

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael Ehrenfeld

Knochenregeneration in einem ausgedehnten porcinen Unterkieferdefektmodell mittels
CAD/CAM-gefertigter stammzellbesiedelter TCP-PLGA-Leitschienen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Egon Burian
aus Reschitz, Rumänien

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Susanne Mayer
Prof. Dr. med. dent. Jürgen Manhart
Prof. Dr. med. dent. Daniel Edelhoff

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Florian Probst

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Geschichte und Grundlagen des <i>Tissue Engineering</i>	1
1.2 Klinischer Einsatz des <i>Tissue Engineering</i>	2
1.3 Leitschienenkonstrukte als Trägermaterialien	4
1.3.1 Beschaffenheit der Leitschienenkonstrukte.....	4
1.3.2 Personalisierte Leitschienenkonstruktion.....	6
1.4 Verwendung von Stammzellen im <i>Tissue Engineering</i>	7
1.4.1 Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (MSCs)	7
1.4.2 Adipogene Stammzellen (ASCs).....	8
1.5 Das orthotope „ <i>Critical-Size-Defektmodell</i> “ im Minischwein	10
1.6 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Versuchstiere	12
2.2 Studiendesign	12
2.2 Versuchsaufbau	14
2.3 Verbrauchsmaterialien	15
2.4 Arzneimittel.....	17
2.5 Geräte und Programme	17
2.6 Antikörper	19
2.7 Leitschienenkonstruktion	19
2.7.1 Gerüsterstellung für in-vitro Teil.....	19
2.7.2 Leitschienen für das Critical-size Defektmodell	19
2.8 Zellkultur und in-vitro Teil	20
2.8.1 Stammzellisolation.....	20
2.8.2 Stammzellexpansion und-proliferation	21
2.8.3 Proliferationsassay (<i>WST-1-Assay</i>).....	22
2.8.4 Zellüberleben/ <i>Live-Dead assay</i>	22
2.8.5 Stammzellendifferenzierung	23
2.8.5.1 Osteogene Differenzierung	23
2.8.5.2 Adipogene Differenzierung	24
2.8.6 Leitschienenbesiedlung	25
2.9 Operationen, perioperatives Procedere und Probengewinnung	26

2.9.1	Erste Operation: Defektsetzung und ASC-Gewinnung.....	26
2.9.2	Zweite Operation: Leitschienenengliederung.....	27
2.9.3	Opferung der Tiere und Probenaufarbeitung.....	28
2.10	Bildgebung.....	29
2.10.1	CT und Rapid Prototyping (RP).....	29
2.10.2	μ CT.....	29
2.11	Immunhistochemie.....	31
2.11.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	31
2.11.2	CD31-Färbung.....	31
2.11.3	Osteocalcin-Färbung.....	32
2.12	Statistik.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	In-vitro Ergebnisse.....	34
3.1.1	Zellproliferation, Zellviabilität (<i>WST-I-Assay</i>) und Zellüberleben (<i>Live-Dead-Assay</i>).....	34
3.1.2	Osteogene Differenzierung (<i>Alizarin-Red-Assay</i>).....	37
3.2	In-vivo Ergebnisse.....	39
3.2.1	μ CT-Daten.....	39
3.2.2	Immunhistochemie.....	44
3.3	Statistik und Korrelation der Daten.....	47
4	Diskussion.....	49
4.1	Synopsis der ermittelten Daten.....	49
4.2	Dateninterpretation.....	51
4.3	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung.....	53
4.4	Pathophysiologische Aspekte und klinische Implementation.....	56
4.5	Limitationen der durchgeführten Studie.....	59
4.5.1	Limitationen des Studiendesigns und der Methodik.....	60
4.5.2	Limitationen der Datenerhebung und der Ergebnisse.....	61
4.6	Perspektiven des <i>Tissue Engineerings</i>	62
5	Zusammenfassung.....	66
	Literaturverzeichnis.....	68
	Danksagung.....	76
	Curriculum vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Publikationen.....	77
	Eidesstattliche Erklärung.....	79

Abkürzungsverzeichnis

α MEM:	Minimum essential medium α
ASC:	Adipogene mesenchymale Stammzelle
bFBF:	Fibroblastenwachstumsfaktor
BMSC:	Knochenmarksstammzelle
BV:	Knochenvolumen (absolut)
CAD:	Computer-aided design
CAM:	Computer-aided manufacturing
CD31:	Cluster of differentiation 31
CSD:	<i>Critical-Size-Defekt</i>
CT:	Computertomographie
DICOM:	Digital Imaging and Communications in Medicine
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's medium
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS:	Fetal bovine serum
FDA:	Fluoresceindiacetat
GM-CSF:	Granulozyten-, Makrophagenkolonien stimulierender Wachstumsfaktor
HGF:	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF:	Hypoxie-induzierter Faktor
HSS-HRP:	Streptavidin konjugiert an Horseradish Peroxidase
IHC:	Immunhistochemie
HE:	Hämatoxylin-Eosin
hMSC:	Humane, mesenchymale Stammzellen
OC:	Osteocalcin
PAP:	Peroxidase-Anti-Peroxidase
pASC:	Porcine, adipogene mesenchymale Stammzelle
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
pBSMC:	Porcine Knochenmarkstammzelle
PCLA:	Polycaprolactonsäure
PFA:	Paraformaldehyd
PHB:	Polyhydroxybutyrat
PI:	Propidiumiodid
PLGA:	Polylactid-co-Glycolidsäure
ROI	Region of interest
RP:	Rapid prototyping
RV:	Restvolumen (absolut)
STL:	Standard Tessellation Language (Standardschnittstelle von CAD-Systemen)
SV:	Restscaffoldvolumen (absolut)

TBS	Dreifachgepufferte Salzlösung
TCP:	Tricalciumphosphat
TGF- β :	Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF α :	Tumornekrosefaktor α
TV:	Gesamtvolumen
VOI:	Volume of interest
VEGF:	Endothelwachstumsfaktor
WST-1:	Water soluble tetrazolium (Proliferationsassay)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper zum Nachweis der osteogenen Differenzierung (OC) und der Neoangiogenese (CD31).....	19
Tabelle 2: Anteile der μ CT-morphologischen Strukturen am Gesamtvolumen. Anteilig zeigt sich das Knochenvolumen (BV) der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Die Leitschienenvolumina (SV) sind gruppenübergreifend vergleichbar repräsentiert. Das Volumen des intermediären Bindegewebes ist in der Kontrollgruppe erhöht.....	43
Tabelle 3: Mittelwerte +/- Standardabweichung, Signifikanz mit * gekennzeichnet. TV in cm^3 , BV/TV, SV/TV und RV/TV in %, CD31 Absolutwerte an jeweils positiv gezählten Zellen, OC Anteil an positiv gefärbten Präparatflächen in %.....	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des „workflows“ beim <i>Tissue Engineering</i> . Initial steht die Gewebeentnahme als Quelle der Stammzellen. Es folgt die in vitro Isolierung, Expansion und spezifische Differenzierung der Zellen. Darauf folgt die Leitschienenbesiedlung und schließlich die Re-Implantation, nach Probst et al., 2013 [20].	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Tricalciumphosphatleitschiene (A). Fertig gestelltes Leitschienenkonstrukt (B). Darstellung der Mikroarchitektur mit einer Kanalgröße von ca. 500 µm und einer Mikroporengröße von 10-30 µm, nach Cornelsen et al., 2017 [40].	5
Abbildung 3: Personalisierte Leitschienenkonstruktion durch RP. Auf Basis eines segmentierten CT-Datensatzes wird eine individualisierte CAM-gefertigte Leitschiene hergestellt, nach Schieker et al., 2006 [44].	7
Abbildung 4: ASCs in <i>Alizarin-Red-Assay</i> (A-D) und <i>Oil-Red-O Assay</i> (E-H) als Nachweis für deren erhaltene Pluripotenz. In der <i>Alizarin-Red-Färbung</i> stellt sich eine nodulär konfigurierte Verteilung des Farbstoffes und insgesamt eine gute osteogene Differenzierung dar. Das Potential in Adipozyten zu differenzieren ist erhalten. Abbildung modifiziert nach Schwarz et al., 2012 [66].	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Generierung eines CSD am Schweinekiefermodell. Postoperativer Zustand nach Defektsetzung (A). Auf Basis des segmentierten DICOM-Datensatzes aus der CT des osteotomierten Knochenstückes durch RP erzeugte Tricalciumphosphat-Polymer-Kompositleitschiene (B). 3D-Rekonstruktion des CSD im Unterkiefer und der Leitschiene (C). Individualisierte Leitschiene (D), nach Probst et al., 2013 [20].	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studiendesigns. Von den anfänglichen 16 Tieren wurden 13 Tiere in die Auswertung miteinbezogen. Ein Tier verstarb noch vor dem ersten Eingriff. Zwei weitere Tiere zeigten lokale Entzündungsreaktionen, sodass diese ebenso ausgeschlossen wurden.	13
Abbildung 7: Chronologische Skizzierung des Versuchsaufbaus.	14
Abbildung 8: Isolierte ASCs in Passage 0. Ausbildung tubulärer Zellfortsätze (1). Prominent dargestellt sind die Zellkerne (2). Im weiteren Expansionsverlauf formierten sich kleinere Zellcluster (3).	21
Abbildung 9: Entfernung des Unterkiefers post mortem zur anschließenden immunhistochemischen Analyse (A). Über Osteosyntheseschrauben ist die Rekonstruktionsplatte entlang des Ramus mandibulae fixiert (B). (C) und (D) zeigen die osseointegrierte, stammzellbesiedelte Leitschiene.	28
Abbildung 10: Definierung der <i>Region of Interest</i> (ROI) für die Bildanalyse. Durch Bestimmung der ROI für die jeweilige Schnittebene kann das VOI bestimmt werden.	30

Abbildung 11: ASCs mit von A nach D sukzessive zunehmender Zelldichte. Die sogenannte Konfluenz der ASCs steigt von ca. 30 % (A) bis zu ca. 80-90% (D) (jeweils 20x Vergrößerung).....	35
Abbildung 12: <i>Live-Dead-Assay</i> MSC (A)- und ASC (B)-besiedelter Leitschienen (1,25 x und 10x Vergrößerung). Die äußeren Anteile des Gerüsts zeigen sowohl bei den MSCs (A) als auch auf den ASCs (B) deutlich mehr lebende Zellen (flächig grün fluoreszierendes Zellnetzwerk) als tote Zellen (punktuelle, disseminierte rote Fluoreszenz). Abbildungen modifiziert aus Burian et al., 2017 [48].....	36
Abbildung 13: ASC-besiedelte Leitschiene, oberflächlich (A) und zentral (B) (10x Vergrößerung). In der vergleichenden Gegenüberstellung der peripheren (A) und der zentralen (B) ASC-Populationen zeigte der <i>Live-Dead-Assay</i> in inneren Leitschienenarealen deutlich mehr rote Fluoreszenz im Sinne von apoptotischen Zellen.	36
Abbildung 14: (A) zeigt die Verteilung der lebenden (grün) und der toten ASCs (rot) an äußeren Gerüstabschnitten. (B) stellt diese Verteilung im zeitlichen Verlauf für das Gerüstzentrum dar. An Tag 14 können signifikant mehr lebende Zellen an äußeren im Vergleich zu inneren Tricalciumphosphatgerüsten detektiert werden (Gerüstoberfläche: $44,08 \pm 4,38$ Zellen, Zentrum: $32,17 \pm 2,10$ Zellen, $p=0,0225$). Im Zentrum des Gerüsts sind nach 14 Tagen hochsignifikant mehr tote Zellen pro Gerüstfläche als an der Oberfläche zu erkennen (Gerüstoberfläche: $3,920 \pm 0,40$ Zellen, Zentrum: $9,25 \pm 0,71$ Zellen, $p<0,0001$).....	37
Abbildung 15: ASCs in <i>Alizarin-Red-Assay</i> (B). In der Kontrolle (A) findet keine osteogene Differenzierung statt. (B) zeigt hingegen eine flächige, teils nodulär betonte Verteilung des Farbstoffes und insgesamt eine gute osteogene Differenzierung dar. Es zeigen sich bereits osteonähnliche Formationen.....	38
Abbildung 16: Quantifizierung der <i>Alizarin-Red</i> -Farbstoffaufnahme auf den mit osteogen differenzierten ASCs besiedelten Leitschienenkonstrukten bei Besiedlungsbeginn und nach 14 Tagen. Es zeigt sich tendenziell eine höhere <i>Alizarin-Red</i> -Konzentration an der Gerüstoberfläche (rot kariert) als im Zentrum (rot ohne Füllung) sowohl nach einem Tag als auch nach 14 Tagen. An Tag 14 zeigt sich an der Gerüstoberfläche eine Konzentration des Alizarin-Red-Farbstoffs von $3,86 \pm 0,53 \mu\text{M}$, und im Zentrum von $3,43 \pm 0,41 \mu\text{M}$ ($p=0,53$).	38
Abbildung 17: Anteil des neu gebildeten Knochens am Gesamtvolumen in der VOI. In der Therapiegruppe findet eine signifikant erhöhte Knochenbildung statt.	39
Abbildung 18: Volumen residueller Leitschienenanteile. Die Volumina der residuellen Leitschienenanteile sind gruppenübergreifend relativ gleich verteilt.	40
Abbildung 19: Restvolumen des Granulations- und Bindegewebes. Die Therapiegruppe zeigt tendenziell geringere prozentuale Anteile an intermediärem Bindegewebe.	40
Abbildung 20: Vergleich eines Kontrolltieres (A) mit einem Therapietier (B). Koronare Schnittführung durch Defektbereich im Unterkiefer. (1) spongiöser Knochen, (2) kortikaler Knochen, (3) Leitschienenfragmente. Im Kontrolltier zeigt sich eine	

fehlgeschlagene Osseointegration mit einer bindegewebigen Ummantelung der Leitschiene, vergleichbar einer Fremdkörperreaktion. Im Randbereich des Defekts stellt sich eine diskrete Osteokonduktion dar. In (B) ist exemplarisch die nahezu vollständige Inkorporation der Leitschiene dargestellt. Es findet sowohl eine Osteogenese im Bereich des implantierten TCP-Gerüsts, als auch in den Randbereichen der Osteotomiegrenze eine Osteokonduktion statt.	42
Abbildung 21: Darstellung des Defektbereichs nach Leitschienenintegration in coronarer (A) und sagittaler (B) Schnitfführung. Die gelben Pfeilspitzen markieren umschriebene osteoinduktive Areale im Randbereich und im Zentrum der Leitschiene.	42
Abbildung 22: Anteil der OC+-gefärbten Präparatflächen (Kontrolle: $17,10 \pm 3,57$, Therapie: $27,98 \pm 2,81$, $p < 0,001$)	44
Abbildung 23: Zahl der CD31+ Zellen (Kontrolle: $25,17 \pm 7,96$, Therapie: $42,43 \pm 5,35$; $p = 0,02$).....	45
Abbildung 24: OC-Färbung eines Therapietiers (A, B) und eines Kontrolltiers (C, D). (A) Flächenhafte OC-Färbung der Schnittpräparate als Zeichen einer flächenhaften Knochenneubildung mit de-novo Synthese von lamellärer Knochen (rotes Rechteck in B).....	46
Abbildung 25: CD31-Färbung eines Therapietiers (A) und eines Kontrolltiers (B). In (A) Darstellung eines Anschnitts mehrerer Osteone und intraossärer Gefäße als Zeichen einer erhöhten Neoangiogenese.	47

1 Einleitung

1.1 Geschichte und Grundlagen des *Tissue Engineering*

Der Begriff *Tissue Engineering* wurde im heutigen Sinne erstmals 1991 von Vacanti verwendet [1]. In den darauffolgenden Jahren führte die Arbeitsgruppe um Vacanti und Langer erstmals Studien zur Herstellung funktioneller Surrogate für Gewebetypen in vitro durch. Dabei wurde versucht mit Hilfe von mit Chondrozyten besiedelten synthetischen biokompatiblen und biodegradierbaren Polymeren Knorpel herzustellen [2]. Langer und Vacanti sahen dabei das *Tissue Engineering* als interdisziplinäres Forschungsfeld, dessen Aufgabe es sei, Lösungsansätze zur Wiederherstellung von Form und Funktion verloren gegangener Gewebe zu erarbeiten [3].

Bis heute gilt bei der Rekonstruktion knöcherner Strukturen bei nicht selbst heilenden Defekten, sog. „*Critical-Size-Defekten (CSD)*“, die autologe Knochentransplantation als Goldstandard. Mit der Transplantation autologen Gewebes geht jedoch eine Hebedefekt-morbidität einher [4-10]. Hinzukommend kann bei entsprechend ausgedehnten Defekten das Gewebeangebot der Graftregion ein limitierender Faktor sein [8].

Obwohl seit längerer Zeit eine Reihe verschiedener allogener, xenogener oder keramik-basierter Knochenersatzmaterialien, wie unter anderem Hydroxylapatit oder demineralisierte Knochenmatrix klinisch eingesetzt werden, ist derzeit keines davon zur hinreichen- den Regeneration ausgedehnter Knochendefekte im Bereich des Gesichtsschädels im kli- nischen Alltag geeignet [11-13].

Das *Tissue Engineering* stellt eine innovative Therapiemöglichkeit ausgedehnter knö- cherner Defektsituationen dar. Bei diesem Verfahren wird das Ersatzgewebe vor dem

Einsatz im lebenden Organismus *in vitro* generiert. Das Prinzip der ektopen Gewebeproduktion und Implantation wird bereits sowohl in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Studien als auch im klinischen Setting erprobt [14-20]. Allerdings gilt es nach wie vor ein geeignetes Defektmodell für die prospektive klinische Implementation im Menschen zu etablieren und geeignete Kombinationen aus Knochenersatzmaterialien und Zelltypen für die jeweilige Fragestellung zu identifizieren.



Abbildung 1: Schematische Darstellung des „workflows“ beim *Tissue Engineering*. Initial steht die Gewebeentnahme als Quelle der Stammzellen. Es folgt die *in vitro* Isolierung, Expansion und spezifische Differenzierung der Zellen. Darauf folgt die Leitschienenbesiedelung und schließlich die Re-Implantation, nach Probst et al., 2013 [13].

1.2 Klinischer Einsatz des *Tissue Engineering*

Theoretisch hat das *Tissue Engineering* das Potential zum Gewebeersatz in unbegrenzter Menge sowie in beliebiger Größe und Form [3, 14]. Insbesondere die Entdeckung und Charakterisierung der humanen, pluripotenten, adulten mesenchymalen Stammzellen (hMSC), aber ebenso der adipogenen mesenchymalen Stammzellen (ASC) haben die For-

schung und die öffentliche Wahrnehmung des *Tissue Engineering* forciert. Auch die Verfügbarkeit dieser Zellentitäten sowie deren Plastizität und Proliferationsfähigkeit bieten großes Potential für den klinischen Einsatz.

Die Integrität des Skelettsystems ist entscheidend für die Funktion eines Organismus. Wenn diese nicht gegeben ist, kann eine Vielzahl von Beeinträchtigungen von funktionellen bis hin zu ästhetischen Defiziten auftreten [21]. Durch Traumata, hereditäre Anomalien oder Tumorerkrankungen bedingte Defekte erfordern die Rekonstruktion der ursprünglichen Anatomie zur Wahrung bzw. Wiederherstellung dieser Integrität. Dabei stellen autologe Transplantate die am häufigsten zur Anwendung kommende Lösung bei einer Vielzahl von Problemstellungen dar. Neben den Risiken und Komplikationen des operativen Eingriffs gilt es unter Umständen auch die Größe und Konfiguration des benötigten Transplantates zu berücksichtigen [4, 7].

Diese Konstellationen verstärken die Nachfrage der regenerativen Medizin an künstlich generiertem Gewebeersatz für den klinischen Einsatz. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems ist das *Tissue Engineering*. Dabei sollen durch ektopy Gewebeproduktion *in vitro* Transplantate erzeugt werden, die die Nachteile des autologen Gewebetransfers umgehen [19-21]. Dies ist durch die Kombination von dreidimensionalen Gerüsten mit proangiogenetischen oder osteogenen Proteinen bzw. Wachstumsfaktoren oder Stammzellen möglich, die osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzen [22-25].

Das Ziel des beschriebenen Ansatzes ist es, die Geweberegeneration zu verbessern bzw. Gewebe komplett, im Sinne einer *Restitutio ad integrum*, wiederherzustellen, indem die mechanische Funktion solange substituiert wird, bis das Reparaturgewebe weit genug differenziert ist, um die lasttragende Funktion zu übernehmen.

In der klinischen Praxis stellt vor allem die Rekonstruktion knöcherner Strukturen des Gesichtsschädels bei großdimensionierten Defekten nach Traumata oder Tumorresektionen eine große Herausforderung dar [19, 26]. Durch die enge Verknüpfung von funktionellen und ästhetischen Eigenschaften anatomischer Strukturen im Kopfbereich ist die exakt dimensionierte Rekonstruktion der morphologischen Verhältnisse essenziell für eine adäquate Rehabilitation durch das eingesetzte Transplantat [17, 27, 28].

1.3 Leitschienenkonstrukte als Trägermaterialien

1.3.1 Beschaffenheit der Leitschienenkonstrukte

In der Vergangenheit wurde von vielen Arbeitsgruppen versucht Leitschienenkonstrukte zu entwickeln, die als Trägermaterialien für Zellformationen oder Wachstumsfaktoren dienen und für die präklinische oder klinische Anwendung geeignet sind [29-32]. Die Kombination einer organischen Matrix und einer Stammzellentität ist das am weitesten verbreitete Verfahren für die Regeneration verschiedener Gewebetypen. Das Prinzip hinter dieser Methodik geht auf die Kombination der osseinduktiv bzw. proliferativ wirkenden Zellen mit einem primärstabilen Gerüst in Form einer Matrix zurück. Häufig verwendete Matrizen stellen Hydrogele oder 3-dimensional konfigurierte Scaffolds bzw. Leitschienen basierend auf einer aus Korallen, Hydroxylapatit oder aus Tricalciumphosphat bestehenden Struktur dar [32, 33]. Vor diesem Hintergrund werden Anforderungen zur Beschaffenheit an die Leitschienenkonstrukte gestellt. Es wird eine Porosität der Gerüststruktur vorausgesetzt, die die Zelladhärenz und die Gefäßeinsprossung im Verlauf der Expansion und Differenzierung der applizierten Zellen in vivo ermöglicht. Es wurde bereits gezeigt, dass dies relevanten Einfluss auf die spätere Knochenformation nimmt

[31]. Um eine Balance zwischen einer guten Resorbierbarkeit der Leitschiene (Porengrößen zwischen 0,1-10 μm) und einer guten regenerativen Kapazität zu finden (Porengröße größer als 20 μm), gilt es die Mikroarchitektur der Leitschiene gut abzustimmen [34, 35]. Die Gerüstformation muss eine gewisse Stabilität und ein bestimmtes Resorptionsintervall besitzen, welche die Primärstabilität vor allem in lasttragenden Bereichen nicht gefährden, aber ebenso die restlose Integration in den Gewebeverbund in einem gewissen Zeitraum ermöglichen [36]. Zur weiteren Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Leitschienenkonstrukte sowie der Stabilität, der Biokompatibilität und der Resorbierbarkeit, können diese mit Polymeren infiltriert werden wie beispielsweise Polycaprolactonsäure (PCLA), Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) oder Polyhydroxybutyrat (PHB) [37-39]. Neben der stabilisierenden Funktion der Leitschienen nimmt die Oberflächen- und Binnenstruktur eine wichtige Rolle zur osteogenen Differenzierung und Vaskularisierung der Stammzellen ein.

