

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. N. R. Kübler

Freisetzungskinetik des Modellproteins FITC-BSA aus verschiedenen polymerbeschichteten
bovinen Kollagenmatrices

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexis Landers

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Herr Prof. Dr. N. Klöcker
Dekan

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Dr. R. Depprich
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. C. Suschek

“Scientists investigate that which already is;
engineers create that which has never been.”

(Albert Einstein)

Zusammenfassung

Ziel des modernen Tissue-Engineerings von Knochenersatzmaterialien ist es, volumenstabile und biokompatible Trägermaterialien mit Zellen und Zytokinen so zu kombinieren, dass die Eigenschaften des autologen Knochens weitgehend nachgebildet werden.

Für den klinischen Gebrauch derzeit zugelassene Knochenersatzmaterialien, die Wachstumsfaktoren enthalten, können aufgrund unphysiologischer Dosierungen und Freisetzungsmuster zum Teil mit schweren Nebenwirkungen einhergehen. Es ist somit erforderlich, die Freisetzung von Wirkstoffen aus den Trägermaterialien besser und kontrollierter zu steuern.

In dieser Arbeit wurde dazu die Freisetzung des Modellproteins BSA (bovines Serumalbumin) aus polymerbeschichteten, bovinen Kollagenmatrices in einem Beobachtungszeitraum von 11 Tagen in vitro untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Art und Menge der verwendeten Polymere PLA (Polylactid) und PLGA (Polylactid-Co-Glycolid) auf die BSA-Retention besitzen. Zur Simulation von in vivo Bedingungen wurde in einer Untergruppe nach jedem Beobachtungsintervall ein Mediumwechsel vorgenommen. Zusätzlich wurden die Matrices mittels Rasterelektronenmikroskop hinsichtlich des Einflusses unterschiedlicher Polymerlösungsmittel auf die Ausbildung der Beschichtung untersucht.

Bei den unbeschichteten Matrices fanden sich BSA-Freisetzungsraten von bis zu 80% in den ersten 24 Stunden, die in einer Übergangsphase bis zum fünften Tag abklangen und bis zum elften Tag vollständig ausliefen. Der initiale Freisetzungsschub an BSA konnte in Abhängigkeit von verwendeter Polymermolekülgröße und Menge reduziert werden. Ein signifikanter Einfluss der Art des Polymers (PLA vs. PLGA) konnte nicht nachgewiesen werden. In der Gruppe mit Mediumwechsel wurde im gesamten Beobachtungszeitraum insgesamt ca. 70% der jeweils aufgetragenen Proteinmenge freigesetzt, in der Gruppe ohne Mediumwechsel ca. 50%. Die Gesamtmenge des abgegebenen Proteins wurde nur durch die Beschichtung mit einem Polymer mittlerer Molekülgröße im Beobachtungszeitraum signifikant reduziert. Morphologische Auswertungen mittels Rasterelektronenmikroskopie ergaben Unterschiede in der Ausbildung der Polymerbeschichtung in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel. Ferner konnte eine schwache mechanische Haftung der Polymerschicht an der Trägermatrix nachgewiesen werden, welche die vergleichsweise geringe Retentionswirkung der Polymerschichten auf die BSA-Freisetzung erklärt.

Durch den Einsatz eines biodegradablen Polymer-Coatings konnte der initiale Freisetzungsschub von Wachstumsfaktoren aus der Trägermatrix abgemindert werden. Das Erreichen eines akzeptablen Wirkungs-/Nebenwirkungsprofils von zytokinhaltigen Knochenersatzmaterialien erfordert jedoch eine weitere Annäherung an physiologische Bedingungen und damit weiterreichende Modifikationen im Freisetzungsprofil der Wachstumsfaktoren.

Summary

The objective of modern bone tissue-engineering is to imitate the properties of autologous bone by combining biocompatible carrier materials with cells and cytokines. Clinically approved bone substitute materials containing growth factors may cause severe side effects due to unphysiological dosage and release pattern. Therefore it is necessary to improve the controlled release of active agents from these carrier materials.

In this study the in vitro release of the model protein FITC-BSA (fluorescein conjugated bovine serum albumine) from bovine cancellous bone matrices (insoluble collagenous bone matrix, ICBM) was examined. Control of protein retention was achieved by coatings of biodegradable polymers (polylactic acid (PLA) and polylactic-glycolic-acid (PLGA)) of different molecular weights. Release kinetics were assessed for an observation period of 11 days. In one subgroup the incubation medium was changed at every measuring point to imitate in vivo conditions.

Additionally the polymer-coated matrices were analyzed by scanning electron microscopy to gain an insight in the mechanisms of protein retention by these polymers and the impact of different organic (polymer) solvent agents on the formation of the polymer coating.

Results show a „burst-release“ of about 80% BSA from the uncoated matrices in the first 24 hours, followed by a delayed release up to day 5, ending in an interval in which only a little amount of protein is released. The initial burst was attenuated in dependence of the amount and the molecular size of the used polymer. There was no measurable difference regarding the kind (PLA vs. PLGA) of the coating-polymer.

In the subgroup with replacement of incubation medium, about 70% of the overall protein dose was released, compared to 50% in the subgroup without medium renewal. Only polymers with a medium molecular size were able to reduce the amount of overall released protein during the observation period.

Scanning electron microscopy results indicate differences between the polymer coatings depending on the organic solvent used. A weak adhesion of the polymer coating to the matrices was observed explaining its rather weak retentive effect on the protein release. Though a PLA or PLGA polymer coating is able to extenuate the initial burst-release of BSA from the collagenous matrix, reducing side effects of a growth factor releasing bone substitute material demands an accurate coordination of the growth factor releasing profile.

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone morphogenetic protein
CSD	Critical size (bone) defect
DBM	Demineralized bone matrix
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme linked immuno sorbend essay
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FITC-BSA	Fluoreszeinconjugat von bovinem Serumalbumin
ICBM	Insoluble collagenous bone matrice
IL-1, IL-6	Interleukin-1/-6
KEM	Knochenersatzmaterial
MedW	Mediumwechsel
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSC	Mesenchymal stem cell
MW	Mittelwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Polycaprolacton
PDGF	Platelet derived growth factor
PEG	Polyethylenglucol
PLA	Poly(lactic-acid)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic)acid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT-PCRs	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
TGF-β	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Knochenneubildung und Knochenheilung.....	2
1.3 Molekulare und zelluläre Komponenten der knöchernen Regeneration.....	2
1.3.1 Pro-inflammatorische Zytokine	3
1.3.2 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren	3
1.3.3 Metalloproteinasen und angiogenetische Faktoren.....	4
1.3.4 Inhibitoren der Osteogenese	4
1.4 Knochenersatzmaterialien und Tissue-Engineering von Knochen:	5
1.4.1 Anforderungen an eine ideale Trägermatrix	5
1.4.2 Biomaterialien für den künstlichen Knochenersatz:	6
1.4.2.1 ICBM - bovine Kollagenmatrices	6
1.4.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren für Knochenersatzmaterialien - rhBMP-2 ..	7
1.4.3.1 FITC-BSA als Modelloprotein - Vergleich mit BMP-2.....	8
1.5 Steuerung der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Rahmen des Tissue-Engineerings von Knochen	9
1.5.1 PLA und PLGA	11
2 Fragestellung und Zielsetzung	13
3 Materialien und Methoden.....	14
3.1 Bovine Kollagenmatrix (ICBM)	14
3.2 FITC-BSA-Dotierung und -Coating der ICBMs.....	15
3.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	17
3.4 Freisetzungskinetiken.....	17
3.5 Statistische Auswertung	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Charakterisierung der ICBMs	19
4.2 Ermittlung der Eichgeraden für die Fluoreszenzmessung von FITC-BSA.....	21
4.3 Freisetzungskinetiken.....	22

4.4	Elektronenmikroskopie	28
5	Diskussion.....	33
5.1	Kritische Wertung von Materialien, Methoden und Versuchsdesign	33
5.1.1	ICBM	33
5.1.2	FITC-BSA als Modellprotein	34
5.1.3	Polymercoating mit PLA und PLGA.....	35
5.1.4	FITC-BSA Freisetzungskinetik	37
5.1.4.1	BSA-Freisetzung von unbeschichteten ICBM	39
5.1.4.2	Einfluss des Polymer-Coating auf die BSA-Freisetzung	40
5.2	Schlussfolgerungen der in-vitro Modellversuche für die Herstellung eines Knochenersatzmaterials	43
5.2.1	Die „optimale“ Dosis von Wachstumsfaktoren für die knöcherne Regeneration	43
5.2.2	Die „optimale“ Releasekinetik von Wachstumsfaktoren für die knöcherne Regeneration	43
6	Literaturverzeichnis	45

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von PLA	11
Abb. 2: Strukturformel von PLGA	11
Abb. 3: Boviner Femurknochen, grob entfettet	14
Abb. 4: ICBM: nativ, FITC-BSA dotiert, polymerbeschichtet	15
Abb. 5: Polymerpulver.....	16
Abb. 6: Gold-beschichtete ICBM	17
Abb. 7: Gewichtsverteilung der ICBM.....	19
Abb. 8: Häufigkeitsverteilung der ICBM-Gewichte.....	19
Abb. 9: Eichgerade für FITC-BSA	21
Abb. 10: Freisetzungs-Kinetik der Gruppe mit Mediumwechsel.	22
Abb. 11: FITC-BSA-Fluoreszenz im Medium nach 6h (Gruppe mit MedW).....	23
Abb. 12: FITC-BSA-Fluoreszenz im Medium nach 12h (Gruppe mit MedW).....	24
Abb. 13: Freisetzungs-Kinetik der Gruppe ohne Mediumwechsel.....	25
Abb. 14: FITC-BSA-Fluoreszenz im Medium nach 6h (Gruppe ohne MedW)	26
Abb. 15: FITC-BSA-Fluoreszenz im Medium an Tag 5 (Gruppe ohne MedW).....	27
Abb. 16: ICBM nativ, 100x	28
Abb. 17: ICBM nativ, 350x	28
Abb. 18: ICBM, coating: PLA10% in DCM, 250x	29
Abb. 19: ICBM, coating: PLGA 5% in EthLac, 100x.....	29
Abb. 20: ICBM, coating: PLGA 5% in EthLac, 300x.....	30
Abb. 21: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 500x.....	30
Abb. 22: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 700x.....	30
Abb. 23: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 400x.....	30
Abb. 24: ICBM, coating: PLGA 20% in DCM, 70x	31
Abb. 25: ICBM, coating: PLGA 5% in DCM, 100x	31
Abb. 26:ICBM, coating: PLGA 20% in DCM mit FITC-BSA, 100x	32
Abb. 27: ICBM, coating: PLGA 20% in DCM nach 3d in Aqua dest., 100x.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: durchschnittliches Gewicht des pro ICBM aufgetragenen Polymers	20
---	----

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das kraniofaziale Skelett ist an einer Vielzahl spezifischer Funktionen beteiligt wie z.B. Schutz des Gehirns und des Sehtraktes, Atmung, Kau-, Sprech- und Hörvorgang.

Die Rekonstruktion komplexer kraniofazialer Knochendefekte kann nach Traumata, ausgedehnten Tumorentfernungen, bei angeborenen Fehlbildungen oder erworbenen Knochenatrophien erforderlich werden. Die damit verbundene chirurgische Herausforderung ist nicht alleine durch die Defektgröße gegeben, sondern auch durch die Lokalisation und die Geometrie des Knochendefektes, die Wahl der rekonstruktiven Methode, die Beschaffenheit des angrenzenden Gewebes bzw. des bedeckenden Weichgewebemantels und anderer patientenindividueller Faktoren wie Alter, allgemeine Vorerkrankungen, Medikation etc.

Knochendefekte „kritischer Größe“ („critical-size-defects =CSD“), die den Einsatz rekonstruktiver Techniken erfordern, wurden ursprünglich als „die kleinste Ausdehnung einer intraossären Wunde in einem speziellen Knochen und einer speziellen Spezies, die nicht spontan während der Lebenszeit des Subjektes spontan ausheilt“, definiert¹. Bezogen auf den humanen Gesichtsschädel lässt sich unter Berücksichtigung des zuvor Gesagten dabei jedoch keine absolute Angabe über die Ausdehnung eines solchen Knochendefektes machen².

Für die Rekonstruktion knöcherner Gesichtsschädeldefekte können autologe und allogene Materialien verwendet werden. Aufgrund seiner osteogenetischen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften ist der autologe Knochen heutzutage immer noch Goldstandard in der Knochenrekonstruktion. Der größte Nachteil des autologen Knochens ist seine limitierte Verfügbarkeit und die u.U. nicht unerhebliche "*Donorsite*-Morbidity" im Bereich der Entnahmestelle. Zudem unterliegen die Transplantate aus autologen Knochen oftmals einer signifikanten Resorption nach der Transplantation³.

Autologer Knochen ist von sich heraus in der Lage die Knochenneubildung anzuregen, da neben der extrazellulären Knochenmatrix (Osteokonduktion) auch das Knochenmark, bzw. Zellen und Wachstumsfaktoren mit transplantiert werden, die ihrerseits zur Rekrutierung von Vorläuferzellen befähigt sind (Osteogenese bzw. Osteoinduktion).

Als Knochenersatz fungierende Biomaterialien sind per Definition natürliche oder synthetische Materialien, die Teile des lebenden Organismus ersetzen oder in unmittelbarem Kontakt mit lebendem Gewebe stehen³. Als volumenstabile Platzhalter dienen sie dem einsprossenden Knochengewebe als Leitschiene, indem sie die Adhäsion von Zellen fördern, die wiederum proliferieren und extrazelluläre Matrix produzieren⁴. Dies hat zur Folge, dass größere zu ersetzende Knochenvolumina nur schwer knöchern durchbaut werden und sich diese Art von Ersatzmaterialien bisher nur unzureichend an den dynamischen Gewebeumbauprozessen des Knochenstoffwechsels - zum Beispiel im noch nicht ausgewachsenen Skelett - beteiligen.

Das moderne Tissue-Engineering von Knochenersatzmaterialien hat zum Ziel, Trägermaterialien mit Zellen und Zytokinen so zu kombinieren, dass die Eigenschaften des autologen Knochens weitgehend nachgebildet werden⁵.

1.2 Knochenneubildung und Knochenheilung

Knochengewebe wird zum einen im Rahmen der Entwicklung gebildet (Osteogenese, Skelettogenese), zum anderen im Rahmen von Frakturheilungsprozessen.

Der Knochen des Gesichtsschädels wird durch die sogenannte desmale Ossifikation gebildet. Dabei entsteht das Knochengewebe ohne Zwischenstufe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe, indem sich Mesenchymzellen zu Osteoblasten differenzieren, die (später konfluierende) Osteoidinseln bilden. Die davon abzugrenzende, sog. chondrale Ossifikation wird auch indirekte Ossifikation genannt, da hier die Verknöcherung über eine aus Knorpelgewebe bestehende Zwischenstufe stattfindet. Diese wird im Verlauf durch Chondroklasten und Osteoblasten in Knochengewebe umgebaut. Die Art und Weise der Knochenbildung (desmal vs. chondral) durch die beteiligten Osteoblasten scheint identisch zu sein⁶.

Bei der sogenannten primären Frakturheilung verwächst unter optimalen Bedingungen die Frakturstelle direkt und ohne Ausbildung von Narbengewebe. Bei der sekundären bzw. indirekten Frakturheilung, die z.B. bei Mobilisation der Frakturrenden gegeneinander auftritt, wird ein sog. „Kallus“ als Bindegewebs- und Knorpelformation gebildet, der analog der bei der chondralen Ossifikation gebildeten knorpeligen Knochenvorstufe als Matrix für die Knochenbildung fungiert. Sowohl auf zellulärer Ebene, als auch bzgl. der beteiligten Signalwege weisen sekundäre Frakturheilung und chondrale Ossifikation viele Gemeinsamkeiten auf. Ein Unterschied zur fetalen Knochenbildung scheint bei Knochenheilungsprozessen im Erwachsenenalter jedoch die Ausprägung von Entzündungsprozessen zu sein, die im zuletzt genannten Fall eine der Hauptquellen für osteoinduktive Signale darstellen („response to injury“)⁷. Insbesondere die zeitlichen Abläufe und die Gewichtung der beteiligten Mechanismen sind jedoch noch nicht abschließend geklärt^{8,9}.

1.3 Molekulare und zelluläre Komponenten der knöchernen Regeneration

Die Komplexität der Biologie knöcherner Regeneration ergibt sich u.a. durch:

- das wechselseitige Zusammenspiel von Promotoren und Inhibitoren und der zum Teil konzentrationsabhängig (sogar gegensätzlichen) Wirkung einzelner Faktoren,
- die versetzte, überlappende und ineinandergreifende zeitliche Abfolge der unterschiedlichen Stadien der Knochenregeneration,
- die räumliche Verteilung und Abgrenzung einzelner Reaktionskompartimente wie extrazellulärer Raum, Zytoplasma und Nukleus oder verschiedene anatomische Reaktionsorte wie Kortex, Periost, Knochenmark oder umgebendes Weichgewebe,
- die Abhängigkeit von Faktoren wie pH-Wert, lokaler Verfügbarkeit von Nährstoffen, Sauerstoffsättigung des Gewebes oder mechanischer Stabilisierung der Frakturstelle^{10,11,12,13}.

Moleküle, welche die Frakturheilung begünstigen, können grob in drei Gruppen unterteilt werden: 1. pro-inflammatorische Zytokine, 2. TGF-beta Superfamilie und andere Wachstumsfaktoren, 3. Metalloproteinasen und angiogenetische Faktoren:

1.3.1 Pro-inflammatorische Zytokine

Interleukin-1 (**IL-1**), Interleukin-6 (**IL-6**), und Tumornekrose-Faktor α (**TNF- α**), die von Makrophagen, inflammatorischen Zellen und periostalen, mesenchymalen Zellen sezerniert werden, besitzen chemotaktische Effekte, erhöhen die extrazelluläre Matrixsynthese, stimulieren die Angiogenese und rekrutieren endogene Fibrozyten zur Frakturstelle. Sie erreichen ihre größten Konzentrationen in den ersten 24 Stunden nach knöcherner Verletzung, durchlaufen ein Minimum während der Periode der Knorpelformation und steigen ein zweites Mal während der knöchernen Remodellierungsphase an. TNF- α rekrutiert mesenchymale Stammzellen, induziert die Apoptose hypertropher Chondrozyten bei der enchondralen Ossifikation und stimuliert die Funktion von Osteoblasten¹⁰.

1.3.2 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

Die TGF- β Superfamilie, von der mindestens 34 Vertreter im menschlichen Genom identifiziert sind, ist eine große Gruppe von Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, welche die bone morphogenetic proteins (BMPs), growth differentiation factors (GDFs), activine, inhibine und die Mullerian inhibiting substance umfasst.

BMPs werden von Osteoprogenitorzellen, mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten der extrazellulären Matrix produziert. Sie induzieren eine Kaskade für die Chondro-/Osteogenese, einschließlich Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen und Osteoprogenitorzellen, sowie Angiogenese und Kontrolle der Synthese von extrazellulärer Matrix. Die regulatorischen Effekte sind sowohl von der Art der Zielzelle, deren Differenzierungsgrad und der lokalen BMP-Konzentration im Bereich ihres Liganden abhängig, als auch von deren Interaktionen mit anderen zirkulierenden Faktoren. Als „pleiotrope Morphogene“ regulieren und determinieren sie Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Osteoblasten, Chondroblasten, Neuralzellen und Epithelzellen. Trotz ihrer Verwandtschaft hat jede Untergruppe von BMPs ihre eigene Rolle bei der knöchernen Regeneration, sowie ein eigenes, charakteristisches zeitliches Expressionsmuster. Derzeit wird angenommen, dass BMP-2, -6 und -9 am potentesten die Osteoblasten-Differenzierung aus mesenchymalen Vorläuferzellen induzieren. Ihrerseits können manche BMPs auch die Synthese und Sekretion anderer angiogenetischer Wachstumsfaktoren (Insulin like growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)) stimulieren, oder direkt Endothelzellen zur Angiogenese anregen^{14,15}.

Thrombozyten setzen während der initialen Phase der Knochenheilung **TGF- β** frei. Diesem Faktor werden Funktionen bei der Initiierung der Kallus-Formation zugeschrieben. TGF- β wird auch von Osteoblasten und Chondrozyten produziert und in der Knochenmatrix gespeichert. Er dient zudem als potenter chemotaktischer Stimulator von mesenchymalen Stammzellen und erhöht deren Proliferation, sowie diejenige von Präosteoblasten, Chondrozyten und Osteoblasten. Darüber hinaus induziert er die

Produktion extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen, Proteoglykane, Osteopontin, Osteonektin und alkalischer Phosphatase. TGF- β (insb. TGF- β_2 und TGF- β_3) wird eine wichtige Rolle in der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation zugeschrieben, sein alleiniges osteoinduktives Potenzial scheint aber beschränkt zu sein.

