.

Bisherige Untersuchungen zur Heilung von kritischen Knochendefekten, bei welchen lediglich eine röntgenologische Erfolgskontrolle erfolgte und eine knöchernen Kontinuität postuliert wurde, sind aufgrund der gefundenen Ergebnisse in diesem Versuch als kritisch zu betrachten.

Die verwendeten Scaffolds stellen einen sehr viel versprechenden Ansatz für

eine zukünftige Anwendung im Menschen dar und bieten eine Möglichkeit, bereits bestehende therapeutische Verfahren zu erweitern und zu verbessern. Die Indikationen und Art ihrer klinischen Anwendung sollten anhand noch durchzuführender klinischer Studien entsprechend erarbeitet werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristisches Raman-Spektrum von Knochengewebe	13
Abbildung 2: Raman– und IR-spektroskopische Bandenverteilung in Knochen- gewebe	13
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Scaffold „coated“....	20
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Scaffold „coated and loaded“:.....	21
Abbildung 5: Osteosynthese – System der Firma Stryker Leibinger	23
Abbildung 6: Hautschnitt lateralseitig über dem linken Femurknochen	26
Abbildung 7: Hervorheben des Femurknochens mittels Hohmannhaken.....	26
Abbildung 8: Stabilisierung der Osteosyntheseplatte mit Zange am Knochen .	27
Abbildung 9: Freibleibendes mittleres Bohrloch über dem Osteotomiespalt	27
Abbildung 10: Sägen des Osteotomiespaltes mit Weichteilprotektion.....	28
Abbildung 11: Im Osteotomiespalt platziertes Scaffold	28
Abbildung 12: Röntgenbild linker Femurknochen.....	31
Abbildung 13: Das „Skyscan-1072 High-Resolution desktop μ - CT system“ ...	35
Abbildung 14: Die Exakt – Präzisions – Klebepresse.....	38
Abbildung 15: „Sandwichblock“ nach Anfertigung	38
Abbildung 16: Osteosyntheseversagen in Form eines Plattenausrisses.....	42
Abbildung 17: Versuchstier mit Leerdefekt, 20 Wochen postoperativ:	43
Abbildung 18: Verlaufskontrolle des knöchernen Wachstums.....	44
Abbildung 19: Axiale Schnitte durch den Knochen.....	47

Abbildung 20: Axiale Schnitte durch den Osteotomiespalt.....	48
Abbildung 21: Scaffolds im Osteotomiespalt, 4 Wochen postoperativ.	49
Abbildung 22: μ -CT-morphologische Degradation der Scaffolds im zeitlichen Verlauf.....	50
Abbildung 23: Scaffold „coated and loaded“, 4 Wochen postoperativ.	52
Abbildung 24: Scaffold „coated and loaded, mit MSCs besiedelt“.....	53
Abbildung 25: Scaffold „coated“ unbesiedelt, 4 Wochen postoperativ.	53
Abbildung 26: Scaffold „coated, mit MSCs besiedelt“.	54
Abbildung 27: Scaffold „coated and loaded, mit MSCs besiedelt“.....	55
Abbildung 28: Scaffold „coated, unbesiedelt“.....	55
Abbildung 29: Verlegung der Markräume.....	56
Abbildung 30: Scaffold „coated“, unbesiedelt, 4 Wochen postoperativ.	57
Abbildung 31: Intussuszeptionelle Gefäßbildung.	57
Abbildung 32: Raman-Spektrum Scaffold „coated“ vor Implantation.....	59
Abbildung 33: Raman–Spektrum Scaffold „coated and loaded“ vor Implantation.	60
Abbildung 34: Raman-Spektrum Femurknochen unbehandelt.....	61
Abbildung 35: Raman-Spektrum Scaffold 4 Wochen postoperativ.....	62
Abbildung 36: Raman-Spektrum Scaffold 20 Wochen postoperativ.....	63
Abbildung 37: Raman-Spektrum des Einbettmediums.....	64