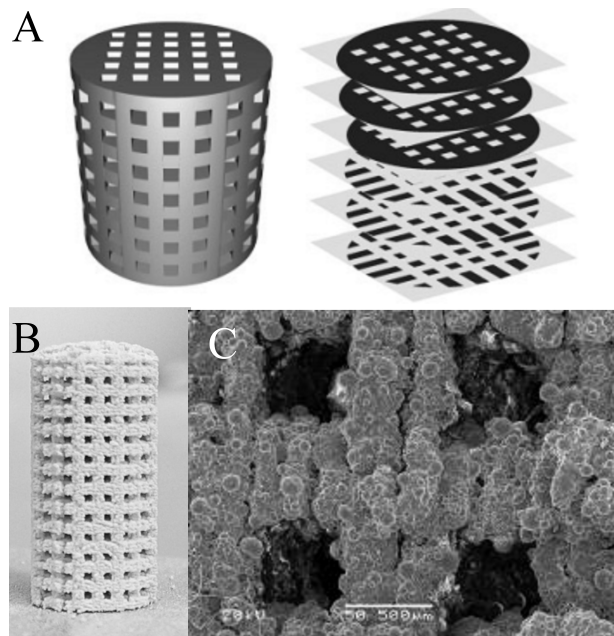


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Tricalciumphosphatleitschiene (A). Fertig gestelltes Leitschienenkonstrukt (B). Darstellung der Mikroarchitektur mit einer Kanalgröße von ca. 500 μm und einer Mikroporengröße von 10-30 μm , nach Cornelsen et al., 2017 [40].

1.3.2 Personalisierte Leitschienenkonstruktion

Die bedarfsgerechte Herstellung der Leitschienen erfordert eine der individuellen Ausgangssituation angepasste Gerüstkonfiguration. Die thematisierte stabilisierende Eigenschaft der Konstrukte ist nur durch eine gute Defektpassgenauigkeit zu erreichen. Besonders die komplexen morphologischen Gegebenheiten im Kiefer-, Gesichts- und Schädelbereich stellen einen hohen Anspruch an die Dimensionsgenauigkeit und Struktur der Leitschienen. Die disziplinübergreifend etablierte CAD/CAM-Technologie zur personalisierten Gerüstanfertigung bietet sich dabei als präzise Methodik an [41]. Dabei erfolgt nach einer dreidimensionalen, bildgebenden Diagnostik der Import und die Weiterverarbeitung der akquirierten Daten in einem 3D-Bildbearbeitungsprogramm. Nach der Segmentierung der Defektsituation wird ein virtuelles Gerüst-Modell zur Rekonstruktion durch *computer-aided design* (CAD) erstellt. Anschließend wird auf Basis der generierten CAD-Daten das reale Gerüstkonstrukt durch *computer-aided manufacturing* (CAM) mittels *rapid prototyping* (RP) Technologie gefertigt. Durch RP Technologien ist es neben der anatomisch individualisierten Erstellung von Gerüsten auch möglich Gerüstkonstrukte mit definierten Materialeigenschaften und bestimmter poröser Binnenarchitektur zu fertigen [13, 42, 43]. Nach Akquirierung des DICOM-Datensatzes erfolgt die Rekonstruktion und Segmentierung des Defektes. Auf Basis dieser Information wird die Leitschiene hergestellt.

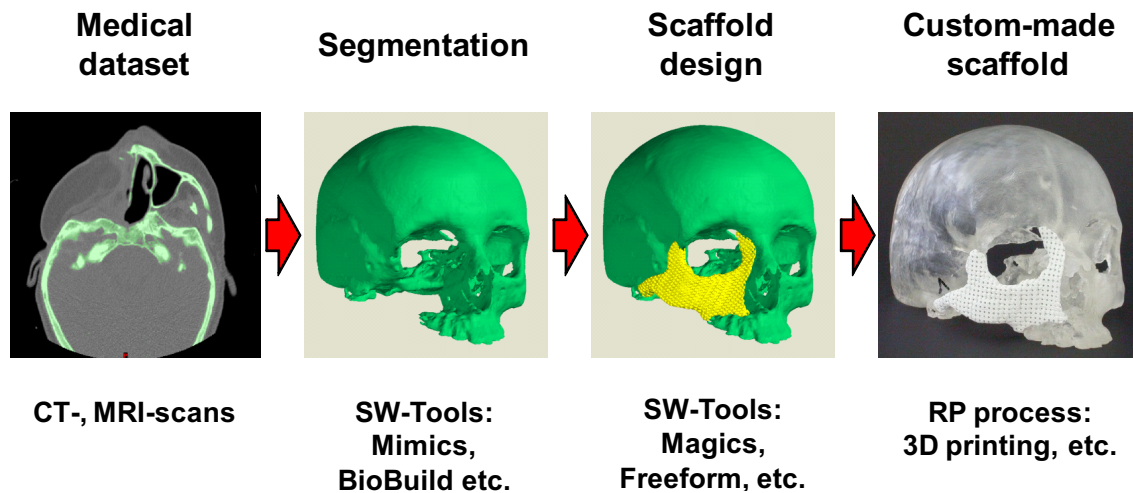


Abbildung 3: Personalisierte Leitschienenkonstruktion durch RP. Auf Basis eines segmentierten CT-Datensatzes wird eine individualisierte CAM-gefertigte Leitschiene hergestellt, nach Schieker et al., 2006 [44].

1.4 Verwendung von Stammzellen im *Tissue Engineering*

Die Verfahren des *Tissue Engineering* stellen eine aussichtsreiche Alternative sowohl zur Verwendung konventioneller Knochenersatzmaterialien als auch zu autologen Rekonstruktionstechniken dar. Zur in vitro Regeneration des für eine bestimmte Region benötigten Knochengewebes erfolgt initial beispielsweise die Entnahme von Knochenmark oder Fettgewebe, um die darin enthaltenen mesenchymalen (MSCs) bzw. adipogenen (ASCs) Stammzellen zu isolieren, zu proliferieren und in die entsprechenden Zelltypen zu differenzieren [45-48]. Im Folgenden werden diese beiden Stammzellentitäten beschrieben und bezüglich ihrer Verfügbarkeit, Proliferationsfähigkeit und ihres osteogenen Potentials verglichen.

1.4.1 Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (MSCs)

Das wissenschaftliche Interesse an BMSCs ist stetig gewachsen und ihr Potential zur Knochenbildung wurde bereits durch zahlreiche Arbeitsgruppen gezeigt. Sie besitzen die

Fähigkeit in eine Vielzahl von mesenchymalen Gewebeentitäten wie Knochen, Knorpel, Fett und Muskel zu differenzieren [49]. Während diese Zellen leicht aus menschlichem Knochenmark isoliert werden können, ist aufgrund ihrer geringen Zahl eine *in vitro* Expansion vor der klinischen Anwendung notwendig [50].

In den vergangenen Jahren wurden die spezifischen Eigenschaften der BMSCs eingehend erforscht. Dabei zeigte sich, dass diese Zellentität neben der neoangiogenetischen, proliferativen ebenso eine hohe osteoinduktive Potenz bei nur geringer Hebmorbidity besitzt [51]. Neben diesen bekannten und in der Literatur gut belegten Eigenschaften wurde molekularbiologisch eine immunsuppressive Wirkung und anti-apoptotische Komponenten im Proteinexpressionsprofil der BMSCs belegt [52]. Diese Charakteristika wurden in einigen präklinischen Studien mit proonkogenen Wirkweisen in Verbindung gebracht. Im Osteosarkom- und Mammakarzinommodell der Maus zeigte sich durch BMSCs ein beschleunigtes Tumorwachstum und sogar eine verstärkte Metastasierungstendenz [53-55].

1.4.2 Adipogene Stammzellen (ASCs)

ASCs stellen wie BMSCs eine pluripotente Stammzellentität dar, die in Äquivalenz zu den BMSCs, in diverse Gewebetypen wie Knochen-, Knorpel- oder Muskelgewebe als auch in Gefäße ausdifferenzieren können [56]. In einigen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde für ASCs in Analogie zu BMSCs ein osteogenes und neoangiogenetisches Potential beschrieben, das bei der prospektiven klinischen Implementation eine große Rolle spielt [57, 58]. Sie weisen ebenso die Fähigkeit auf in Osteoblasten zu differenzieren. Im Vergleich zu BMSCs können ASCs durch minimalinvasive Eingriffe in großen Mengen

bereitgestellt werden [13, 59, 60]. Zudem zeichnen sie sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff- und Nährstoffmangel aus [13, 48, 61]. In experimentellen Tierstudien wurde gezeigt, dass ASCs unter hypoxischen Bedingungen verschiedene antiapoptische und angiogenetische Mediatoren wie VEGF, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$, HGF, GM-CSF und bFGF exprimieren [62, 63]. Jedoch wurden ASCs, wie BMSCs, bei in vitro Untersuchungen und im Xenograft-Brustkrebsmodell der Maus mit onkogenen bzw. karzinogenen Mechanismen in Verbindung gebracht [64, 65].

Vor dem Hintergrund der unklaren Interaktion zwischen Stammzellen und residuellen Tumorzellen sind die Patientenanamnese und die Befundkonstellation vor klinischer Implementierung des beschriebenen Verfahrens zum Zwecke des Gewebeersatzes zu berücksichtigen.

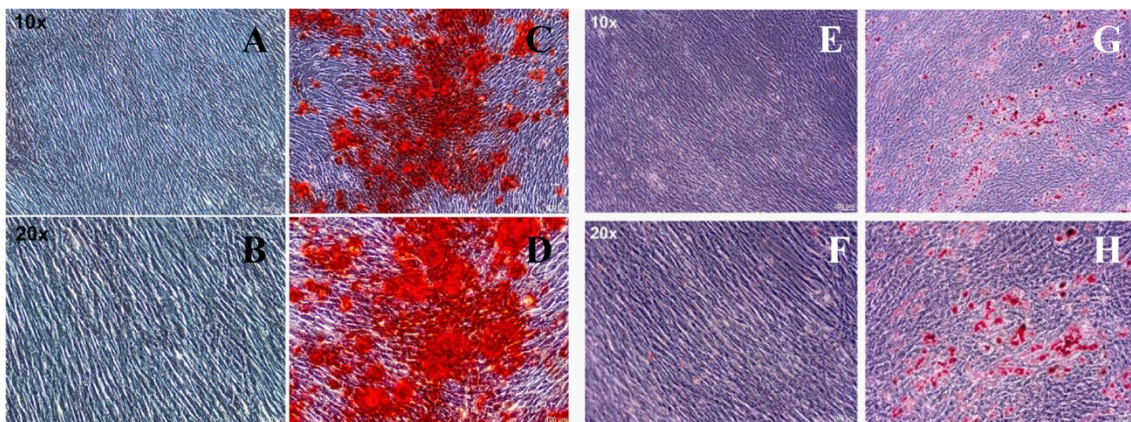


Abbildung 4: ASCs in *Alizarin-Red-Assay* (A-D) und *Oil-Red-O Assay* (E-H) als Nachweis für deren erhaltene Pluripotenz. In der *Alizarin-Red-Färbung* stellt sich eine nodulär konfigurierte Verteilung des Farbstoffes und insgesamt eine gute osteogene Differenzierung dar. Das Potential in Adipozyten zu differenzieren ist erhalten. Abbildung modifiziert nach Schwarz et al., 2012 [66].

1.5 Das orthotope „Critical-Size-Defektmodell“ im Minischwein

1986 beschrieben Schmitz und Hollinger den „Critical-Size-Defekt (CSD)“ als Defekt, der aufgrund seiner Ausdehnung vom Organismus nicht innerhalb einer Lebensspanne geheilt werden kann [67]. Häufig wird bei derartigen Defektkonfigurationen der Einsatz eines autologen Transplantates in Form von freien, mikrovaskulär anastomosierten, osteomyo-kutanen Lappen evaluiert. Hierbei umgeht man zwar Fremdkörperreaktionen, muss aber die je nach Ausdehnung des Hebedefekts in ihrer Häufigkeit und Ausprägung variierenden Risiken dieses formal zweiten chirurgischen Eingriffs bedenken [4, 7, 9].

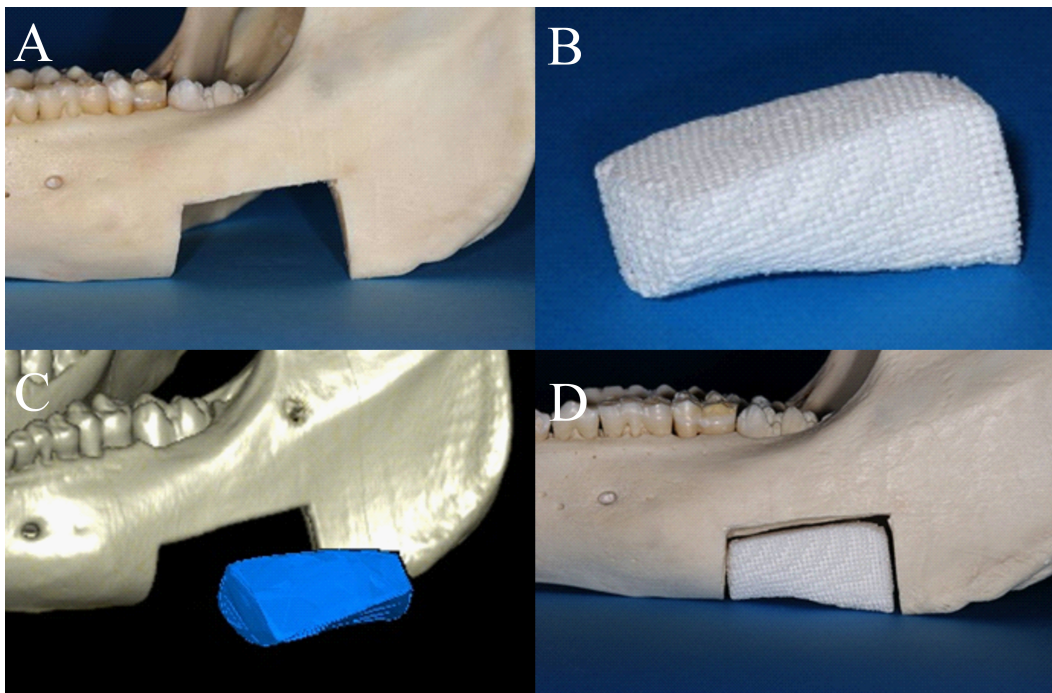


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Generierung eines CSD am Schweinekiefermodell. Postoperativer Zustand nach Defektsetzung (A). Auf Basis des segmentierten DICOM-Datensatzes aus der CT des osteotomierten Knochenstückes durch RP erzeugte Tricalciumphosphat-Polymer-Kompositleitschiene (B). 3D-Rekonstruktion des CSD im Unterkiefer und der Leitschiene (C). Individualisierte Leitschiene (D), nach Probst et al., 2013 [13].

1.6 Fragestellung

Das Ziel dieser Studie war die Evaluation des Applikationspotentials von CAD/CAM-gefertigten stammzellbesiedelten Tricalciumphosphat-Polymer-Kompositgerüsten in einem Großtiermodell. In Vorarbeiten erfolgte nach der Erarbeitung eines entsprechenden CAD/CAM-Workflows zunächst die Bestimmung der biologischen und mechanischen Eigenschaften von Tricalciumphosphat-Polymer-Kompositgerüsten [39, 48, 68]. Ein weiterer Teilschritt des Projekts war die Etablierung eines Konzepts zur Isolierung, Expansion und osteogenen Differenzierung von porcinen mesenchymalen und adipogenen Stammzellen (pBSMC und pASC). Nach Abschluss dieser Untersuchungen erfolgte die Umsetzung der gewonnenen Informationen in ein *in vivo* Modell. Die qualitative und quantitative Aufarbeitung der akquirierten Daten erfolgte durch immunhistochemische Analyse und durch Vermessung der μ CT-Datensätze.

Letztlich war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob es in einem Großtiermodell einen Unterschied in der knöchernen Regeneration von ausgedehnten Unterkieferdefekten zwischen stammzellbesiedelten Kompositleitschienen im Vergleich zu unbesiedelten Kompositleitschienen gibt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden gemäß den Richtlinien des National Institute of Health gehalten und versorgt. Die Versuche wurden nach Genehmigung durch das Sachgebiet für Veterinärwesen der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG, in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt (Gz. 55.2-1-54-2532-3-13). Für die Studie wurden 16 Münchener Trollschweine (Alter: 12-14 Monate, Gewicht: ca. 85 kg) verwendet, deren Knochenstoffwechsel physiologisch ist. Die Haltung der Tiere erfolgte in Schweineställen (n=2 Schweine pro Stall), bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 °C und einem natürlichen Tag-Nacht-Zyklus. Die Tiere wurden zweimal täglich gefüttert und konnten über eine Trinkvorrichtung ad libitum Wasser trinken. Nach den Operationen wurde das Futter mit Wasser zu einem Nahrungsmittelbrei gemischt, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern. Die Schweine wurden auf Stroh gehalten und in jedem Stall wurde ein Stück Weichholz platziert. Zusätzlich erhielten die Schweine farbige Plastikbälle. Postoperativ wurden die Schweine einzeln, aber mit Sichtkontakt zueinander gehalten und unter tierärztlicher Aufsicht nachbetreut und ggf. medikamentös behandelt. Alle Abschnitte dieses Manuskripts entsprechen den ARRIVE-Leitlinien zur Berichterstattung über Tierversuche [69].

2.2 Studiendesign

Nach der anfänglichen in vitro Erprobung eines geeigneten Leitschienen- und Stammzellmodells wurde im Rahmen des ersten operativen Eingriffs im Großtiermodell ein CSD am Corpus mandibulae rechts generiert [39]. Den Tieren der Therapiegruppe wurden zur Stammzellgewinnung ca. 20 g abdominelles Fett entnommen.

Der osteotomierte Knochenblock diente als CT-morphologische, voxelbasierte Matrix zur Herstellung der jeweiligen Leitschiene. Im Falle der Therapietiere wurde diese mit ASCs besiedelt. Beim zweiten operativen Eingriff wurde die jeweilige individualisierte Leitschiene wieder im Bereich des erzeugten Defekts implantiert. Nach 12 Wochen Einheilungs- und Konsolidierungszeit erfolgte die Opferung der Tiere, die konsekutive Probengewinnung und anschließenden Aufarbeitung der Daten.

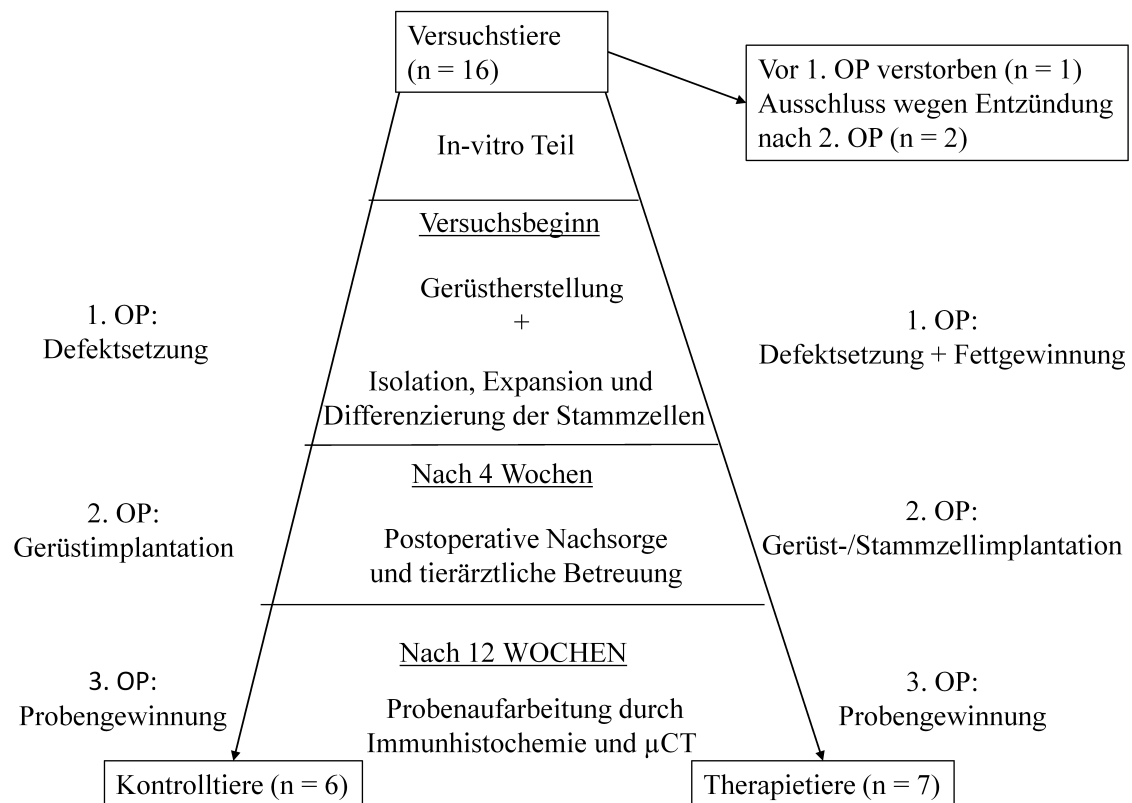


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Studiendesigns. Von den anfänglichen 16 Tieren wurden 13 Tiere in die Auswertung miteinbezogen. Ein Tier verstarb noch vor dem ersten Eingriff. Zwei weitere Tiere zeigten lokale Entzündungsreaktionen, sodass diese ebenso ausgeschlossen wurden.