PDGF (platelet derived growth factor) wird in Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Osteoblasten synthetisiert und ist ein starkes Mitogen für Zellen mesenchymalen Ursprungs. IL-1, TNF- α und TGF- β beeinflussen die Bindung von PDGF an seinen Rezeptor. Von Thrombozyten freigesetzt wirkt es als Stimulans für Proliferation und Migration mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten während der frühen Phase der Frakturheilung. Im Gegensatz zu BMPs, deren therapeutischer Einsatz bereits klinische Verwendung findet, ist das therapeutische Potenzial von PDGF bislang unklar.

Während der initialen Phase der Frakturheilung werden ebenfalls **FGFs** (fibroblast growth factor) aus Monozyten, Makrophagen, mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten synthetisiert, die ihrerseits auf Wachstum und Differenzierung von Fibroblasten, Monozyten, Osteoblasten und Chondrozyten wirken. FGFs wird eine Rolle bei der Kallusformation zugeschrieben und spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese.

1.3.3 Metalloproteinasen und angiogenetische Faktoren

Heutzutage schreibt man Metalloproteinasen (=MMP) eine Schlüsselrolle bzw. Signalwirkung in der Steuerung von Zellverhalten und Signalwegen zu, da ihr spezifisches proteolytisches Spektrum auch Membranoberflächenproteine, andere Proteinasen, intrazelluläre Substrate, Protein-Inhibitoren, chemotaktische Moleküle, Wachstumsfaktoren, Membranrezeptoren und Zell-Zell- sowie Zell-ECM-Adhäsionsmoleküle umfasst¹⁶.

Damit bei der enchondralen Ossifikation Blutgefäße einsprießen können, geht der Ossifikation ein Umbau der extrazellulären Matrix voraus. Entsprechend wird die enge zeitliche und räumliche Verbindung zwischen Knochenformation und Vaskularisierung als „angiogenetisch-osteogenetische Kupplung“ bezeichnet.

Einige osteogenetische Wachstumsfaktoren besitzen direkte (VEGF, TGF- β , PDGF), andere indirekte angiogenetische Effekte (BMP-2,-4,-7). Die VEGF-Produktion wird durch die meisten osteoinduktiven Faktoren stimuliert. **VEGF** ist sowohl essenziell für die angiogenetischen Aktivitäten der Wachstumsfaktoren FGF und BMP-2, als auch für die primäre (BMP-vermittelte) Osteoblastendifferenzierung^{17,18}.

1.3.4 Inhibitoren der Osteogenese

Bei der Regulation des Knochenstoffwechsels existieren zahlreiche inhibitorisch wirkende Moleküle, die im Sinne eines negativen Feedbacks fungieren oder über quervernetzende Wirkung in den Signalpfaden die Wirkung von stimulierenden Molekülen antagonisieren. Der hemmende Einfluss kann auf allen Stufen der Signalkaskade wirken: auf extrazellulärer Ebene, auf Rezeptorebene, oder auf intrazellulärer Ebene.

Noggin ist ein von Osteoblasten produzierter Inhibitor, der durch Bindung an BMPs (-2,-4,-5,-6,-7, GDF-5 und -6) deren Andocken an BMP-Rezeptoren verhindert. Die Expression von Noggin wird zum einen selbst durch BMP induziert, freies BMP-2 (in der ECM) kann

zum anderen den hemmenden Effekt von Noggin auf die Differenzierung von Osteoblasten aufheben. Weitere Inhibitoren, die ebenfalls durch Bindung an BMPs deren Rezeptorbindung blockieren, sind **Chordin** und **Gremlin**. **Sclerostin** wirkt hemmend über eine kompetitive Bindung an BMP Rezeptoren (-2,-4,-6,-7) und wird ausschließlich von Osteozyten gebildet. Der inhibitorische Effekt von **Follistatin** erfolgt über die Bindung an BMPs (-2,-4,-15,-7) an BMP-Rezeptoren.

Auch einige BMPs selbst sind Antagonisten osteogener BMPs: z.B. behindert **BMP-3** die Wirkung von BMP-2¹⁰.

1.4 Knochenersatzmaterialien und Tissue-Engineering von Knochen:

1.4.1 Anforderungen an eine ideale Trägermatrix

Die **Biokompatibilität** eines Biomaterials ist als die wünschenswerte Eigenschaft definiert „reguläre Zellaktivität - einschließlich ihrer molekularen Signalwege - zu unterstützen ohne lokale oder systemische toxische Nebenwirkungen auf den Wirt auszuüben^{19, 20}“. Im einfachsten Falle wäre damit eine gegenseitige Toleranz von Biomaterialien und Wirt gemeint. Im Idealfall bedeutet dies für ein Knochenersatzmaterial (KEM) die Befähigung zur Osteoinduktion einschließlich Angiogenese.

Die ideale Trägermatrix für ein KEM sollte dergestalt vom Körper **abbaubar** sein, dass sie in einer definierten Art und Weise resorbiert wird und somit den Platz für das Einwachsen neuen Knochens freigibt. Die gewünschte Resorptionsgeschwindigkeit ist unter anderem von der mechanischen Beanspruchung im Bereich des zu ersetzenden Defektes abhängig. Besondere Anforderungen werden an den Knochenersatz im wachsenden Skelett gestellt, denn dieser sollte vollständig resorbierbar sein und der defekte Bereich sollte sich am besten synchron mit dem Wachstum remodellieren²¹.

Eine weitere funktionale Schlüsselrolle nimmt die **Porosität der KEM** ein. Analog zur natürlichen Knochenspongiosa bilden verbundene Hohlräume mit einem Durchmesser von mindestens 100µm (150-500µm²²) die Möglichkeit zur Einwanderung von Zellen, sowie der Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff für deren Versorgung. Natürliche Spongiosa ist in Bereichen mechanischer Beanspruchung verdichtet. Umgekehrt nimmt die mechanische Widerstandsfähigkeit mit der Größe der Poren ab, so dass je nach Anforderung die benötigte mittlere Porengröße variierbar sein sollte. Die reproduzierbare technische Herstellung eines solch komplexen 3D-Konstruktes ist mit entsprechenden wissenschaftlichen und technischen Herausforderungen verbunden²³.

Die **mechanische Stabilität** eines Knochenersatzmaterials sollte im Idealfall mit derjenigen des Wirtsknochens im Bereich des Implantatlagers identisch sein und den Alltagsbelastungen der Patientenaktivität standhalten. Zum einen muss das Knochenersatzmaterial zerstörungsfrei die Implantationsprozedur überstehen, zum anderen die Kräfte aushalten, die typischerweise an der Grenzfläche zwischen Gewebe und Implantat einwirken. So besitzt dichte biokeramische Matrix das mechanische Widerstandsprofil von Kortikalis, wohingegen Polymere bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften meistens Spongiosa ähneln²⁴.

1.4.2 Biomaterialien für den künstlichen Knochenersatz:

Biomaterialien, welche die Matrix eines Knochenersatzmaterials bilden, können in natürliche und synthetische Polymere, bioaktive Keramiken und Glasderivate, Hydrogele und Metalle unterteilt werden. Teilweise werden diese Biomaterialien auch miteinander kombiniert^{25, 26, 27, 3}.

Beispiele für eingesetzte natürliche **Polymere** sind Polysaccharide (z.B. Chitosan) und Proteine (z.B. Kollagen). Zu den Vertretern synthetisch hergestellter Polymere zählen Polymilchsäure (= PLA, Polylaktat) oder Polylaktat-Coglycolid (PLGA). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter kontrollierten Bedingungen hergestellt werden können, und somit steuerbare und reproduzierbare mechanische und physikalische Eigenschaften besitzen.

Da ca. 85% der knöchernen Extrazellulärmatrix aus Calciumphosphat bestehen, liegt es nahe, auch primär anorganische, calciumphosphathaltige **Bio-Keramiken** als Knochenersatzmaterialien zu entwickeln. Die Derivate umfassen Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat und bi-phasisches Calciumphosphat. Dabei hat Hydroxylapatit eine langsamere Abbaurate als das triphasische Calciumphosphat wohingegen β -Tricalciumphosphat am schnellsten abgebaut wird²⁸. Da die Abbauraten dennoch vergleichsweise langsam sind und calciumphosphathaltige Biomaterialien oft nachteilige mechanische Eigenschaften besitzen (Sprödigkeit), haben diese Stoffe beispielsweise in Kombination mit synthetischen Polymeren deutlich stabilere, und bezüglich des Abbaus steuerbare Produkte ergeben.

Glasbasierte Knochenersatzmaterialien, die in poröse Glas/Glaskeramik-Gerüste oder in poröse Glas-Polymergerüste eingeteilt werden, weisen den Vorteil auf, dass das in ihnen enthaltende Silikat die Expression von osteoblastären Genen induziert, welche wiederum die Osteogenese und die Produktion von Wachstumsfaktoren regulieren. Nachteilig an den glasbasierten KEM sind jedoch ihre geringe mechanische Stabilität und Bruchfestigkeit, welche den Einsatz limitieren.

Eine weitere Gruppe von Biomaterialien stellen die sog. **Hydrogele** dar, welche durch die Querverbindung eines hydrophilen Polymers mit einem quervernetzenden Molekül (engl. „crosslinker“) entstehen und große Mengen Wasser aufnehmen können²⁹. Sie besitzen dadurch den Vorteil, dass sie durch alleiniges Quellen mit Zytokinen beladen werden können, welche sie nach der Implantation in einem Diffusionsprozess wieder abgeben. Ein natürlicher Vertreter dieser Gruppe ist Gelatine. Synthetische Hydrogele basieren oftmals auf Makromeren oder Co-Polymeren von Polyethylenglykol (PEG)³⁰.

1.4.2.1 ICBM - bovine Kollagenmatrices

ICBM (Insoluble collagenous bone matrix) wird aus spongiösem Knochengewebe von Rind oder Pferd durch physikalische und chemische Bearbeitung gewonnen und ist damit streng genommen kein „de novo“ synthetisiertes Matrixmaterial, wie z.B. eine computerdesignte, dreidimensional gedruckte Hydroxylapatit-Matrix¹⁹. ICBM setzt sich aus dem freigelegten, trabekulären und überwiegend aus Kollagen-1 bestehenden Netzwerk zusammen, welches das Gerüst der Spongiosa darstellt. Als Naturprodukt besitzt

es bezüglich des Materials (Kollagen) und des Gerüsts bzw. der Porengröße eine optimale Biokompatibilität. Das Größenspektrum der Poren erstreckt sich von ca. 85 bis >325µm. Dabei sind kleinere Porengrößen für die Zelladhäsion von Vorteil, größere Poren für die Migration und Angiogenese^{31, 32}.

In der nativen Form ist ICBM elfenbeinfarben, in getrocknetem Zustand hart und spröde, nach Aufquellung schwammartig und elastisch komprimierbar. ICBM unterscheidet sich von DBM (demineralisierte Knochenmatrix) u.a. dadurch, dass eine Inaktivierung osteoinduktiver Matrixproteine vorgenommen wurde. Demineralisierte Knochenmatrix weist im Gegensatz zum extrahierten xenogenen Kollagengerüst von ICBM endogene Proteinkonzentrationen von beispielsweise 3.800ng/g an BMP-2 oder 20.000ng/g an Osteopontin auf³³.

Ebenso wie DBM ist ICBM in vivo resorbierbar. Die Resorption des Kollagen-1 Gerüsts verläuft vergleichsweise langsam und kann bei einem Volumen von ca. 1-2cm³ bis zu 6 Monate betragen³⁴.

Die mechanischen Eigenschaften von ICBM lassen die Verwendung als belastungsstabiles Knochenersatz-Material nicht zu und schränken damit die Verwendbarkeit im Bereich der Wirbelsäule und der langen Röhrenknochen der unteren Extremität ein. Der Einsatz zum Ersatz auch größerer Volumina von Gesichtsschädeldefekten ist jedoch ohne weiteres möglich³⁵.

1.4.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren für Knochenersatzmaterialien – rhBMP-2

Ab einer bestimmten Defektgröße ist die Lokalisation und Konzentration der endogen produzierten Signalmoleküle für die knöcherne Durchbauung eines Matrixgerüsts nicht mehr ausreichend. In in-vitro- und Tiermodellen wurde deshalb eine Vielzahl an Faktoren bezüglich ihres osteogenen Potentials für ein Knochenersatzmaterial untersucht: BMPs, TGF-β, Progranulin (PGN), Aktivine, Growth differentiation factor (GDF), IGF, FGF, VEGF, PDGF, TNF-α, Interleukin, Interferon-γ, Prostaglandine, Parathormon, Steroide sowie Vitamin D³⁶. Insbesondere BMP-2 und BMP-7 zeigten ein großes Potential für die Knorpel- und Knochenregeneration. Nach der Entdeckung der BMPs 1965-1971 durch Urist et al.^{37,38} wurde diese Proteinfamilie intensiv studiert. Als einer der stärksten bekannten osteoinduktiven Faktoren kann BMP-2 in vitro und in vivo die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten und Chondrozyten initiieren, sogar die Transdifferenzierung von Muskelzellen in Knochenzellen bewirken und heterotrope Knochenformation induzieren³⁹. Nach erfolgter Herstellung eines rekombinaten BMP-2 (rhBMP-2) und dessen Anreicherung^{40, 41} 1988, wurde BMP-2 im Jahr 2002 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur medizinischen Verwendung am Menschen zugelassen. Im Jahr 2001 wurde das Produkt OP-1 Implant® (Stryker, Hopkinton, MA), das aus in einem in rhBMP-7-Lösung getränkten, bovinen Kollagenschwamm besteht, zur Behandlung von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen zugelassen. Ein Jahr später wurde das rhBMP-2-enthaltene, ebenfalls auf einem bovinen Kollagenträger aufgebrachte Präparat InFuse® (Medtronic, Memphis, TN) für die Wirbelkörperfusion (1 Segment, L4-S1) auf den Markt gebracht. Im weiteren Verlauf

wurde zwar die Zulassung dieser Präparate für die Revision posterolateraler lumbaler Arthrodesen und Pseudarthrosen der Lendenwirbelsäule erweitert, die Verwendung erfolgte jedoch zu über 85% als „*off-labeluse*“ in der Wirbelsäulenchirurgie. Nachdem sich Berichte über schwere Nebenwirkungen bei den ersten beiden der oben genannten Präparate häuften (bis zu 23% der behandelten Patienten), brachte die FDA 2008 Warnungen für den Umgang mit diesen Präparaten heraus. Die gehäuften unerwünschten Wirkungen beinhalteten übermäßige Weichgewebeschwellungen und –entzündungen, akute Luftnot im Zusammenhang mit der operativen Anwendung im Bereich der anterioren Halswirbelsäule, Osteolysen, Radikulitis, überschießende Knochenneubildung und geäußerte Bedenken bezüglich einer möglichen onkogenen Eigenschaft durch die hohen Dosierungen von rhBMP-2 in den zugelassenen Präparaten. Letzter Grund untersagt die Verwendung bei Tumorpatienten oder Schwangeren^{39,42}. Es wird angenommen, dass die beobachteten Nebenwirkungen Folge der „unphysiologischen“ Abgabe der BMPs aus der Kollagenmatrix und damit auch dosisabhängig sind⁴². Da in Lösung befindliches BMP eine kurze Halbwertszeit besitzt, scheinen die Kollagenmatrices mit einer zu hohen Menge des Proteins beladen zu sein, damit der gewünschte Erfolg einer Knochenregeneration klinisch beobachtbar ist⁴³. Dies unterstützt die Forderung nach einer gesteuerten/steuerbaren Freisetzung von Zytokinen aus ihrer Trägermatrix.

1.4.3.1 FITC-BSA als Modelloprotein - Vergleich mit BMP-2

Aufgrund der linearen Beziehung zwischen Fluoreszenz und Konzentration wird Fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltes bovines Serumalbumin (FITC-BSA) insbesondere in der Pharmakologie und Biochemie oft als Modellprotein z. B. für pharmakokinetische Fragestellungen verwendet^{44,45, 46}.

Da molekulare und physikochemische Charakteristika der freizusetzenden Proteine entscheidenden Einfluss auf die Freisetzungskinetik aus einer Trägermatrix besitzen, wird im Folgenden BSA näher charakterisiert und dem Wachstumsfaktor BMP-2 gegenübergestellt.

Nicht nur die Molekülgröße besitzt Einfluss auf das Diffusionsverhalten durch ein molekulares Maschenwerk (z.B. Gelatinematrix), auch elektrische Ladungen auf der Proteinoberfläche oder die Wasserlöslichkeit beeinflussen die Affinität zur Trägermatrix oder die Freisetzungskinetik aus einem Coating.

BSA enthält 583 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 66,4kDa sowie einen hydrodynamischen Durchmesser von 7,2nm. Die 3D-Konformation ist herzförmig⁴⁷.

Hydrophobe Taschen finden sich vor allem im Bereich der Furche in der Mitte „zwischen den Herzhöhlen“. Über Disulfid-Brücken ist auch die Ausbildung von Inter-Protein-Multimeren - und damit eine Aggregation- möglich⁴⁸.

In Kristallen von BSA sind eine Reihe kleiner Moleküle gefunden worden. Neben Salzen der Essigsäure, Malonsäure und Succinylsäure ließen sich interessanterweise auch Fragmente von Polyethylenglykol (PEG) und Sulfationen nachweisen. Dies wird als Hinweis darauf verstanden, die hohe Affinität von Serumalbumin zu vielen möglichen Bindungsliganden herstellen zu können⁴⁹.

Die physiologische Hauptaufgabe von Serumalbumin ist die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes und eine Stabilisierung des pH-Wertes. Weiterhin hat dieses Protein Funktionen beim Transport einer Reihe endogener und exogener Moleküle einschließlich Fettsäuren, Magnesium- und Calciumionen, Aminosäuren, Steroiden und Medikamenten. Es zeichnet sich also durch eine hohe Bindungskapazität und -vielfalt aus, wobei jedoch nicht von einer spezifischen Kollagenbindungsstelle auszugehen ist⁵⁰.

BMP-2 ist einer der potentesten osteogenen Wachstumsfaktoren, der bis heute am besten untersucht wurde und der eine Zulassung zur klinisch/therapeutischen Verwendung besitzt. BMPs liegen im Körper N- und O-glycosyliert vor. Diese Modifikation erhöht die Stabilität und die Halbwertszeit in vivo. Für rekombinantes BMP, das nicht primär glycosyliert ist, wurde dennoch eine osteogene Potenz in vivo nachgewiesen. BMP-2 besteht aus 114 Aminosäuren und liegt in der biologisch aktiven Form als Homodimer vor. Das Monomer hat eine bohnenförmige Struktur, die oft mit einer flachen, aufgehaltene Hand verglichen wird. Die Monomere lagern sich einander zugewandt und versetzt an, sodass eine paragrafen-förmige Struktur entsteht. Die Größe des Dimers beträgt ca. 70 x 35 x 30 Ångström. Durch die Dimerisierung wird eine weitere Stabilisierung des Proteins erreicht, in dem ein hydrophober Kern zwischen den Monomeren entsteht. Auf der dem hydrophoben Kern abgewandten Seite des Proteins findet sich ein positives elektrostatisches Potenzial mit Bindungspotential für Heparin. Die "Fingerspitzen"-Domänen an beiden Enden des Proteins weisen negative elektrostatische Potenziale auf.

Da der hydrophobe Kern erst durch Anlagerung zweier Monomere entsteht, tendieren die Monomere in wässriger Lösung zur Aggregation, da die Isolation der hydrophoben Anteile von der Hydrathülle eine energetisch günstige Konformation darstellt^{51,52}.

Bezüglich der Einflussfaktoren „Größe“ und „Oberflächenladungsverteilung“ lassen sich FITC-BSA und BMP-2 in Hinblick auf die Freisetzungsprofile der geplanten Freisetzungskinetik näherungsweise miteinander vergleichen, zumal die Adsorption auf die Trägermatrix unspezifisch durch Auftrocknung vorgenommen wird.

1.5 Steuerung der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Rahmen des bone tissue engineering

Die Art und Weise der Verbindung zwischen Trägermatrix und Wachstumsfaktor bestimmt maßgeblich die zeitliche Charakteristik seiner Freisetzung.

Der Wachstumsfaktor sollte lokal in der benötigten physiologischen Konzentration zum richtigen Zeitpunkt zur Verfügung stehen und nicht sofort abdiffundieren.

Die Abbaugeschwindigkeit der Matrix sollte idealerweise dergestalt sein, dass möglichst lange eine mechanische Stabilität gewährleistet ist und die Matrixresorption genauso schnell erfolgt, wie die Front des von peripher einwachsenden Knochengewebes voranschreitet.

Die Verbindungsweise zwischen Matrix und Wachstumsfaktor hängt sowohl von der Art der Matrix, als auch von der Art des Wachstumsfaktors ab. Zudem können verschiedene Verbindungsarten zwischen einer Wachstumsfaktor-/Matrix-Kombination hergestellt werden:

Einschluss - Hierbei wird das Molekül in die Matrix bei dessen Synthese inkorporiert, d.h. physisch eingeschlossen. Dafür müssen physiko-chemische Hürden überwunden werden, wie z. B. die unterschiedliche Löslichkeit der wässrigen Lösung des Wachstumsfaktors in einer hydrophoben Matrixgrundmasse. Ein Ansatz besteht aus Emulsifikationstechniken, obwohl die Verwendung organischer Lösungsmittel die biologische Aktivität von Wachstumsfaktoren negativ beeinflussen kann. Im einfachsten Fall wird der Wachstumsfaktor (GF) direkt mit dem Matrixmaterial bei dessen Formulierungsvorgang dazu gegeben und vermischt. Die Freisetzung des GF erfolgt dann entweder durch Diffusion aus der Matrix oder im Rahmen der Freisetzung während der Matrixdegradation. Im ersten Falle wäre die Abgabegeschwindigkeit von der Molekülgröße, der Löslichkeit und Ladung sowohl des Wachstumsfaktors als auch der Matrixmoleküle abhängig, im zweiten Fall von der Degradationsgeschwindigkeit der Matrix.