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere und Gruppeneinteilung	18
Tabelle 2: Kenngrößen der verwendeten Scaffolds	19
Tabelle 3: Verwendetes Osteosynthesematerial der Firma Stryker Leibinger..	22
Tabelle 4: verwendete Narkosemedikamente	24
Tabelle 5: Entwässerung und Entfettung der Knochenproben	33
Tabelle 6: Zusammensetzung verschiedener Gebrauchslösungen aus „Technovit 9100® Neu“	34
Tabelle 7: Herstellung des drei Komponenten Kunststoffes „Technovit 4000“	36

9 Abkürzungsverzeichnis

AP	anterior posterior
Aq. dest.	Aqua destillata
BMPs	Bone morphogenic proteins
BRMs	Bone replacement materials
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CaP	Calciumphosphat
CCD	Charge Coupled Device
CSD	Critical sized defect
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
et.al.	et altera
ggf.	gegebenenfalls
Hrsg.	Herausgeber
i.d.R.	in der Regel
IR	Infrarot
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
MSCs	mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NZW	New Zealand White
o.g.	oben genannte(n)
o.J.	ohne Jahresangabe
PLGA	Poly-D/L-Lactit-Co-Glykolsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Seite(n)
SBF	Simulated body fluid
sog.	sogenannte(n)
u. a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
ZKT	Zellkultur

10 Literaturverzeichnis

- (1) **Agrawal CM, Ray RB.**
Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering.
J Biomed Mater Res. 2001 May; 55(2):141-50.
- (2) **Albrektsson T, Johansson C.**
Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.
Eur Spine J. 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.
- (3) **Alix AJP, Bernard L, Manfait M.**
Spectroscopy of Biological Molecules
John Wiley, Chichester, 1985.
- (4) **Asahina I, Seto I, Oda M, Marukawa E, Imranul AM, Enomoto S.**
„Bone Engineering“, 1st edition, Em squared, Toronto 1999, p.526.
- (5) **Athanasίου KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X.**
Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone.
Tissue Eng. 2000 Aug; 6(4):361-81.
- (6) **Babis CG, Soucacos PN.**
Bone scaffolds: The role of mechanical stability and instrumentation.
Injury, 36 (Suppl): S34-44, November 2005.
- (7) **Barthold M.**
Züchtung primärer osteogener Zellen auf neuartigen Gerüststrukturen
in Kleinfemurern zur Herstellung von Knochenimplantaten.
Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2003.
- (8) **Barthold M, Majore I, Fargali S, Stahl F, Schulz R, Lose S, Mayer H, Jäger V.**
3D-Cultivation and Characterisation of Osteogenic Cells for the

- Production of
Highly Viable Bone Tissue Implants.
Animal Cell Technology Meets Genomics, Volume 2, Chapter 2.
pages 199–205. Springer Netherlands, 2005.
- (9) **Bertoluzza A, Fagnano C, Monti P.**
Spectroscopy of Biological Molecules – State of the Art
Esculapio, Bologna, 1989.
- (10) **Bertoluzza A, Fagnano C, Monti P, Simoni R, Tinti A, Tosi MR,
Caramazza R.**
Raman Spectroscopy in the Study of Biocompatibility.
Clinical Materials 9 (1992) 49-68.
- (11) **Boskey AL, Mendelsohn R.**
Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues.
Vibrational Spectroscopy, 2005 Jul 29;38(1-2):107-114.
- (12) **Burg KJ, Porter S, Kellam JF.**
Biomaterial developments for bone tissue engineering.
Biomaterials. 2000 Dec;21(23):2347-59
- (13) **Cancedda R, Cedola A, Giuliani A, Komlev V, Lagomarsino S,
Mastrogiacomo M, Peyrin F, Rustichelli F.**
Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered
bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction.
Biomaterials 28 (2007) 2505-2524.
- (14) **Carden A, Timlin JA, Edwards CM, Morris MD, Hoffler CE, Kozloff
KM, Goldstein SA.**
Raman imaging of bone mineral and matrix: composition and function.
Proc. SPIE 3608, 132-138 (1999).