2.2 Versuchsaufbau

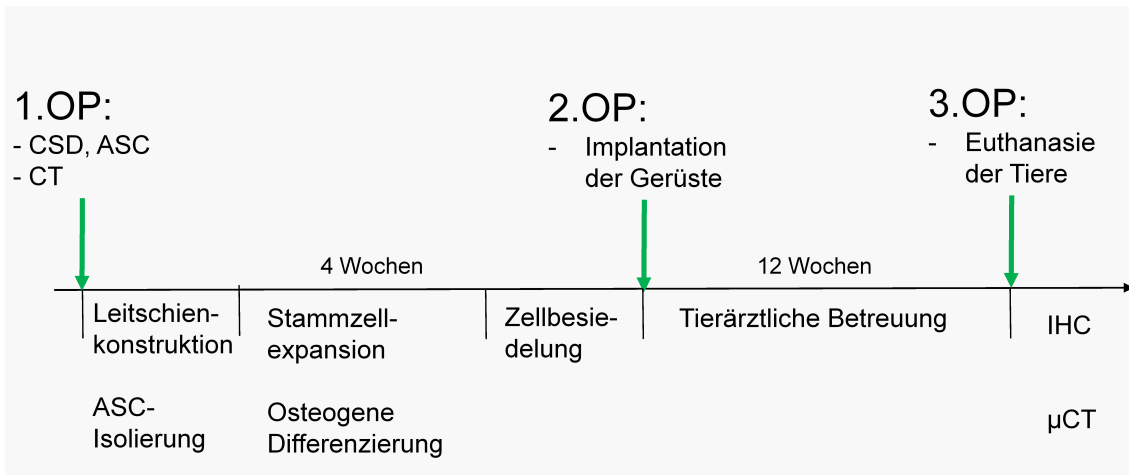


Abbildung 7: Chronologische Skizzierung des Versuchsaufbaus.

2.3 Verbrauchsmaterialien

Azeton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC-Farbstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
Cell & Tissue Staining Kit	HRP-DAB System, R&D Systems, McCinley, Kanada
Corning®Costar®Stripette	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytospinkammern BioRad	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
Desinfektionsspray (Propan-2-ol)	Bode, Hamburg, Deutschland
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf Reagenzgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eosinlösung 0,5%	Klinikumsapotheke, München, Deutschland
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoromount G	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glucose 5%	Braun, Melsungen, Deutschland
H ₂ O ₂ 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe, puderfrei	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Hematoxylin Gill's Formula H-3401	Vector, Burlingame, Kanada
Injectionsnadeln Microlance	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kaiser's Glycerin- Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Live/Dead Staining Kit II	Promokine, Heidelberg, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland

Mikroplattenleser	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Mundschutz	Barrier, Göteborg, Schweden
Na-Acetat-Puffer 0,1 M	Klinikapotheke, München, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
O ₂	Linde, Pullach, Deutschland
Objektträger Thermo Scientific	Menzel, Braunschweig, Deutschland
<i>Oil Red O</i> -Färbung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Osteogenesis quantification kit (ECM815)	Merck Millipore, Hessen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen	Nunclon™Surface, Roskilde, Dänemark
PBS 0,1 M	Klinikapotheke, München, Deutschland
Pipetboy®Comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Stickstoff flüssig	Messer, Krefeld, Deutschland
Tris-HCL-Puffer 0,5 mol/l	Klinikapotheke, München, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Xylol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
6-Well-Plats Multiwett™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Microtest™ U-Bottom	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.4 Arzneimittel

Amoxicillin-Trihydrat 11,5mg/kg	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
Amoxicillin-Trihydrat 200mg/kg	Chevita GmbH, Pfaffenhofen, Deutschland
Azaperon 1 mg/kg	Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Bepanthen® Augensalbe	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Carprofen 4 mg/kg	Rimady®, Pfizer Animal Health, New York, USA
Isofluran 1,5-2%	Intervet, Unterschleissheim, Deutschland
Ketamin 10 mg/kg	Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland
Metamizol 40 mg	Intervet, Unterschleissheim, Deutschland
Pentobarbital 450 mg/5 kg	Release®, WDT eG, Garbsen, Deutschland
Propofol 1%, 10 mg/ml	MCT Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Ulcogant®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (Rompun®) 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.5 Geräte und Programme

64-Zeilen CT	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Analysenwaage Pioneer™	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Analysenwaage PM4600	Mettler, Giessen, Deutschland
AxioObserver Z1	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Digitale Waage	Soehnle, Nassau, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland

Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Floureszenzmikroskop TCS-SP2	Leica, Solms, Deutschland
Kühlschrank 5 °C (K5)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Kyrostattmodell CM 1900	Leica, Bensheim, Deutschland
Luftstromschrank Uni Protect	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Mikroskop Standard 25	Zeiss, Ulm, Deutschland
Mikrowellengerät	Sharp, Hamburg, Deutschland
Mobiles Narkosesystem UniVet®	Groppler, Deggendorf, Deutschland
OsiriX	Pixmeo SARL, Bernex, Switzerland
pH- Messsonde MR3001K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
SPSS 21.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Sterilwerkbank LaminAir HLB2448GS/ HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Temperaturmessgerät	Rapid, Rimpar, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Cytospin Universa	Hettich, Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge Rotanda 46R	Hettich, Kirchlengern, Deutschland

2.6 Antikörper

Antikörper/ Detektions- systeme	Beschreibung	Verdün- nung
Anti-CD31	Primärantikörper monoklonal Kaninchen anti-CD31 (ab28364, Abcam)	1:50
Anti-Osteo- calcin	Primärantikörper monoklonal IgG Maus anti-Osteocalcin	1:10000
Anti-Anti- CD31	Ziege anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (BA-1000, Vector)	1:200
Anti-Anti- Osteocalcin	Pferd anti-Maus-Sekundärantikörper (BA-2001, Vector)	1:200

Tabelle 1: Antikörper zum Nachweis der osteogenen Differenzierung (OC) und der Neoangiogenese (CD31).

2.7 Leitschienenkonstruktion

2.7.1 Gerüsterstellung für in-vitro Teil

Alle verwendeten Leitschienenengerüste dieser Studie bestanden aus Tricalciumphosphat (TCP). Für den in-vitro Teil wurden standardisiert gefertigte, zylindrische TCP-PLGA Leitschienen mit einer Höhe von 20 mm und einer Breite von 10 mm (Volumen ca. 1,57 cm³) verwendet. Die Leitschienen waren durch interkonnektierende Kanäle mit einem Durchmesser von 450-500 µm gekennzeichnet. Die Gerüste wurden im Labor des Lehrstuhls für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik der Universität Rostock hergestellt [39]. Die Besiedlung der Leitschienenengerüste wurde wie unter 2.8.6 beschrieben durchgeführt.

2.7.2 Leitschienen für das Critical-size Defektmodell

Die morphologischen Charakteristika des im Rahmen des ersten operativen Eingriffs entnommenen Knochenstücks wurden durch eine Computertomographie erfasst und dienten im weiteren Verlauf als Template zur Erstellung eines passenden Trägergerüsts. Darauf

erfolgte der Import und die Weiterverarbeitung der gewonnenen Daten in einem 3D-Bildbearbeitungsprogramm. Hierfür wurde das Programm OsiriX® (Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz). Nach Segmentierung der Defektsituation wurde ein virtuelles Gerüst-Modell zur Rekonstruktion erstellt (CAD), im STL Format gespeichert und an den Lehrstuhl für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik der Universität Rostock versendet. Anschließend wurde auf Basis der generierten CAD-Daten das reale Gerüstkonstrukt mittels Rapid Prototyping (RP) Technologie gefertigt (CAM). Für den in-vivo Teil dieser Studie wurde so eine anatomisch individualisierte Gestaltung der Leitschienen mit anschließender Infiltration mit PLGA durchgeführt.

2.8 Zellkultur und in-vitro Teil

2.8.1 Stammzellisolation

Die Isolation der Stammzellen basierte auf dem von Yamamoto für murine ASCs beschriebenen Verfahren [70]. Gewonnen wurden die porcinen ASCs aus dem abdominalen Fett von 12 Wochen alten Hausschweinen. Genehmigt wurde diese Entnahme durch die Regierung von Oberbayern (55.2-1-54-2531.3-30-09). Nach dem Wiegen des gewonnenen Fettgewebes wurde es zerkleinert und mit 20 ml PBS mit 0,2% Kollagenase Typ II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) gemischt. Die enzymatische Verdauung des Gewebes wurde durch Inkubieren der Emulsion bei 37 °C für 45 Minuten induziert. Darauf folgte das Filtern der Zellsuspension durch ein 100 µm-Zellsieb. Anschließend wurde eine volumenäquivalente Menge (ca. 20 ml) Kulturmedium zur Suspension zugegeben. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 g für 10 Minuten), der Überstand entfernt und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Patricin (0,5 µg/ml) wurde beim ersten Durchgang zugesetzt. Die Zellen wurden daraufhin in T25-, T75- oder T225-Kolben übertragen. Das Zellmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

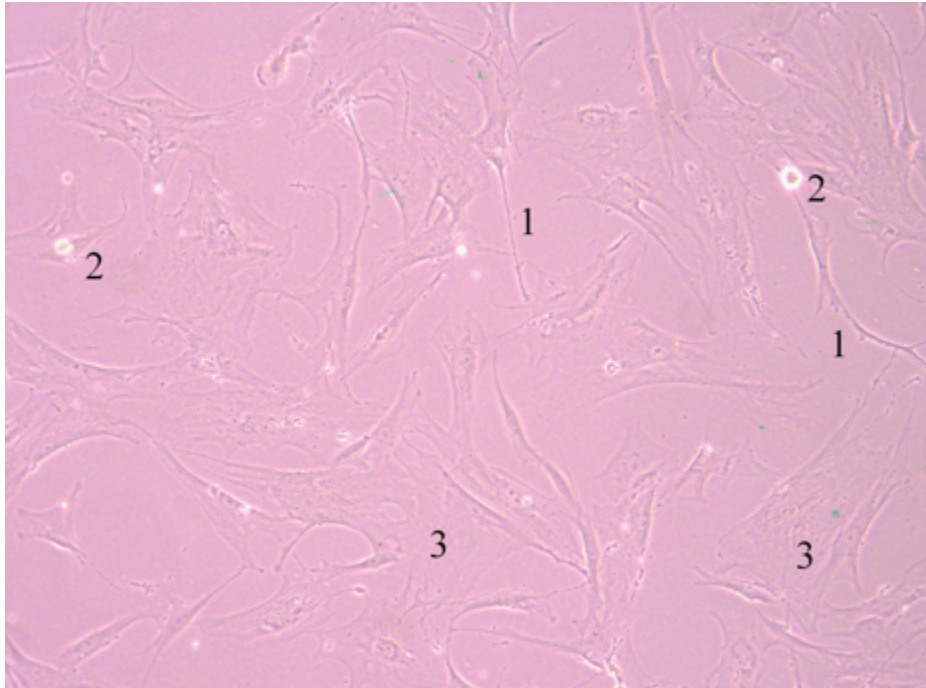


Abbildung 8: Isolierte ASCs in Passage 0. Ausbildung tubulärer Zellfortsätze (1). Prominent dargestellt sind die Zellkerne (2). Im weiteren Expansionsverlauf formierten sich kleinere Zellcluster (3).

2.8.2 Stammzellexpansion und-proliferation

Die isolierten Stammzellen wurden in alpha-modifiziertem *eaglemedium* (Gibco) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, Sigma-Alrich, St. Louis, MO, USA) und 1% Penicillin-Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) kultiviert. Die Zellen wurden jeweils in T25-, T75- oder T225-Flasks inkubiert. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Drei Tage nach der Isolierung wurde das Medium gewechselt, um den Stammzellen initial die Möglichkeit zur Adhärenz zu geben. Danach wurde das Kulturmedium zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden bei 80-90% Konfluenz subkultiviert und darauf trypsinisiert und gesplittet.

2.8.3 Proliferationsassay (*WST-1-Assay*)

Die Zellviabilität und damit indirekt die proliferative Aktivität der gewonnenen ASCs in den Zellkulturflasks oder nach der Besiedlung der Leitschienen wurde mit einem WST-Assay bestimmt. Die Applikation des WST-1-Reagens (PreMix Roche) auf die zu untersuchende Zellpopulation ermöglichte die Quantifizierung der Zellviabilität und damit indirekt der Zellproliferation mittels kolorimetrischem *Assay*. Die Messung basierte auf der Spaltung von Tetrazoliumsalzen durch mitochondriale Dehydrogenase in vitalen Zellen. Mit Hilfe eines ELISA Geräts wurde die Extinktion der Zellpopulation gegen eine Leerprobe gemessen und somit die Konzentration des entstandenen Formazanprodukts gemessen. Die Wellenlänge bei der Messung der Extinktion betrug 420-480 nm.

2.8.4 Zellüberleben/ *Live-Dead assay*

Das Zellüberleben wurde durch kombinierte Färbung mit Calcein-AM/EthD-III unter Verwendung des *Live-Dead Zell Staining Kit II* (Promokine, PK-CA707-30002, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Zellen wurden dazu in 35-mm-Petrischalen ($3,5 \times 10^4$ Zellen pro Well) für 24 Stunden kultiviert, um ihnen eine Adhäsion zu ermöglichen. Die Zellen wurden dann 7 Tage lang mit ZA, GGOH oder beiden behandelt. Darauf wurden die Zellmonoschicht zweimal mit PBS gewaschen und mit ausreichend Calcein-AM/EthD-III-Färbelösung bedeckt. Die Zellen wurden 30 bis 45 Minuten lang bei Raumtemperatur vor Licht geschützt inkubiert.

Anschließend wurden die Proben direkt nach der Färbung durch Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines AxioObserver Mikroskops, das mit einem 75 XBO W / 2 ausgestattet war, analysiert.

Lebende Zellen fluoreszierten grünlich, während sich tote Zellen rot färbten. Die Aufnahmen wurden mit einer Schwarz-Weiß-Digitalkamera, einem Zeiss Fluar 10x/0.50 Objektiv und mit der Axiovision Software, AxioVs40 V4.7.1-08-2008, verarbeitet. Die Analyse der jeweiligen Zellzahlen wurde unter Verwendung von „ImageJ“ durchgeführt (ImageJ 1.43i software, Image Processing and Analysis in JAVA, public domain, National Institute of Health, Bethesda, USA). Die Zellzahlen wurden in *high-power-fields* analysiert und an Tag 1, 7 und 14 bestimmt. Dazu wurden die Leitschienen entlang ihrer Längsachse geteilt und die Zellzahlen im Zentrum und an der Oberfläche ermittelt und verglichen.

2.8.5 Stammzellendifferenzierung

2.8.5.1 Osteogene Differenzierung

Die ASCs der vierten Passage wurden zunächst bis zu einer Zelldichte von 40.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (NUNC, Langenselbold, Deutschland) kultiviert. Die osteogene Differenzierung wurde nach 24 Stunden Inkubation mit normalem Zellmedium durch Zusatz von DMEM mit 10% FBS, Dexamethason (100 nM), Ascorbinsäure-2-phosphat (50 μ M) und β -Glycerophosphat-Disodium (10 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Penicillin / Streptomycin (40 IE / ml) induziert und über 21 Tage durchgeführt. Zellen, die in α -MEM ohne Zusätze zur Induktion der osteogenen Differenzierung inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Nach dem entsprechenden Differenzierungszeitraum erfolgte die Trypsinierung der Zellen und der Transfer auf die Leitschienenkonstrukte. Die Validierung der osteogenen Differenzierung wurde durch die *Alizarin-Rot*-Färbung zur Detektion von kalzifizierten Matrixablagerungen (Osteogenesis quantification kit: ECM815, Merck Millipore, Hessen, Germany) vorgenommen.

Zur Quantifizierung der *Alizarin-Rot*-Konzentration wurden 1,2 ml 10% (v / v) Essigsäure den Zellen in jedem Well zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter

Schütteln inkubiert. Die Zellmonoschicht wurde dann mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in ein 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Vortexen für 30 Sekunden wurde die Suspension für 10 Minuten auf 85 °C erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf Eis überführt. Anschließend wurde die Suspension dann bei $14.000 \times g$ für 25 Minuten zentrifugiert und 375 μ l des Überstands in ein neues 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Darauf wurden 150 μ l 10% (v / v) Ammoniumhydroxid zugegeben, um die Säure zu neutralisieren. Dann wurden 100 μ l des Überstandes in 96-Well-Platten pipettiert und die Absorption und Extinktion bei 405 nm unter Verwendung eines Mikroplattenlesers (Multiskan FC Plattenleser, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) gemessen. Mineralisierte Knötchen wurden mit Axiovert 40 CFL Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) visualisiert und fotografiert. Ein osteogener Quantifizierungskit wurde zur Quantifizierung der Färbung verwendet (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland).

Die exakte Bestimmung der Alizarin Red Konzentration wurde durch Erstellung einer Verdünnungsreihe von 2 mM bis 0,0313 mM Farbstoffkonzentration mit anschließender Intrapolation bzw. Extrapolation durchgeführt. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer RGB Farbkamera (AxioCam ICc3, Carl Zeiss, Deutschland) und einem Phasenkontrastobjektiv mit 10-facher Vergrößerung (A-Plan, Carl Zeiss, Deutschland) erstellt.

2.8.5.2 Adipogene Differenzierung

Zur Validierung des Stammzellcharakters der isolierten ASCs wurde die adipogene Differenzierung durchgeführt, um die erhaltene Pluripotenz nachzuweisen. Dazu wurden jeweils 8000 Zellen/cm² pro auf Kulturplatten kultiviert und adipogen differenziert. Das Induktionsmedium bestand aus DMEM mit 10 % FBS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin (40

IU/ml), Indomethacin (0.1 mM), Dexamethason (1 μ M), Isobutylmethylxanthine (IBMX) (0,05 mM) und Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (1 %). Die bei positiver Differenzierung entstandenen Fettvakuolen wurden mittels *Oil Red O*-Färbung nachgewiesen.

2.8.6 Leitschienenbesiedlung

Zur Gerüstbesiedlung wurden die für 21 Tage osteogen differenzierten Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in vollständigem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden unter Verwendung eines automatisierten Zellzählers gezählt, um eine Endkonzentration von $\sim 5 \times 10^3$ Zellen/ml Medium zu erreichen. Jedes Konstrukt und 1 ml Zellsuspension ($\sim 5 \times 10^4$ Zellen) wurden in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurde zur Besiedlung der Leitschiene folgendes Protokoll zur Drehung des Konstrukts verwendet:

Mit Medium benetzte Leitschienenengerüste wurden in Falcon-Röhrchen platziert und mit 1,5 ml der Zellsuspension beträufelt. Die Falcon-Röhrchen wurden dann in eine Teflonzentrifuge geladen und mit einer niedrigen Drehzahl zentrifugiert, um die Zellen in die Gerüstinnenräume zu bewegen. Die Gerüste wurden unter Verwendung steriler Techniken entfernt, in ein Spinner-Röhrchen, das 125 ml Wachstumsmedium enthielt, überführt und 24 Stunden bei 40 rpm zentrifugiert [70].

2.9 Operationen, perioperatives Procedere und Probengewinnung

2.9.1 Erste Operation: Defektsetzung und ASC-Gewinnung

Für die in vivo Experimente wurden Münchner Trollschweine verwendet (n=16). Alle Operationen wurden in einer tierärztlich überwachten Allgemeinanästhesie durchgeführt. Nach intramuskulärer Sedierung mit Azaperon (1 mg/kg Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Ketamin (10 mg/kg Ursotamin, Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), erfolgte die intravenöse Applikation von Propofol (Propofol, 1 % 10 mg/1ml MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) über einen peripheren Venenkatheter in der lateralen Ohrvene zur Narkoseeinleitung. Darauf wurden die Tiere oral intubiert und eine Isoflurannarkose begonnen. Intermittierend wurde Atropin (0,05 mg, Atropinsulfat, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zur Kreislaufstabilisierung gegeben. Zur intraoperativen Schmerztherapie wurde den Tieren Metamizol (40 mg /kg, Vetalgin, Intervet Deutschland, GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) appliziert.

Als Antibiose erhielten die Tiere eine Stunde präoperativ 11,5 mg Amoxicillin-Trihydrat/kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht (Aucilin 150 mg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland). Postoperativ wurde den Tieren jeweils 11,5 mg Amoxicillin-Trihydrat/kg Körpergewicht zweimal täglich an drei aufeinanderfolgenden Tagen in den Nahrungsmittelbrei vermischt verabreicht (Amoxicillin-Trihydrat 200 mg/kg, Chevita GmbH, Pfaffenhofen, Deutschland).

Im Rahmen des ersten Eingriffs wurde bei allen Tieren ein „*Critical-Size-Defekt (CSD)*“, an der kaudalen Seite des Corpus mandibulae über einen äußeren submandibulären Zugang generiert. Nach stumpfer Präparation auf den Unterkieferrand und Ablösung und

Entfernen des Periostes im Bereich des umschriebenen Defekts erfolgte das Sägen des knöchernen Defektes unter Schonung des Mandibularkanals. Die durchschnittliche Defektgröße betrug dabei $7,15 \text{ cm}^3$ (Intervall: $5,58 - 8,80 \text{ cm}^3$). Bei den Tieren der Therapiegruppe ($n=7$) wurde hinzukommend noch jeweils ca. 20 g subkutanes, abdominelles Fett entnommen und in PBS asserviert. In der Kontrollgruppe ($n=6$) wurde nur der CSD für die anschließende Leitschienenimplantation gesetzt. Um postoperativ eine ausreichende die Stabilität zu gewährleisten und Unterkieferfrakturen zu verhindern, wurde eine lasttragende Osteosyntheseplatte (DePuy Synthes Matrix Mandible Ltd., West Chester, USA) an der lateralen Seite des Unterkiefers eingebracht.