Absorption - Das Matrixmaterial saugt hierbei den freizusetzenden Wachstumsfaktor schwammartig auf. Meist wird die vorgefertigte Matrix in eine Lösung aus Wachstumsfaktoren gelegt und quillt in dieser auf. Die Abgabe des GF folgt in diesem Falle über Diffusion und ist dabei neben der Molekülgröße auch von der Ladung der beteiligten Stoffe abhängig. Geeignete Matrixmaterialien für diesen Verbindungsvorgang sind Hydrogele wie Gelatine und Kollagenschwämme²⁹.

Immobilisation und physikalische Adsorption - Mithilfe der kovalenten Bindung kann der GF an die Matrix gebunden werden. Dies kann die direkte chemische Anbindung an das Matrixmaterial beinhalten oder die kovalente Überbrückung durch ein weiteres Molekül (sogenannter „crosslinker“).

Die direkte Konjugation an das Matrixmolekül findet meist über funktionelle Gruppen statt. Sitzen diese zum Beispiel an Seitenverzweigungen eines Matrixpolymers, so ist der gebundene Wachstumsfaktor umso aktiver, je länger diese Verzweigung ist. Die physiologische Halbwertszeit des Wachstumsfaktors wird durch die kovalente Bindung erhöht, weil sie ihn vor dem Abbau/der Phagozytose anderer Zellen schützt.

Viele Wachstumsfaktoren wie BMPs besitzen eine Affinität zu Heparin, die elektrostatischer Natur ist. Diese Eigenschaft hat sich, so wird angenommen, aufgrund von Wechselwirkungen mit Makromolekülen der extrazellulären Matrix (zum Beispiel Glycosaminoglycanen wie Heparansulfat) entwickelt. Konjugation der Matrixmoleküle mit Heparin führt somit zu einer Absorption von BMP an diese Oberflächen. Heparin schützt darüber hinaus viele Wachstumsfaktoren vor dem Abbau in vivo^{53,54,55,56,57}.

1.5.1 PLA und PLGA

Polylactat (PLA = polylactic acid) und Poly(lactat-co-glycolid) (PLGA = polylactic glycolic acid) stellen biologisch abbaubare Polyester dar, deren Synthese über die Polymerisation der Monomere Lactid bzw. Lactid-Co-Glycolid durch Öffnung einer Ringstruktur mit anschließender Veresterung erfolgt. Sie bilden unterschiedliche und determinierbare Kettenlängen aus und besitzen die in den Abbildungen 1 und 2 dargestellten Strukturformeln^{58,59}.

Da bei der Synthese der Polymere auf die gewünschten physikochemischen Eigenschaften (Grad der Hydrophilie, Kristallinität und Stabilität, Degradationszeit) Einfluss

genommen werden kann sind in den vergangenen Jahren bereits verschiedene biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten entstanden⁶⁰: resorbierbares Nahtmaterial, Schrauben, Platten, Stents, Medikamenten-Carrier, aber auch als Matrix-Material für das *Tissue Engineering* sind diese Polymere bereits eingesetzt worden. Für die Steuerung von Medikamentenfreisetzungen wird PLA und PLGA meist in Form von Mikropartikeln und Nanosphären verwendet, in denen der freizusetzende Wirkstoff inkorporiert wird.

Die hydrolytische, nicht-enzymatische Spaltung des Polymermoleküls findet nicht von den Enden her statt, sondern geschieht unselektiv im Bereich des Molekül-Rückgrates. Aus der eigentlichen Kettenlänge des Moleküls (bzw. der damit korrelierenden Molekülmasse) kann daher auch keine direkte Aussage über den Degradationszeitraum gegeben werden, da beispielsweise ein Molekül mit 60 Kilo-Dalton (kD) bei der ersten hydrolytischen Spaltung sofort in zwei 30kD Moleküle gespalten werden kann, wenn dies zufälligerweise genau in der Mitte des Polymers geschieht. Darüber hinaus ist die Degradation vom bei der Verarbeitung verwendeten Lösungsmittel abhängig. Aus diesen Gründen wird die inhärente Viskosität zur Beschreibung der Polymereigenschaften der Angabe der Molekülmasse vorgezogen. Die Abbauprodukte werden über die Niere ausgeschieden oder weiter zu CO₂ und H₂O verstoffwechselt⁶⁰.

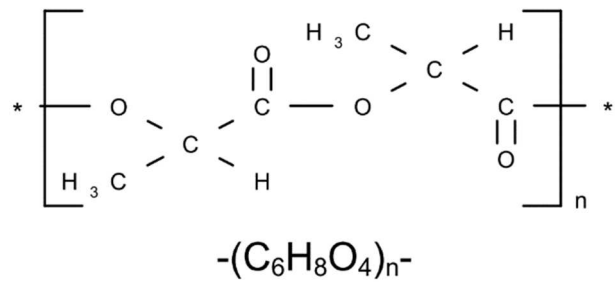


Abb. 1: Strukturformel von PLA⁵⁸

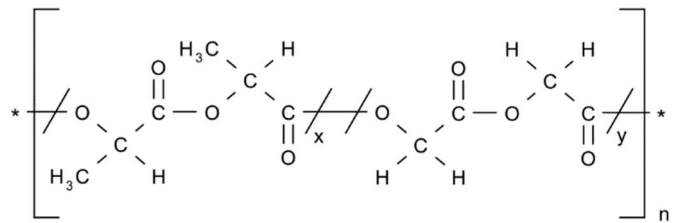


Abb. 2: Strukturformel von PLGA⁵⁹

Der Degradationsprozess kann in folgende Schritte unterteilt werden, die nahtlos ineinander übergehen⁶¹:

- H₂O-Benetzung der Polymer-Oberfläche
- H₂O-Diffusion in das Polymer (die Geschwindigkeit dieses Prozesses ist von der Porosität, der Porengröße und der Oberflächenspannung abhängig)
- eigentlicher Start der Polymer-Degradation durch Aufspaltung der Esterverbindungen und damit Reduzierung der Kettenlänge
- Ablösung und Auflösung schmaler Kettensegmente (wenn <100g/Mol) und Beginn der Erosion der Polymeroberfläche.
- Abbau der in Lösung gegangene Polymere/Monomere in vivo durch den Metabolismus/Stoffwechsel.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, unter Verwendung des Modellproteins BSA die Eignung von Polymerbeschichtungen aus PLA und PLGA für die gesteuerte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus bovinen Kollagenmatrices (ICBM) zu untersuchen.

Folgenden Fragestellungen soll dabei nachgegangen werden:

- Wie ist der zeitliche Verlauf der Freisetzung des Modellproteins BSA aus ICBM?
- Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Polymerbeschichtungen (bzgl. inhärenter Viskosität, aufgebrachter Menge und Art des Polymers) auf die Freisetzungskinetik von BSA?
- Haben die Konzentration und die Art des verwendeten Polymer-Lösungsmittels einen elektronenmikroskopisch nachweisbaren Einfluss auf die Morphologie der Polymerschicht?
- Finden sich elektronenmikroskopisch Hinweise auf die Art der Degradation des Polymers?
- Welche Variablen, Einflussgrößen und Wechselwirkungen müssen bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Bedingungen berücksichtigt werden?

3 Materialien und Methoden

3.1 Bovine Kollagenmatrix (ICBM)

Als dreidimensionales Gerüst („scaffold“) wurde eine bovine Kollagenmatrix in Quaderform mit Abmessungen von ca. 1x1x0,5cm gewählt, deren Herstellung in Anlehnung an die Patentschrift von Kuberasampath and Ridge, 1992⁶², modifiziert nach einem bereits etablierten Verfahren⁶³ erfolgte.

Frische, ca. 1cm dicke, kniegelenksnahe Rinder-Femurknochenscheiben (Schlachthof Bochum) wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.



Abb. 3: Boviner Femurknochen, grob entfettet

Die wichtigsten Arbeitsschritte zur ICBM-Herstellung beinhalten Entfettung, Bleichung, Demineralisierung, Inaktivierung osteoinduktiver Matrixproteine, Waschung, Lyophilisierung und Sterilisation:

- grobes Entfetten des Knochenmarkes mittels Dampfstrahler (Abbildung 3)
- vollständige Entfettung durch dreimalige Einwirkung von Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 3:1) unter ständigem Rühren (Zeitintervalle: 24 Stunden, 72 Stunden, 24 Stunden).
- Waschen in H₂O dest., Bleichen durch Einlegen in H₂O₂ Lösung (3 %ig für 15 Minuten), Waschung mit H₂O dest. und Lufttrocknung
- Demineralisierung durch dreimaliges Einlegen in 0,5M HCL (je 1,5 Stunden).
- Waschung, Aussägen der Knochenquader, Einlegen in 0,5M HCL für 1 Stunde, Waschung in Milliporewasser, Inaktivierung knocheninduktiver Matrixproteine durch Einwirkung von 4M Guanidin-HCl/Tris-HCl (pH 7,0) für 24 Stunden bei 4°C.
- Zweimaliges Waschen durch Einlegen in 50mM Tris-HCl/150mM NaCl Lösung (pH 7), Waschen in Aqua dest. für 30 Minuten, Einfrieren bei -80°C für 72 Stunden, Lyophilisieren der Träger bei -4°C (0,05mbar) für 24 Stunden, Lagerung bei 4° bis zur erfolgten Gamma-Sterilisation, danach Lagerung in sterilen 50mL-Röhrchen bei Raumtemperatur.
- Aufgrund der großen Streubreite von Gewicht, Porösität und Volumen wurden die ICBM vor der Lagerung in drei Gruppen jeweils ähnlicher Spongiosadichte aufgeteilt. Für die Experimente wurden dann ausschließlich ICBMs aus der Gruppe mit mittlerer Spongiosadichte verwendet.

3.2 FITC-BSA-Dotierung und -Coating der ICBMs

FITC-BSA wurde in 5mg Portionen von invitrogen™, Molecular Probes™, Oregon, USA bezogen (verwendete Lot:1575600). Für die Hauptversuche wurde Lot.-Nr. 1081751 verwendet.

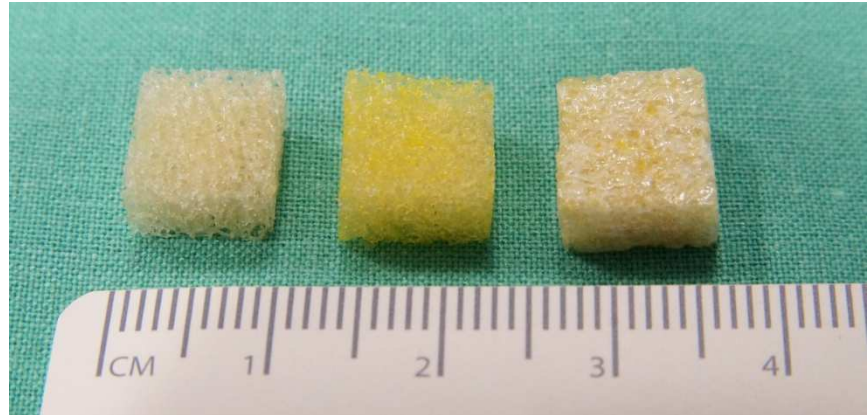


Abb. 4: ICBM: nativ, FITC-BSA dotiert, polymerbeschichtet (v.l.n.r.)

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine FITC-BSA Konzentration von $< 5\mu\text{g/mL}$ unter den gewählten Detektionsbedingungen nicht mehr signifikant von der Leerprobe (hier: Aqua dest.) abgrenzbar ist. Im Intervall von $5\text{--}500\mu\text{g/mL}$ ist eine lineare Beziehung zwischen den Konzentrationen an FITC-BSA und den im GENios™ reader (s.u.) ermittelten Fluoreszenzwerten gegeben. Daher wurde nach Herstellung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 5mg/mL FITC-BSA die Dotierung eines einzelnen ICBMs für die Hauptversuche der Freisetzungskinetik mit $500\mu\text{g}$ festgesetzt.

Nach Wässerung (1min in Aqua dest.) und Zentrifugation zur Entfernung des überschüssigen Wassers (1000rpm für 3sec) wurden die Kollagenmatrices auf Nadeln gesteckt um eine Abgabe der anschließend applizierten wässrigen Lösung an FITC-BSA ($500\mu\text{g/ICBM}$) an die Unterlage bis zur vollständigen Auftrocknung des Proteins zu verhindern.

Folgende Polymere wurden für die eingesetzten Beschichtungen verwendet:

- RESOMER R 203 H (Boehringer Ingelheim), Lot.: 1038461, Poly(DL-lactide), inhärente Viskosität: $0,25\text{--}0,35\text{dL/g}$, mittl. Molekulargewicht: $18\text{--}28\text{tsd. Dalton}$
- RESOMER RG 503 H (Boehringer Ingelheim), Lot.:1037323, Poly(DL-lactide-co-glycolide), acid terminated, Verhältnis lactide/glycolide = 50:50, inhärente Viskosität: $0,32\text{--}0,44\text{dL/g}$, mittl. Molekulargewicht $24\text{--}38\text{tsd. Dalton}$
- RESOMER RG 504 H (Sigma Aldrich), Lot.:STBD1648V, Poly(DL-lactide-co-glycolide), acid terminated, Verhältnis lactide/glycolide = 50:50, inhärente Viskosität: $0,45\text{--}0,6\text{dL/g}$, mittl. Molekulargewicht $38\text{--}54\text{tsd. Dalton}$
- RESOMER RG 505 (Sigma Aldrich), Lot.: STBD7078V, Poly(DL-lactide-co-glycolide), ester terminated, Verhältnis lactide/glycolide = 50:50, inhärente Viskosität: $0,61\text{--}0,74\text{dL/g}$, mittl. Molekulargewicht: $54\text{--}69\text{tsd. Dalton}$
- RESOMER L 206 S, (Sigma Aldrich), Lot.: STBC8857V, Poly(L-lactide), ester terminated, inhärente Viskosität: $0,8\text{--}1,2\text{dL/g}$, mittl. Molekulargewicht n.A..

Die angegebenen inhärenten Viskositäten sind unter folgenden Bedingungen definiert:
Lösungsmittel Chloroform 0,1% (w/v), 25°C.



Abb. 5: Polymerpulver:
RESOMER R 203 H,
RESOMER RG503 H,
RESOMER RG504 H,
RESOMER RG505,
RESOMER L 206 S
(je 200µg, v.l.n.r und v.o.n.u.):

Um bei der Verarbeitung der Polymer-Lösungen eine vergleichbare Viskosität zu erlangen, wurden die Polymere mit niedriger inhärenter Viskosität (RESOMER R203 H und RG503 H) zu jeweils 20% (w/v) in Dichlormethan (DCM, Merck KGaA, Darmstadt) gelöst. Die Polymere mit höherer inhärenter Viskosität (RG504 H, RG505, L 206 S) wurden zu jeweils 10 Gewichtsprozent in DCM gelöst. Je 600µL dieser Lösungen wurde als Coating auf die ICBM aufpipettiert. Dies entspricht 120mg Polymer pro ICBM in der erstgenannten Gruppe, 60mg Polymer/ICBM in der letztgenannten. Anschließend wurden die Proben unter dem Abzug bis zur vollständigen Verflüchtigung des Lösungsmittels unter Lichtschutz gelagert und anschließend bis zu den Versuchen bei 4°C deponiert.

Um die Morphologie polymerbeschichteter ICBM zu untersuchen, wurden für elektronenmikroskopische Aufnahmen PLA- und PLGA-Beschichtungen unter Verwendung von Dichlormethan (DCM), Ethyllaktat (EthLac) und Dimethylsulfoxid (DMSO) - jeweils 5%ig - miteinander verglichen.

3.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Zur bildmorphologischen Analyse der Kollagenmatrices und der Polymerbeschichtung diente das Elektronenmikroskop Hitachi S 3000N.

Die Präparation der biologischen Proben für die Untersuchbarkeit mit dem REM erfolgt in der Regel durch kritische Punkt-Trocknung (Anlage CPD 030, Ball-Tec/Leica) gefolgt von einer Goldbeschichtung (Cressington Sputter 108 Auto).

Da die bei der kritischen Punkt-Trocknung eingesetzten Lösungsmittel (Dichlormethan, Aceton) die Polymerschicht zerstören würde, erfolgte bei den verwendeten Proben die Trocknung in einem Glas-Exsikkator mit Unterdruck und Zugabe von Silikatkügelchen^{64, 65}.

Vor der Aufbereitung der Proben wurden diese manuell mit einem Skalpell quer aufgeschnitten und in zwei verschiedenen räumlichen Orientierungen auf die Kohlefolie bzw. den Probenhalter aufgebracht, um so die Schnittkanten unter dem REM aus verschiedenen Einstellwinkeln analysieren zu können (s. Abb. 6).



Abb. 6: Gold-beschichtete ICBM auf Träger für die REM

Bei der REM-Mikroskopie wurden Vergrößerungssequenzen von 100-fach, 350-fach, und 2500-fach gefahren. Die „working distances“ betrugen dabei 18-19mm.

3.4 Freisetzungskinetiken

Die Detektion der Fluoreszenzwerte des FITC-BSA erfolgte mit dem GENios™ Microplate reader (TECAN), der mit der Software XFLUOR4 (Ver.:4.51) arbeitet. Für die Proben wurden schwarze 96-well Platten verwendet. Der Detektionsmodus wurde auf „top“ eingestellt, sodass die Fluoreszenz nur von der Oberseite gemessen wurde. Die Emissionswellenlänge betrug 535nm, die Exzitationswellenlänge 485nm. Die Zieltemperatur betrug 29°C, bei einer eingestellten Verstärkung („gain“ =57) wurden pro Messung je 3 Lichtimpulse mit einer Pulszeit von 20µs voreingestellt.

Zur Simulation der möglichen in vivo Resorptionsbedingungen wurde die Freisetzung von FITC-BSA aus den beschichteten ICBM unter zwei verschiedenen Bedingungen vorgenommen: In der ersten Gruppe wurden die ICBM in 24-well Platten mit je 2mL Medium (Aqua dest.) inkubiert und das Medium zu jedem Zeitpunkt erneuert. In der zweiten Gruppe wurden die ICBM in 6-well Platten mit je 6mL Medium inkubiert und kein Wechsel des Mediums vorgenommen. Das Volumen der Behältnisse für die Gruppe mit Mediumwechsel wurde möglichst klein gewählt (2mL), damit im Verlauf der Kinetik auch geringe, in das zuvor erneuerte Medium abgegebene Mengen an Protein zu detektierbaren Konzentrationen führen. Das Volumen der Behältnisse für die Gruppe ohne

Mediumwechsel wurde hingegen möglichst groß gewählt (6mL), damit die jeweils zur Messung notwendigerweise entnommene Volumen -und damit der entstehende Fehler- klein ausfällt. Dieses, für die Messung entnommene Volumen (125µL, entspr. 2,1% des Gesamtvolumens) wurde jeweils durch Aqua dest. ersetzt. Messungen erfolgten jeweils nach 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, und an den Tagen 3, 5, 7, 9 und 11.

Zur Aufbewahrung wurden die entnommenen Proben bis zur Messung in 500µL Eppendorfröhrchen bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert. Zur Messung im GENios™ reader wurden jeweils Volumina von 100µL in die Messkammern einer schwarzen 96-well-plate pipettiert.

3.5 Statistische Auswertung

Jede Versuchsbedingung der Releasekinetik wurde im 6-fachen Ansatz durchgeführt.

Insgesamt ergaben sich dadurch 648 Proben (6-fach-Ansatz x 5 Coatings x 2

Messbedingungen x 8 Messzeitpunkte, zzgl. Kontrollgruppen).

Für die Vergleiche der Fluoreszenzmittelwerte der unterschiedlichen Coatings zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, between subj.) vorgenommen. Eine einfaktorielle ANOVA „within subjects“ wurde zur Berechnung der Signifikanz innerhalb einer Versuchsbedingung zu unterschiedlichen Messzeitpunkten gerechnet. Als „post-hoc“-Test wurde die Bonferroni-Korrektur verwendet.

Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS in der Version 24 durchgeführt.

Bezüglich des Signifikanzniveaus wurde ein α -Fehler mit $p < 0,05$ angesetzt.

Zur Grafikerstellung wurde neben SPSS auch Microsoft Excel (Version 2016) verwendet.

Die dafür erforderlichen Berechnungen (Mittelwert, Standardfehler, Standardabweichung, Konfidenzintervalle u.Ä.) wurden in diesem Falle ebenfalls mit Excel durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der ICBMs

Für die Hauptversuche wurden insgesamt 72 ICBM aus der Gruppe mit mittlerer Porengröße verwendet. Das durchschnittliche Gewicht eines „nativen“ ICBM lag bei 104,7 mg (Min: 66,6mg, Max: 157,3mg, SD: 17,46mg), mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test wurde in der explorativen Datenanalyse die Annahme einer Normalverteilung der Gewichte bestätigt. Der Einzelwert von 157,3mg wird als Ausreißer (außergewöhnlich schweres ICBM) gewertet (vgl. Abbildungen 7 und 8).