-
- (15) **Cassinelli C, Morra M, Carpi A, Giardino R, Fini M.**
Controlling the lateral distribution and alignment of human gingival fibroblasts by micropatterned polysaccharide surfaces.
Biomed Pharmacother. 2002 Sep; 56 (7):325-31.
- (16) **Cherry SR.**
In vivo molecular and genomic imaging: new challenges for imaging physics.
Phys Med Biol 2004;49:R 13-48.
- (17) **Concannon MJ, Boschert MT, Puckett CL.**
Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long-term study.
Plast Reconstr Surg. 1997 Jun;99(7):1983-8.
- (18) **Danis R.**
Theorie et pratique de l'osteosynthese
Liege, Desoer et Masson, Paris, 1949.
- (19) **Davies JE, Vacanti JP.**
Bone engineering.
EM Squared, 2000.
- (20) **Davies JE.**
In vitro modeling of the bone/implant interface.
Anat Rec. 1996 Jun;245(2):426-45.
- (21) **Davies JE, Guan L.**
Preparation and characterization of a highly macroporous biodegradable composite tissue engineering scaffold.
Journal of Biomedical Material Research, 71(3):480-487, December 2004.

-
- (22) **Donath K.**
Die Trenn-Dünnschlifftechnik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien.
Apparate- und Methodenbeschreibung, 1987.
- (23) **Donnelly E, Boskey AL, Baker SP, van der Meulen MC.**
Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex.
J Biomed Mater Res A. 2010 Mar 1;92(3):1048-56
- (24) **Draper ERC, Morris MD, Camacho NP, Matousek P, Towrie M, Parker AW, Goodship AE.**
Novel Assessment of Bone Using Time-Resolved Transcutaneous Raman Spectroscopy.
Journal of Bone and Mineral Research, Vol 20, Number 11, 2005.
- (25) **Drescher, Birgit**
Einfluss unterschiedlicher Haltungsverfahren auf das Skelettsystem bei Neuseeländer Fleischkaninchen und Chinchilla-Bastard-Versuchskaninchen
Dissertation FU Berlin 1989
- (26) **Einhorn TA.**
Enhancement of fracture-healing.
J Bone Joint Surg Am. 1995 Jun;77(6):940-56
- (27) **Einhorn TA, Lee CA.**
Bone regeneration: new findings and potential clinical applications.
J Am Acad Orthop Surg. 2001 May-Jun; 9(3):157-65.
- (28) **Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC.**
The expression of cytokine activity by fracture callus.

J Bone Miner Res. 1995 Aug;10(8):1272-81.

(29) Elvira C, Mano JF, San Román J, Reis RL.

Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems.

Biomaterials. 2002 May;23(9):1955-66.

(30) Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W.

Mikro-ct.

Radiologe, 39(3): 203-212, März 1999.

(31) Fargali S.

In vitro Etablierung eines Kaninchenmodells zur Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten auf Basis osteogener Zellen und bioresorbierbarer Trägergerüste.

PhD Thesis, Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, Germany, November 2006.

(32) Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE.

In vivo bone engineering in a rabbit femur.

J Craniofac Surg. 2003 May;14(3):324-32.

(33) Frame JW.

A convenient animal model for testing bone substitute materials.

J Oral Surg. 1980 Mar;38(3):176-80

(34) Gautier E, Perren SM, Ganz R.

Principles of internal fixation.

Injury, 6(4): 220-232, October 1992.

(35) Goldstein SA.

Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome.
Ann N Y Acad Sci. 2002 Jun;961:183-92.