Zur postoperativen Schmerztherapie wurde den Tieren Carprofen alle 12 Stunden für 3 Tage verabreicht (4 mg/kg, Rimady® Pfizer Animal Health, New York, USA). Präoperativ und für 3 Tage postoperativ wurde den Tieren das Antibiotikum Streptomycin gegeben (0,5 g, einmal täglich). Nun erfolgte die Leitschienenherstellung (siehe 2.7.2) und die Stammzellisolation und die Leitschienenbesiedlung (siehe 2.8.1, 2.8.2, 2.8.6). Es wurden jeweils zwischen 5×10^6 und 8×10^6 ASCs pro Leitschiene angesiedelt. Dies entspricht einer ungefähren Zahl von 1×10^6 ASCs pro 1 cm^3 Gerüstvolumen. [71]

2.9.2 Zweite Operation: Leitschieneneingliederung

Nach vier Wochen wurde die Implantation der stammzellbesiedelten und der unbesiedelten Leitschienen über den initial durchgeführten submandibulären Zugang durchgeführt. Das perioperative Procedere und das Anästhesieprotokoll entsprachen dabei dem des ersten Eingriffs. Den Tieren der Therapiegruppe wurden im Rahmen des zweiten Eingriffs eine stammzellbesiedelte Leitschiene implantiert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten

allein das Gerüst. Die Fixierung des Gerüsts erfolgte jeweils über eine Rekonstruktionsplatte (DePuy Synthes Matrix Mandible, West Chester, USA). Darauf erfolgte wiederum der schichtweise Verschluss der Wunde.

2.9.3 Opferrung der Tiere und Probenaufarbeitung

Die letzte Operation bzw. die Opferrung der Tiere erfolgte nach einer Dauer von 12 Wochen. Die Tiere erhielten dazu eine Sedierung mit Azaperon (1 mg/kg Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Ketamin (10 mg/kg Ursotamin, Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die Applikation von Pentobarbital (Release® 300 mg/ml, injectable solution, WDT eG, Garbsen, Deutschland) über die laterale Ohrvene. Darauf wurden die Unterkiefer entfernt, die Proben gewonnen und in Paraformaldehyd 4 % fixiert und aufbewahrt.

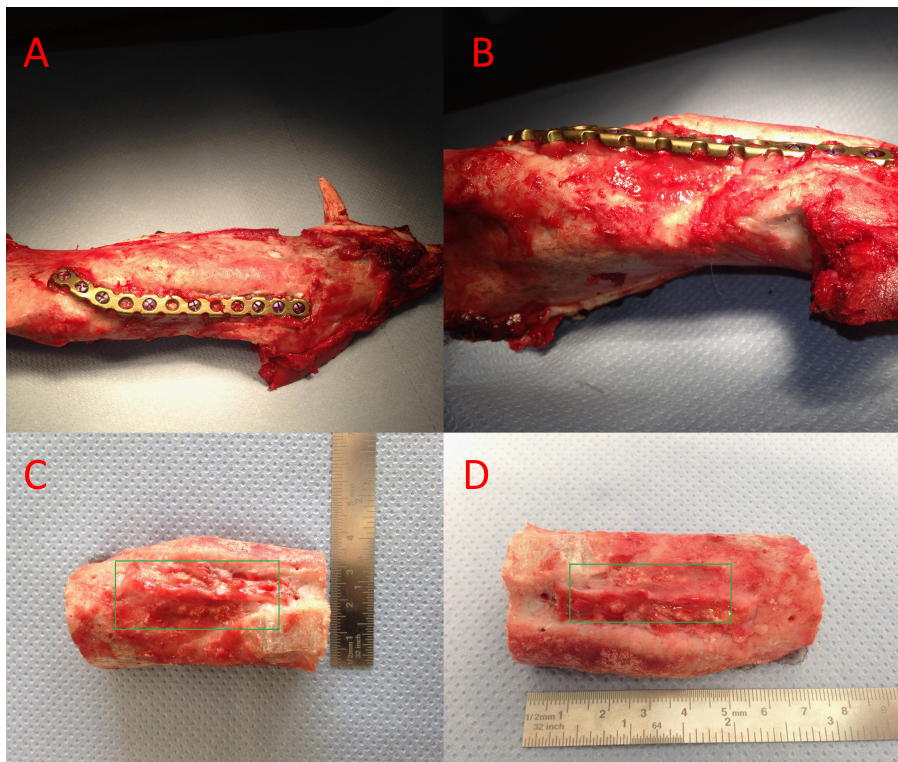


Abbildung 9: Entfernung des Unterkiefers post mortem zur anschließenden immunhistochemischen Analyse (A). Über Osteosyntheseschrauben ist die Rekonstruktionsplatte entlang des Ramus mandibulae fixiert (B). (C) und (D) zeigen die osseointegrierte, stammzellbesiedelte Leitschiene.

2.10 Bildgebung

2.10.1 CT und Rapid Prototyping (RP)

Zunächst war eine entsprechende Ermittlung der Defektdimensionierung mit dreidimensionaler CT-Bildgebung notwendig. Dazu wurde von dem osteotomierten Knochenblock ein CT-morphologischer DICOM-Datensatz akquiriert. Nach Segmentierung der CT-Daten erfolgte die Erstellung eines STL-Datensatzes mittels des Programms OsiriX Pixmeo (SARL, Bernex, Schweiz), der als Template zur Konstruktion einer Leitschiene mittels RP diente. Die STL-Datensätze wurden an den Lehrstuhl für Fluidtechnik und Mikrofluidik der Universität Rostock übertragen.

2.10.2 μ CT

Nach der Einschläferung der Tiere und der Probengewinnung erfolgte die Durchführung der μ CT-Analyse (μ CT80, Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz, räumliche Auflösung 80 μ m). Zur Verarbeitung der erfassten μ CT-Datensätze wurde das Programm OsiriX verwendet. Dazu wurde die in den Schweinen bei der ersten Prozedur entstandene originale Defektgröße voxelweise rekonstruiert. Die STL-Dateien, die in Größe und Form den eingesetzten Gerüsten entsprachen, definierten die Ausdehnung des ursprünglichen Defektes in der späteren μ CT-Analyse. So konnte das Ausmaß der lokalen osteogenen Konsolidierung nach der Gerüstimplantation im Rahmen des zweiten Eingriffs bestimmt werden. Die durch die akquirierten CT-Datensätze ermittelten Defektgrößen wurden in die μ CT-Daten implementiert und dienten als *Volume of Interest* (VOI) zur präzisen Größenbestimmung des verbleibenden Defekts und zur genauen Lokalisation von ossären Umbauprozessen und Konsolidierungen (Abbildung 10).

Zur Vereinfachung wurde in der μ CT-Analyse zwischen drei Gewebetypen unterschieden: Knochen (300-700 HU), übriges Gerüst (> 700 HU) und Bindegewebe (<300 HU). Eine Schwelle und eine Bandbreite für jeden Gewebetyp wurde bestimmt und absolut sowie prozentual in Verhältnis zum ursprünglichen Defektvolumen gesetzt.

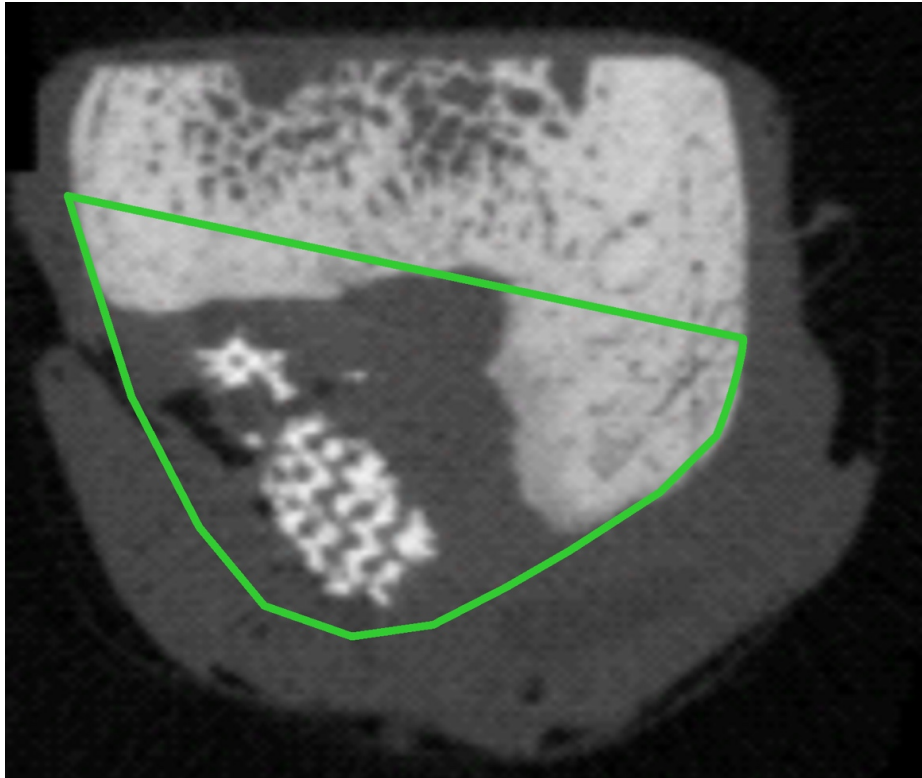


Abbildung 10: Definierung der *Region of Interest* (ROI) für die Bildanalyse. Durch Bestimmung der ROI für die jeweilige Schnittebene kann das *Volume of Interest* (VOI) bestimmt werden.

2.11 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Präparate für zwei Wochen in PFA (1,5%) inkubiert. Dann wurde der Entkalkungsprozess begonnen und an die umfangreiche Probengröße angepasst. Nach 12 Wochen Entkalkung wurde die Probe in Paraffin eingebettet und auf eine Schichtdicke von 8 μm geschnitten. Zur Quantifizierung der Osteoneogenese und Neoangiogenese wurden Hämatoxylin-Eosin-(HE-), Osteocalcin- und CD31-Färbungen durchgeführt.

2.11.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Für die HE-Färbung wurden die entparaffinierten Präparate zunächst für 5 Minuten in einer Hämatoxilinlösung nach Gill inkubiert und darauf zweimal für jeweils eine Minute in ddH₂O gespült. Danach wurden die Präparate für 5 Minuten in einer Eosinlösung (1 %) gefärbt. Anschließend wurden die Präparate in 80 % Ethanol fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe und zweimal fünf Minuten in Xylol-Ersatz inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

2.11.2 CD31-Färbung

Nach Entparaffinierung wurden die Gewebeproben mit 0,1 M Citratpuffer in der Mikrowellenbestrahlung bei 600 W demaskiert. Dann wurden die Proben mit dem primären Antikörper für 2 Stunden inkubiert (1:50, Kaninchen anti-CD31, polyklonales IgG, ab28364 Abcam, Cambridge, England). Nach dem Spülen und Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper für 60 Minuten aufgetragen (1: 200, Ziege Anti-Kaninchen-IgG, BA-1000 Vektor, Burlingame, USA). Ein kommerziell erhältliches Färbe-Kit wurde für das weitere Verfahren (EnVision + System HRP (AEC), DAKO GmbH, Deutschland) verwendet. Die Quantifizierung der CD31-Färbung wurde wie bereits von Schubert et al.,

2011 beschrieben durchgeführt [72]. Für die Analyse des mikrovaskulären Färbungsmusters als Korrelat für die Neoangiogenese wurden in jedem Präparat 10 *high-power fields* (0,16 mm² / Feld) bei 10-facher Vergrößerung unter Verwendung des Axiovert 40 CFL-Mikroskop bestimmt und mittels ZEN Software analysiert (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

2.11.3 Osteocalcin-Färbung

Zu Beginn wurden die Proben mit PBS gewaschen. Dann wurde der 1. Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (1: 10.000, monoklonaler Maus Anti-Osteocalcin-IgG, Ab13418 Abcam, Cambridge, England). Dann wurden die Proben erneut gewaschen und der 2. Antikörper wurde aufgetragen und bei Raumtemperatur inkubiert (1: 200, Pferde Anti-Maus-IgG, BA-2001 Vector, Burlingame, USA). Dann wurde Streptavidin konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HSS-HRP) zu den Proben für 30 Minuten zugegeben. Für den weiteren Färbeprozess wurde das Cell & Tissue Staining Kit (HRP-DAB-System, R&D Systems, McCinley, Kanada) gemäß Herstellerempfehlungen verwendet.

Die relative Osteocalcin-Färbung wurde innerhalb der Region von neu gebildetem Knochen gemäß dem Protokoll von Sawyer et al., 2009 beurteilt und quantifiziert [73]. Ein definierter Schwellenwert wurde ermittelt, um eine positive Färbung innerhalb von fünf zufällig ausgewählten Bereichen pro Probe unter Verwendung eines Axiovert 40 CFL Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) bei 10-facher Vergrößerung zu bestimmen. Die positive OC-Färbung wurde in Relation zur gesamten Knochenfläche bestimmt.

2.12 Statistik

Die im μ CT untersuchten Parameter waren Knochenvolumen, Gerüstvolumen und Restvolumen. In der Immunhistochemie waren es für die jeweilige Färbung die positiv gefärbten Strukturen. Die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchung werden als Mittelwerte mit Standardfehlern wiedergegeben.

Der t-Test wurde verwendet, um die zwei voneinander unabhängigen Probengruppen zu vergleichen. Eine statistische Signifikanz wurde einem Konfidenzinterfall von 95 % ($p < 0,05$) angenommen. Die Korrelationen zwischen den Parametern der Bildgebung und denen der Immunhistochemie wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Eine Fallzahlschätzung wurde mit Hilfe der Software G * Power Version 3.1.0 vorgenommen [74]. Gemäß dieser sollte ein Unterschied von 10 % bei BV/TV zwischen beiden Studiengruppen nachweisbar sein. Unter Annahme einer Standardabweichung von 6,5 % für BV/TV und eines α -Fehlers von 0,05 wurden 8 Tiere in beiden Gruppen benötigt, um mindestens eine statistische Trennschärfe („power“) von 0,8 zu erreichen.

3 Ergebnisse

Die Messungen durch das μ CT sowie die immunhistochemische Aufarbeitung wurden bei insgesamt 13 Tieren erfolgreich durchgeführt (Therapiegruppe, n=7; Kontrollgruppe, n=6). Eine initiale, autoregenerative Knochenbildung im Defektbereich musste vor der Leitschieneneingliederung durch eine selektive Osteotomie reduziert werden. Alle Leitschienen (n=13) konnten erfolgreich implantiert und über jeweils zwei Schrauben an den Osteosyntheseplatten fixiert werden.

3.1 In-vitro Ergebnisse

3.1.1 Zellproliferation, Zellviabilität (*WST-1-Assay*) und Zellüberleben (*Live-Dead-Assay*)

Die Zellzahl wurde nach Stammzellisolation und -expansion mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zielzellzahl wurde an das Volumen der zu besiedelnden Leitschiene angepasst. Pro 1 cm³ wurden 1x10⁶ Zellen benötigt. In der komparativen Analyse der proliferativen Kapazität und der Zellviabilität der ASCs und MSCs ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Beide Zellentitäten zeigten hinsichtlich ihrer Proliferation keine signifikanten Unterschiede bis zur vierten Passage. Im Vergleich der *Population Doublings Time (PDT)* war ebenso kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (MSC = 99,0 ± 45,5 Stunden, ASC = 81,0 ± 41,8 Stunden). Sowohl bei MSCs als auch bei ASCs waren keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Zellviabilität in Passage 3, 7, 9, 11 und 13 erkennen. ASCs kamen dabei auf eine mittlere optische Dichte beim *WST-1-Assay* von 106,9 % ± 41,7 %, MSCs auf 100,0 % ± 44,2 % [48].

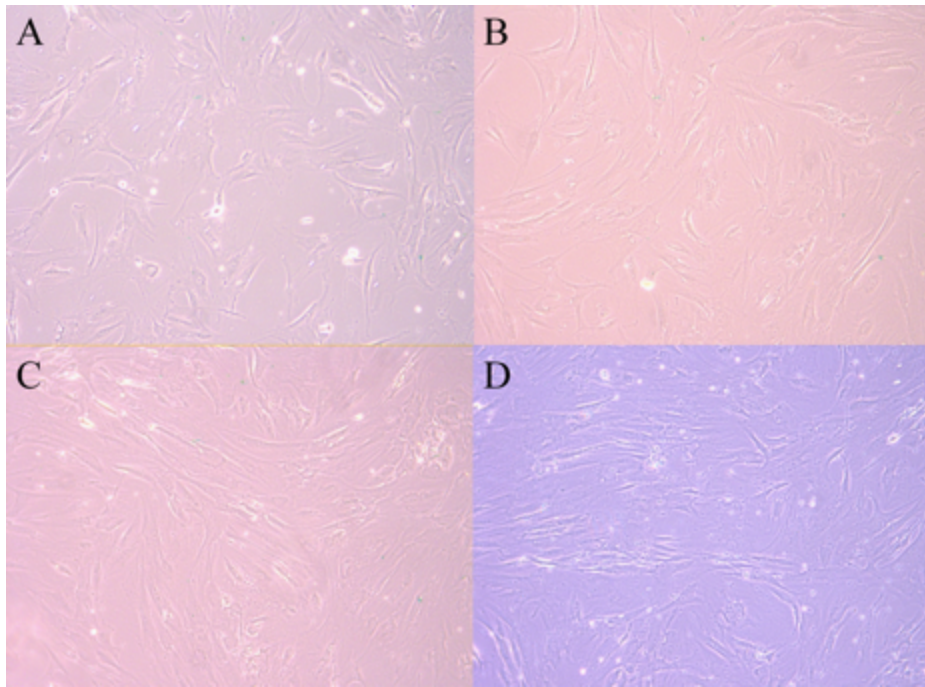


Abbildung 11: ASCs mit von A nach D sukzessive zunehmender Zelldichte. Die sogenannte Konfluenz der ASCs steigt von ca. 30 % (A) bis zu ca. 80-90% (D) (jeweils 20-facher Vergrößerung).

Abbildung 11 A zeigt die initiale Zelldichte der adhärennten ASCs wenige Tage nach Isolation und Beginn der Zellexpansion. Die Zellen wurden jeweils bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in einer Kulturschale besiedelt und dann passagiert. Zu Beginn der zellkulturell begleiteten Proliferation waren die Stammzellen noch eher nodulär konfiguriert. Mit voranschreitender Zellreife und Proliferation veränderte sich die Zellmorphologie hin zur Ausbildung von spindelzellartigen Ausläufern der Zellwand (Abbildung 8). Nach dieser Phase bildeten sich Zellaggregate mit mehreren Dutzend Zellen und die Konfluenz nahm zu (Abbildung 11 C und 11 D).

In den Abbildungen 12 bis 14 sind sowohl qualitativ als auch quantitativ die Unterschiede im Zellüberleben an äußeren und inneren Gerüststrukturen dargestellt. Kurz nach Besiedlung der Tricalciumphosphatkonstrukte mit ASCs waren die Unterschiede in der Verteilung der lebenden und toten Zellen im Vergleich zentraler zu peripheren Gerüststrukturen

noch diskret. Nach 14 Tagen waren jedoch signifikant mehr lebende Zellen an der Gerüstoberfläche (Gerüstoberfläche: $44,08 \pm 4,38$ Zellen; Zentrum: $32,17 \pm 2,10$ Zellen; $p = 0,0225$) und hochsignifikant mehr tote Zellen im Zentrum zu verzeichnen (Gerüstoberfläche: $3,92 \pm 0,40$ Zellen; Zentrum: $9,25 \pm 0,71$ Zellen; $p < 0,0001$).

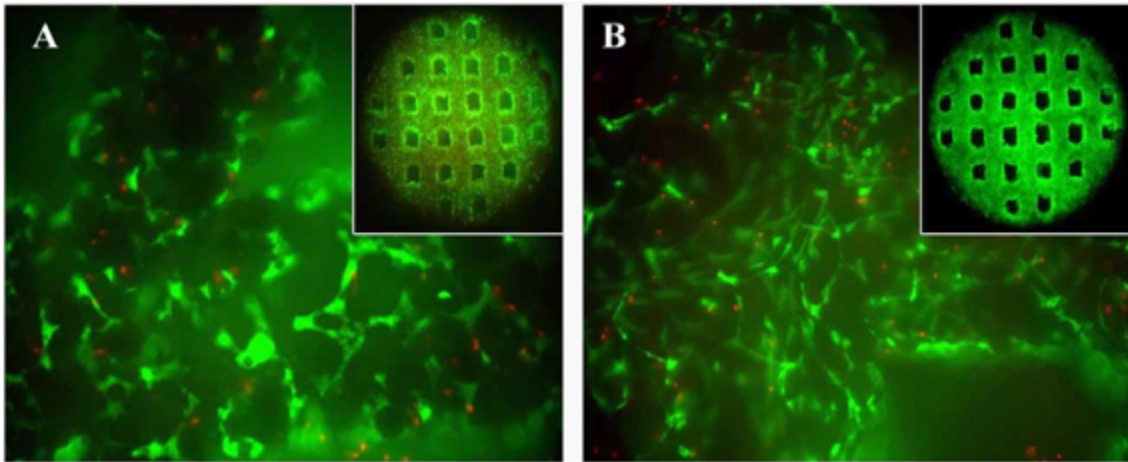


Abbildung 12: *Live-Dead-Assay* MSC (A)- und ASC (B)-besiedelter Leitschienen (1,25-facher und 10-facher Vergrößerung). Die äußeren Anteile des Gerüsts zeigen sowohl bei den MSCs (A) als auch auf den ASCs (B) deutlich mehr lebende Zellen (flächig grün fluoreszierendes Zellnetzwerk) als tote Zellen (punktuelle, disseminierte rote Fluoreszenz). Abbildungen modifiziert aus Burian et al., 2017 [48].

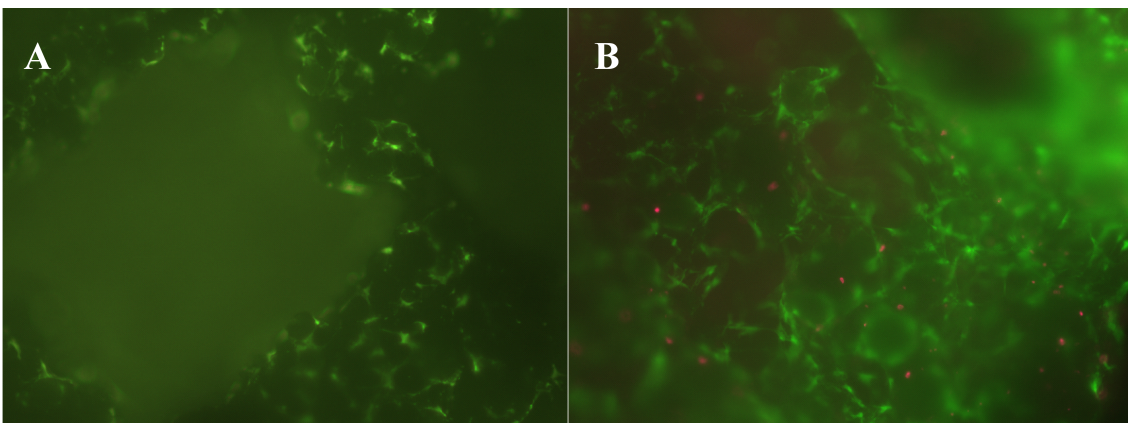


Abbildung 13: ASC-besiedelte Leitschiene, oberflächlich (A) und zentral (B) (10-facher Vergrößerung). In der vergleichenden Gegenüberstellung der peripheren (A) und der zentralen (B) ASC-Populationen zeigte der *Live-Dead-Assay* in inneren Leitschienenarealen deutlich mehr rote Fluoreszenz im Sinne von apoptotischen Zellen.