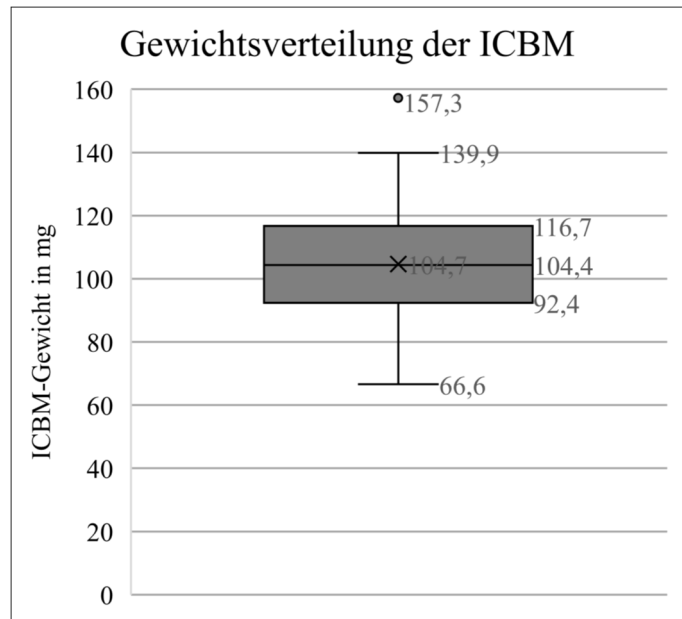


Abb. 7: Box-Plot Diagramm: Gewichtsverteilung der ICBM

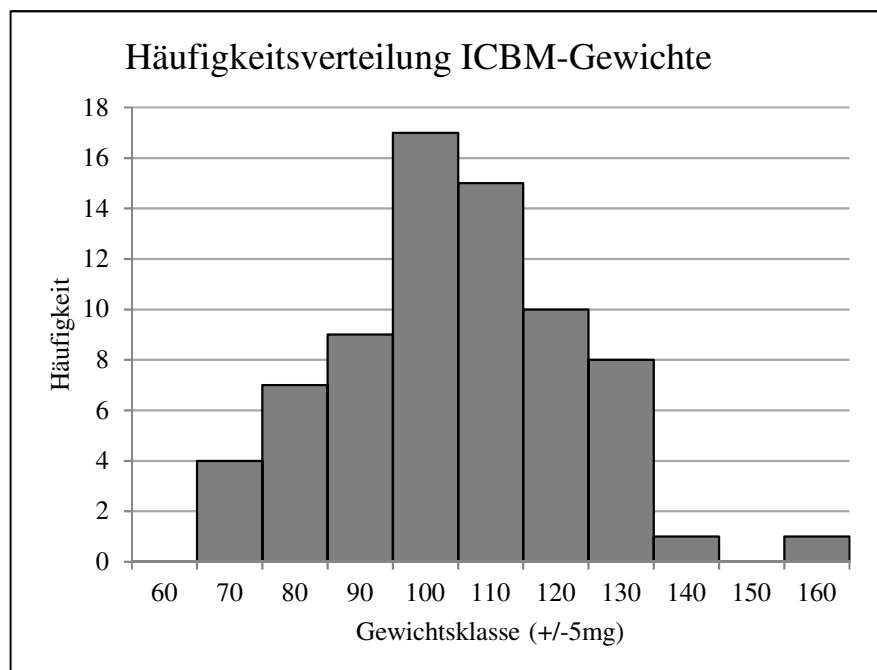


Abb. 8: Häufigkeitsverteilung der ICBM-Gewichte. Für die grafische Darstellung wurden Gewichtsklassen innerhalb einer Streuung von +/- 5mg gebildet.

Durch Wiegen der ICBM vor und nach dem Coating mittels Analysenwaage wurde die Menge des aufgetragenen Polymers ermittelt (s. Tabelle 1). Dies wurde nach erfolgter Trocknung und unter Annahme einer vollständigen Verflüchtigung des Lösungsmittels durchgeführt.

Art des Coating	Menge an Coating in mg (MW)	STABW
RESOMER R 203 H, ohne MedW	127,6	1,17
RESOMER RG503 H, ohne MedW	121,4	5,22
RESOMER RG504 H, ohne MedW	62,2	1,21
RESOMER RG505, ohne MedW	63,6	1,89
RESOMER L 206 S, ohne MedW	55,3	0,74
Art des Coating	Menge an Coating in mg (MW)	STABW
RESOMER R 203 H, mit MedW	130,2	1,63
RESOMER RG503 H, mit MedW	125,8	4,17
RESOMER RG504 H, mit MedW	62,6	1,62
RESOMER RG505, mit MedW	64,2	0,86
RESOMER L 206 S, mit MedW	54,2	0,55

Tabelle 1: durchschnittliches Gewicht des pro ICBM aufgetragenen Polymers

Die zur Kontrolle mitgewogenen, unbeschichteten ICBM, die zusammen mit den beschichteten ICBM den Trocknungsvorgang durchliefen, verloren dabei im Mittel ca. 3mg an Gewicht (in Form von H₂O)..

Bei dem Coating mit RESOMER R 203 H und RG503 H wurden jeweils 600µL 20% (w/v) Polymerpulver in Dichlormethan gelöst. Dies entspricht einer errechneten aufgetragenen Menge von 120mg Polymer.

RG504 H, RG505 und L 206 S wurden jeweils 600µL 10% (w/v) Polymerpulver in Dichlormethan gelöst. Dies entspricht einer errechneten aufgetragenen Menge von 60mg Polymer.

4.2 Ermittlung der Eichgeraden für die Fluoreszenzmessung von FITC-BSA

In Vorversuchen wurde der lineare Zusammenhang zwischen der Konzentration an FITC-BSA und dem im GENios®-Reader ermittelten Fluoreszenzwert bestätigt: (Pearson) $r=0,993$, $p=0,000$.

Nachfolgend dargestellt ist die für die Hauptversuche generierte Eichkurve, mit deren Hilfe ein gemessener Fluoreszenzwert in die entsprechende Konzentration an FITC-BSA umgerechnet werden kann:

$$y = 161,85x + 0,64$$

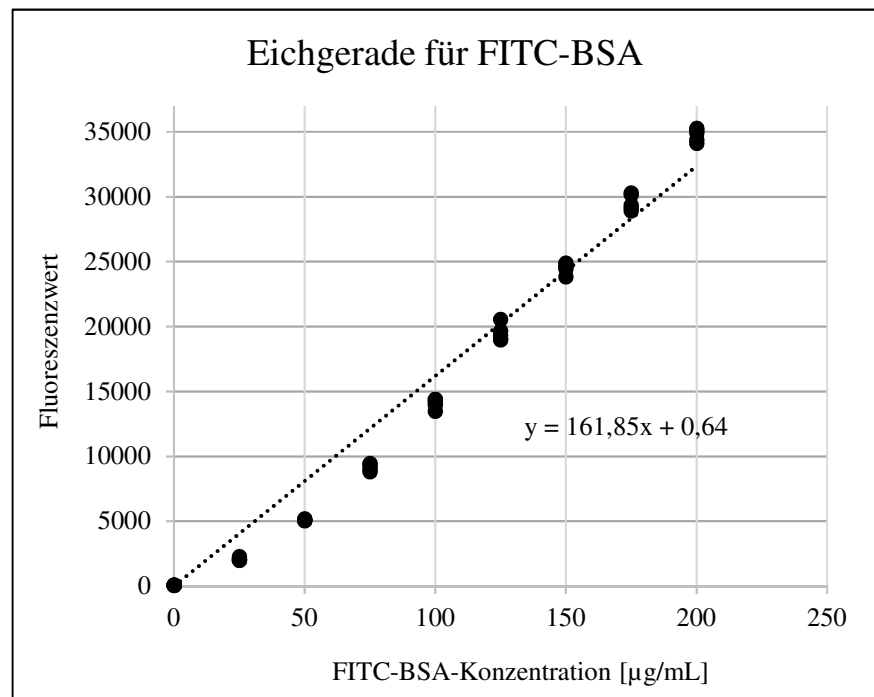


Abb. 9: Verdünnungsreihe von FITC-BSA mit Eichgerade

Unter Berücksichtigung des Volumens an H_2O , in das das ICBM während der Freisetzungsgenetik das Protein BSA abgibt, kann die abgegebene Menge an BSA bestimmt werden (jeweils 2mL in der Versuchsbedingung mit Mediumwechsel, jeweils 6mL in der Versuchsbedingung ohne Mediumwechsel). Da eine Probe aus reinem Aqua dest. einen mittleren Fluoreszenzwert von 64 im Genius Reader erzeugt, wurde dieser Wert als Schnittpunkt der zu ermittelnden Eich-Geraden mit der y-Achse festgelegt.

In Vorversuchen konnten keine Interferenzen der in Lösung gegangenen Polymere mit der Detektion der Fluoreszein-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Unter Lichtabschluss und Inkubation bei 4 °C konnten während eines 14-tägigen Zeitintervalls keine signifikanten Veränderungen der Fluoreszenzwerte einer angesetzten Verdünnungsreihe nachgewiesen werden. Daher wurden während des Beobachtungszeitraums der laufenden Freisetzungskinetik (11 Tage) die Messproben gesammelt, und nach Abschluss der Freisetzungskinetik in einem Arbeitsschritt ausgewertet.

Unter identischen Bedingungen stattfindende Wiederholungsmessungen der 96-well Platten mit dem GENios® Reader ergaben im Durchschnitt eine Abnahme der Fluoreszenzwerte von ca. 2,5% pro Messwiederholung.

4.3 Freisetzungskinetiken

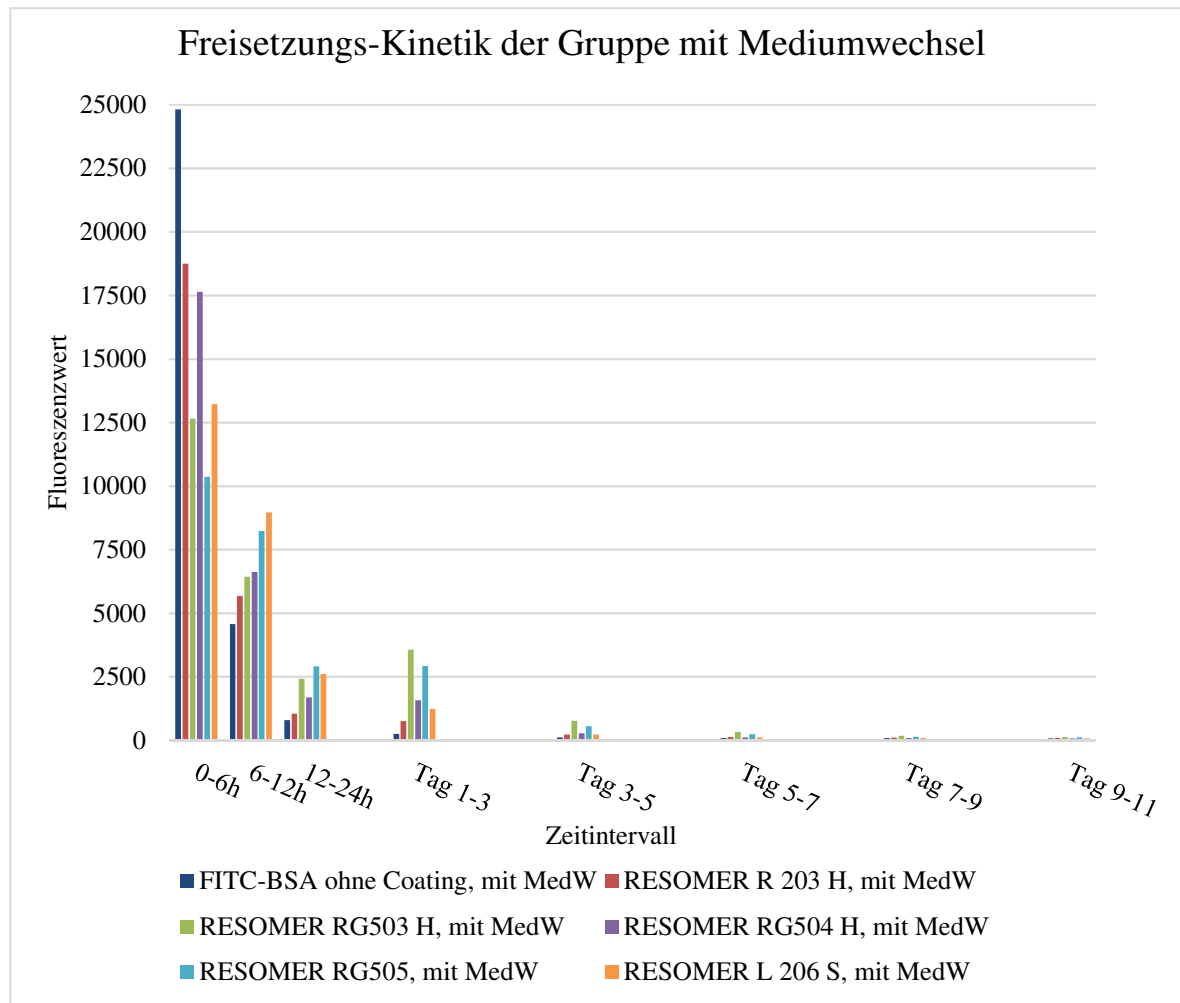


Abb. 10: Freisetzungskinetik der Versuchsbedingung mit MedW bei jeder Messung im Übersichtsdiagramm. Jeder Balken stellt den gemessenen mittleren Fluoreszenzwert im darunter angegebenen Zeitintervall dar. Die Balkengruppen stellen - in Leserichtung von links nach rechts - Polymere mit aufsteigender inhärenter Viskosität dar.

Die Ermittlung der freigesetzten BSA-Menge (in μg) erfolgte unter Verwendung der o.g. Eichgeraden.

Dabei zeigte sich, dass im Mittel in der Gruppe *mit Mediumwechsel* von den nicht beschichteten ICBMs $383\mu\text{g}$ BSA während des Beobachtungszeitraums von 11 Tagen freigesetzt wurde, korrespondierend $269\mu\text{g}$ in der Gruppe *ohne Mediumwechsel*. Von der ursprünglich dotierten Menge an BSA ($500\mu\text{g}$ pro ICBM) entspricht dies einem Anteil von ca. 70% respektive ca. 50%.

Zum ersten Messzeitpunkt (nach 6 Stunden) ist die freigesetzte Menge an BSA aus den unbeschichteten ICBMs am höchsten, während sie tendenziell bei Polymerbeschichtungen mit höherer inhärenter Viskosität geringer ausfällt. Bei den unbeschichteten ICBMs entspricht diese Menge ca. 81% der während des gesamten Beobachtungszeitraums

abgegebenen Proteinmenge, bzw. 62% der ursprünglich auf das ICBM aufgetragenen Gesamtmenge von 500µg an BSA.

Bei RESOMER L 206 S werden in den ersten 6 Stunden 50% der über den gesamten Zeitraum freigesetzten Proteinmenge abgegeben (entspricht 33% der gesamten Dotierungsmenge eines ICBM).

Im zweiten Messintervall (6 Stunden bis 12 Stunden) haben sich die Verhältnisse umgekehrt: Hier weist die Versuchsbedingung mit RESOMER L 206S die höchste Freisetzung auf: 34% der insgesamt freigesetzten Proteinmenge im Vergleich zu lediglich 15% bei der Gruppe mit unbeschichteten ICBM.

In den darauffolgenden Zeitintervallen (12-24h und Tag 1 bis 3) sind die höchsten Freisetzungsraten in den Polymergruppen mittlerer Viskositäten (RG 503, RG 505) vorzufinden. Nach Tag 5 werden in 48-Stundenintervallen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nur noch sehr geringe Mengen an BSA in das zuvor gewechselte Medium freigesetzt.

In Abbildung 11 sind die Fluoreszenzwerte im Medium (2mL) der jeweils unterschiedlich polymerbeschichteten ICBM nach 6 Stunden aufgetragen.

Jede Polymerbeschichtung zeigt dabei im Vergleich mit den unbeschichteten ICBM eine signifikant geringere Abgabe von BSA in das Medium ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede ergeben sich bezüglich der freigesetzten Proteinmenge aus den ICBM mit R203 und RG 504-Beschichtung ($p = 1,000$), sowie zwischen den Beschichtungen mit RG503, RG 505 und L 206.

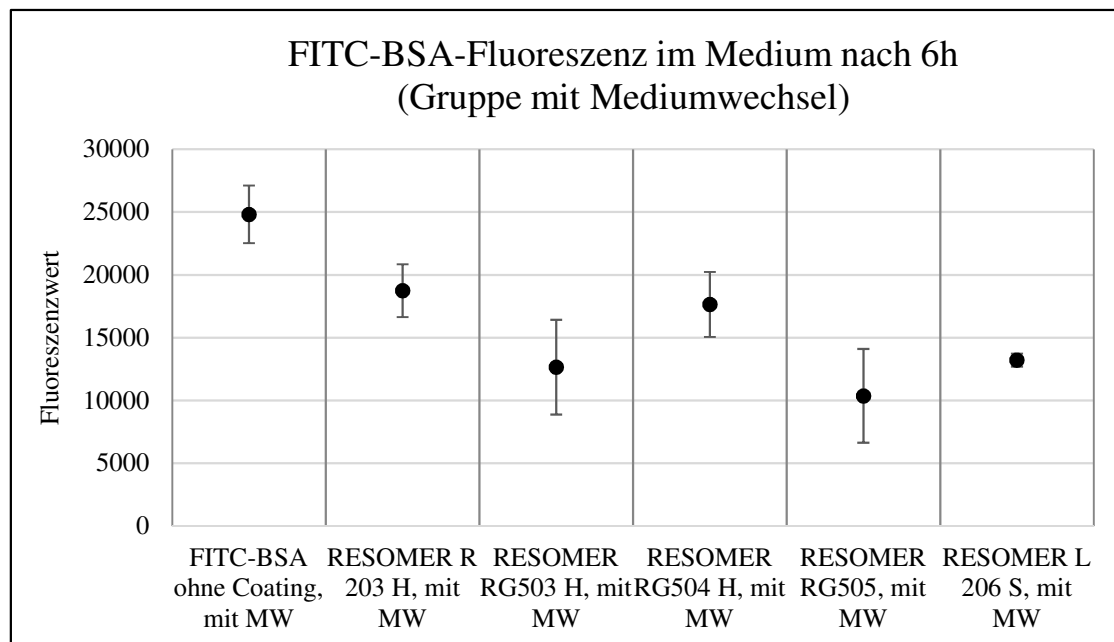


Abb. 11: Mittlere Fluoreszenzwerte der polymerbeschichteten ICBM in 2mL Medium nach 6 Stunden, angegeben mit 95% Konfidenzintervall. Das Konfidenzintervall von RESOMER L206 S (Wert: 520) lässt sich grafisch aufgrund der Skalierung der Ordinatenachse kaum darstellen.

Der überwiegende Einfluss der applizierten Polymermenge auf die Proteinfreisetzung im Vergleich zur Viskosität bzw. Molekülgröße hat sich jedoch im Zeitintervall von 6-12 Stunden nivelliert (vgl. Abb.12). Bis auf R 203 H ($p=0,37$) ist jetzt die Abgabe von BSA bei den Polymer-Coatings höher als bei den unbeschichteten ICBM.

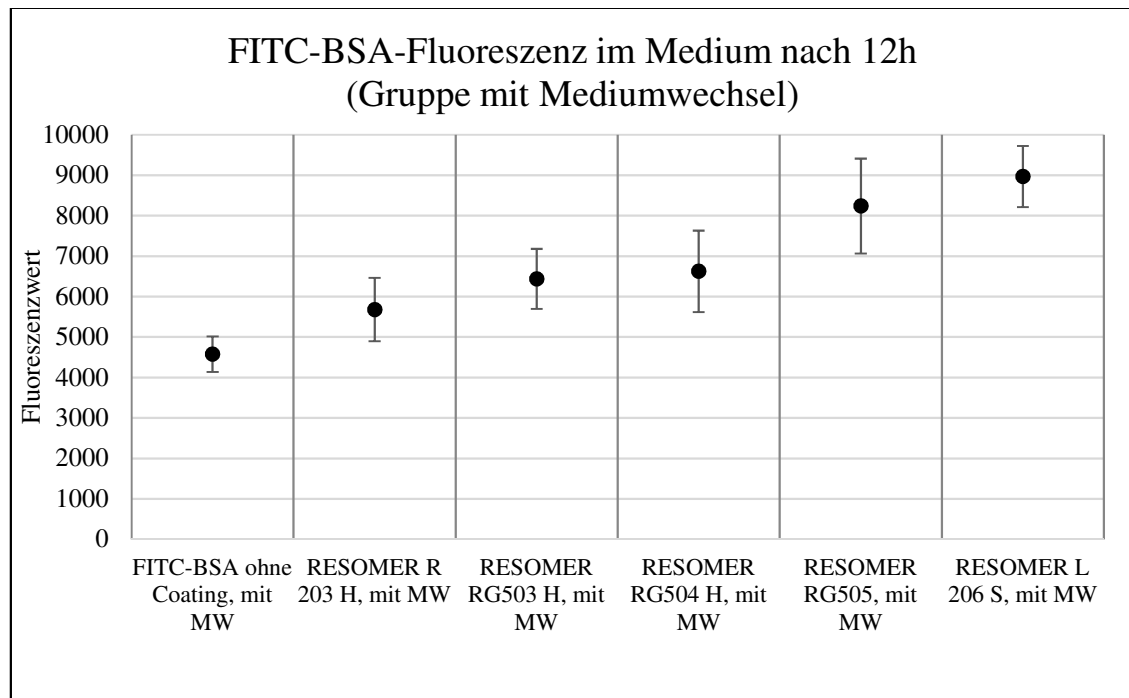


Abb. 12: Mittlere Fluoreszenzwerte der unterschiedlich polymerbeschichteten ICBM im Medium nach 12 Stunden, angegeben mit 95% Konfidenzintervall.