- (36) **Gomes ME, Salgado AJ, Reis RL.**
Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration
1st edition, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands 2002, p.221
- (37) **de Grauw CJ, Otto C, Greve J.**
Line-scan Raman microspectrometry for biological applications.
Appl. Spectrosc. 51 (11), 1607-1612 (1997).
- (38) **Guldberg RE, Duvall CL, Peister A, Oest ME, Lin ASP, Palmer AW, Levenston ME.**
3D imaging of tissue integration with porous biomaterials.
Biomaterials 29 (2008) 3757-3761.
- (39) **Hilldore A, Wojtowicz, Wagoner Johnson A.**
Micro-CT based quantification of non-mineralized tissue on cultured hydroxyapatite scaffolds.
Journal of Biomedical Materials Research Part A, published online 2007 in Wiley InterScience. DOI: 10.1002/jbm.a.31264
- (40) **Hollinger JO, Kleinschmidt JC.**
The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials.
J Craniofac Surg. 1990 Jan;1(1):60-8
- (41) **Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M, Fukuyama N, Tanaka E, Tsuji C, Miyasaka M, Tanino R, Nakazawa H.**
Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute.

Plast Reconstr Surg. 2003 Apr 15;111 (5):1638-45.

- (42) **Holy CE, Fialkov JA, Shoichet MS, Davies JE.**
Bone Engineering, chapter "In Vivo Models for Bone Tissue Engineering", pages 496-503
Number 46. Em Squared Inc., 2000.
- (43) **Hutmacher DW.**
Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.
Biomaterials 2000, 21, 2259.
- (44) **Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, Yamano Y, Kato Y, Koike T.**
Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits.
Calcif Tissue Int. 1998 Dec;63(6):490-5.
- (45) **Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG.**
Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery.
J Biomed Mater Res. 1997 Jul;36(1):1-8
- (46) **Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA.**
Assesement of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT.
Biomaterials 28 (2007) 2491-2504.
- (47) **Karp JM, Rzeszutek K, Shoichet MS, Davies JE.**
Fabrication of precise cylindrical three-dimensional tissue engineering scaffolds for in vitro and in vivo bone engineering applications.

Journal of Craniofacial Surgery, 14(3):317-323, May 2003.

- (48) **Kneser U, Schaefer DJ, Munder B, Klemt C, Andree C, Stark GB.**
Min. Invas. Ther. Allied Technol. 2002, 11, 107
- (49) **Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Osawa K, Bessho K.**
Experimental study of osteoinduction using a new material as a carrier
for bone morphogenetic protein-2.
Br J Oral Maxillofac Surg. 2010 Jun 14.
- (50) **Krebsbach PH, Robey PG.**
Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for
craniofacial regeneration.
J Dent Educ. 2002 Jun;66(6):766-73.
- (51) **Kubiak EN, Fulkerson E, Strauss E, Egol KA.**
The evolution of locked plating.
Journal of Bone and Joint Surgery, 88(Suppl 4): 189-200, December
2006.
- (52) **Lane JM, Werntz JR.**
Biology of fracture healing.
In: Lane J.M. (Hrsg) Fracture Healing. Churchill Livingstone 1987; p
49-59
- (53) **Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B.**
Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical
characteristics of titanium
surfaces depend on the roughness of the material.
Biomol Eng. 2002 Aug;19(2-6):255-61
- (54) **Langer R, Vacanti JP.**
Tissue engineering.

Science. 1993 May 14;260(5110):920-6.

(55) Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA Jr.

Tissue engineering: orthopedic applications.

Annu Rev Biomed Eng. 1999;1:19-46.

(56) van Lenthe GH, Hagenmüller H, Bohner M, Hollister SJ, Meinel L, Müller R.

Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold-bone interaction in vivo.

Biomaterials 28 (2007) 2479-2490

(57) Leong KF, Cheah CM, Chua CK.

Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.

Biomaterials. 2003 Jun;24(13):2363-78.

(58) Mackenzie DJ, Sipe R, Buck D, Burgess W, Hollinger J.

Recombinant human acidic fibroblast growth factor and fibrin carrier regenerates bone.

Plast. Reconstr. Surg. 2001 Apr 1; 107 (4):989-96.

(59) McKibbin B.

The biology of fracture healing in long bones.

J Bone Joint Surg Br. 1978 May; 60-B(2):150-62.

(60) Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN, Vacanti JP.

Polymer 1994, 35.1068

(61) Mosekilde L.

Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis

research.

Bone. 1995 Oct;17(4 Suppl):343S-352S.

(62) Mundell RD, Mooney MP, Siegel MI, Losken A.

Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane.

J Oral Maxillofac Surg.

(63) Murphy WL, Khon DH, Mooney DJ.

Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro.

J. Biomed. Mater. Res. 2000, 50, 50.

(64) Olerud S, Danckwardt-Lilieström G.

Fracture healing in compression osteosynthesis. An experimental study in dogs with an avascular, diaphyseal, intermediate fragment.

Acta Ortop Scand Suppl 1971;137:1-44.

(65) Paderni S, Terzi S, Amendola L.

Major bone defect treatment with an osteoconductive bone substitute.

Musculoskelet Surg. 2009 Sep;93(2):89-96.

(66) Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E.

MicroRaman Spectral Study of the PO₄ and CO₃ Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites.

Calcif Tissue Int (1998) 63: 475-481.

(67) Penel G, Delfosse C, Descamps M, Leroy G.

Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy.

Bone 36 (2005) 893 – 901

(68) Plenk H.

Romeis Mikroskopische Technik, chapter 25, pages 527-557.
Peter Böck, 17 edition, 1989.

(69) Raman CV, Krishnan KS.

A new type of secondary radiation.
Nature, 121 (1928) 501-2

(70) Rose FR, Oreffo RO.

Bone tissue engineering: hope vs hype.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 292, 1.

(71) Rotundi A.

Combined micro-Raman, micro-infrared, and field emission scanning electron microscopy analysis of comet 81P/Wild2 particles collected by Stardust.
Meteoritics and Planetary Science, 43, 367-397, 2008.

(72) Sachlos E, Reis N, Ainsley C, Derby B, Czernuszka JT.

Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication.
Biomaterials. 2003 Apr;24(8):1487-97.

(73) Scharnweber T, Santos C, Franke RP, Almeida MM, Costa ME.

Influence of spray-dried hydroxyapatite-5-fluorouracil granules on cell lines derived from tissues of mesenchymal origin.
Molecules. 2008 Nov 1;13(11):2729-39.

(74) Schmitz JP, Hollinger JO.

The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.
Clin Orthop Relat Res. 1986 Apr;(205):299-308.

-
- (75) **Service RF.**
Tissue engineers build new bone.
Science. 2000 Sep 1;289(5484):1498-500.
- (76) **Shea LD, Wang D, Franceschi RT, Mooney DJ.**
Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds.
Tissue Eng. 2000, 6, 605.
- (77) **Siegel MI, Mooney MP.**
Appropriate animal models for craniofacial biology.
Cleft Palate J. 1990 Jan;27(1):18-25.
- (78) **Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG.**
Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor.
J Biomed Mater Res. 2002 Oct;62(1):136-48.
- (79) **Simon CG Jr, Khatri CA, Wight SA, Wang FW.**
Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres.
J. Orthop. Res. 2002, 20, 473.
- (80) **Smekal A.**
The quantum theory of dispersion.
Naturwiss., 11 (1923) 873-5.
- (81) **Smith R, Rehman I.**
Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone.
Journal of Materials Science: Materials in Medicine 5 (1995) 775-778
- (82) **Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI.**

J. Orthop. Res. 1999, 17, 205.

(83) Spitzer R, Perka C, Lindenhayn K, Zippel H.

Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha-tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture.

J. Biomed. Mater. Res. 2002, 59, 690.

(84) Steele A, Fries M, Ammundsen H, Mysen B, Fogel M, Schweizer M and Boctor N.

Comprehensive imaging and Raman spectroscopy of carbonate globules from Martian meteorite ALH84001 and a terrestrial analog from Svalbart.

Meteoritics and Planetary Science, 42, 1549-1566, 2007.

(85) Strube A, Hoffmann J, Stepina E, Hauff P, Klar U, Käkönen SM.

Sagopilone inhibits breast cancer bone metastasis and bone destruction due to simultaneous inhibition of both tumor growth and bone resorption.

Clin Cancer Res. 2009 Jun 1;15(11):3751-9.

(86) Sumanasinghe RD, King MW.

New trends in biotextiles – the challenge of tissue engineering.