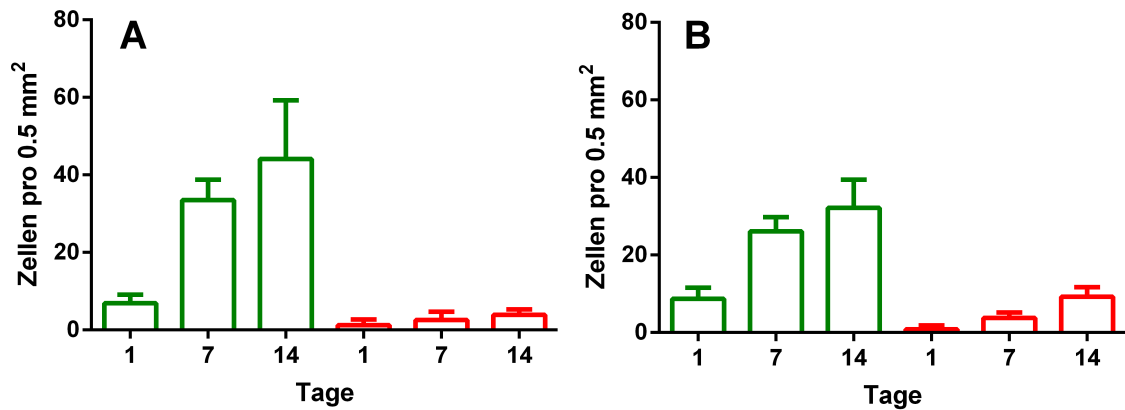


Abbildung 14: (A) zeigt die Verteilung der lebenden (grün) und der toten ASCs (rot) an äußeren Gerüstabschnitten. (B) stellt diese Verteilung im zeitlichen Verlauf für das Gerüstzentrum dar. An Tag 14 können signifikant mehr lebende Zellen an äußeren im Vergleich zu inneren Tricalciumphosphatgerüsten detektiert werden (Gerüstoberfläche: $44,08 \pm 4,38$ Zellen; Zentrum: $32,17 \pm 2,10$ Zellen; $p = 0,0225$). Im Zentrum des Gerüsts sind nach 14 Tagen hochsignifikant mehr tote Zellen pro Gerüstfläche als an der Oberfläche zu erkennen (Gerüstoberfläche: $3,920 \pm 0,40$ Zellen; Zentrum: $9,25 \pm 0,71$ Zellen; $p < 0,0001$).

3.1.2 Osteogene Differenzierung (*Alizarin-Red-Assay*)

Die Pluripotenz der isolierten und expandierten ASCs, d.h. die Kapazität der Zellpopulation sowohl in Osteoblasten als auch Adipozyten zu differenzieren, wurde mittels *Alizarin-Red-Assay* für die osteogene Differenzierung untersucht. Abbildung 15 B zeigte eine teils nodulär, teils flächig-konfluierend konfigurierte Rotfärbung eingelagerter Ca^{2+} -Matrixes im *Alizarin-Red-Assay* als Beweis der erfolgreichen osteogenen Differenzierung. Abbildung 15 A stellt die Negativkontrollen der *Alizarin-Rot-Färbung* dar.

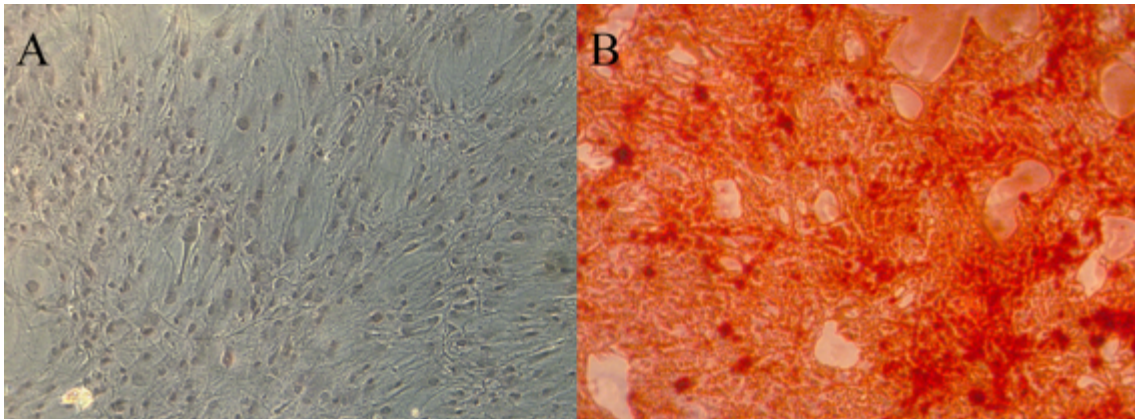


Abbildung 15: ASCs in *Alizarin-Red-Assay* (B). In der Kontrolle (A) findet keine osteogene Differenzierung statt. (B) zeigt hingegen eine flächige, teils nodulär betonte Verteilung des Farbstoffes und insgesamt eine gute osteogene Differenzierung dar. Es zeigen sich bereits osteonähnliche Formationen

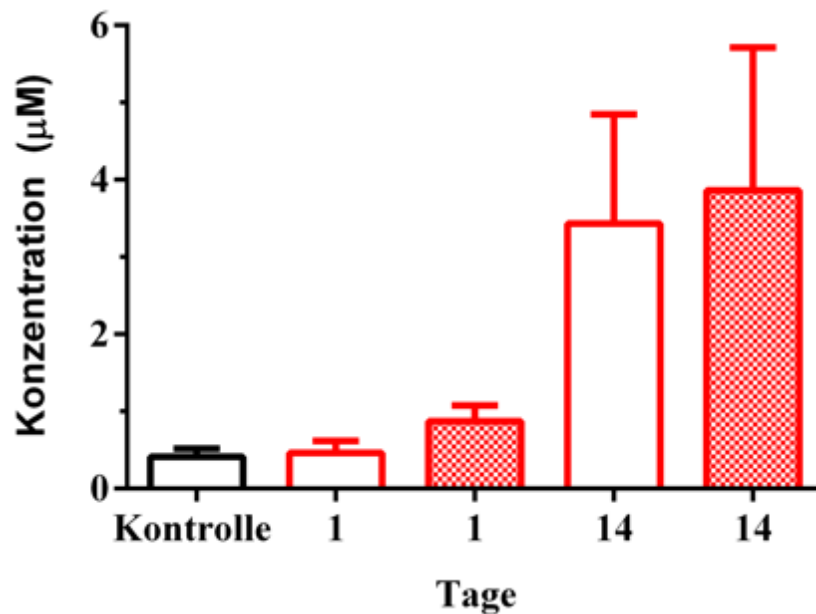


Abbildung 16: Quantifizierung der *Alizarin-Red*-Farbstoffaufnahme auf den mit osteogen differenzierten ASCs besiedelten Leitschienenkonstrukten bei Besiedlungsbeginn und nach 14 Tagen. Es zeigt sich tendenziell eine höhere *Alizarin-Red*-Konzentration an der Gerüstoberfläche (rot kariert) als im Zentrum (rot ohne Füllung) sowohl nach einem Tag als auch nach 14 Tagen. An Tag 14 zeigt sich an der Gerüstoberfläche eine Konzentration des *Alizarin-Red*-Farbstoffes von $3,86 \pm 0,53 \mu\text{M}$, und im Zentrum von $3,43 \pm 0,41 \mu\text{M}$ ($p = 0,53$).

3.2 In-vivo Ergebnisse

3.2.1 μ CT-Daten

Die Analyse der μ CT-Daten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe hinsichtlich des prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens (BV=*Bone Volume*) am gesamten Defektvolumen (TV= *Total Volume*) in dem definierten VOI. Bei der Kontrollgruppe war ein Knochenzuwachs von $22,4 \% \pm 9,85 \%$ im Vergleich zu $34,8 \% \pm 4,80 \%$ in der Therapiegruppe zu verzeichnen ($p = 0,026$) (Abbildung 17).

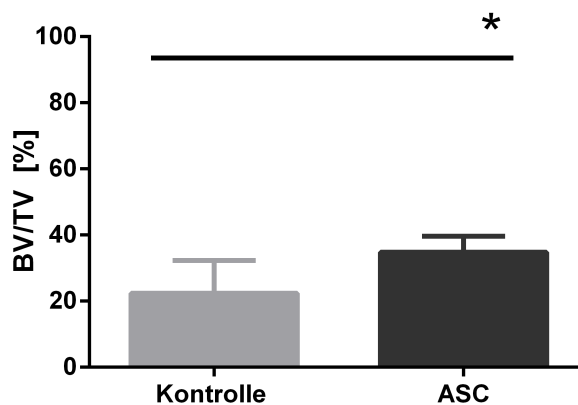


Abbildung 17: Anteil des neu gebildeten Knochens am Gesamtvolumen des VOI. In der Therapiegruppe findet eine signifikant erhöhte Knochenbildung statt.

Hinsichtlich des residuell verbleibenden, unvollständig resorbierten Leitschienengerüsts (SV=*Scaffold Volume*) gab es keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen (Kontrollgruppe: $16,98 \% \pm 20,98 \%$, Therapiegruppe: $13,69 \% \pm 8,83 \%$; $p = 0,7108$). In der Kontrollgruppe wurde nur jedes zweite Leitschienentransplantat regelrecht inkorporiert. Drei Tiere zeigten eine unvollständige bzw. allein minimale Integration der Leitschiene in den knöchernen Verbund (Kontrolltier 2 und 5). Im Bereich der VOI bei Tier 2 sind Leitschienenanteile von $57,9 \%$ am Gesamtvolumen zu erheben.

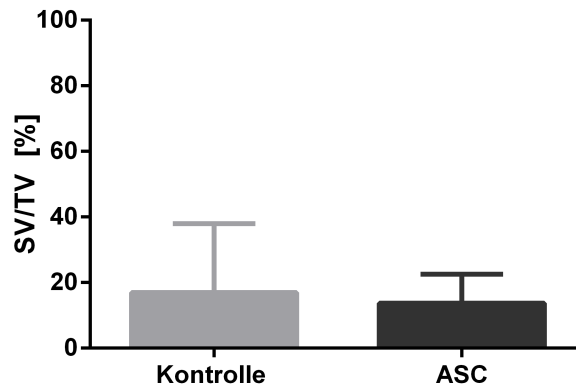


Abbildung 18: Volumen residueller Leitschienenanteile. Die Volumina der residuellen Leitschienenanteile sind gruppenübergreifend relativ gleich verteilt.

Neben den bereits verknöcherten Arealen und den residuellen Leitschienenanteilen konnte anhand der differierenden Dichtewerte eine weitere, mehrere Gewebetypen (Bindegewebe, reaktives Granulationsgewebe, narbige Verwachsung) subsumierende μ CT-morphologische Entität abgegrenzt werden (RV= hier vereinfacht als sog. „Rest Volume“ bezeichnet). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Therapiegruppe war der Anteil dieser Subklassifikation unter allen untersuchten Geweben am größten (Kontrollgruppe: 60,65 % \pm 13,92 %; Therapiegruppe 51,50 % \pm 8,74 %; $p = 0,1766$), ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu zeigen.

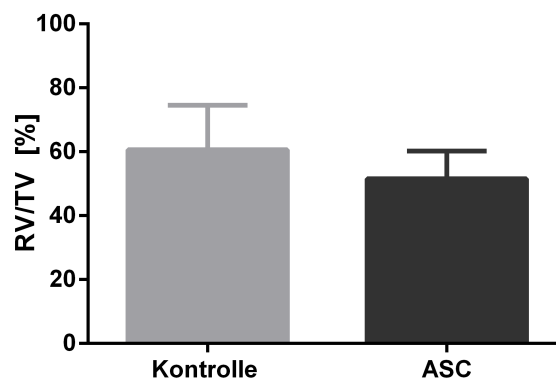


Abbildung 19: Restvolumen des Granulations- und Bindegewebes. Die Therapiegruppe zeigt tendenziell geringere prozentuale Anteile an intermediärem Bindegewebe.

An einer exemplarischen, komparativen Gegenüberstellung eines akquirierten Datensatzes eines Kontroll- (20 A) - und eines Therapietieres (20 B) ließen sich die herausgearbeiteten Unterschiede beider Gruppen veranschaulichen (siehe Abbildung 20). Zunächst wurde eine grobe Unterteilung des Unterkieferknochens in spongiösen (1) und kortikalen (2) Knochen und residuelle Leitschiene vorgenommen. In 20 A ist der allein partielle Abbau des Tricalciumgerüsts mit größtenteils beibehaltener Struktur und weichgewebiger Umkapselung zu erkennen. An den Osteotomieändern bilden sich reaktive Knochenappositionen. Im Vergleich dazu ist die Transplantatintegration in 20 B nahezu abgeschlossen. Es sind lediglich kleine, disseminierte Gerüstfragmente zu sehen, die jedoch bereits in den neu gebildeten lamellären Knochen integriert sind und im Zuge der knöchernen Inkorporation ihre ursprüngliche Morphologie nahezu komplett verloren haben. Durch die osteoinduktive und osteokonduktive Wirkung des Leitschienenkonstrukts scheint der neugebildete Knochen im Gegensatz zu 20 A in die Defektzone einzuwachsen, sodass es zu einer guten Integration des Transplantats kommt.

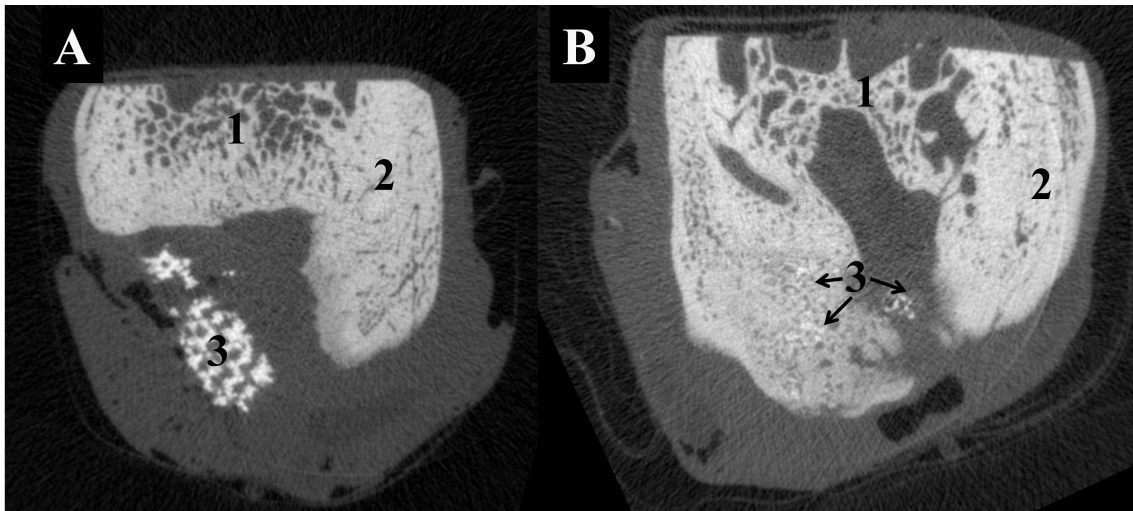


Abbildung 20: Vergleich eines Kontrolltieres (A) mit einem Therapietier (B). Koronare Schnittführung durch Defektbereich im Unterkiefer. (1) spongioser Knochen, (2) kortikaler Knochen, (3) Leitschienenfragmente. Im Kontrolltier zeigt sich eine fehlgeschlagene Osseointegration mit einer bindegewebigen Ummantelung der Leitschiene, vergleichbar einer Fremdkörperreaktion. Im Randbereich des Defekts stellt sich eine diskrete Osteokonduktion dar. In (B) ist exemplarisch die nahezu vollständige Inkorporation der Leitschiene dargestellt. Es findet sowohl eine Osteogenese im Bereich des implantierten TCP-Gerüsts, als auch in den Randbereichen der Osteotomiegrenze eine Osteokonduktion statt.

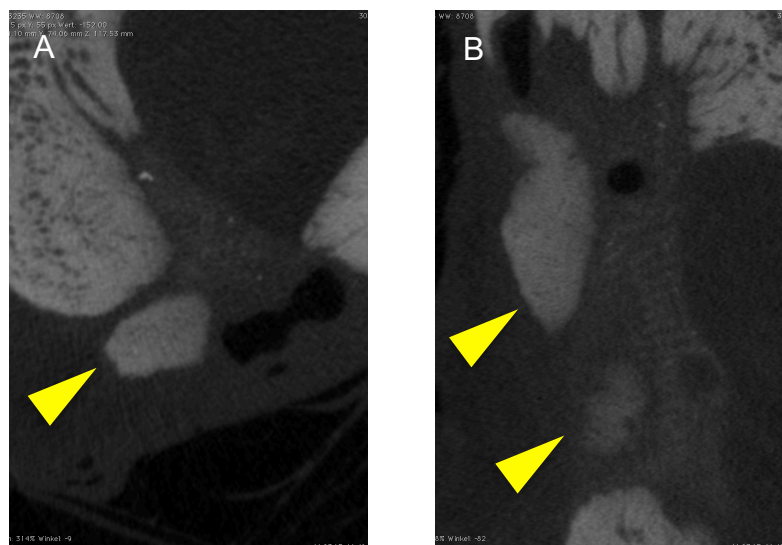


Abbildung 21: Darstellung des Defektbereichs nach Leitschienenintegration in einem Therapietier in koronarer (A) und sagittaler (B) Schnittführung. Die gelben Pfeilspitzen markieren umschriebene osteoinduktive Areale im Randbereich und im Zentrum der Leitschiene.

Die Probenaufarbeitung zeigte eine korrekte ossäre Integration des neu gebildeten Knochens in den Wirtsknochen. Dieser Prozess wird auch als Osseointegration bezeichnet. Eine de-novo-Osteogenese in den Gerüstzentren war bei allen Tieren der Therapiegruppe zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten nur 3 von 6 Tieren der Kontrollgruppe eine entsprechende Osseointegration. Eine de-novo-Osteogenese zeigten sich hingegen in dieser Gruppe nur 2 Tiere.

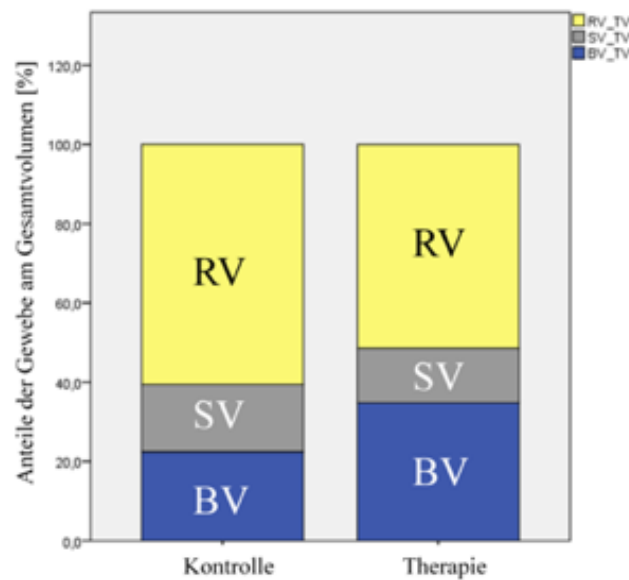


Tabelle 2: Anteile der μ CT-morphologischen Strukturen am Gesamtvolumen. Anteilig zeigt sich das Knochenvolumen (BV) der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Die Leitschienenvolumina (SV) sind gruppenübergreifend vergleichbar repräsentiert. Das Volumen des intermediären Bindegewebes ist in der Kontrollgruppe erhöht.

3.2.2 Immunhistochemie

Nach bildmorphologischer Analyse erfolgte die histologische Aufarbeitung der Präparate. Als Indikator der Osteogenese wurde die Expression von Osteocalcin (OC) in den definierten VOI gemessen und in Relation zur Gesamtfläche gesetzt. Bei jeder Art von Knochenneubildung ist neben der Bildung der Hartschubstanz die Vaskularisierung von großer Bedeutung. CD31 ist ein Protein das u.a. auf Monozyten, Thrombozyten, Osteoklasten und T-Zellen exprimiert wird, aber ebenso auf Endothelzellen, vor allem während deren Zellteilung vorzufinden ist. In der immunhistologischen Analyse hat sich CD 31 als Surrogatparameter zur Quantifikation der Neoangiogenese etabliert [75].

Hinsichtlich der OC-Färbung der beiden Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Therapiegruppe. In der Kontrollgruppe waren $17,10 \% \pm 3,57 \%$ der Präparatfläche OC+ gefärbt. In der Therapiegruppe hingegen waren es $27,98 \% \pm 2,81 \%$ ($p < 0,001$) (Abbildung 22). Analog der Verteilung der OC+ Präparatanteile zeigte CD31 eine spezifische in der Therapiegruppe kumulierende Verteilung mit einer signifikant höheren Anzahl an CD31+ Zellen als in der Kontrollgruppe (Kontrolle: $25,17 \pm 7,96$; Therapie: $42,43 \pm 5,35$; $p = 0,02$) (Abbildung 23).