In den darauffolgenden Zeitintervallen (bis Tag 5) ist die Freisetzung von BSA aus der Gruppe mit RG 503-Beschichtung am höchsten. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 11) ist sie noch als einzige signifikant ($p=0,007$) höher als die (unbeschichtete) Kontrollgruppe. Die abgegebene Menge im Zeitraum zwischen Tag 9 und 11 ist jedoch gering (umgerechnet $0,7\mu\text{g}$ BSA).

In der zweiten Versuchsgruppe wurde das Inkubationsmedium (Aqua dest.) zu keinem Messzeitpunkt ausgetauscht.

Das Messvolumen ($125\mu\text{L}$), das jedoch zu jedem Messzeitpunkt für die spätere Fluoreszenzwertbestimmung im GENiosTM reader entnommen werden musste, wurde durch Aqua dest. ersetzt um das Gesamtvolumen pro Versuchskammer mit 6mL konstant zu halten.

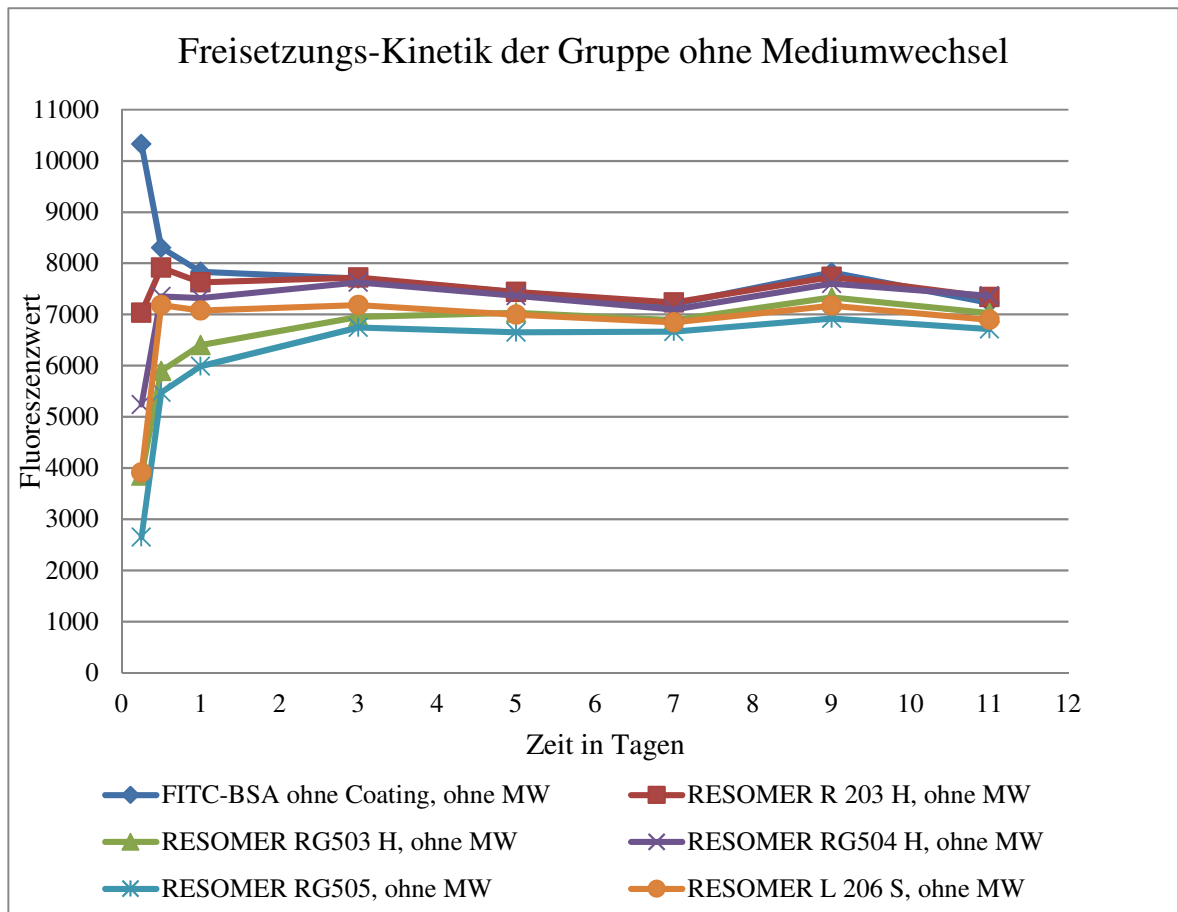


Abb. 13: Übersichtsdiagramm der Freisetzungskinetik, Versuchsbedingung ohne MedW.

Die in Abb.13 dargestellte Freisetzungskinetik zeigt, dass sich Unterschiede in der Menge des freigesetzten Proteins insbesondere innerhalb der ersten 3 Tage bemerkbar machen. Anschließend verlaufen die Kurven, durch die verschiedenen Messzeitpunkte annähernd parallel.

Bei allen beschichteten ICBM zeigt sich eine initiale hohe Proteinfreisetzung als sog. „burst“ (in den ersten 24 Stunden) gefolgt von einer Abflachung des Kurvenverlaufs in einen Sättigungsbereich. Ab Tag 3 sind kaum noch Anstiege der Fluoreszenzwerte als Ausdruck weiterer BSA-Freisetzungen zu verzeichnen. Abweichend davon lässt sich in der Kontrollgruppe bis zu Tag 7 ein kontinuierlicher Abfall der Fluoreszenzwerte beobachten.

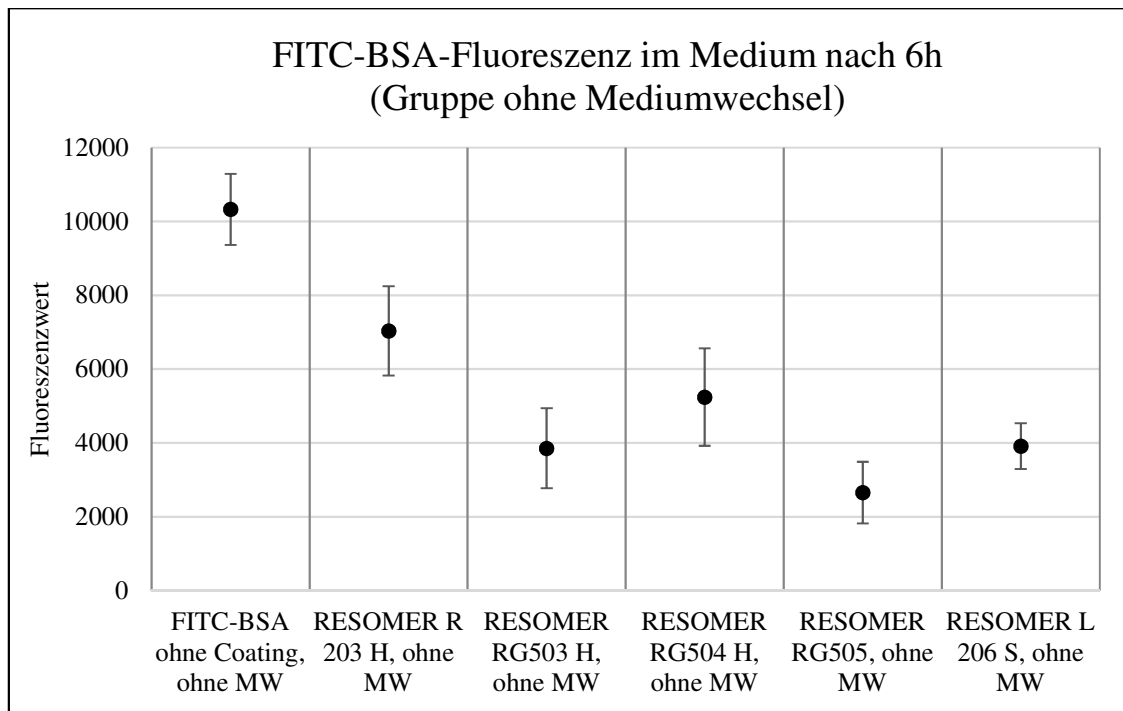


Abb. 14: Mittlere Fluoreszenzwerte der unterschiedlich polymerbeschichteten ICBM in 6mL Medium nach 6 Stunden, angegeben mit 95% Konfidenzintervall.

Das Inkubationsvolumen in der Gruppe ohne Mediumwechsel ist dreimal so groß wie dasjenige der Gruppe mit Mediumwechsel (6mL vs. 2mL). Ansonsten sind die Versuchsbedingungen für den Beobachtungszeitraum 0 bis 6 Stunden für diese beiden Gruppen identisch (vgl. Abb.11 und Abb. 14). Aufgrund der Proportionalität von BSA-Konzentration und Fluoreszenzwert können direkt die jeweils freigesetzten BSA-Mengen verglichen werden. Der Mittelwert der Quotienten der Fluoreszenzwerte (mit MedW/ohne MedW bzw. 6mL Volumen/2mLVolumen) beträgt 3,16. Die Proteinmenge, die in ein Inkubationsgefäß mit 6mL freigesetzt wird, ist somit durchschnittlich um 5% größer als die in ein 2mL-Volumen abgegebene Proteinmenge.

Im weiteren Vergleich der Messwerte (Intervall: 0-6h) zwischen den Gruppen *mit* und *ohne* Mediumwechsel ist der zwischen den Polymeren RG 503 und 504 ersichtliche Unterschied in Abbildung 14 (ohne MedW) statistisch nicht signifikant ($p=0,311$).

Im weiteren zeitlichen Verlauf gleichen sich die Mittelwerte der Fluoreszenzwerte für die einzelnen polymerbeschichteten Gruppen an. In der Gruppe *mit Mediumwechsel* wurde im zweiten Zeitintervall (zwischen 6 und 12 Stunden) umso mehr BSA freigesetzt je größer das Molekulargewicht des Polymers ist.

Im selben Beobachtungszeitraum ist auch in der Gruppe *ohne* Mediumwechsel bei RESOMER 206 S die Proteinfreisetzung am deutlichsten gesteigert.

Nach 24 Stunden sind lediglich die Fluoreszenzwerte der mit RESOMER RG 503 und RG 505 beschichteten ICBMs signifikant geringer als diejenigen der (unbeschichteten) Kontrolle ($p = 0,005$ bzw. $0,000$), jedoch nicht untereinander ($p = 1,000$).

An Tag 5 liegt lediglich RESOMER RG 505 bezüglich der bis dahin freigesetzten BSA-Menge signifikant unter der unbeschichteten Kontrolle (vgl. Abb. 15: Mittlere

Fluoreszenzwerte der unterschiedlich polymerbeschichteten ICBM in 6mL Medium nach 5 Tagen, angegeben mit 95% Konfidenzintervall.). Danach haben sich die Konzentrationen an BSA so weit angeglichen, dass keine Unterschiede zwischen Kontrolle und beschichteten ICBM mehr nachweisbar sind.

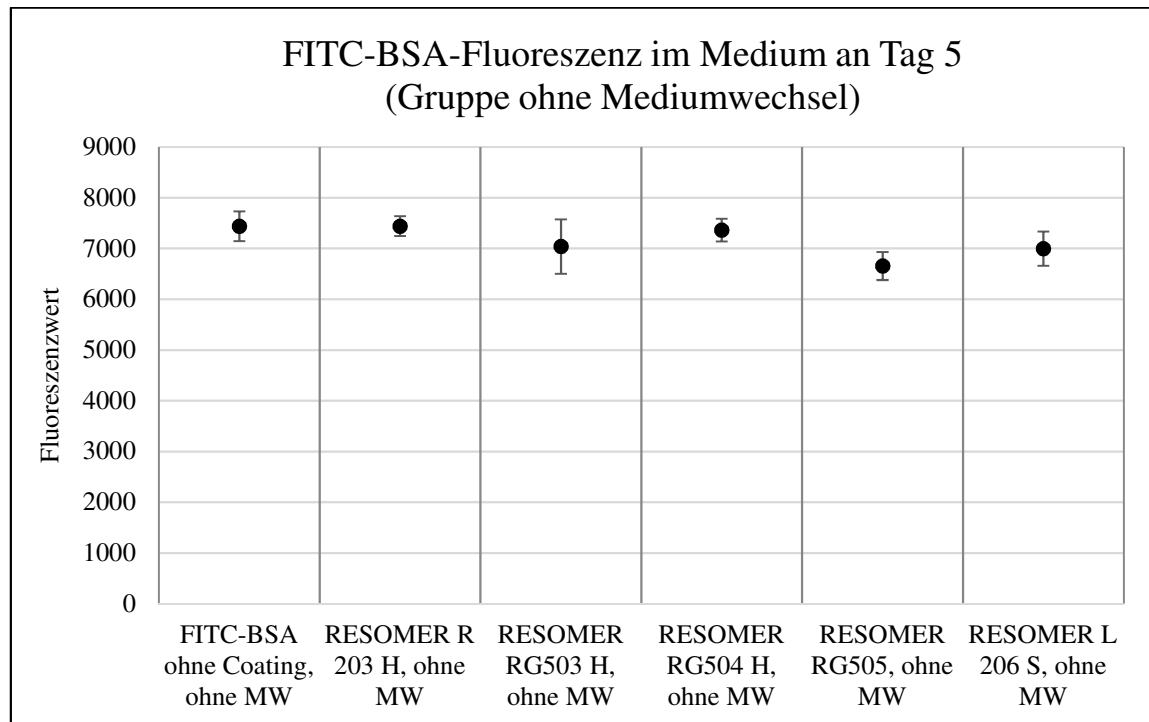


Abb. 15: Mittlere Fluoreszenzwerte der unterschiedlich polymerbeschichteten ICBM in 6mL Medium nach 5 Tagen, angegeben mit 95% Konfidenzintervall.

4.4 Elektronenmikroskopie

Das trabekuläre Gerüst der ICBM wurde sowohl vor der Beschichtung als auch nach Applikation verschiedener Polymere rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Neben der Formulierung verschiedener Schichtdicken durch Ansätze unterschiedlicher Polymerkonzentrationen, wurden auch verschiedene organische Lösungsmittel für die Applikation des jeweiligen Polymers hinsichtlich mikroskopisch detektierbarer Unterschiede untersucht.

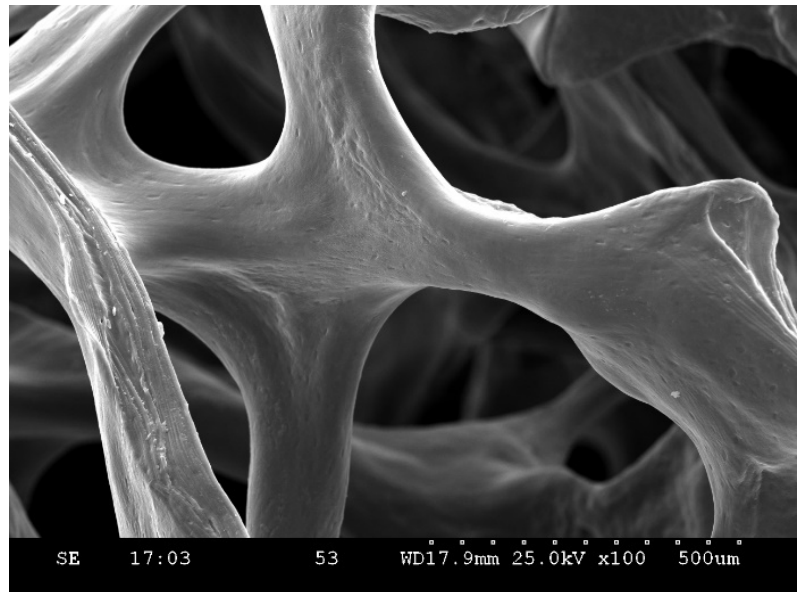


Abb. 16: ICBM nativ, 100x

Die ICBM sind hauptsächlich aus Kollagen-1 aufgebaut, welches sich als maschendraht-bzw. geflechtartiges, dreidimensionales Gerüst mit interkonnektierenden Hohlräumen und Porositäten mit Durchmessern von ca. 50µm bis 700µm darstellt. Die Dichte des regulären Geflechts ist innerhalb und zwischen den einzelnen Kollagenträgern sehr unterschiedlich und aufgrund der natürlichen Herkunft großen Schwankungen unterworfen.

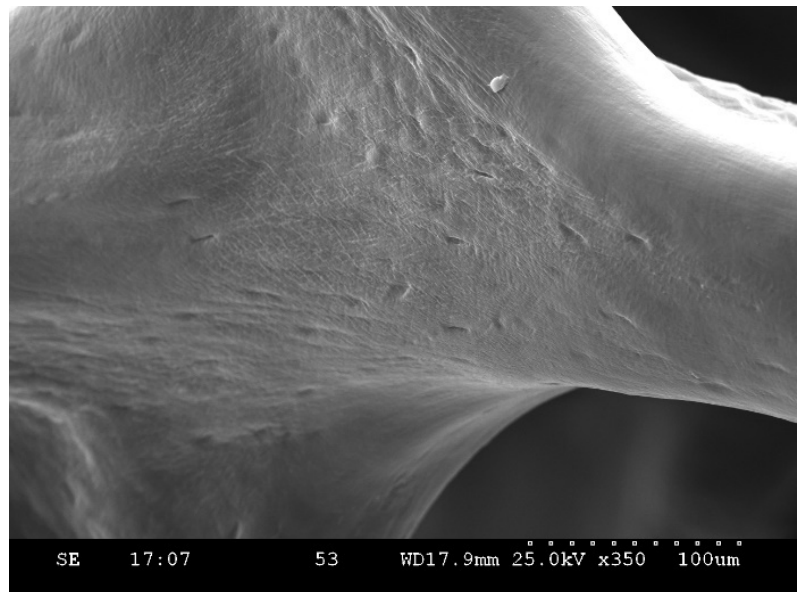


Abb. 17: ICBM nativ, 350x

Die rasterelektronischen Untersuchungen ergaben, dass außer dem trabekulären Kollagengeflecht keine weiteren Residuen der ursprünglichen Knochenmarkssubstanz zurückgeblieben waren. Die Matrix lies bei höheren Vergrößerungen (Abbildung 17, 350-fach) kleine Mulden und Vertiefungen auf einer aufgeraut imponierenden Oberfläche erkennen.

Alle Polymere waren am besten in Dichlormethan (DCM) löslich. In Vorversuchen wurden zunächst dünnere Polymercoatings durch Herstellung geringer Konzentrationen an Polymer (5% bis 10%) mit anschließender Abzentrifugation des Überschusses („Anzentrifugieren“ bis 900rpm) hergestellt. Morphologisch ergab sich dadurch gleichmäßig und der Matrix unmittelbar aufliegendes Polymer von ca. 5µm Schichtdicke. Die auf dem nativen Kollagengerüst nachweisbaren Mulden bzw. die aufgeraute Oberfläche, zeichnete sich nicht auf der glatten Polymerschicht ab. Abb. 18 zeigt beispielhaft ein Coating mit PLA (10% in DCM). Bei der Verwendung von Ethyllaktat als Lösungsmittel lässt sich in Bereichen, in der die Polymerbeschichtung aufgerissen ist, die Beschaffenheit des Überzugs als faserartig, zerfranst oder pseudokristallin und gebündelt beschreiben. In anderen Bereichen zeigt sich die Struktur schlierig und wie mit ausgezogenem Klebstoff überzogen (Abb. 20). Das Coating stellt sich nicht mehr homogen dar, sondern gewölbt und höckrig. Es findet sich ein Craquelé-Muster aus Rissbildungen, das lediglich in den Proben vorhanden ist, bei denen das Polymer mit Ethyllaktat gelöst wurde.