JTATM; 3(2): 1-13.

(87) Taddei P, Tinti A, Bottura G, Bertoluzza A.

Vibrational spectroscopic characterization of new calcium phosphate bioactive coatings.

Biopolymers. 2000;57(3):140-8.

(88) Toporski J, Fries M, Steele A, Nittler L and Kress M.

Sweeping the skies: Stardust and the origin of our Solar System.

Imaging and Microscopy, 04/2004, 38-40.

-
- (89) **Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD.**
Animal models for osteoporosis.
Rev Endocr Metab Disord. 2001 Jan; 2(1):117-27.
- (90) **Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y.**
Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor-beta1 to promote bone repair in skull defects in rabbits.
Biomaterials. 2002 Feb;23(4):1003-10.
- (91) **Uhrich KE, Ibim SE, Larrier DR, Langer R, Laurencin CT.**
Chemical changes during in vivo degradation of poly(anhydride-imide) matrices.
Biomaterials. 1998 Nov;19(22):2045-50.
- (92) **Vacanti CA, Bonassar LJ.**
An overview of tissue engineered bone.
Clin Orthop Relat Res. 1999 Oct;(367 Suppl): S375-81.
- (93) **Vögelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Liebermann JR.**
Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic proteins.
Journal of Bone and Joint Surgery, 87(6): 1323-1331, June 2005.
- (94) **Weiss P, Obadia L, Magne D, Bourges X, Rau C, Weitkamp T.**
Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials.
Biomaterials 2003;24:4598.

-
- (95) **Wentrup-Byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM.**
Fourier transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth.
J. Raman Spectrosc. 28, 151-158 (1997)
- (96) **Whang K, Tsai DC, Nam EK, Aitken M, Sprague SM, Patel PK, Healy KE.**
Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds.
J. Biomed. Mater. Res. 1998, 42, 491.
- (97) **Williams DF.**
„Bone engineering“, 1st edition, Em squared, Toronto 1999, p.577.
- (98) **Wintermantel E, Mayer J, Blum J.**
Tissue engineering scaffolds using superstructures.
Biomaterials; 17(2):83-91, 1996.
- (99) **Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK.**
The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors.
Tissue Eng. 2001 Dec;7(6):679-89.
- (100) **Yaszemski MJ, Oldham JB, Lu L, Curier BL.**
„Bone engineering“, 1st edition, Em squared, Toronto 1994, p.541.
- (101) **Zhu L, Liu W, Cui L, Cao Y.**
Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells.
Tissue Eng. 2006 Mar; 12(3): 423-33.

11 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir eine gute Bildung ermöglichten, mich immer zur Verfolgung meiner Ziele und Träume ermutigten und deren bedingungsloser Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Ohne die Hilfe vieler weiterer Personen und Institute wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen. Besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. med. Dr. ing. Ralf-Peter Franke für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die zu jeder Zeit sehr freundliche Unterstützung.
- meinem Freund und Mitstreiter Julian Hägele für endlose Stunden gemeinsamer Arbeit am Projekt, die gegenseitige Motivation und Hilfestellungen sowie die immer angenehme Gesellschaft während zahlreicher Reisen durch verschiedene Institute der Bundesrepublik.
- Frau Marita Kratz für die außerordentliche, über das normale Maß weit hinausgehende Mitarbeit und fortwährende Hilfe in allen Belangen sowie auch außerhalb des Labors! Du warst großartig und nicht zu ersetzen!
- PD Dr. med. Stefan Endres für die über den gesamten Zeitraum andauernde, hervorragende, freundschaftliche Begleitung und unentbehrliche aktive Mitwirkung am Projekt sowie ebenfalls auch außerhalb dessen. Danke Stefan!
- Prof. Dr. med. Dr. physiol. Axel Wilke für die fachliche Unterstützung und die Herstellung wichtiger Kontakte zu vielen am Versuch mitwirkenden Instituten. Weiterhin vielen Dank für die Ermöglichung zur Präsentation der Arbeit auf dem „Süddeutschen Orthopädenkongress“ in Baden Baden.
- Prof. Dr. David Jones für die Bereitstellung der Laborräume der Experimentellen Orthopädie zu jeder Zeit.
- Frau Dr. Rosi Fuhrmann für die immer freundliche Zusammenarbeit und die große Gastfreundschaft während der zahlreichen Besuche in Ulm.