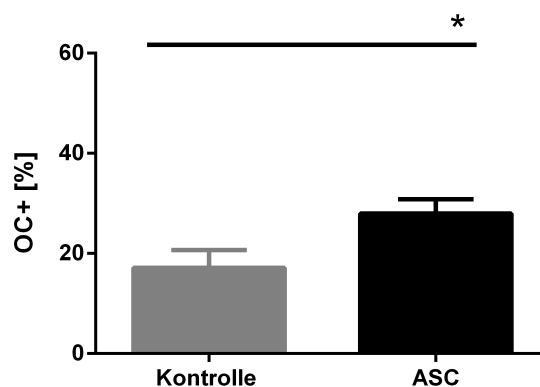


Abbildung 22: Anteil der OC+-gefärbten Präparatflächen (Kontrolle: $17,10 \pm 3,57$; Therapie: $27,98 \pm 2,81$; $p < 0,001$)

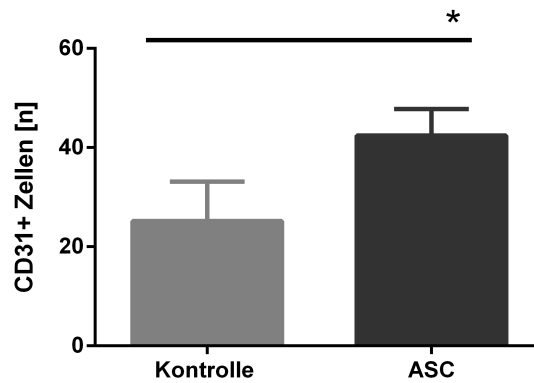


Abbildung 23: Zahl der CD31+ Zellen (Kontrolle: $25,17 \pm 7,96$; Therapie: $42,43 \pm 5,35$; $p = 0,02$).

An exemplarischen Schnitten beider Gruppen ließ sich die homogene OC+-Färbung großer Teile der Präparatflächen in der Therapiegruppe erkennen (Abbildung 24, siehe A). Im Vergleich dazu war die OC+-Färbung im Kontrollpräparat disseminierter und heterogener verteilt (Abbildung 24 C und 24 D). Hier fiel eine Tendenz zur periosteonären OC+-Akkumulation auf. Im Bereich der Grenzzone der Osteoneogenese waren charakteristische Konfigurationen der beteiligten Gewebe zu erkennen. Die Therapiegruppe (in 24 B rotes Rechteck) zeigte eine vom ortständigen Knochen in den Defektbereich penetrierende, unreife, reaktive Knochenform (lamellärer Knochen). Im zentralen Präparatteil konnten residuelle, noch nicht vollständig inkorporierte Leitschienenfragmente detektiert werden. Die Kontrollgruppe zeigte im unmittelbaren Grenzbereich der Defektzone sowohl eine partiell erhöhte OC+-Färbung als auch Areale mit lamellären Knochenformationen, Osteonen und Gefäßanschnitten. Unreife Knochenformen sind im Bereich der Markierung zu erkennen (24 B, rotes Rechteck). Im Vergleich zur Therapiegruppe kommt es bei der Kontrollgruppe zum gehäuftem Auftreten von Leukozyten (24 D, rotes Rechteck), hier im Speziellen: Granulozyten. Diese lokale inflammatorische Reaktion bzw. Granulation an den Grenzzonen des Defekts deutet auf eine fehlgeschlagene Transplantateinheilung hin.

Hinsichtlich der Neoangiogenese ließen sich anhand der immunhistologischen Färbungen ebenso Charakteristika beider Gruppen erarbeiten. In Abbildung 19 sind CD31+ Arterio-
len und Venolen zu erkennen. In der Therapiegruppe (25 A) ist im Vergleich zur Kon-
trollgruppe (25 B) die Anzahl der neu gebildeten Gefäße erhöht und das vaskuläre Netz-
werk als Ganzes nimmt einen größeren Anteil an der Gesamtfläche des Präparats ein.

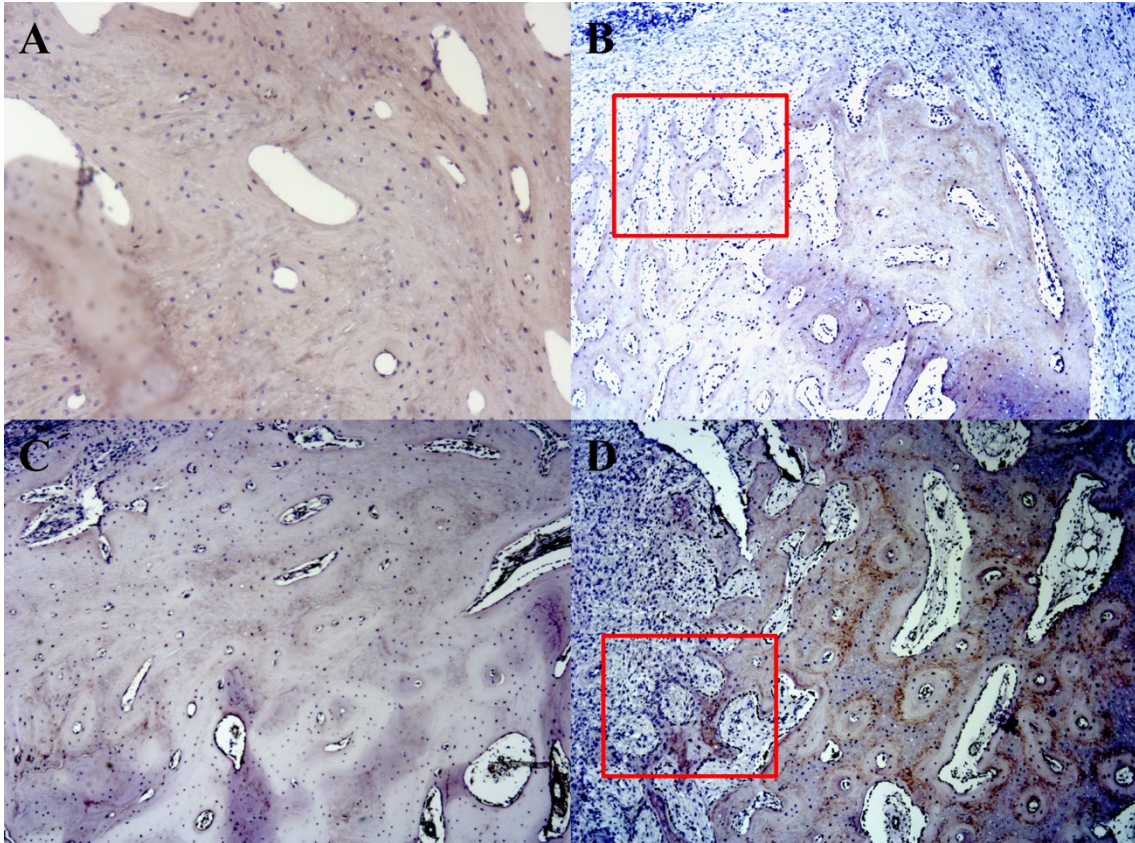


Abbildung 24: OC-Färbung eines Therapietiers (A, B) und eines Kontrolltiers (C, D). (A) Flächenhafte OC-Färbung der Schnittpräparate als Zeichen einer flächenhaften Knochenneubildung mit de-novo Synthese von lamellärer Knochen (rotes Rechteck in B).

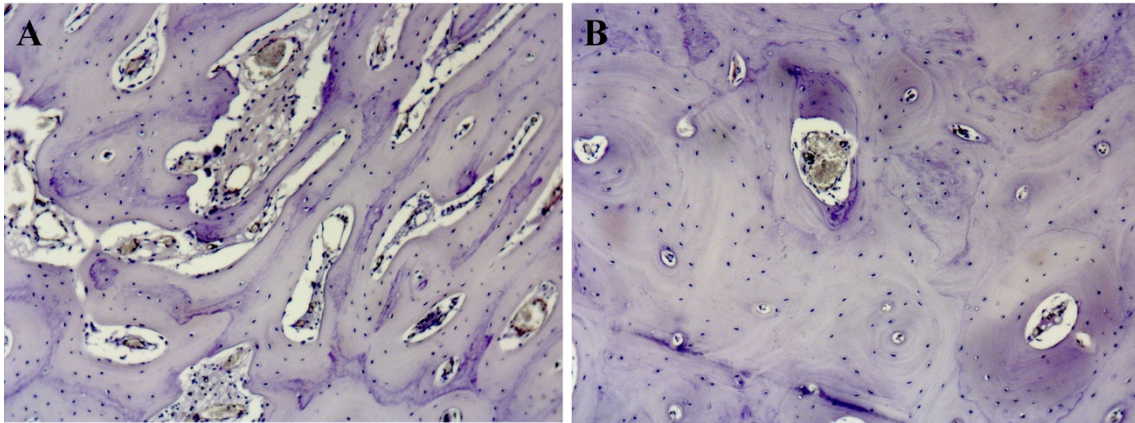


Abbildung 25: CD31-Färbung eines Therapietiers (A) und eines Kontrolltiers (B). In (A) Darstellung eines Anschnitts mehrerer Osteone und intraossärer Gefäße als Zeichen einer erhöhten Neoangiogenese.

3.3 Statistik und Korrelation der Daten

	Kontrolle	Therapie	
BV/TV	22,4 ± 9,85 %	34,8 ± 4,80 %	p < 0,05
SV/TV	16,98 ± 20,98 %	13,69 ± 8,83 %	p = 0,7108
RV/TV	60,65 ± 13,92 %	51,50 ± 8,74 %	p = 0,1766
CD31	25,17 ± 7,96	42,43 ± 5,35	p = 0,026
OC	17,10 ± 3,57%	27,98 ± 2,81%	p < 0,001

Tabelle 3: Mittelwerte +/- Standardabweichung, Signifikanz mit * gekennzeichnet. TV in cm³, BV/TV, SV/TV und RV/TV in %, CD31 Absolutwerte an jeweils positiv gezählten Zellen, OC Anteil an positiv gefärbten Präparatflächen in %.

Mit dem prozentualen Anteil des neu gebildeten Knochens im Bereich der ROI des jeweiligen Schnittbildes in der μ CT zeigte BV/TV einen signifikanten Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (p < 0,05). Ebenso unterschied sich die Anzahl an neu gebildeten Blutgefäßen und die prozentuale Fläche der jeweiligen Schnittpräparate

der beiden Gruppen signifikant. Die Ergebnisse wurden anschließend untereinander korreliert. Dabei ergab sich sowohl eine moderate positive Korrelation zwischen der Größe des Anteils an neu gebildetem Knochen mit der Expression von Osteocalcin (Pearson $r = 0,690$, $p = 0,009$), als auch eine starke positive Korrelation mit der Anzahl an CD31+ Zellen, als Indikator der Neoangiogenese (Pearson $r = 0,812$, $p = 0,001$). Die beiden histologisch erhobenen Parameter korrelierten ebenso signifikant positiv miteinander (Pearson $r = 0,8$, $p = 0,001$).

4 Diskussion

In dieser experimentellen Tierversuchsstudie wurde die Regeneration ausgedehnter Unterkieferdefekte mit stammzellbesiedelten Leitschienen in einem orthotopen Großtiermodell bildgebend durch μ CT untersucht und immunhistologisch evaluiert. Die Ergebnisse der Studie zeigten im Rahmen des vorliegenden experimentellen Settings, dass sowohl der prozentuale Anteil an neu gebildetem Knochen als auch die lokoregionale Neoangiogenese durch eine *in vitro* Stammzellbesiedlung erhöht waren. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Studie diskutiert, in den Kontext des derzeitigen Stands der Forschung gesetzt, die potentiellen klinischen Implementationen eruiert und die Limitationen dieses Verfahrens ausgeführt.

4.1 Synopsis der ermittelten Daten

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die knöchernen Defizite sowohl mittels stammzellbesiedelter als auch mittels unbesiedelter Gerüste nach 12 Wochen nur partiell, das heißt in der Größenordnung 15-40 % des Gesamtdefektvolumens, knöchern regeneriert werden konnten. Dabei zeigte sich allerdings ein statistisch signifikanter Vorteil in der Gruppe, in der die TCP-PLGA-Leitschienen mit adipogenen mesenchymalen Stammzellen besiedelt waren (BV/TV 34,8 % vs. 22,4 %).

Die bereits beschriebene Datenkonstellation zeigte das osteogene und neoangiogenetische Potential dieser stammzellbesiedelten TCP-PLGA-Leitschienen *in vivo*. Die ermittelten Ergebnisse ließen mehrere Schlussfolgerungen bzgl. der verwendeten Leitschienenstammzellkonstellation und deren osteogenem und proangiogenetischem Potential zu.

Es zeigte sich, dass sich bei alleiniger Implantation des Leitschienengerüsts zwar neue vaskuläre Strukturen bilden und zudem zu einem gewissen Grad eine Osteoneogenese als auch eine Osteokonduktion stattfindet (Abbildungen 22, 23 und 24). Diese waren jedoch signifikant geringer als bei ASC-Besiedlung. Die Osteokonduktion war bildgebend zum größten Anteil an der Knochenneubildung in toto beteiligt, die von den Osteotomiegerändern von peripher nach zentral zieht (Abbildung 20 A). Insgesamt schien die azelluläre Implantation dabei heterogene Ergebnisse hervorzurufen. 3 von 6 Kontrolltieren zeigten jeweils eine der Therapiegruppe nahekommende Knochenneubildung mit moderater Osteoneogenese, bedingt durch das Tricalciumphosphatleitgerüst, und bestätigten das in mehreren Studien ermittelte Potential der auf Calciumphosphat basierten Materialien zur Osteokonduktion [76, 77]. Neben diesen Tieren zeigte sich hingegen bei den Kontrolltieren 2, 3 und 5 eher eine Tendenz zur konsekutiven bindegewebigen Umkapselung der inserierten Konstrukte (RV/TV Kontrollen > RV/TV Therapie).

Bei additiver ASCs-Besiedlung der Leitschienenkonstrukte kam es zu einer besseren Incorporation, signifikant erhöhten Knochenneubildung (BV/TV Kontrolle < BV/TV Therapie, OC Kontrolle < OC Therapie, dabei Osteoneogenese >> Osteokonduktion) und einer signifikant gesteigerten Neoangiogenese in vivo (CD31 Kontrolle < CD31 Therapie).

Die unwesentlichen Differenzen der Gerüstreststrukturen der beiden Gruppen deutete lediglich tendenziell auf eine erleichterte Degradation des Tricalciumphosphats bei Stammzellbesiedlung hin (SV/TV Kontrolle > SV/TV Therapie). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde für Calciumphosphate bereits 2002 von Lu et al. beschrieben [78].

4.2 Dateninterpretation

In dieser Studie wurde μ CT-morphologisch ein qualitativer und quantitativer, signifikanter Unterschied in der Osteogenese (BV/TV) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe zugunsten ersterer gezeigt. Hinsichtlich der Verteilung von Bindegewebe (RV/TV) und verbliebenem Leitschienenengerüst (SV/TV) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, bei einer relativ heterogenen Resorptionsverteilung in der Kontrollgruppe. Hierbei zeigten 3 von 6 Tieren der Kontrollgruppe eine erfolglose Integration der Leitschiene. Bei diesen Tieren ist jedoch auch jeweils ein großer bindegewebiger Anteil nachweisbar. Dieser kann mit Granulationsreaktionen assoziiert sein (Abbildung 20 A und 24 D).

Als mögliche relevante Parameter einer erfolgreichen Integration wurden in der Literatur Leitschienenarchitektur- und Porengröße beschrieben. Diese waren in der vorliegenden Studie jedoch durch das standardisierte Druckverfahren und das normierte Defektdesign konstant [31, 35, 43, 79]. Das Volumen der Leitschienenkonstrukte untereinander variierte zwar in einem gewissen Umfang, allerdings ließen sich weder signifikante Unterschiede, noch Tendenzen erkennen und größere Volumina bedeuteten nicht, dass es zu einer schlechteren Integration kam.

Der Schlüssel zu einer erfolgreichen Integration des besiedelten Leitgerüsts und einer konsekutiven Knochenneubildung stellte die Neoangiogenese und der Erhalt einer möglichst großen Zahl aktiver Zellen dar [80]. Die Entstehung neuer Gefäße schreitet in einer Spanne von 100 μ m bis 1 mm pro Tag voran [81]. Die Diffusion von Sauerstoff in avaskuläres Gewebe ist bis zu einem Radius von 200 μ m um ein perfundiertes Gefäß möglich [82]. Vitaler Knochen kann nur in Entfernung von 100 μ m zu einer intakten Kapillare entstehen [83]. Diese Erkenntnisse spiegelten sich auch in vivo in den Ergebnissen und

Korrelationen dieser Studie wieder. Neben den erwähnten bildgebend ermittelten signifikanten Unterschieden in der Knochenneubildung zeigten sich ebenso hochsignifikante Unterschiede bei histologischer Aufarbeitung hinsichtlich der Marker für die Neoangiogenese (CD31) und die Ossifizierung (OC). Darüber hinaus stellten sich signifikante positive Korrelationen sowohl zwischen dem μ CT-morphologisch errechneten Anteil an neugebildeten Knochen am Gesamtvolumen und der Neoangiogenese (Pearson $r = 0,812$, $p = 0,001$) und dem Grad der Ossifizierung (Pearson $r = 0,690$, $p = 0,009$) als auch der beiden histologischen Marker untereinander (Pearson $r = 0,8$, $p = 0,001$) dar. Diese Korrelationen unterstreichen das Primat der Vaskularisierung bei der Osteogenese. Die thematisierte Etablierung eines stabilen, funktionellen Gefäßnetzwerks zur physiologischen Perfusion der neu formierten Osteoblastencluster ist vor allem in CSD in Großtiermodellen, die den in der klinischen Praxis benötigten Transplantatvolumina am nächsten kommen, eine Herausforderung. Mit der Transplantatgröße steigt die Zahl der für eine suffiziente Besiedelung benötigten Zellen und die hypoxische Schwelle bei deren Unterschreitung der Apoptosezyklus eingeleitet wird, kann in zentralen Leitschienenbereichen schneller erreicht werden [80, 84]. Um diese Mechanismen weitestgehend auszuschalten, ist ein gut balanciertes Verhältnis von Mikroarchitektur (Leitschienenendesign, Kanalgröße, Porosität und Porengröße) und Stammzellzahl- und Entität notwendig. Hierbei werden Porengrößen von mehr als 20 μm mit einer verbesserten regenerativen Kapazität und Porengrößen bis zu 30-40 μm mit proangiogentischer Aktivität und einem guten Einheilungspotential assoziiert. Ebenso spielt die Porosität als auch die Größe der interkonnektierenden Kanäle eine große Rolle. So wurde bereits von Karageorgiu et al. 2005 gezeigt, dass die in dieser Studie verwendete Porengröße der interkonnektierenden Kanäle von

450-500 μm mit einer guten ossären Regeneration, Neoangiogenese und dadurch mit einer guten Sauerstoffversorgung verknüpft sind (in dieser Studie verwendete Leitschienen: Porengröße: 10-30 μm ; Kanalgröße 450-500 μm , siehe Abbildung 2) [34, 35, 85-87]. Das vasoaktive Potential der ASCs wurde in Form der molekularbiologischen Verifizierung der VEGF-, Tumornekrosefaktors α (TNF α)- und der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)- Exprimierung nachgewiesen [63, 88].

In dieser Studie hatte die Testgruppe mit Stammzellbesiedlung absolut auf alle Studientiere gesehen eine signifikant gesteigerte Knochenneubildung zur Folge. Dazu wurden sowohl die osteokonduktiven Effekte der Defektränder als auch die Osteoneogenese im Bereich der Leitschiene gerechnet. Die Stammzellbesiedlung war hierbei mit einer erhöhten osteoneogenetischen Aktivität verknüpft.

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung

Die Regeneration von großdimensionierten knöchernen Defekten, die durch Traumata oder neoplastische Erkrankungen entstehen, stellt sowohl medizinisch als auch sozioökonomisch eine große Herausforderung dar. Spezielle Defektkonstellationen, deren Ausdehnung die individuelle physiologische Kapazität zur lokalen, spontanen Konsolidierung überschreiten, erfordern autologe, allogene oder xenogene Transplantate zur Wiederherstellung der knöchernen Integrität, vor allem in Form und Funktion [89-92]. Unweigerlich sind jedoch mit jeder der genannten Transplantatformen gewisse Nachteile verbunden. Beim Einsatz eines Autografts, wie sie gefäßgestielte Radialis-, Fibula- oder Beckentransplantate darstellen, sind unweigerlich Hebedefektmorbiditäten und im Falle

der allogenen und xenogenen Transplantate Immunreaktionen verbunden [4, 5, 7, 8, 93, 94]. Diese Gegebenheiten haben die präklinische und teilweise bereits die selektiv klinische Erprobung alternativer Verfahren zum Knochenersatz, wie das *Tissue Engineering* forciert [3, 14, 26].

In der Vergangenheit wurden mehrere experimentelle Kleintiermodelle mit verschiedenen Kombinationen von Defektkonstellationen, Leitschienenarchitekturen, für die Besiedlung verwendeten Zellentitäten und hinzugefügten, die Zelladhäsion und die Neoangiogenese beeinflussenden Proteinen untersucht [23, 95-99]. Um der klinischen Situation beim Menschen näher zu kommen, eignen sich Großtiermodelle wie in der vorliegenden Studie verwendet.

In dem von Viateau et al. untersuchten ektopen Großtiermodell zeigte sich äquivalent zu dieser Studie ein signifikant gesteigerte Knochenneubildung bei den stammzellbesiedelten Leitschienenkonstrukten [100]. Ein weiterer Schritt hin zur Annäherung an die klinische Situation ist die Kombination aus entsprechender Defektgröße, wie dem hier beschriebenen CSD, mit einem orthotopen Großtiermodell. Nach derzeitiger Datenlage ist die vorliegende Arbeit die einzige Studie mit entsprechenden Parametern.

Initial stellt der in der Literatur von mehreren Arbeitsgruppen unterschiedlich interpretierte und beschriebene Begriff des CSD eine heterogene Größe dar. So beschrieben Ma et al. einen 2 cm langen, segmentalen Defekt im Schweineunterkiefer ohne periostale Deckung als CSD, Sun et al. wiederum sahen einen Defekt erst ab einer Größe von 5 cm³ als kritisch an [101, 102]. Die Arbeitsgruppe um Ruehe et al. wiederum zeigte auf, dass selbst ein zwei- bis dreiwandiger Effekt mit einer Ausdehnung von bis zu 10 cm³ mit mukoperiostaler Deckung nicht zwangsweise als CSD klassifiziert wird [103]. Allen erwähnten Studien war eine hohe Autoregeneration gemein. In dieser Studie wurden die

verschiedenen erwähnten Charakteristika eines CSD kombiniert, sodass ein zwei- bis dreiwandiger Defekt mit einer Ausdehnung von 6-8 cm³ ohne Periostdeckung als Ausgangsdefekt definiert wurde.