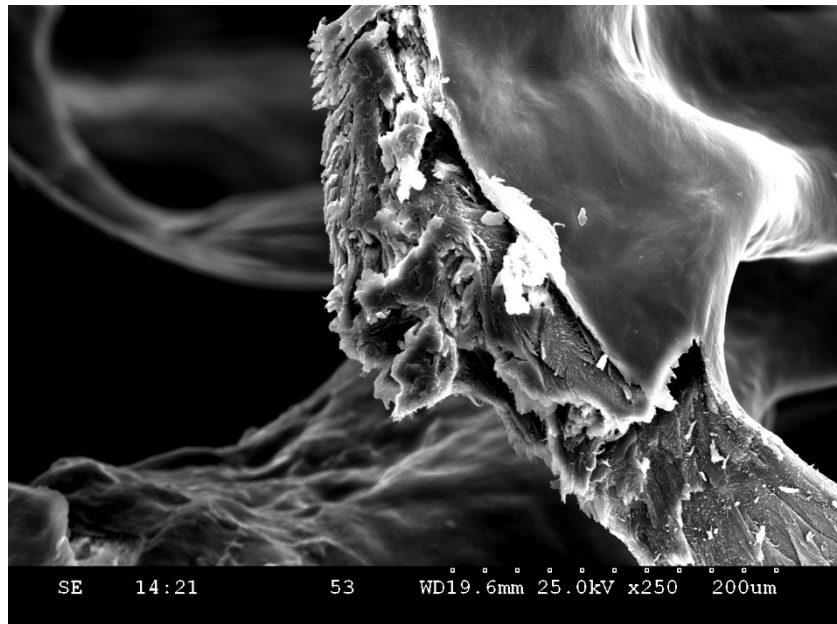


Abb. 18: ICBM, coating: PLA10% in DCM, 250x

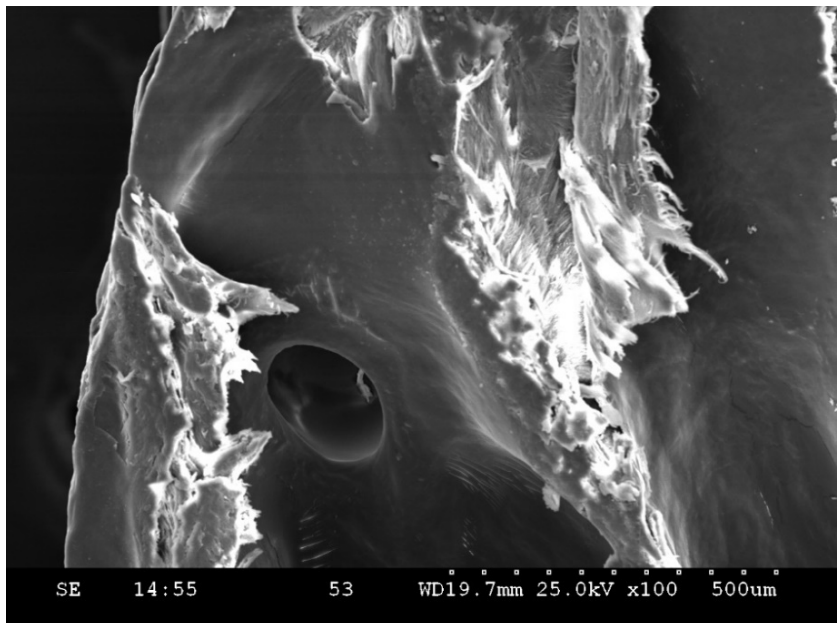


Abb. 19: ICBM, coating: PLGA 5% in EthLac, 100x

Wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) als Lösungsmittel für die Polymere verwendet, ist die entstehende Oberfläche des Coatings ebenfalls nicht glatt, sondern weist homogen verteilte, ca. 7 bis 10µm große, glasige Auftreibungen im Sinne von Blasenbildung auf (siehe Abb. 21 bis 23). Neben der Blasenbildung zeigt sich darüber hinaus auch eine (ähnlich wie bei der Beschichtung mit EthLac) faserige Innenstruktur im Bereich der Abbruchkanten, die sich im Vergleich in Form und Größe ähneln (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 23).

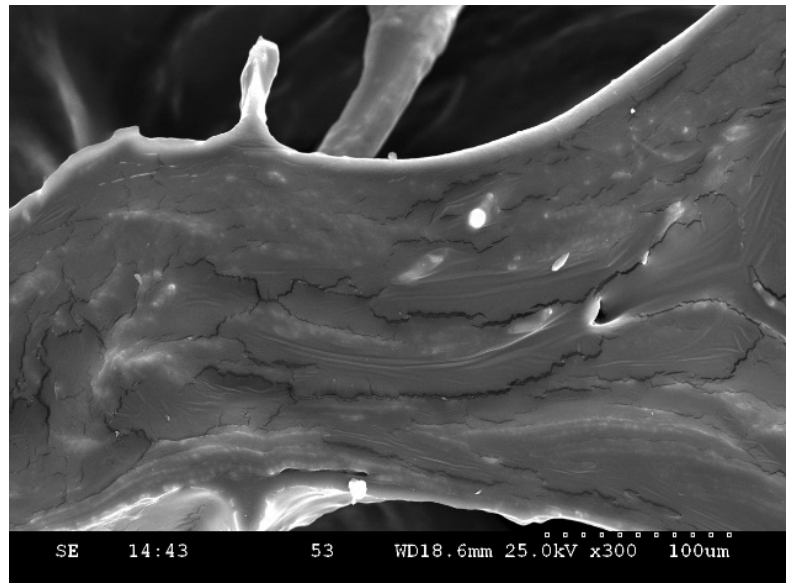


Abb. 20: ICBM, coating: PLGA 5% in EthLac, 300x

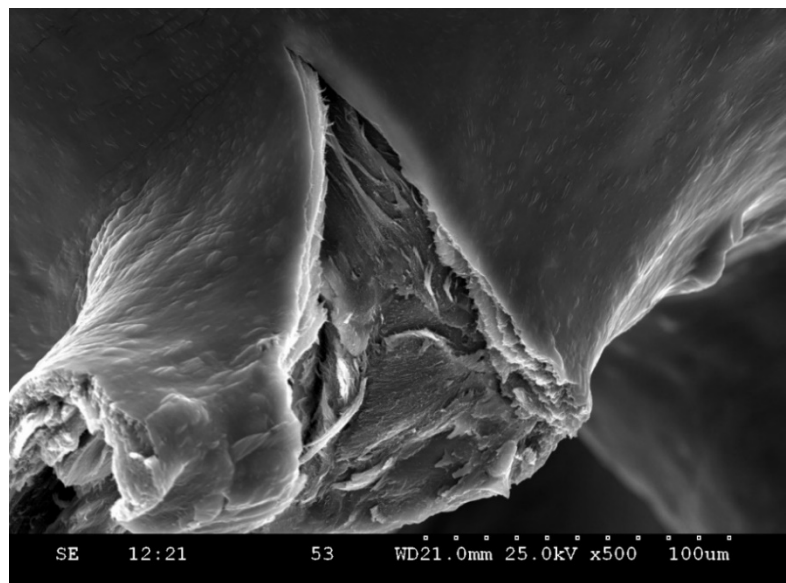


Abb. 21: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 500x

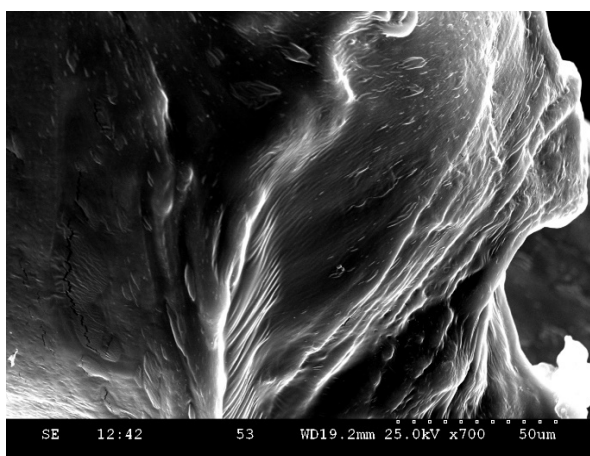


Abb. 22: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 700x



Abb. 23: ICBM, coating: PLGA 5% in DMSO, 400x

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass vergleichsweise dünne Beschichtungen (, die durch niedrig konzentrierte Polymerlösungen erreicht wurden, und bei denen die ICBM vor der Verflüchtigung des Lösungsmittels zentrifugiert wurden,) zu kaum nennenswerter Verzögerung der Proteinfreisetzung führten, ist nachfolgend auf den Schritt der Abzentrifugation verzichtet worden (Abb. 24). Zusätzlich wurden ICBM mit höherkonzentrierter Polymerlösung beschichtet.

Dies hatte zur Folge, dass kleinere Porositäten (bis 200µm Durchmesser) von einer häutigen Schicht an Polymer überspannt und verschlossen wurden.

Während der Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop, konnte in der Gruppe mit 5% PLGA (w/v) die Entwicklung von Rissbildungen in diesen häutigen Membranen als Artefakte bei der Exposition durch den Elektronenstrahl nachgewiesen werden (Abb.25).

Die Polymermembranen, welche die Matrixporen in der Gruppe mit 20% (w/v) überzogen, rissen während der Betrachtung nicht ein (Abb. 24).

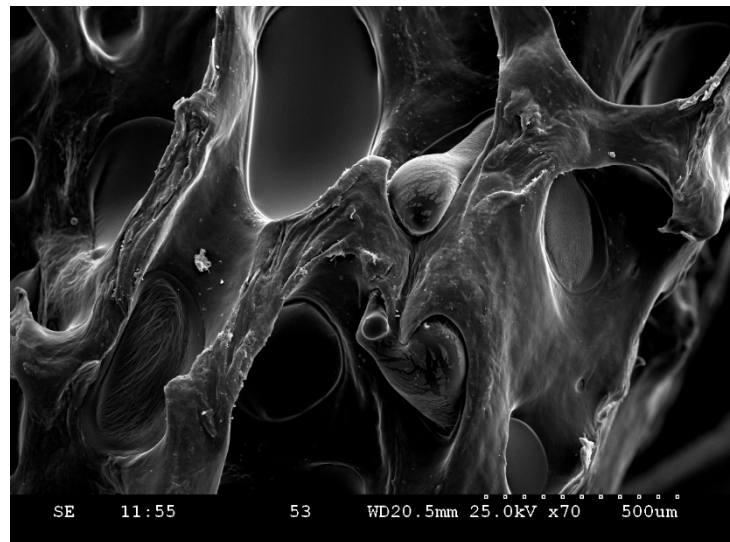


Abb. 24: ICBM, coating: PLGA 20% in DCM, 70x

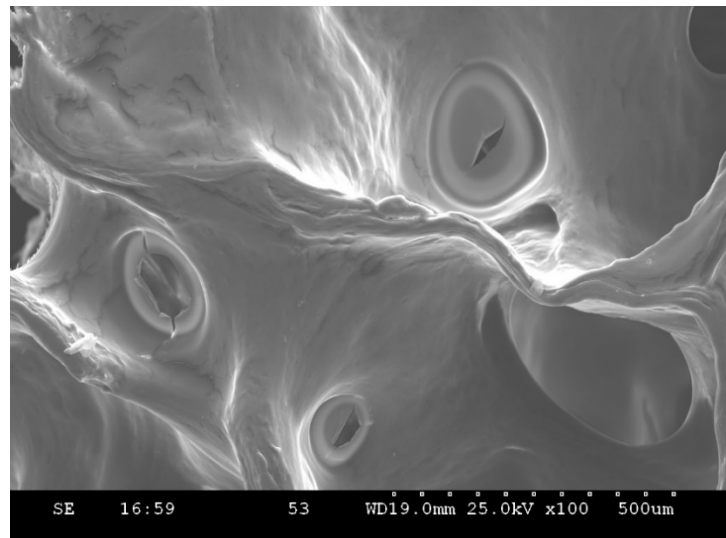


Abb. 25: ICBM, coating: PLGA 5% in DCM, 100x

Wurden ICBM mit FITC-BSA dotiert und anschließend mit einem Polymer-Coating (PLA/PLGA unterschiedlicher Viskositäten) überzogen, ergibt der Überzug teilweise wellenförmige bzw. kissenartige Auftreibungen (siehe Abbildung 26). Im Bereich der Schnittkanten zeigt sich z.T. eine Spaltbildung zwischen der Polymermembran und der Oberfläche der Kollagenmatrix.

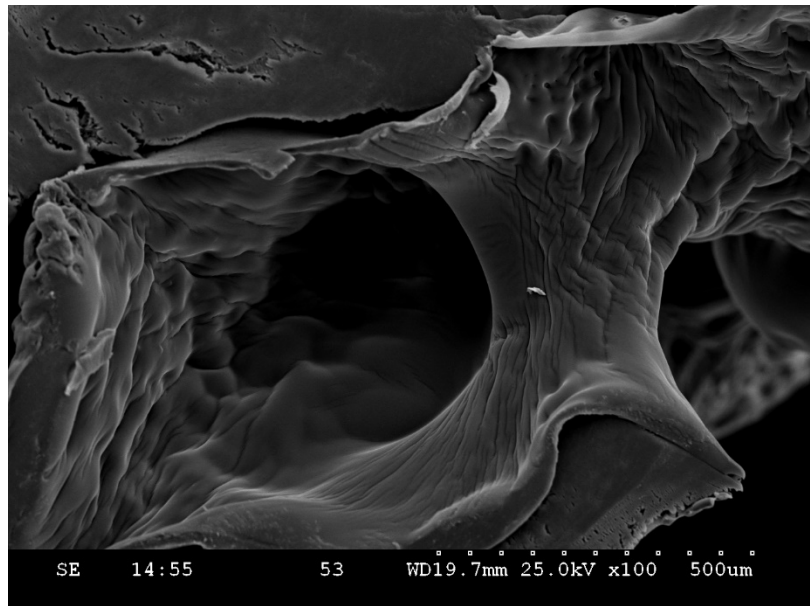


Abb. 26: ICBM, coating: PLGA 20% in DCM mit FITC-BSA, 100x

Nach Inkubation in Aqua dest. für drei Tage (siehe Abb. 27) ließen sich - wie hier am Beispiel von RESOMER 503 - die morphologischen Korrelate des beginnenden Erosionsprozesses/ Degradationsprozesses des Polymers erkennen. Die bis dato glatte Oberfläche zeigt Einkerbungen, Krater und Löcher. Im Anschnitt lässt sich erkennen, dass diese die gesamte

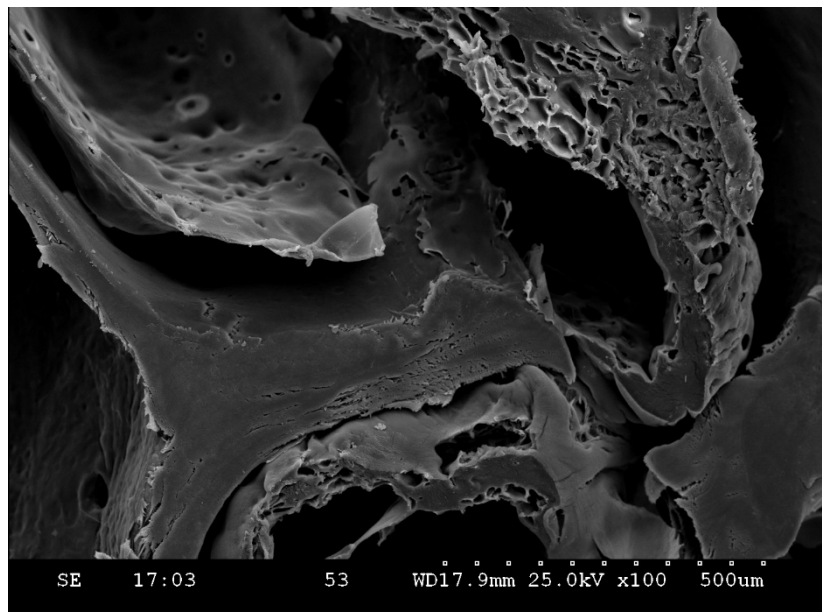


Abb. 27: ICBM, coating: PLGA 20% in DCM nach 3d in Aqua dest., 100x

Polymerschicht durchsetzen und nicht nur auf der Oberfläche (in Angrenzung an das wässrige Medium) entstanden sind. Die Spaltbildung, die sich in Abb. 26 andeutet, ist derart vergrößert, dass breite Polymerplatten sich schuppenartig von der Kollagenoberfläche abheben. Das BSA, das als freizusetzendes Protein auf die Matrix aufgebracht wurde, ließ sich elektronenmikroskopisch nicht darstellen. Bezüglich der Morphologie der verwendeten Polymere konnte rasterelektronenmikroskopisch nicht zwischen PLA und PLGA unterschieden werden. Höhere Molekulargewichte ergaben bei ansonsten vergleichbaren Bedingungen größere Schichtdicken.

5 Diskussion

5.1 Kritische Wertung von Materialien, Methoden und Versuchsdesign

5.1.1 ICBM

Ziel des modernen Tissue Engineering ist es, durch eine ideale Kombination aus Wachstumsfaktor und Trägermaterial die Regeneration von Gewebe zu erzielen. Die maximale Effizienz eines Wachstumsfaktors wird nur dann erreicht, wenn dieser frühzeitig und konstant aus der Matrix freigesetzt wird. Der Träger hingegen sollte möglichst lange standhalten um das Volumen zu erhalten und die Einwanderung der Zellen zu begünstigen. Somit ist es ungünstig, die Trägermatrix selbst aus dem abbaubaren Biomaterial zu synthetisieren, aus dem der eingebettete Wachstumsfaktor freigesetzt werden soll, denn damit wäre die Freisetzung des Wachstumsfaktors zeitlich an die Degradation der Matrix und deren mechanischer Integrität gekoppelt. Um also eine, von der Degradation des Trägermaterials unabhängige Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer Matrix zu erlangen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Verwendung einer separaten Polymerbeschichtung untersucht.

Matrixmaterialien aus PLA und PLGA wurden bereits entwickelt und getestet^{66, 82, 96}; sie erwiesen sich dabei bezüglich ihrer Stabilität, ihres zeitlichen Degradationsmusters und ihrer Verarbeitbarkeit (Herstellung von porösen Gerüsten) als geeignet. Es wäre also denkbar, einen Wachstumsfaktor in eine PLA/PLGA-Matrix zu inkorporieren, aus der er bei deren Degradation freigesetzt wird.

Bezüglich der klinischen Anwendbarkeit besitzen ICBM die Vorteile, dass sich der Grad der Mineralisierung bei der fortschreitenden knöchernen Regeneration artefaktfrei in Röntgenverlaufskontrollen darstellen lässt, die Herstellung kostengünstig ist und es bislang keine Hinweise auf überschießende immunologische Reaktionen gibt⁴². Ein weiterer Vorteil von ICBM als Naturprodukt ist ihre hervorragende Biokompatibilität, sowohl was das Material, als auch die dreidimensionale Struktur betrifft. So besitzt Kollagen als natürliche Komponente der extrazellulären Matrix Liganden, die von spezifischen Zelloberflächenrezeptoren (Integrine) erkannt werden. Spezifische Ligand/Integrin-Verbindungen spielen bei der Zelladhäsion und der Migration eine entscheidende Rolle und begünstigen so das Einwandern von Zellen in die Matrix³¹. Für das native ICBM ist die Attraktivität für Stammzellen bzgl. der Adhäsion und Proliferation bereits nachgewiesen worden⁶⁷. Bei der Verwendung beschichteter ICBM ist davon auszugehen, dass diese Zellen zumindest initial unmittelbaren Kontakt mit der Polymerschicht aufnehmen, bevor sie nach Zerfall dieser Schicht das darunterliegende Kollagengerüst besiedeln können. Nachteilig könnte sich dabei auswirken, dass die einwandernden Zellen dem durch den Polymerabbau hervorgerufenen, aziden Mikromilieu ausgesetzt werden. Nichtsdestotrotz ist die Biokompatibilität von degradablen Polymeren auf PLA/PLGA-Basis in vivo und in vitro vielfach nachgewiesen worden⁶⁸. Einige Untersuchungen legen sogar nahe, dass das Polymer per se als Matrix-Material fungieren und unterstützend auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen einwirken kann⁶⁹.

5.1.2 FITC-BSA als Modellprotein

Nachdem in Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit quantitative Proteinbestimmungen mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) für das Protein VEGF und mittels Bradford-Assay für BSA vorausgegangen waren, wurde schließlich bei der Wahl des Modellproteins und der Detektionsmethode FITC-BSA der Vorzug gegeben, da hierbei der Detektionsmodus direkt über die Bestimmung der Fluoreszenz möglich ist. Beim ELISA-Assay erfolgt der Proteinnachweis auf indirekte Art durch Enzymreaktionen und Antikörperkopplung, beim Bradford-Assay wird eine Komplexbildung mit zugegebenen Farbstoffen für den quantitativen Proteinnachweis verwendet. Darüber hinaus erweist sich die Fluoreszenzdetektion von FITC-BSA als kostengünstig.

Bezüglich seiner physikochemischen Eigenschaften wie Molekülgröße und Molekülform, sowie Ladungsverteilung und Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche kann BSA vor dem Hintergrund der hier aufgezeigten Fragestellungen näherungsweise mit BMP-2 verglichen und damit als Modellprotein verwendet werden.