-
- Dr. med. vet. Bernhard Hiebl für die fundierten Fachkenntnisse aus dem Bereich der Tiermedizin und die praktische Mitarbeit.
 - PD Dr. med. Marc Kalinowski für die immer freundliche Hilfe bei den röntgenologischen Untersuchungen der Tiere (auch außerhalb der üblichen Dienstzeiten)
 - Herr Guido Schemken für die tatkräftige Unterstützung bei allen Fragen rund um die Tierhaltung und Pflege.
 - Dr. Jäger für die Besiedlung der Scaffolds im Bioreaktor in Braunschweig.
 - Meiner wunderbaren Freundin Dr. rer. nat. Anne Strube sowie Oberstabsarzt Dr. med. Uwe Müller für das Korrekturlesen der Arbeit und die konstruktive Kritik „auf den letzten Metern“.
 - Nicht zuletzt möchte ich der EU für die Bereitstellung der notwendigen Fördergelder zur Durchführung des Projektes danken.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *„Tierexperimentelle Biokompatibilitätsuntersuchung von PLGA/CaP-Scaffolds unter besonderer Berücksichtigung der Raman-Spektroskopie – Eine Pilotstudie“* unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Franke mit Unterstützung durch Frau Marita Kratz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

13 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten:

In Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Dietrich, Ellenrieder, Feuser, Görg, Grau, Gress, Grimm, Griss, Gotzen, Hertel, Hoffmann, Hoyer, Klose, Koolman, Kuhlmann, Langer, Lill, Löffler, Maisch, Mandrek, Max, Meyer, Moll, Mueller, Müller, Oertel, Neubauer, Renz, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Zielke.

In Kapstadt: Vlok, Pretorius.

14 Lebenslauf



Name: Christian Rainer Beltzer

Geburtsdatum und –ort: 08.02.1982 in Marburg

Familienstand: ledig

Religion: römisch-katholisch

Schule

2001 Allgemeine Hochschulreife, Alfred-Wegener-Schule Kirchhain

Grundwehrdienst

11/2001-08/2002 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst, Rennerod und Stadtallendorf

Studium

10/2002 – 11/2008 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

2004 Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote „Gut“ (1.66)

Praktisches Jahr

08/2007 Erstes Tertial:

Department of Orthopaedic Surgery

Tygerberg Hospital, Cape Town / Republic of South Africa

Direktor: Prof. Dr. Vlok

University of Stellenbosch

12/2007 Zweites Tertial:

Abteilung für VTG - Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Abteilung für Unfallchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Ruchholtz

Universitätsklinikum Marburg

04/2008 Drittes Tertial:

Abteilung für Kardiologie und Internistische Notaufnahme

Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch

Universitätsklinikum Marburg

Staatsexamen

11/2008 Staatsexamen, Gesamtnote „Sehr gut“ (1.5)

Beruflicher Werdegang

06/2002 Übernahme in die Laufbahn der Sanitätsoffizieranwärter der Bundeswehr

03/2004 Offizierlehrgang, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München

03/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Abteilungsleiter: Flottenarzt Dr. med. Stefan Lenz

06/2010 Aufnahme in den „Einsatzpool Sanitätsoffiziere Rettungsmedizin“ für die Auslandseinsätze der Bundeswehr

Weiterbildung

11/2009 Kurs „ATLS“ (Advanced Trauma Life Support), Berlin

04/2010 DEGUM - Kurs „Chirurgische Sonographie“, Ulm

05/2010 Kurs „Notfallmedizin“ der Bayrischen Landesärztekammer, München

11/2010 Seminar „Basischirurgie Common Trunk“, Berlin

Hobbies

Handball, Tennis, Tauchen, Skifahren.