Ein weitere Variable ist die verwendete Zellentität, die die Osteoneogenese in vivo unterstützt. ASCs zeigten eine gute osteogene Differenzierung und erhöhen das neoangiogenetische Potential der eingegliederten Leitschienenkonstrukte im Implantationsgebiet (siehe Abbildung 23) [48, 104]. Neben Hsiao et al. bestätigten sowohl Kachgal und Putnam als auch Schubert die proangiogenetische Aktivität der ASCs, die mit der Hochregulierung der Aktivität des TNF α , HGF oder VEGF in Zusammenhang stand [24, 72, 104]. Darüber hinaus werden ASCs mit einer Stimulierung der Perizytenrekrutierung in Verbindung gebracht, die ihrerseits einen stabilisierenden Effekt auf neu gebildete Gefäße haben [63, 105, 106]. Dies ist eine Erklärung für die signifikant gesteigerte Zahl an neu gebildeten Gefäßen in den Schnittpräparaten (Abbildung 24 A). Die bereits beschriebene vasoaktive Leitschienenarchitektur erklärt die in der Kontrollgruppe stattgehabte Neoangiogenese (Abbildung 24 B). Bereits Zhang et al. und Ghanaati et al. stellten in ihren Studien den Stellenwert der präformierten Porenstruktur als vasoaktives Leitgerüst für die Gefäßeinsprossung in vivo heraus [79, 107].

Die nun mehrfach beschriebene, zugrundeliegende vaskuläre Matrix dient als Basis für die konsekutive Osteogenese. Dies hat jedoch im Rückschluss zur Folge, dass es im Falle einer unzureichenden Vaskularisierung des eingebrachten Tricalciumphosphatgerüsts nicht zur Osteoneogenese, sondern zu der wie bei 3 von 6 Kontrolltieren beobachteten fehlgeschlagenen Inkorporation in Form einer Granulationsreaktion kommt (Abbildung 20 A) [108]. Hierbei ist wie bei der Neubildung einer jeden neuen organischen Matrix

primär die Etablierung und der Erhalt eines stabilen Versorgungsnetzwerks als Grundlage der späteren Entstehung komplexer Zellverbände notwendig [109-111].

Parallel zu den präklinischen Untersuchungen zur Eruierung des Stammzellpotentials, wurden einige wenige Fallserien zur klinischen Implementation der bisherigen Ergebnisse präsentiert, die den Synergismus und die Interdisziplinarität dieses Forschungsbereichs unterstreichen. 2001 stellten Quarto et al. drei Fallberichte vor, bei denen ausgedehnte knöcherne Defekte der Tibia, Ulna und des Humerus durch ex vivo expandierte Stammzellen erfolgreich therapiert wurden [112]. Im selben Jahr berichtete Vacanti et al. in einer Kasuistik über die Gewinnung von periostalen Stammzellen aus dem distalen Radius, deren ex vivo Expansion und an ein Tricalciumphosphatgerüst gekoppelte konsekutive Reimplantation zum Ersatz eines Daumenendgelenks. Dabei zeigte sich eine gute Osseointegration, jedoch allein 5 % Knochenneubildung [113].

4.4 Pathophysiologische Aspekte und klinische Implementation

Aus den geschilderten Erkenntnissen und den dargelegten naheliegenden Interpretationsansätzen ergeben sich Implikationen für die Stammzellauswahl, deren weitere molekularbiologische Behandlung und prospektive klinische Implementation, die im Folgenden ausgeführt werden.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich Stammzellentitäten (hier im Speziellen ASCs) bzgl. ihrer Zugänglichkeit und ihrer Eigenschaften unter sich verändernden physiologischen und pathologischen Bedingungen in vitro und in vivo [48, 114-116]. Diesbezüglich

wurden mehrfach die Besonderheiten ihrer Stammzellaktivität und des damit verbundenen Potentials in mehrere Zelllinien zu differenzieren und letztendlich ihre Wechselwirkungen mit umgebenden organischen Strukturen erörtert [117]. Daraus geht hervor, dass für den erfolgreichen präklinischen und weiteren klinischen Einsatz eine Anpassung der genannten Parameter für jede individuelle Situation und Applikationsform erforderlich ist.

Im Folgenden wird näher auf die Stammzellaktivität auf Leitschienengerüsten, deren Zell-Zell- und Zell-Gerüst-Interaktion und der Bedeutung der Stammzelllokalisation innerhalb der Gerüste eingegangen. Initial folgt nach jeder Expansion *in vitro* die Gerüstbesiedelung, wobei es zur ersten Kommunikation des Gerüstmaterials mit dem Zelltyp und der sich anschließenden Adhärenz kommt. Neben dem Medienzusatz, die den Stammzellen die Richtung der Differenzierung vorgibt, sind es nun vor allem Gerüstcharakteristika wie Porengröße, Architektur und Zusammensetzung, die die eingeschlagene – hier osteogene Differenzierung – weiter bahnen und durch proangiogentische Konfiguration weiter unterstützen [85]. Modifizierend kann an dieser Stelle bereits durch eine Gerüst- bzw. Stammzellpräkonditionierung in Form einer *a priori* Supplementation mit proangiogentischen Wachstumsfaktoren (VEGF) oder vasoaktiven Gerüststrukturen, welche Ionen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} freisetzen und sowohl die Angiogenese durch Differenzierung in Endothelzellen und Perizyten als auch ferner die Osteoneogenese nachweislich positiv beeinflussen [22, 23, 99, 107].

Um sich der klinischen Problematik ausgedehnter Defekte zu nähern, ist die Konstruktion von großen vaskularisierten, osteogen differenzierten Konstrukten notwendig, deren Ausdehnung allein verschiedene Bedingungen hinsichtlich Oxygenierung und Perfusion je

nach topographischer Lage über das Gerüst hinweg erzeugt. Hierbei kann es nun zu zentralen hypoxischen Bereichen kommen. Hypoxie kann in gewissen Korridoren proangiogenetische und proliferative Auswirkungen haben. Abhängig vom Stammzelltypus kann das osteogene Potential auch negativ beeinflusst werden [51, 118]. Dabei scheinen ASCs weniger sensibel unter hypoxischen Bedingungen im 3D-Modell zu reagieren als BMSCs, was einen Vorteil beim Einsatz zur Rekonstruktion eines CSD darstellt [48]. Die zentrale Hypoxie in *Tissue Engineering* Konstrukten hingegen kann, wenn sie über einen längeren Zeitraum persistiert, einen limitierenden Faktor darstellen. Dies legt bei der zukünftigen Konstruktion im *Tissue Engineering* die Etablierung eines engmaschigen Sauerstoffmonitoring nahe [119]. Eine standardisierte Sauerstoffmessung scheint in verschiedenen Bereichen des Gerüsts vor (und im besten Fall ebenso nach) Implantation sinnvoll, um regulatorisch bei lokalen oder temporären hypoxischen Sauerstoffgehalten eingreifen zu können [84]. Dies ist bis dato jedoch nicht non-invasiv möglich. Eine Sondenpenetration in die Leitschiene hingegen kann wiederum ein Risiko für Materialbruch, Beschädigung oder eine Infektion der Zellkolonie darstellen.

Eine weitere Option zur Optimierung der Effektivität von *Tissue Engineering* Konstrukten ist die Kombination aus verschiedenen Kultivierungs- bzw. Besiedlungskonzepten. Dazu ist z.B. die Kokultur des extrahierten Stammzelltypus mit einer weiteren Zellentität denkbar, zur Umgehung einzelner zellspezifischer Nachteile [120-123]. Ferner wäre unter Berücksichtigung des Stammzellpotentials und der mehrfach aufgezeigten parakrinen Aktivität der ASCs eine selektive osteogene Differenzierung äußerer Gerüstanteile und kontrollierte Etablierung eines Gefäßnetzwerks im Gerüstzentrum, zur Vermeidung zentraler apoptischer bzw. azelluärer Implantatanteile durch initiale Oxygenierungs- bzw. Perfusionsdefizite, möglich [110, 124, 125].

Bei der letztendlichen, klinischen Implementation sind neben den erläuterten methodischen Komponenten die Stammzellcharakteristika, der Vorgang der Implantation und der Einheilung von besonderer Relevanz. Nach der initial beschriebenen verhältnismäßig komplikationslosen Gewinnung der ASCs, im Vergleich zu den BMSCs aus Lipoaspiraten, scheint im weiteren Verlauf das individuelle Alter für einen guten, funktionellen Einsatz eine große Rolle zu spielen. Alle Stammzellentitäten zeichnen sich durch ihre erhaltene Plastizität bzw. Pluripotenz aus. Jedoch unterliegen sie, wie alle andere Zellentitäten auch, dem natürlichen Alterungsprozess mit den damit verbundenen, potentiellen Abberationen bei jedem Zellteilungszyklus [56, 116]. Im Tiermodell zeigten Duscher et al. die reduzierte regenerative Kapazität von ASCs, die aus älteren Mäusen isoliert wurden [126].

Darüber hinaus sind die Wechselwirkungen zwischen implantierten Stammzellkonstrukten mit residuellen Tumorzellen noch nicht geklärt. In einigen Studien wurde eine tumorpromovierende Wirkung von Stammzellen im Mammakarzinom- und Osteosarkommodell in der Maus gezeigt [54, 55, 127]. Diese Interaktion der verschiedenen Zellentitäten gilt es in weiteren Studien noch genauer zu untersuchen.

4.5 Limitationen der durchgeführten Studie

Jeder experimentelle Studienaufbau zur Rekonstruktion ausgedehnter, knöcherner Defekte stellt eine Approximation an die realen Gegebenheiten einer klinischen Situation dar. Durch die Methodik der Näherung können weder alle individuellen Konstellationen abgedeckt noch eine exakte Umsetzung bzw. Nachbildung der Realität gelingen. Im fol-

genden Abschnitt sollen die methodischen Grenzen und die Limitationen der Datenerhebung und der ermittelten Ergebnisse aufgezeigt und deren Auswirkungen diskutiert werden.

4.5.1 Limitationen des Studiendesigns und der Methodik

Zum Zwecke der Knochenregeneration bei CSD wurde das Großtiermodell gewählt, das durch die mögliche Defektdimensionierung mit der klinischen Situation beim Menschen gut vergleichbar ist [96]. Hierbei handelte es sich um ein komplexes Tiermodell. Dabei entstanden durch den apparativen und prozeduralen Aufwand der Narkose und Defektdarstellung längere Ischämiezeiten der besiedelten Leitschienenkonstrukte als es im Kleintiermodell der Fall ist. Eine Korrelation des Implantationserfolgs mit der operativen Dauer oder intraoperativen Komplikationen wurde nicht durchgeführt. Durch das artifizielle Setting eines primären Endpunkts zur Evaluation der Einheilung nach 12 Wochen ließ sich weder die initiale Phase der knöchernen Konsolidierung beurteilen noch das langfristige Outcome der inkorporierten Gerüste bildgebend oder immunhistologisch darstellen.

Weiterhin gilt der in der immunhistologischen Analyse von Gefäßneubildungen zwar etablierte, jedoch nicht allein dafür spezifische Marker CD31 als methodisch limitierend. So wird CD31 ebenso bei einer Entzündungsreaktion auf Monozyten und Plasmazellen exprimiert [128].

Ferner wäre eine Ergänzung der immunhistochemisch erhobenen Parameter CD31 und OC um einen Apoptosemarker wie TUNEL sinnvoll, um den Anteil und die Verteilung von toten Zellen innerhalb des Gerüsts zu ermitteln. Dies könnte weitere Rückschlüsse

auf die Effizienz des Besiedelungsverfahrens und Perfusionskonzepts auf immunhistologischer Ebene erlauben.

4.5.2 Limitationen der Datenerhebung und der Ergebnisse

Bei der Erhebung der Daten der Bildgebung und der Immunhistochemie wurden allein die Veränderungen der absoluten Knochenneubildung und Gefäßneubildung bestimmt, unabhängig von den zugrundeliegenden (patho-)physiologischen Prozessen. In diesem Sinne trugen sowohl Osseinduktion als auch Osteokonduktion zur Knochenneubildung insgesamt bei. Ähnliches gilt für die OC-Bestimmung in der Immunhistochemie. Es ist fraglich, ob eine dogmatische Trennung dieser beiden Prozesse für die Knochenneubildung *in vivo* und prospektiv für den klinischen Einsatz sinnvoll ist. Zu bedenken ist jedoch, dass formal allein die Osteoneogenese innerhalb des Implantats auf das osteogene (bzw. ferner das neoangiogenetische) Potential der inserierten (stammzellbesiedelten), polymerinfiltrierten Tricalciumphosphatgerüste zurückzuführen ist. Die beschriebene Osteokonduktion ist wohl eher als reaktiv zu werten [19, 129].

Auf Tricalciumphosphat basierende Gerüste allein haben eine intrinsische osteoinduktive Aktivität im Tiermodell gezeigt [130]. In dem verwendeten Messverfahren in der μ CT wurden wie schon erwähnt Osteokonduktion und Osteoinduktion, welche sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe auftraten, unter dem Begriff der absoluten Knochenneubildung subsummiert. Dadurch war es nicht möglich die Abhängigkeiten dieser Prozesse voneinander und deren Verhältnis zur hier rein additiv ermittelten Stammzell-Gerüst-Aktivität zu bestimmen. Phasenspezifische Limitationen und die Rolle der ASCs im longitudinalen Verlauf konnten nicht ermittelt werden.

Ferner muss von einem anfänglichen Primat der Initiierung und Etablierung eines Gefäßnetzwerks ausgegangen werden, das die Basis für die folgende sukzessive Mineralisierung und Organisation der Knochenmatrix darstellt.

4.6 Perspektiven des *Tissue Engineerings*

In weiteren Studien gilt es Methoden zu entwickeln, um die de novo Osteogenese von der Osteokonduktion in den Randbereichen der Defekte zu unterscheiden [19]. Darüber hinaus ist es von weitreichender Bedeutung individuelle Besiedelungs-, Vaskularisierungs- und Oxygenierungskonzepte für die jeweilige Zell-Gerüst-Kombination zu entwerfen, die eine optimale, gleichmäßige Zellverteilung auf und innerhalb des Gerüsts und deren adäquate Perfusion und Oxygenierung gewährleisten [99, 131, 132]. Eine modifizierte in vitro Adaptation des klinischen Vorstoßes von Warnke et al. wäre denkbar, dessen Arbeitsgruppe durch die Implantation eines aus autologen, spongiösen und kortikalen Knochenblöcken und BMP bestehenden Transplantats unter den M. latissimus dorsi zur Gewährleistung einer suffizienten Perfusion und Oxygenierung unternahm [27, 28]. Unter Einsatz eines den in vivo Bedingungen sukzessive angepassten bioreaktorgleichen Systems, das sowohl hämodynamische Druck- und Sauerstoffgradienten als auch Perfusionsgeschwindigkeiten erzeugt, wäre bereits eine schrittweise Adaptierung des Transplantats und der frühen Zellschichten an das spätere Transplantatbett möglich [133]. Von einer initialen Übertragung der genannten Parameter vom Menschen auf die Situation in der Zellkultur ist hingegen abzusehen, da diese der Adhäsion der Stammzellen abträglich wären [99].

Wie bereits unter 4.5.2 angedeutet, gilt es in Zukunft im zeitlichen Verlauf proangiogene und proosteogene Faktoren zu identifizieren und deren phasenspezifische Wechselwirkungen und additiven Effekte qualitativ und quantitativ darzustellen. Das Modell der Kokultur verschiedener ASC-Zelllinien, wie z.B. Endothelzellen und Osteoblasten, oder der zeitversetzten Besiedlung *in vitro* vor Implantation stellen Konzepte dar, die auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen basieren [120, 122, 134]. In diesem Zusammenhang ist der Stellenwert der regionalen Sauerstoffkonzentration als einer der zentralen Parameter im Prozess des *Tissue Engineering* zu nennen. So spielen vor allem hypoxische Kulturbedingungen sowohl für das Beibehalten der Stammzellaktivität als auch für deren Expansions- und Differenzierungskapazität eine entscheidende Rolle [46, 48, 135]. Neben der bereits erläuterten Induktion der Angiogenese über HIF1 und VEGF können hypoxische Bedingungen auch die ASC-Proliferation erhöhen [136, 137].

Ein Schlüssel zur erfolgreichen Transplantatkonstruktion und konsekutiven Einheilung im Transplantatbett scheint nach Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse und entsprechend der aktuellen Datenlage ein gesteuerter, sequenzieller Wechsel zwischen Phasen der Proliferation bzw. Expansion und anabolen Abschnitten der Osteogenese mit intermittierenden Abschnitten der Etablierung bzw. Stärkung des Gefäßnetzwerkes unter Berücksichtigung des lokalen Sauerstoffgehalts zu sein [23, 84, 119].

Darüber hinaus scheint der pH-Wert *in vivo* während des Regenerationsprozesses nach Implantation des stammzellbesiedelten Leitschienenkonstruktes ebenso eine Rolle zu spielen. So wurden bereits von Fliefel et al. die negativen Auswirkungen eines sauren Milieus auf die Proliferation und Mineralisierung von hMSCs *in vitro* beschrieben [138].

Molekularbiologische und pathophysiologische Parallelen des beschriebenen Konzepts sind dabei in der Karzinogenese zu beobachten. Der Prozess der Tumorentstehung zeigt

Ähnlichkeiten hinsichtlich des strukturellen Ablaufs seiner Pathophysiologie zur Implantation größerer Autografts bei CSD. Hier zeigen vor allem fortgeschrittene Wachstumsphasen aufgrund der starken Expansion in Abhängigkeit der jeweiligen Tumoraggressivität Problematiken auf, die es bei der Regeneration von nicht heilenden CSD schon initial zu lösen gilt. Das Tumorwachstum wirkt sich bei einer gewissen Größe auf die Stabilität des Gefäßnetzwerkes aus, was konsekutiv zu insuffizienten Perfusion und Oxygenierung zentraler Tumorabschnitte führt und letztendlich die Apoptose und bzw. sekundären Nekrose im Tumorzentrum zur Folge hat [110, 139].

In diesem Sinne ist es wahrscheinlich nicht allein die proangiogenetische Aktivität der Stammzellentität oder die Verwendung vasoaktiver Gerüstmaterialien, sondern vielmehr die stadienspezifische Balance aus Zellproliferation, Knochenneubildung und intermittierender Etablierung bzw. Stärkung vorhandener vaskulärer Strukturen, die zu einer erfolgreichen Regeneration von CSD in einem präklinischen und prospektiv klinischen Setting führen. Dazu ist es notwendig in weiteren tierexperimentellen Studien die Aktivierung der proangiogenetischen und proosteogenen Genabschnitte und die Konzentration der von ihnen exprimierten Proteine im zeitlichen Regenerationsverlauf und in Abhängigkeit der Lokalisation ihrer Akkumulation in der Leitschiene zu bestimmen. Dies ermöglicht die mediatorselektive, phasenspezifische Applikation von Proteinen, die die Einheilung und Regeneration unterstützen.

Letztendlich gilt es bei einem zukünftigen klinischen Einsatz des *Tissue Engineering*, um bei dem Vergleich zu bleiben, die Situation im Transplantatbett gründlich hinsichtlich neoplastischer Grunderkrankungen zu prüfen. Präklinischen Studien zeigen, dass die Datenlage hinsichtlich der Tumoraktivität von Stammzellen noch nicht abschließend geklärt ist [127, 140].

Darüber hinaus gilt es abschließend in pragmatischen Ansätzen die Problematik der operativen Eingliederung der strukturell porösen und bruchgefährdeten Leitschiene Konstrukte zu lösen. Um die Verbundstärke des Osteosynthesystems mit dem TCP-PLGA-Transplantat zu erhöhen und einen zweiten Eingriff zur Metallentfernung zu vermeiden wären resorbierbare, polymerbasierte Kunststoffe wie Poly-D,L-Laktid (PDLLA) oder PLGA (z.B. SonicWeld/Resorb-X, KLS Martin, Tuttlingen, Germany) denkbar [141].

5 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion knöcherner Strukturen bei großdimensionierten, die regenerative Kapazität des Organismus überschreitenden Defekten (sog. „*Critical-Size-Defekte*“, CSD) stellt sowohl in der präklinischen Forschung als auch im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar. Das *Tissue Engineering* bietet theoretisch das Potential, Gewebeersatz in unbegrenzter Menge sowie in beliebiger Größe und Form in vitro zu erzeugen. Vor diesem Hintergrund stellen adipogene Stammzellen (ASCs) eine geeignete Quelle und therapeutische Alternative durch ihre komplikationsarme Gewinnung und ihre bereits mehrfach untersuchte Pluripotenz, namentlich ihre Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung dar.

In dieser Studie wird die Regeneration von ausgedehnten knöchernen Defekten im orthotopen Großtiermodell durch ASC besiedelte und mit Poly (D,L-lactid-co-glycolid) infiltrierte Tricalciumphosphat-Leitschienen (TCP-PLGA-Leitschienen) untersucht. Initial wurden dazu Defekte im Unterkiefer der Tiere generiert ($7,15 \text{ cm}^3 \pm 1,15 \text{ cm}^3$). Basierend auf CT-Datensätzen wurden individualisierte Leitschienen hergestellt. Die stammzellbesiedelten Leitschienen zeigten nach 12 Wochen eine signifikant gesteigerte Knochenneubildung sowohl in der bildgebenden Analyse durch die μCT (Therapie: BV/TV, 34,8 % gegenüber Kontrolle: 22,4 %; $p < 0.05$) als auch bei der immunhistochemischen Auswertung (Therapie: $27,98 \% \pm 2,81 \%$ gegenüber Kontrolle: $17,10 \% \pm 3.57 \%$; $p < 0.001$) und darüber hinaus eine ebenso signifikant gesteigerte Neoangiogenese (Therapie: $42,43 \pm 5,35$ Zellen gegenüber Kontrolle: $25,17 \pm 7,96$ Zellen; $p = 0,02$) nach Implantation im Defektbereich.