Es ist davon auszugehen, dass zwischen dem Modellprotein BSA und dem Kollagen-1 des Matrixgerüsts keine spezifischen Wechselwirkungen auftreten. Diese Annahme ist mit ihrer Herkunft aus unterschiedlichen anatomisch/physiologischen Kompartimenten begründbar. Serumalbumin ist zwar - ebenso wie Kollagen-1 - bei einem pH-Wert von 7 ein netto negativ geladenes Protein. Neben elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen könnte jedoch eine Art der Verbindung zwischen BSA und Kollagen über Ca^{2+} -Ionen erfolgen⁷⁰, für die Albumin vier spezielle Bindungsstellen besitzt^{47, 49}. Für den osteogenen Wachstumsfaktor BMP-2 gibt es bezüglich seiner Affinität zu Kollagen unterschiedliche Angaben:

Einerseits wird BMP eine lediglich schwache Affinität zu Kollagen attestiert, die, - vergleichbar mit der BSA-Releasekinetik-, zu einer überschießenden initialen Freisetzung und einer insgesamt geringen Retentionskapazität führt^{71, 72, 73, 74, 75}.

Andere Autoren schätzen die Bindungskapazität für rhBMP-2 an Kollagen für vergleichsweise hoch ein^{54, 76} und untermauern ihre Beobachtungen mit der Erklärung, dass Kollagen-1 - als eines der organischen Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix von Knochen - gleichsam physiologischer Wirkort von BMP sei. Darüber hinaus existieren auch Untersuchungen zu speziellen Kollagen-Bindungsstellen für BMP-2⁷⁷. Chen et al.⁷⁸ modifizierten rekombinantes BMP-2 indem sie im Bereich des N-Terminus des Proteins eine Kollagen-Bindungsdomäne hinzufügten. Sie zeigten, dass durch diese Modifikation die Knochenneubildung in Knochendefekten kritischer Größe (im Unterkiefer-Defekt-Modell von Kaninchen) signifikant gesteigert werden konnte.

Zumindest ist eine Übertragbarkeit der Freisetzungskinetik von BSA auf BMP-2 nicht uneingeschränkt möglich: Ruhe et al.⁷⁹ konnten im direkten Vergleich der Proteine Serum-Albumin und rhBMP-2 zeigen, dass bezüglich ihrer Adsorptionseigenschaften an Kalziumphosphat-Matrices unterschiedliche Mechanismen existieren müssen.

In Releasekinetiken, die an negativ geladenen Hyaluronsäure-Hydrogelen durchgeführt wurden, zeigte BSA eine signifikant schnellere Freisetzung als VEGF und VEGF wiederum eine signifikant schnellere Freisetzung als BMP-2⁸⁰.

Im Rahmen der Vorversuche für die vorliegende Arbeit wurden mithilfe von Verdünnungsreihen Eichkurven für FITC-BSA erstellt, die den linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Proteinkonzentration bestätigten. Ferner wurde ausgeschlossen, dass die Kollagenmatrix oder die verwendeten Polymere mit der Fluoreszenz interferieren. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Fluoreszenz von FITC-BSA in wässriger Lösung bei 4°C und Lichtabschluss über einen Zeitraum von zwei Wochen nicht signifikant abfällt.

FITC-BSA unterscheidet sich hinsichtlich der Größe, Form und Homogenität praktisch kaum von BSA⁸¹. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass die Detektion der Fluoreszenz nicht mit dem Nachweis eines biologisch aktiven Proteins gleichzusetzen ist. Zum einen könnte die Verbindung zwischen FITC und BSA aufgebrochen und gelöst werden, sodass die detektierten Fluoreszenzwerte nicht mehr ein Maß für die Menge an vorhandenem BSA sind. Andererseits kann FITC auch seine Fluoreszenzeigenschaften behalten, selbst wenn das Protein denaturiert bzw. biologisch inaktiv wäre.

Da BSA keine eigentliche, in vitro biologisch messbare Funktion besitzt, kann neben der Primärstruktur zum näherungsweisen Nachweis eines intakten Proteins die Sekundärstruktur untersucht werden. Um die intakte Protein-Struktur in einer Freisetzungsanalyse zu überprüfen, verglichen Determan et al.⁴⁸ das native FITC-BSA mit einer behandelten Probe. Die Primär-Struktur des Proteins wurde durch SDS-Elektrophorese analysiert, die Sekundärstruktur durch Infrarot-Spektroskopie. Durch die Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass während der Behandlungsdauer eine gewisse Fraktion an BSA in kleinere Bestandteile hydrolytisch zerfallen war. Der Anteil bzw. die Geschwindigkeit des BSA-Zerfalls war dabei abhängig von der Temperatur, der Zeit und vom pH-Wert. Dies bedeutet für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass im Hinblick auf den Nachweis einer Freisetzung eines biologisch aktiven Proteins die Möglichkeit einer „falsch-positiven“ Messung besteht und dass sich dieser Fehler während der Freisetzungskinetiken mit voranschreitender Zeit und Erniedrigung des pH-Wertes vergrößern könnte.

Um diese Fehlermöglichkeit auszuschließen wäre es sinnvoll, in einem weitergehenden Versuchsaufbau den Grad des BSA-Zerfalls zu ermitteln und zu analysieren.

5.1.3 Polymercoating mit PLA und PLGA

Im Rahmen von Vorversuchen wurden Löslichkeitstests der oben genannten Lösungsmittel mit RESOMER R 203 H (PLA) und RG 503 H (PLGA) durchgeführt. Dabei erwies sich PLA (5%ig, w/v) als in Ethyllaktat sehr gut löslich, wohingegen PLGA in fünfprozentiger Konzentration bei Raumtemperatur nur noch sehr schlecht/kaum löslich war. PLGA wies andererseits bei der Verwendung von DMSO (jeweils bis 5 %) eine vergleichbar bessere Löslichkeit auf als PLA. Dichlormethan erwies sich als hervorragendes Lösungsmittel für beide Polymere, jedoch ergab sich bei RESOMER 206 S aufgrund seiner Molekülgröße ab einer Konzentration von 5 Vol.-% eine derartig hochvisköse Lösung, dass es in einer höheren Konzentration nicht mehr pipettiert werden konnte. Durch die Flüchtigkeit des Lösungsmittels einerseits und durch das schwierige Handling der unterschiedlichen Viskositäten der Polymerlösungen andererseits, lässt sich die Differenz der errechneten Menge zur anschließend gewogenen Menge an aufgebrachtem Polymer erklären: Die

einzelnen Ansätze (RG 504, RG 505, 206 S) wiesen z.T. ein so hochvisköses Fließverhalten auf, dass Mengen des Polymers in der Pipettierspitze zurückblieben. Daher wurde der Versuchsaufbau durch Erhöhung des Lösungsmittelanteils so gestaltet, dass die betreffenden ICBMs nur mit 60mg dieser zähflüssigen Polymere beschichtet wurden. Trotzdem wurden anstelle der errechneten Menge (60mg) nur ca. 55mg im Mittel gemessen. Bei den niedrigviskösen Ansätzen (z.B. 20% R 203 H) konnte hingegen die Lösung nach Ansaugen nur schwer in der Pipettierspitze gehalten werden, da sich sofort Anteile des DCM im Luftüberstand der Pipettenspitze verflüchtigten und die Lösung aus der Spitze heraustropfte. Hier waren die aufgetragenen Polymermengen tendenziell höher als die errechneten Mengen (im Mittel 127,6mg bei 120mg errechneter Menge).

Geeignete organische Lösungsmittel für meist hydrophobe Polymere sind gleichzeitig „schlechte“ Lösungsmittel für wässrige Proteinlösungen. Eine wässrige Lösung aus FITC-BSA lässt sich in DCM nicht ohne Weiteres lösen. Daher wurde statt einer Inkorporation in die Polymerschicht zuerst das Protein auf die ICBMs aufgetrocknet und anschließend der Überzug mit der Polymerschicht angeschlossen. Um trotzdem eine Inkorporation von Wachstumsfaktoren in eine Polymermatrix zu ermöglichen, wurden verschiedene Prozessansätze entwickelt, um diesen Umstand zu umgehen. Um beispielsweise Polymer-Mikropartikel herzustellen (Mikrosphären, Nanosphären), die den Wachstumsfaktor enthalten, wird am häufigsten die Lösungsmittel -Evaporationstechnik (aus einer „Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion“) angewandt⁵³: Dabei wird durch die Zugabe einer wässrigen Proteinlösung zum Polymer-/Lösungsmittelgemisch eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt, die mit einem Ultraschall-Homogenisator dispergiert und anschließend unter hochtourigem Mixen in eine wässrige Lösung gegeben wird (Wasser/Öl/Wasseremulsion). Unter ständigem Rühren verflüchtigt sich dann das Lösungsmittel, sodass Polymer-Mikrosphären übrigbleiben, die den Wachstumsfaktor enthalten. Richardson et al.⁸² inkorporierten z.B. einen Wachstumsfaktor (PDGF) in Mikrosphären aus PLGA in einer (ebenfalls aus PLGA) bestehenden Polymermatrix, die ihrerseits mit VEGF als einem zweiten Wachstumsfaktor beladen war. So konnten sie die Freisetzung zweier Wachstumsfaktoren mit jeweils unterschiedlichen Freisetzungskinetiken innerhalb einer Matrix realisieren.

Es muss berücksichtigt werden, dass der Einsatz organischer Lösungsmittel die biologische Aktivität von Proteinen wie Wachstumsfaktoren beeinflussen kann. Auch die Einwirkung mechanischer Kräfte (intensives Verrühren, Ultraschalldispersion) kann die Funktion eines Proteins reversibel oder irreversibel beeinträchtigen.

Die Denaturierung der Wachstumsfaktoren durch den Kontakt mit organischen Lösungsmitteln kann abgeschwächt werden, indem protektive Agenzien wie BSA der Lösung hinzugegeben werden⁸³.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der polymerbeschichteten ICBM-Träger wurde durchgeführt um den Einfluss der organischen Lösungsmittel auf die Morphologie der Beschichtungen zu untersuchen.

Als Lösungsmittel wurden Dichlormethan (DCM), Ethyllaktat (EthLac) und Dimethylsulfoxid (DMSO) miteinander verglichen. Die Auswertung der elektromikroskopischen Bilder ergab, dass bei der Verwendung von Dichlormethan als Lösungsmittel ein homogener und glatter Polymerüberzug entstand, wohingegen der Einsatz von Ethyllaktat eine schlierige und rissige Oberflächenbeschichtung hervorbrachte, die im Bereich der Schnittkanten pseudokristallin und faserartig gebündelt erschien. DMSO als Lösungsmittel für die Polymere PLA und PLGA erzeugte wiederum Coatings mit charakteristischen Blasenbildungen und weitere, mit Ethyllaktat vergleichbare Inhomogenitäten.

Die beschriebenen Beobachtungen sind mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Madsen et al.⁸⁴ vergleichbar. Die Arbeitsgruppe verwendete PLGA und PCL als Polymere, sowie Dichlormethan, Aceton und Ethanol als Lösungsmittel. Als Protein wurde BSA (in lyophilisierter, pulveriger Form) 10%ig zu der jeweiligen Polymer-/Lösungsmittel-Mischung dazu gegeben.

Demnach hängt das hydrodynamische Volumen, das ein gelöstes Polymer einnehmen kann, von demjenigen Lösungsmittel ab, in das es zur Auflösung gegeben wird. Je „besser“ das Lösungsmittel, das heißt je geringer die Löslichkeitsunterschiede zwischen Lösungsmittel und Polymer, desto besser können sich die Polymermoleküle ausbreiten und entfalten. Dies hat zur Folge, dass das Polymer in einem „schlechten“ Lösungsmittel eher kondensiert oder präzipitiert und sich nach der Verflüchtigung des Lösungsmittels in einem kleineren Volumen stabilisiert. Somit kann ein Polymer in einem guten Lösungsmittel aufgrund der freieren Entfaltung mehr Polymer-Polymer Interaktionen eingehen. Als Folge fällt die dabei gebildete Maschenweite der Matrix kleiner aus und ein freizusetzendes Molekül kann schwerer hindurch- oder abdiffundieren.

Die o.g. Arbeitsgruppe um Madsen konnte zeigen, dass ein freizusetzendes Protein umso langsamer durch eine bestimmte Polymermatrixschicht abdiffundiert, je „besser“ das Lösungsmittel ist, in dem das Polymer zuvor gelöst war.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden Untersuchung rasterelektronenmikroskopisch festgestellten Unterschiede nicht nur die Morphologie des Polymer-Coatings betreffen, sondern auch Einfluss auf die Freisetzung des eingeschlossenen Wachstumsfaktors besitzen.

5.1.4 FITC-BSA Freisetzungskinetik

Obwohl der Prozess der Ossifikation von Defekten kritischer Größe einen Zeitraum von Wochen bis Monaten umfasst, wurde für die Messung der Freisetzungskinetik in der vorliegenden Untersuchung ein **Zeitfenster** von elf Tagen gewählt, da bekannt ist, dass die Initiierung der Knochenneubildung durch BMP-2 in dieser Frühphase des Heilungsprozesses stattfindet⁸⁵.

Anhand von Vorversuchen wurden der festzulegende Gesamtzeitraum der Releasekinetik bestimmt, sowie die einzelnen zeitlichen Messintervalle kalkuliert. Da für die Hauptversuche eine initiale erhöhte Freisetzung von BSA anzunehmen war, wurden die

anfänglichen Zeitintervalle kürzer gewählt (zweimal je 6 Stunden, gefolgt von 12 Stunden, und anschließend zweitägig).

Als **Nährmedium** wurde Aqua dest. verwendet, da hierbei im Vergleich mit einem Zell-Nährmedium Interferenzen bei der Fluoreszenzmessung oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden können. Das benötigte Volumen des Nährmediums wurde mit der freigesetzten Menge an FITC-BSA und dem Detektionsbereich für die erforderliche Fluorescein-Konzentration abgestimmt und ebenfalls in Vorversuchen ermittelt. Da eine FITC-BSA Konzentration von $<5\mu\text{g/mL}$ nicht mehr zuverlässig von der Leerprobe mit Aqua dest. abgrenzbar war, wurden verhältnismäßig große Mengen an BSA pro ICBM verwendet ($500\mu\text{g}$), die Volumina an Nährmedium verhältnismäßig gering (6mL bzw. 2mL) gehalten, und die Messintervalle in der zweiten Hälfte der Kinetik vergleichsweise groß (zwei Tage) gewählt.

Um den Abtransport bzw. Stoffwechsel in vivo zu simulieren, wurde bei der einen Untersuchungsgruppe nach jedem Beobachtungsintervall ein Mediumwechsel durchgeführt. Da so im Vergleich zur Gruppe ohne Mediumwechsel keine Kumulation des freigesetzten BSA stattfand und in den gewählten Messintervallen von geringen Abgabemengen an BSA ausgegangen wurde, musste das Volumen des Nährmediums in dieser Gruppe mit 2mL klein gehalten werden. Bis zur Erhebung der ersten Messwerte (Zeitintervall: 0 bis 6 Stunden) wurden die ICBM der Gruppe *ohne* Mediumwechsel und der Gruppe *mit* Mediumwechsel ansonsten völlig identisch behandelt. Dem entsprechend ist die sich ergebende Messwertverteilung sehr ähnlich (vergleiche Abb.11 und Abb. 14). Der Einfluss des unterschiedlichen Konzentrationsgradienten zwischen den Gruppen unterschiedlicher Mediumvolumina (6mL vs. 2mL) auf das Gleichgewicht des in Lösung gehenden BSA, kann anfänglich als gering angesehen werden. Rein rechnerisch müsste bei gleicher abgegebener Menge die Konzentration in der Gruppe mit 2mL Volumen um den Faktor 3 größer sein. Die Messwerte nach 6 Stunden ergeben als Mittelwert einen Faktor von 3,16 (SD: 0,5).

Es wäre jedoch auch denkbar, dass – je nach einer bestimmten Affinität zum Carrier - ab einer bestimmten Protein-Konzentration im umgebenden Medium ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Adsorption und Abdiffusion entsteht und daher der Einfluss eines Konzentrationsgradienten an Bedeutung gewinnt. Der Anteil an freigesetzter Gesamtproteinmenge in der Behandlungsgruppe mit Mediumwechsel ist zumindest um 20% höher als derjenige in der Behandlungsgruppe ohne Mediumwechsel, sodass ein Einfluss des Konzentrationsgradienten zumindest möglich ist. In vivo wäre ein solcher Konzentrationsgradient sowohl vom zellulären/enzymatischen Abbau, als auch vom Abtransport über das örtliche Blutsystem und Lymphsystem abhängig.

Um Messfehler aufgrund eines Konzentrationsgradienten an BSA innerhalb des 6mL-Mediumsgefäßes zu minimieren wurde das ICBM bei jeder Probenentnahme vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Nährmedium herausgehoben, das Volumen durchmischt und danach das Messvolumen pipettiert.

5.1.4.1 BSA-Freisetzung von unbeschichteten ICBM

Anhand der Freisetzungskinetiken wurde zum einen der zeitliche Verlauf der BSA-Freisetzung von ICBM charakterisiert. Zum anderen wurde der Einfluss unterschiedlicher Polymerbeschichtungen auf diese Freisetzung untersucht.

Nach einem initialen und überschießenden Ausstoß des Proteins innerhalb der ersten 12 Stunden bremsst die Freisetzungsrates nachfolgend bis zum dritten Tag stetig ab, um von da an in eine Plateauphase auszulaufen, in der ab dem fünften Tag kaum noch nennenswerte Mengen freigesetzt werden. Diese Releasekinetik deckt sich in ihrer zeitlichen Charakteristik mit Untersuchungen, in welcher die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus (unbeschichteten) Kollagenschwämmen *in vitro* beschrieben wurde^{74, 75, 86}.

Folgende Einflussfaktoren bzw. Wechselwirkungen könnten bei der Ausbildung der Freisetzungseharakteristika aus beschichteten und unbeschichteten ICBM eine Rolle spielen^{54, 87, 88, 89}:

- die Wechselwirkung des freizusetzenden Proteins mit dem Trägermaterial (Matrix, Carrier)
- die Art und Weise der durch die Polymerbeschichtung erreichten Retention des Proteins (Art des Polymers, Art des Proteins, Art der Bindung/des Einschlusses des Proteins)
- das verwendete (Polymer-)Lösungsmittel hinsichtlich der Ausbildung der Polymerschicht und damit die Freisetzung des Proteins
- das Inkubations-Medium.

Die Tatsache, dass in den durchgeführten Versuchen innerhalb der ersten 6 Stunden bereits eine Fraktion von 81% der im Zeitraum von 11 Tagen an das Medium abgegebenen Gesamtproteinmenge freigesetzt wurde, spricht auf den ersten Blick dafür, dass das Protein nur wenig effektiv auf/in der Matrix zurückgehalten wurde.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der aus den Fluoreszenzwerten des Nährmediums errechnete Anteil an insgesamt (in 11 Tagen) freigesetztem Protein lediglich 70% (Versuchsbedingungen mit Mediumwechsel) bzw. 50% (Versuchsbedingung ohne Mediumwechsel) der ursprünglich auf die ICBM aufgetrachten Menge beträgt. Da in Vorversuchen ausgeschlossen werden konnte, dass im Beobachtungszeitraum die Fluoreszenz von FITC-BSA signifikant abfällt, kann davon ausgegangen werden, dass eine gewisse Fraktion des Proteins entweder auf/in der ICBM zurückgehalten wurde, und/oder sich ein Anteil des freigesetzten BSA an die Kunststoffwandungen des Reaktionsgefäßes adsorbiert hat. Um letzteres zu vermeiden versetzten Determan et al.⁴⁸ bei einer Releasekinetik mit FITC-BSA die wässrige Lösung des Inkubationsmediums mit 3%igem SDS (Natriumlaurylsulfat). Dieses sollte als Surfactant fungieren und eine Proteinbindung an die Reaktionsgefäßwand vermeiden.

Die Adsorption von Proteinen wie BSA an die Kollagenmatrix geschieht nicht-covalent über van-der-Waals Kräfte, ionische Bindungen, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen u. Ä.^{53, 54}.

Eine ICBM besitzt durch den trabekulären Aufbau zwar eine verhältnismäßig große Oberfläche, bezogen jedoch auf die Größe der quaderförmigen Matrix (ca. 10x10x5mm) könnte die in den Versuchen zu dieser Arbeit aufgetrachten Menge von 500µg an BSA die

„Beladungskapazität“ der ICBM in Hinblick auf die Bindungsstellen des Gerüsts überschritten haben. In einer Studie von Horváthy et al.⁹⁰ waren 4mm Durchmesser betragende Scheiben an demineralisierter Knochenmatrix (Volumen nicht angegeben) bei einer Menge von 380µg an Albumin gesättigt. Serro et. al.⁷⁰ errechneten, dass die Sättigung (für einen BSA-Monolayer) bei 4 mg/m² liegen müsste.

Es wird davon ausgegangen, dass der initiale Schub an freigesetztem Protein („burst“) durch diejenigen Proteinmengen hervorgerufen werden, die aufgrund eines „overload“ des Trägers von vornherein keine Wechselwirkung mit der Oberflächen-Matrix aufweisen und deswegen rapide abdiffundieren⁹¹.

Die Charakteristik der frühzeitigen und rapiden Freisetzung von BSA aus den unbeschichteten ICBM lässt das reine Dotieren eines Kollagenträgers mit einem Wachstumsfaktor wie BMP-2 für die Verwendung als Knochenersatzmaterial unvorteilhaft erscheinen. Die initial freigesetzten Mengen wären unphysiologisch hoch und führen zu den Nebenwirkungen, die aus der klinischen Verwendung dieser Knochenersatzmaterialien bekannt geworden sind.