Diese Ergebnisse unterstreichen das regenerative Potential der ASCs im Großtierdefektmodell. Vor einer möglichen klinischen Implementation gilt es jedoch in weiteren orthotopen Großtiermodellen das komplexe Wechselspiel der proliferativen Mediatoren im zeitlichen Verlauf über die gesamte Regeneration und unter dem Einfluss sowohl verschiedener Sauerstoff- und Elektrolytkonzentrationen als auch verschiedener pH-Werte genauer zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Vacanti, C.A. and J.P. Vacanti, *Functional Organ Replacement, The New Technology of Tissue Engineering*. Surg Technol Int, 1991. **I**: p. 43-49.
2. Vacanti, C.A., et al., *Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation*. Plast Reconstr Surg, 1991. **88**(5): p. 753-9.
3. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
4. Arrington, E.D., et al., *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
5. Coventry, M.B. and E.M. Tapper, *Pelvic instability: a consequence of removing iliac bone for grafting*. J Bone Joint Surg Am, 1972. **54**(1): p. 83-101.
6. Dawson, J., et al., *The reamer-irrigator-aspirator as a device for harvesting bone graft compared with iliac crest bone graft: union rates and complications*. J Orthop Trauma, 2014. **28**(10): p. 584-90.
7. Dimitriou, R., et al., *Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review*. Injury, 2011. **42 Suppl 2**: p. S3-15.
8. Laurencin, C., Y. Khan, and S.F. El-Amin, *Bone graft substitutes*. Expert Rev Med Devices, 2006. **3**(1): p. 49-57.
9. Schwarzer, C., et al., *Donor site morbidity and flap perfusion of subfascial and suprafascial radial forearm flaps: A randomized prospective clinical comparison trial*. J Craniomaxillofac Surg, 2016. **44**(9): p. 1299-304.
10. Moura, L.B., et al., *Autogenous non-vascularized bone graft in segmental mandibular reconstruction: a systematic review*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2016. **45**(11): p. 1388-1394.
11. Burstein, F.D., et al., *Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction: experience in 150 patients*. Plast Reconstr Surg, 2006. **118**(2): p. 484-9.
12. Kolk, A., et al., *Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials*. J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(8): p. 706-18.
13. Probst, F., et al., *Zukünftige Optionen zur Rekonstruktion bei ausgedehnten knöchernen Defekten im Kiefer-, Gesichts- und Schädelbereich mittels CAD/CAM-gefertigter bioaktiver Leitschienen*. OP-Journal, 2013. **29**(2): p. 200-204.
14. Petite, H., et al., *Tissue-engineered bone regeneration*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 959-63.
15. Perka, C., et al., *Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits*. Biomaterials, 2000. **21**(11): p. 1145-53.
16. Rai, B., et al., *Differences between in vitro viability and differentiation and in vivo bone-forming efficacy of human mesenchymal stem cells cultured on PCL-TCP scaffolds*. Biomaterials, 2010. **31**(31): p. 7960-70.
17. Warnke, P.H., et al., *The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone*. Biomaterials, 2006. **27**(7): p. 1081-7.
18. Trautvetter, W., et al., *Tissue-engineered polymer-based periosteal bone grafts for maxillary sinus augmentation: five-year clinical results*. J Oral Maxillofac Surg, 2011. **69**(11): p. 2753-62.

19. Meijer, G.J., et al., *Cell based bone tissue engineering in jaw defects*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3053-61.
20. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 947-55.
21. Ridwan-Pramana, A., et al., *Porous polyethylene implants in facial reconstruction: Outcome and complications*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(8): p. 1330-4.
22. Rohringer, S., et al., *Mechanisms of vasculogenesis in 3D fibrin matrices mediated by the interaction of adipose-derived stem cells and endothelial cells*. Angiogenesis, 2014. **17**(4): p. 921-33.
23. Sparks, D.S., et al., *Vascularised bone transfer: History, blood supply and contemporary problems*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2017. **70**(1): p. 1-11.
24. Kachgal, S. and A.J. Putnam, *Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms*. Angiogenesis, 2011. **14**(1): p. 47-59.
25. Schieker, M. and W. Mutschler, *[Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(9): p. 715-32.
26. Vacanti, C.A., *History of tissue engineering and a glimpse into its future*. Tissue Eng, 2006. **12**(5): p. 1137-42.
27. Warnke, P.H., et al., *Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man*. Lancet, 2004. **364**(9436): p. 766-70.
28. Warnke, P.H., et al., *Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible*. Biomaterials, 2006. **27**(17): p. 3163-7.
29. Ishaug-Riley, S.L., et al., *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. **36**(1): p. 1-8.
30. El Backly, R.M., et al., *Platelet rich plasma enhances osteoconductive properties of a hydroxyapatite-beta-tricalcium phosphate scaffold (Skelite) for late healing of critical size rabbit calvarial defects*. J Craniomaxillofac Surg, 2014. **42**(5): p. e70-9.
31. Cipitria, A., et al., *Porous scaffold architecture guides tissue formation*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(6): p. 1275-88.
32. Ryan, A.J., et al., *Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair*. J Anat, 2015. **227**(6): p. 732-45.
33. Reichert, J.C., et al., *A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones*. Sci Transl Med, 2012. **4**(141): p. 141ra93.
34. Linnes, M.P., B.D. Ratner, and C.M. Giachelli, *A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. **28**(35): p. 5298-306.
35. Davison, N.L., et al., *Osteoclast resorption of beta-tricalcium phosphate controlled by surface architecture*. Biomaterials, 2014. **35**(26): p. 7441-51.
36. Huttmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 245-60.

37. Kaito, T., et al., *Potential of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite*. *Biomaterials*, 2005. **26**(1): p. 73-9.
38. McManus, A.J., et al., *Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites*. *J Biomed Mater Res A*, 2005. **72**(1): p. 98-106.
39. Cornelsen, M., et al., *Mechanical and biological effects of infiltration with biopolymers on 3D printed tricalciumphosphate scaffolds*. *Dent Mater J*, 2017. **36**(5): p. 553-559.
40. Cornelsen, L., et al., *Change in non-alcoholic beverage sales following a 10-pence levy on sugar-sweetened beverages within a national chain of restaurants in the UK: interrupted time series analysis of a natural experiment*. *J Epidemiol Community Health*, 2017. **71**(11): p. 1107-1112.
41. Leukers, B., et al., *Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing*. *J Mater Sci Mater Med*, 2005. **16**(12): p. 1121-4.
42. Zein, I., et al., *Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2002. **23**(4): p. 1169-85.
43. Seitz, H., et al., *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005. **74**(2): p. 782-8.
44. Schieker, M., et al., *Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering*. *European Journal of Trauma* 2006. **32**(2): p. 114-124.
45. Hayashi, O., et al., *Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue*. *Calcif Tissue Int*, 2008. **82**(3): p. 238-47.
46. De Ugarte, D.A., et al., *Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow*. *Cells Tissues Organs*, 2003. **174**(3): p. 101-9.
47. Qu, C.Q., et al., *Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007. **43**(2): p. 95-100.
48. Burian, E., et al., *Effect of hypoxia on the proliferation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells in 2- and 3-dimensional culture*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017. **45**(3): p. 414-419.
49. Jaiswal, N., et al., *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. *J Cell Biochem*, 1997. **64**(2): p. 295-312.
50. Caplan, A.I., *Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics*. *Tissue Eng*, 2005. **11**(7-8): p. 1198-211.
51. Potier, E., et al., *Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression*. *Bone*, 2007. **40**(4): p. 1078-87.
52. Schinkothe, T., W. Bloch, and A. Schmidt, *In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2008. **17**(1): p. 199-206.
53. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 557-63.
54. Wang, Y., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway*. *Oncotarget*, 2017. **8**(14): p. 23803-23816.
55. Xu, W.T., et al., *Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis*. *Cancer Lett*, 2009. **281**(1): p. 32-41.
56. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.

57. Cowan, C.M., et al., *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 560-7.
58. Lendeckel, S., et al., *Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report*. J Craniomaxillofac Surg, 2004. **32**(6): p. 370-3.
59. Moseley, T.A., M. Zhu, and M.H. Hedrick, *Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery*. Plast Reconstr Surg, 2006. **118**(3 Suppl): p. 121S-128S.
60. Schneider, S., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine*. Eur J Med Res, 2017. **22**(1): p. 17.
61. Mischen, B.T., et al., *Metabolic and functional characterization of human adipose-derived stem cells in tissue engineering*. Plast Reconstr Surg, 2008. **122**(3): p. 725-38.
62. Rehman, J., et al., *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells*. Circulation, 2004. **109**(10): p. 1292-8.
63. Aurora, A., et al., *A PEGylated platelet free plasma hydrogel based composite scaffold enables stable vascularization and targeted cell delivery for volumetric muscle loss*. Acta Biomater, 2017.
64. Li, W., H. Xu, and C. Qian, *c-Kit-Positive Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Growth and Angiogenesis of Breast Cancer*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 7407168.
65. Zimmerlin, L., et al., *Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(1-2): p. 93-106.
66. Schwarz, C., et al., *Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells*. Res Vet Sci, 2012. **93**(1): p. 457-62.
67. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
68. Berger, M., et al., *A concept for scaffold-based tissue engineering in alveolar cleft osteoplasty*. J Craniomaxillofac Surg, 2015. **43**(6): p. 830-6.
69. Kilkenny, C., et al., *Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research*. PLoS Biol, 2010. **8**(6): p. e1000412.
70. Yamamoto, N., et al., *Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue*. J Dermatol Sci, 2007. **48**(1): p. 43-52.
71. Godbey, W.T., et al., *A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2799-805.
72. Schubert, T., et al., *The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 8880-91.
73. Sawyer, A.A., et al., *The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2*. Biomaterials, 2009. **30**(13): p. 2479-88.
74. Faul, F., et al., *G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences*. Behav Res Methods, 2007. **39**(2): p. 175-91.

75. Newman, P.J., et al., *PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily*. Science, 1990. **247**(4947): p. 1219-22.
76. Klein, C., et al., *Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues*. Biomaterials, 1994. **15**(1): p. 31-4.
77. Habibovic, P. and K. de Groot, *Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 25-32.
78. Lu, J., et al., *The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(4): p. 408-12.
79. Ghanaati, S., et al., *Influence of beta-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo*. Acta Biomater, 2010. **6**(12): p. 4476-87.
80. Tang, D., et al., *Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration*. Biomaterials, 2016. **83**: p. 363-82.
81. Mikos, A.G., et al., *Prevascularization of porous biodegradable polymers*. Biotechnol Bioeng, 1993. **42**(6): p. 716-23.
82. Kashani, I.R., et al., *Retinoic acid induces mouse bone marrow-derived CD15(+), Oct4(+) and CXCR4(+) stem cells into male germ-like cells in a two-dimensional cell culture system*. Cell Biol Int, 2014. **38**(6): p. 782-9.
83. Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. J Bone Joint Surg Am, 2004. **86-A**(7): p. 1541-58.
84. Volkmer, E., et al., *Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(11): p. 2793-801.
85. Osathanon, T., et al., *Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(30): p. 4091-9.
86. Bryers, J.D., C.M. Giachelli, and B.D. Ratner, *Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts*. Biotechnol Bioeng, 2012. **109**(8): p. 1898-911.
87. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
88. Caplan, A.I., *Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 628767.
89. Calori, G.M., et al., *Classification of non-union: need for a new scoring system?* Injury, 2008. **39 Suppl 2**: p. S59-63.
90. Megas, P., *Classification of non-union*. Injury, 2005. **36 Suppl 4**: p. S30-7.
91. Tzioupis, C. and P.V. Giannoudis, *Prevalence of long-bone non-unions*. Injury, 2007. **38 Suppl 2**: p. S3-9.
92. Cypher, T.J. and J.P. Grossman, *Biological principles of bone graft healing*. J Foot Ankle Surg, 1996. **35**(5): p. 413-7.
93. Strong, D.M., et al., *Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts*. Clin Orthop Relat Res, 1996(326): p. 107-14.
94. Campana, V., et al., *Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(10): p. 2445-61.
95. Zhu, L., et al., *Tissue-engineered bone repair of goat-femur defects with osteogenically induced bone marrow stromal cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(3): p. 423-33.
96. Pearce, A.I., et al., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. Eur Cell Mater, 2007. **13**: p. 1-10.

97. Liebschner, M.A., *Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1697-714.
98. Koike, N., et al., *Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 138-9.
99. Baldwin, J., et al., *In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective*. Vasc Cell, 2014. **6**: p. 13.
100. Viateau, V., et al., *Comparative study of the osteogenic ability of four different ceramic constructs in an ectopic large animal model*. J Tissue Eng Regen Med, 2016. **10**(3): p. E177-87.
101. Ma, J.L., et al., *Determination of critical size defect of minipig mandible*. J Tissue Eng Regen Med, 2009. **3**(8): p. 615-22.
102. Sun, Z., et al., *Establishing a critical-size mandibular defect model in growing pigs: characterization of spontaneous healing*. J Oral Maxillofac Surg, 2014. **72**(9): p. 1852-68.
103. Ruehe, B., et al., *Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009. **108**(5): p. 699-706.
104. Hsiao, S.T., et al., *Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(12): p. 2189-203.
105. Meng, M.B., et al., *Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy*. Future Oncol, 2015. **11**(1): p. 169-79.
106. Mendes, L.F., et al., *Perivascular-like cells contribute to the stability of the vascular network of osteogenic tissue formed from cell sheet-based constructs*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41051.
107. Zhang, W., et al., *3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration*. Biomaterials, 2017. **135**: p. 85-95.
108. Aurora, A., et al., *An acellular biologic scaffold does not regenerate appreciable de novo muscle tissue in rat models of volumetric muscle loss injury*. Biomaterials, 2015. **67**: p. 393-407.
109. Bouhadir, K.H. and D.J. Mooney, *Promoting angiogenesis in engineered tissues*. J Drug Target, 2001. **9**(6): p. 397-406.
110. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
111. Flamme, I., T. Frolich, and W. Risau, *Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis*. J Cell Physiol, 1997. **173**(2): p. 206-10.
112. Quarto, R., et al., *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 385-6.
113. Vacanti, C.A., et al., *Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone*. N Engl J Med, 2001. **344**(20): p. 1511-4.
114. Pal, B. and B. Das, *In vitro Culture of Naive Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Stemness Based Approach*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 69.
115. Duscher, D., et al., *Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 126.
116. Duscher, D., et al., *Ultrasound-assisted liposuction provides a source for functional adipose-derived stromal cells*. Cytotherapy, 2017.

117. Wankhade, U.D., et al., *Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 3206807.
118. Pugh, C.W. and P.J. Ratcliffe, *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 677-84.
119. Otto, S., *Optimierung der Sauerstoffversorgung in dreidimensionalen Zell-Leitschienen-Kulturen für das tissue engineering von Knochen*. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. Dissertationsschrift an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2011.
120. Valenzuela, C.D., et al., *Characterization of adipose-derived mesenchymal stem cell combinations for vascularized bone engineering*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(11-12): p. 1373-85.
121. Deng, J., et al., *Inhibition of Pathological Phenotype of Hypertrophic Scar Fibroblasts Via Coculture with Adipose-Derived Stem Cells*. Tissue Eng Part A, 2017.
122. Rybalko, V., et al., *Therapeutic potential of adipose-derived stem cells and macrophages for ischemic skeletal muscle repair*. Regen Med, 2017. **12**(2): p. 153-167.
123. Correia, C.R., et al., *Semipermeable Capsules Wrapping a Multifunctional and Self-regulated Co-culture Microenvironment for Osteogenic Differentiation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21883.
124. Skiles, M.L., et al., *ASC spheroid geometry and culture oxygenation differentially impact induction of preangiogenic behaviors in endothelial cells*. Cell Transplant, 2015. **24**(11): p. 2323-35.
125. Hess, S.C., et al., *Gene expression in human adipose-derived stem cells: comparison of 2D films, 3D electrospun meshes or co-cultured scaffolds with two-way paracrine effects*. Eur Cell Mater, 2017. **34**: p. 232-248.
126. Duscher, D., et al., *Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7144.
127. Wang, Y., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stem cell-secreted CXCL1 and CXCL8 facilitate breast tumor growth by promoting angiogenesis*. Stem Cells, 2017.
128. Govender, D., et al., *CD31 (JC70) expression in plasma cells: an immunohistochemical analysis of reactive and neoplastic plasma cells*. J Clin Pathol, 1997. **50**(6): p. 490-3.
129. Meijer, G.J., et al., *Cell-based bone tissue engineering*. PLoS Med, 2007. **4**(2): p. e9.
130. Santos, P.S., et al., *Osteoinductive porous biphasic calcium phosphate ceramic as an alternative to autogenous bone grafting in the treatment of mandibular bone critical-size defects*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017.
131. Volkmer, E., et al., *Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 153-64.
132. Baeyens, N. and M.A. Schwartz, *Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(1): p. 7-11.
133. Campbell, G.R. and J.H. Campbell, *Development of tissue engineered vascular grafts*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. **8**(1): p. 43-50.

-
134. Gao, L., et al., *An investigation of the population impact of variation in HbA1c levels in older people in England and Wales: from a population based multi-centre longitudinal study*. BMC Public Health, 2008. **8**: p. 54.
 135. Niemeyer, P., et al., *Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3572-9.
 136. Yamamoto, Y., et al., *Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells*. Biores Open Access, 2013. **2**(3): p. 199-205.
 137. Kakudo, N., et al., *Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 α Activation*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0139890.
 138. Fliefel, R., et al., *Mesenchymal stem cell proliferation and mineralization but not osteogenic differentiation are strongly affected by extracellular pH*. J Craniomaxillofac Surg, 2016. **44**(6): p. 715-24.
 139. Tonini, T., F. Rossi, and P.P. Claudio, *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6549-56.
 140. Torsvik, A., et al., *Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6393-6.
 141. Freudlsperger, C., et al., *Mandibular reconstruction with a prefabricated free vascularized fibula and implant-supported prosthesis based on fully three-dimensional virtual planning*. J Craniofac Surg, 2014. **25**(3): p. 980-2.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben. Ich bedanke mich beim Klinikdirektor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Michael Ehrenfeld für die Möglichkeit der Promotion an seinem Lehrstuhl.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto. Er war mir immer ein kompetenter und inspirierender Mentor. Ich schulde ihm meine tiefste Dankbarkeit, nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die allzeit tatkräftige Hilfe bei allen Problemen, die im Laufe der Arbeit auftraten, sondern auch und ganz besonders für die ausgezeichnete persönliche Betreuung. Er führte und förderte mich beim wissenschaftlichen Arbeiten und Denken sowohl bei der Entstehung dieser Arbeit als auch bei anderen Projekten.

Auch Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Florian Probst danke ich für seine stetige Präsenz und seine Begleitung bei dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Experimented Labors der LMU bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Attila Aszodi, der es mir ermöglichte den zellkulturellen Teil dieser Arbeit im Experimented Labor durchzuführen. Herrn Dr. Matthias Eddicks und dem gesamten Team der Klinik für Schweine der Tierärztlichen Fakultät der LMU München danke ich für die kollegiale und kompetente Zusammenarbeit bei den Operationen und der Nachbetreuung der Versuchstiere.

Meiner Mutter und meinem Vater gilt ein ganz besonderer Dank. Mein Leben lang unterstützen sie mich in allen meinen Entscheidungen aus vollen Kräften und mit aller Liebe. Dadurch war es mir erst möglich diese Arbeit zu erstellen.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht

Probst FA, **Burian E**, Riedel C, Fliefel R, Saller MM, Aszodi A, Cornelsen M, Eddicks M, Otto S. Bone regeneration in an extended porcine mandibular defect with adipose MSC seeded CAD/CAM-fabricated TCP-PLGA scaffolds. ECM 2018. (peer review)

Burian E, Probst FA, Palla B, Riedel C, Cornelsen M, Saller MM, König F, Schieker M, Otto S. Effect of hypoxia on the proliferation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells in 2- and 3-dimensional culture. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2016

Cornelsen M, Probst FA, Schwarz C, **Burian E**, Tröltzsch M, Otto S, Saller MM, Schieker M, Seitz H. Mechanical and biological effects of infiltration with biopolymers on 3D printed tricalciumphosphate scaffolds. Dent Mater J. 2017

Probst FA, Otto S, Cornelsen M, Fliefel R **Burian E**, Berger M, Ehrenfeld M, Schieker M. Custom-made vitalized scaffolds for bone tissue reconstruction in cranimaxillofacial defects. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 42(10):1375, 2013

Probst FA, **Burian E**, Fliefel R, Ehrenfeld M, Otto S; Zukünftige Optionen zur Rekonstruktion bei ausgedehnten knöchernen Defekten im Kiefer-, Gesichts- und Schädelbereich mittels CAD/CAM-gefertigter bioaktiver Leitschienen; OP-Journal; 29(2): 200-204, 2013

Weitere Veröffentlichungen

Burian E, Schulz C, Probst FA, Palla B, Tröltzsch M, Maglitter F, Califano L, Ehrenfeld M, Otto S. Fluorescence based characterization of oral squamous cell carcinoma using the Visually Enhanced Light Scope technique. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017

Kazmierczak PM, **Burian E**, Eschbach R, Hirner H, Moser M, Havla L, Reiser M, Nikolaou K, Cyran. Annexin-basierte optische Fluoreszenzbildgebung und Perfusions-MRT zum Monitoring der frühen pro-apoptischen Effekte einer anti-angiogenetischen Therapie im Tiermodell. *RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der R 187(S 01)*, 2015

Kazmierczak PM, **Burian E**, Eschbach R, Hirner H, Moser M, Havla L, Eisenblätter M, Nikolaou K, Cyran CC; Non-invasive characterization of regorafenib therapy effects on experimental colon carcinomas using a multimodal imaging protocol with apoptosis-targeted optical fluorescence imaging, perfusion MRI, and immunohistochemical validation; *PLoS ONE*, 2015

Otto S, Tröltzsch M, **Burian E**, Mahaini S, Probst FA, Pautke C, Ehrenfeld M, Smolka W; Ibandronate treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible; *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2015

Palla B, **Burian E**, Klecker J, Fliefel R, Otto S; Systematic Review of Oral Ulceration with Bone Sequestration. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2016

Palla B, **Burian E**, Otto S. Systematic review of oral manifestations related to hyperparathyroidism. *Clinical Oral Investigations*, 2017

Otto S, **Burian E**, Tröltzsch M, Kaeppler G, Ehrenfeld M. Denosumab as a potential treatment alternative for patients suffering from diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible – a rapid communication. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017

Otto S, Kleye C, **Burian E**, Ehrenfeld M, Cornelius CP. Custom-milled individual allogeneic bone grafts for alveolar cleft osteoplasty – a technical note. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Egon Burian, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Knochenregeneration in einem ausgedehnten porcinen Unterkieferdefektmodell mittels
CAD/CAM-gefertigter stammzellbesiedelter TCP-PLGA-Leitschienen

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.02.2019

(Ort, Datum)

(Egon Burian)