5.1.4.2 Einfluss des Polymer-Coating auf die BSA-Freisetzung

Bei insgesamt vergleichbaren Bedingungen konnte in der Freisetzungskinetik dieser Arbeit ein Einfluss der Polymergröße, sowie der applizierten Polymermenge (sowohl von PLA, als auch von PLGA) auf die Freisetzung von BSA nachgewiesen werden. Die Annahme, dass BSA umso stärker retiniert wird, je größer die Menge des Polymers und je größer das verwendete Polymerelement ist, kann für die anfänglichen Untersuchungsintervalle bestätigt werden. Die Stärke dieses Einflusses fällt aber vergleichsweise gering aus.

Bei der Interpretation der Freisetzungskinetik ist zu beachten, dass von den drei Polymeren hoher Viskosität (RG 504, RG 505, 206 S) aus Gründen der Verarbeitbarkeit im Mittel nur die Hälfte der Menge an Polymer (60mg) pro ICBM appliziert wurde (120mg bei 203, RG 503). So ist die Tatsache zu erklären, dass zum Beispiel nach 6 Stunden (vergleiche Abb. 11) RG 504 trotz des größeren Molekulargewichtes initial signifikant weniger Proteinmenge an der Abdiffusion in das Nährmedium hindert, als RG 503 ($p = 0,036$).

Der Einfluss der inhärenten Viskosität bzw. Molekülgröße des Polymers ist größer, als der Einfluss der verwendeten Menge an Polymer (in Gramm pro ICBM). Unter Berücksichtigung von Viskosität und eingesetzter Menge des jeweiligen Polymers ergaben sich keine Hinweise auf Unterschiede in der BSA-Freisetzung zwischen der Polymerart PLA und PLGA. Die initiale Proteinfreisetzung (im ersten Untersuchungsintervall von 6 Stunden) wurde umso stärker zurückgehalten, je größer das Polymerelement und je größer die eingesetzte Menge gewesen ist. Nach Umkehrung dieser Verhältnisse im zweiten Untersuchungsintervall (höchste BSA Freisetzung in der Gruppe mit RESOMER 206 S im Intervall von 6 bis 12 Stunden) sind in den nachfolgenden Tagen die höchsten Freisetzungsraten in den ICBMs mit Polymerbeschichtungen mittlerer Molekülgröße (RG 503, RG 505) zu finden. Diese zuletzt genannte Polymergruppe dämpft die initialen Proteinfreisetzungsschübe ab. In der Behandlungsgruppe mit Mediumwechsel ist im letzten Beobachtungsintervall (48 Stunden zwischen Tag 9 und Tag 11) die BSA-

Freisetzung allein in den mit RG 503 beschichteten ICBM signifikant höher als in der Kontrollgruppe, in der Untersuchungsgruppe ohne Mediumwechsel ist am Ende des Beobachtungszeitraums die abgegebene Gesamtproteinmenge lediglich bei mit RG 505 beschichteten ICBM signifikant geringer als in der (unbeschichteten) Kontrollgruppe.

In pharmakologischen Untersuchungen zu PLA/PLGA-Trägern^{84, 92, 93, 94} konnte gezeigt werden, dass die initiale, starke Freisetzung (sogenannter „burst-release“) ein typisches Charakteristikum für die Proteinfreisetzung aus einer hydrophoben Polymermatrix darstellt. Vergleicht man die zeitlichen Dimensionen der Freisetzungskinetik vor dem Hintergrund der in zu dieser Arbeit verwendeten Polymere (Molekülgröße, eingesetzte Mengen) so wäre bei den hier durchgeführten Experimenten sowohl eine größere Verzögerung der BSA-Freisetzung von den ICBM zu erwarten gewesen, als auch größere Unterschiede in den Behandlungsgruppen zwischen den einzelnen Polymeren. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand liefern die zusätzlich durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen: dabei zeigte sich eine Ablösung (Delamination) der Polymerschicht von den ICBM, wenn diese zuvor mit der Proteinschicht überzogen wurden, als auch eine Zunahme der Spaltbildung zwischen Matrixoberfläche und Polymerschicht mit zunehmender Exposition im Medium. Dadurch war es möglich, dass die Proteine aus den ICBM abdiffundieren konnten, bevor die Polymerschicht vollständig abgebaut war. Es ist dabei jedoch allgemein zu berücksichtigen, dass die Abdiffusion/Freisetzung eines Proteins nicht erst mit dem vollständigen Abbau der Polymerschicht beginnt. Zum einen ist die Diffusion freizusetzender Moleküle durch die Maschen einer Polymerschicht möglich, zum anderen geschieht der Abbau der Polymerschicht nicht gleichmäßig von der Kontaktoberfläche mit dem wässrigen Medium („*surface*“-*degradation*), sondern diskontinuierlich durch Ablösung von Polymerklumpen und Schuppen (sog. *bulk-degradation*,). Darüber hinaus handelt es sich bei den ICBM nicht um eine beschichtete plane Oberfläche, sondern um ein dreidimensionales poröses Netzwerk, dessen Poren (wie elektronenmikroskopisch in Kapitel 4.4 gezeigt) ebenfalls durch die Polymerschicht verschlossen wurden. Es ist daher davon auszugehen, dass das BSA im Zentrum der ICBM weit effektiver zurückgehalten wurde als im Randbereich des ICBM. Vor dem Hintergrund, dass eine knöcherne Durchbauung in umgekehrter Richtung (von peripher nach zentral in das ICBM) erfolgen soll, könnte dies von Vorteil sein.

Neben den Charakteristika der Proteinfreisetzung aus PLA/PLGA wurden auch die schwachen mechanischen Haftungseigenschaften der Polymerbeschichtungen (insbesondere PLA und PLGA) an Werkstoffoberflächen (zum Beispiel Metallimplantaten) beschrieben^{92, 95, 96}. Die Arbeitsgruppe von Amir et al.⁹² entwickelte diesbezüglich ein bifunktional quervernetzbares PLA mit Epoxid- und Alken-Seitenketten. Dabei konnten sie über die Epoxid-Seitenketten die Polymerschicht mit der Metalloxid-Oberfläche eines Trägermaterials kovalent verbinden und über die Alken-Seitenketten (ebenfalls kovalente) Verbindungen zu einer weiteren Polymerschicht herstellen.

Um zu verhindern, dass ein freizusetzendes Protein auf einer Kollagenträgermatrix unter einer sich delaminierenden Polymerschicht herausgewaschen wird, kann neben der Möglichkeit des physikalischen Einschlusses des Proteins in der Polymerschicht (vgl. ⁸²) die Umsetzbarkeit einer kovalenten Bindung des Proteins/Wachstumsfaktors an das Polymer untersucht werden. Da eine Immobilisation des Proteins auf der Trägermatrix den Nachteil hätte, dass dessen Freisetzung an den Abbau der (mechanisch stabilisierenden) Matrix gekoppelt wäre, hätte hingegen die Bindung an die sich auflösende Polymerschicht den weiteren Vorteil, dass mit Auflösung/Ablösung des Polymer der Wachstumsfaktor in sequestrierter Form im extrazellulären Raum vorliegen könnte. Da für einige zelluläre Antworten von BMPs die (intrazelluläre) Inkorporation von gelöstem BMP/Rezeptorkomplex von Bedeutung zu sein scheint, wäre dies von Vorteil gegenüber einer kovalenten immobilisieren Bindung an die Matrixoberfläche, die lediglich einer Präsentation des Wachstumsfaktors an die chemotaktisch angezogenen Zellen gleichkäme³⁹.

Gharibjanian et al.⁹⁷ konnten zeigen, dass eine durch Carbodiimid katalysierte, kovalente Bindung von BMP-2 an PLGA und PCL osteogene Differenzierungsmarker von Maus-Präosteoblasten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe anstiegen ließ.

Neben der Möglichkeit einer kovalenten Bindung gibt es auch Hinweise darauf, dass rekombinantes BMP-2 sich durch Absorption an PLGA anbinden kann⁹⁸. Untersuchungen von Schrier et al.⁹⁹ ergaben dabei, dass die Menge an absorbiertem BMP-2 nicht von der Molekülmasse bzw. Kettenlänge der eingesetzten unterschiedlichen PLGA-Polymere abhängig war, wenn die anderen Bedingungen konstant gehalten wurden.

5.2 Schlussfolgerungen der in-vitro Modellversuche für die Herstellung eines Knochenersatzmaterials

5.2.1 Die „optimale“ Dosis von Wachstumsfaktoren für die knöcherne Regeneration

Die durch die jährlich mehr als 600.000mal durchgeführten autologen Knochentransplantationen entstandenen Mehrkosten werden allein in den USA auf 2,5 Mrd.US\$ geschätzt¹⁰⁰. Die Entwicklung eines neuen, wachstumsfaktor-freisetzenden Knochenersatzmaterials würde hingegen im Zeitraum von acht Jahren Kosten von 50 bis 800 Mio.US\$ verursachen. Der Gebrauch des in den USA für die klinische Verwendung zugelassenen osteoinduktiven Knochenersatzmaterials Infuse® (Medtronic) kostet jährlich schätzungsweise 750 Mio. US\$¹⁰¹. Den überwiegenden Kostenanteil stellt dabei die Produktion des rekombinanten BMP dar, das in Dosisbereichen von einigen Milligramm pro Einheit an Knochenersatzmaterial vorliegt. Bis heute gibt es keine konkrete Empfehlung bezüglich der benötigten Konzentration an BMPs für bestimmte chirurgische Fragestellungen. Vor dem Hintergrund, dass 1kg menschlichen Knochens ca. 1µg BMP-2 enthält, sind die derzeit klinisch eingesetzten Dosen um viele Potenzen höher: eine Einheit des Knochenersatzmaterials OP-1 Implant® (Stryker) enthält 3,5mg an rekombinanten BMP-7. Dies entspricht einer äquivalenten Dosis an BMP-7, die im gesamten Skelett zweier Menschen vorkommt¹⁰². Die mögliche Dosierung von rhBMP-2, das in klinischen Studien für die Fusion von Wirbelkörpern verwendet wird, liegt zwischen 1,4 und 12mg pro Fusionslevel⁴².

Ein Großteil der nicht selten auftretenden und zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen beim klinischen Einsatz von (rh)BMPs wird auf die verwendeten hohen Dosen zurückgeführt, welche jedoch erforderlich sind, um den klinisch gewünschten Effekt ausreichender Knochenneubildung gewährleisten zu können³⁹.

Um die physiologisch erwünschten Wirkungsweisen der BMPs zumindest annähernd im Rahmen eines *Tissue Engineering* imitieren zu können, scheint es unwahrscheinlich, dass der Einsatz eines einzelnen (ggf. rekombinanten) Wachstumsfaktors für ein osteoinduktives Knochenersatzmaterial ausreichend ist. Die Angaben einzelner Mengen an benötigten BMPs pro Volumeneinheit an Knochenersatzmaterial werden vermutlich der Angabe von Mengenverhältnissen der einzelnen eingesetzten Wachstumsfaktoren weichen müssen. Es ist zumindest davon auszugehen, dass die eingesetzten Dosen an Wachstumsfaktoren drastisch reduzierbar sind, wenn sie ihre biologische Aktivität im Zusammenspiel mit weiteren Agonisten und Antagonisten entfalten können.

5.2.2 Die „optimale“ Releasekinetik von Wachstumsfaktoren für die knöcherne Regeneration

In Schemata zu den Stadien primärer Frakturheilung^{11, 43, 103} wird ein Zeitintervall von ca. 21-30 Tagen in inflammatorische (1.-6.Tag), chondrogene (7.-9. Tag) und osteogene (10-30.Tag) Abschnitte unterteilt, in denen jeweils unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren ihre maximale Gewebekonzentration aufweisen: Initial dominieren

Zytokine wie IL1b, IL-6, TNF- α und - β und Morphogene wie TGF β 1 und BMP-2, in der zweiten Phase Faktoren wie TGF β 2 und -3, BMP-4, -5, -6 sowie Metalloproteinasen und im Übergang zur dritten Phase Botenstoffe wie BMP-7, VEGF (-b und -c), Osteopontin. Als Richtschnur könnten zukünftige „Designs“ von Releasekinetiken diese Zeiträume als Anhalt nehmen.

Sollten zukünftig mehrere Wachstumsfaktoren/Zytokine auf einer Trägermatrix in Kombination ihre Wirkung entfalten, werden auch unterschiedliche zeitliche Freisetzungsprofile aus einem einzelnen Knochenersatzmaterial erforderlich sein. In vitro und in kleineren tierexperimentellen Untersuchungen sind dabei bereits vielversprechende Ansätze erfolgt^{82, 103}.

Vergleicht man die Freisetzung von BMP-2 aus verschiedenen Matrices in vivo und in vitro, scheint die Freisetzung und der Abbau (aus Kollagenmatrices) in vivo schneller zu verlaufen^{104, 105, 106}. Diejenigen Matrices, die eine größere Menge an eingeschlossenen GF zurückhalten, scheinen bezüglich der Knochenregeneration effektiver zu sein^{80, 107}.

Bezüglich BMP-2 ergaben Untersuchungen von Li et al⁸⁵, dass eine prolongierte Freisetzung (4 Wochen) zu einer höheren Neuformation von Knochen führt als die Freisetzung äquivalenter Mengen innerhalb der ersten 3 Tage. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass ein initialer „burst-release“ von BMP-2 für die Initiierung einer Knochenneubildung von positiver Bedeutung sein kann. Eine Untersuchung von Li et al⁸⁵ ergab, dass sich eine Nivellierung der anfänglichen Konzentrationsmaxima von BMP-2 durch Retention des Wachstumsfaktors in Mikrosphären nachteilig auf die Knochenneubildung auswirkte. Dies zeigt, wie anspruchsvoll und komplex sich die künstliche Nachbildung biologischer Abläufe in vivo darstellt, ohne, dass unerwünschte Begleitwirkungen überwiegen.

Die Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren wie der veränderten Zell-Antwort auf BMP's in Abhängigkeit von präsentierten Extrazellulärmatrix- Proteinen, der Interaktion assoziierter „nicht-BMP“-Proteine bei der Osteoinduktion und die Beeinflussung der biologischen Aktivität durch pH-Wert, Löslichkeit, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen etc. zeigen die Herausforderungen bei der Herstellung eines maßgeschneiderten Knochenersatzmaterials auf.

Mit jeder weiteren neu gewonnenen Erkenntnis über die komplexen Mechanismen des Knochenstoffwechsels und der knöchernen Regeneration rückt die ursprüngliche Vorstellung zunehmend in den Hintergrund, es bedürfe lediglich eines Trägermaterials und eines "juice of stonemaking"³⁸ um die Natur der Knochenheilung nachzubilden. Die Berücksichtigung dieser Erkenntnisse könnte sukzessive zur Entwicklung von Techniken und Knochenersatzmaterialien führen, die durch immer weiter verbesserte Wirkungs-/Nebenwirkungsprofile die orthopädische und knöcherne kraniofaziale Chirurgie zukünftig revolutionieren könnten.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ Schmitz JP, Hollinger JO (1986) [The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.]
Clin Orthop.:299–308
- ² Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. (2010) [Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect.]
Plast Reconstr Surg. Jun;125(6):1685-92
- ³ R. Tevlin et al. (2014) [biomaterials for craniofacial bone Engineering]
J Dent Res 93(12):1187-1195.
- ⁴ Albrektsson T, Johansson C. (2001) [Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.]
Eur Spine J. Oct;10 Suppl 2: S96-101.
- ⁵ Ward BB, Brown SE, Krebsbach PH (2010) [Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies.]
Oral Dis 16:709-716.
- ⁶ Shahi M, Peymani A, Sahmani M. (2017) [Regulation of Bone Metabolism.]
Rep Biochem Mol Biol. Apr;5(2):73-82.
- ⁷ Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) [Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?]
Mech Dev 87: 57-66.
- ⁸ Forriol F, Shapiro F (2005) [Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces.]
Clin Orthop Relat Res. Mar;(432):14-33.
- ⁹ Shapiro F. (2008) [Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts.]
Eur Cell Mater. Apr 1; 15:53-76.
- ¹⁰ Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. (2007) [Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?]
Injury. Mar;38 Suppl 1: S11-25.
- ¹¹ Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) [Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation.]
J Cell Biochem 88:873-884
- ¹² Allori AC, Sailon AM, Warren SM. (2008) [Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules.]
Tissue Eng Part B Rev. Sep;14(3):259-73.
- ¹³ Allori AC, Sailon AM, Warren SM. (2008) [Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix.]
Tissue Eng Part B Rev. Sep;14(3):275-83.
- ¹⁴ Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro (2014) [Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives.]
JM J Dent Res. Apr;93(4):335-45.
- ¹⁵ Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. (2014) [Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications.]
Arch Biochem Biophys. Nov 1;561:64-73.

-
- ¹⁶ Paiva KB, Granjeiro JM (2014) [Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions.]
Arch Biochem Biophys. Nov 1; 561:74-87.
- ¹⁷ Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M (2011) [Angiogenesis in bone regeneration]
Injury. Jun;42(6):556-61.
- ¹⁸ Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. (2014) [Role of angiogenesis in bone repair]
Arch Biochem Biophys. Nov 1; 561:109-17.
- ¹⁹ Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. (2012) [Recent advances in bone tissue engineering scaffolds.]
Trends Biotechnol. Oct;30(10):546-54.
- ²⁰ Williams DF (2008) [On the mechanisms of biocompatibility.]
Biomaterials. 29:2941-2953
- ²¹ Patel M, Fisher JP (2008) [Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering.]
Pediatr Res. 63:497-501.
- ²² Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004) [Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering.]
J Bone Joint Surg. Am 86-A:1541-1558.
- ²³ Ricci JL, Clark EA, Murriky A, Smay JE (2012) [Three-dimensional printing of bone repair and replacement materials: impact on craniofacial surgery.]
J Craniofac Surg. 23:304-308.
- ²⁴ Wahl DA, Czernuszka JT (2006) [Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair]
Eur Cell Mater. 11:43-56.
- ²⁵ Mantripragada VP, Lecka-Czernik B, Ebraheim NA, Jayasuriya AC (2013) [An overview of recent advances in designing orthopedic and craniofacial implants]
J Biomed Mater Res A. 101:3349-3364.
- ²⁶ Agarwal R, García AJ. (2015) [Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair]
Adv Drug Deliv Rev. Nov 1; 94:53-62.
- ²⁷ Fishero BA, Kohli N, Das A, Christophel JJ, Cui Q (2015) [Current concepts of bone tissue engineering for craniofacial bone defect repair.]
Craniofac Trauma Reconstr. Mar;8(1):23-30.
- ²⁸ Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V (2012) [Craniofacial bone tissue engineering]
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Sep;114(3):e1-9.
- ²⁹ Gibbs DM, Black CR, Dawson JJ, Oreffo RO (2016) [A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration]
J Tissue Eng Regen Med. Mar;10(3):187-98.
- ³⁰ Lee SH, Shin H (2007) [Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering]
Adv Drug Deliv Rev. 59:339-359.
- ³¹ Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ (2010) [The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering.]
Biomaterials. Jan;31(3):461-6.
- ³² Sicchieri LG, Crippa GE, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. (2012) [Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering.]
J Tissue Eng Regen Med. Feb;6(2):155-62.

-
- ³³ Holt DJ, Grainger DW. (2012) [Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair.]
Adv Drug Deliv Rev. Sep;64(12):1123-8.
- ³⁴ Kimoto T, Hosokawa R, Kubo T, Maeda M, Sano A, Akagawa Y. (1998) [Continuous administration of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates bone induction on rat calvaria--an application of a new drug delivery system.]
J Dent Res. Dec;77(12):1965-9.
- ³⁵ van Griensven M. (2015) [Preclinical testing of drug delivery systems to bone.]
Adv Drug Deliv Rev. Nov 1; 94:151-64
- ³⁶ Agrawal V, Sinha M. (2017) [A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2.]
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. May;105(4):904-925.
- ³⁷ Urist MR (1965) [Bone: formation by autoinduction.] Science 150:893 – 899
- ³⁸ Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S. (2017) [Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins.]
Int Orthop. May;41(5):1065-1069.
- ³⁹ Migliorini E, Valat A, Picart C, Cavalcanti-Adam EA. (2016) [Tuning cellular responses to BMP-2 with material surfaces.]
Cytokine Growth Factor Rev. Feb; 27:43-54.
- ⁴⁰ Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) [Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.]
Science. Dec 16;242(4885):1528-34.
- ⁴¹ Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. (1988) [Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors.]
Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;85(24):9484-8.
- ⁴² Chrastil J, Low JB, Whang PG, Patel AA. (2013) [Complications associated with the use of the recombinant human bone morphogenetic proteins for posterior interbody fusions of the lumbar spine.]
Spine. Jul 15;38(16): E1020-7
- ⁴³ Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. (2011) [Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing.]
Int Orthop. Sep;35(9):1271-80.
- ⁴⁴ Wischke C, Borchert HH (2006) [Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks.]
Pharmazie. 61(9):770-4.
- ⁴⁵ A. Sukarto and B. G. Amsden. (2012) [Low melting point amphiphilic microspheres for delivery of bone morphogenetic protein-6 and transforming growth factor- β 3 in a hydrogel matrix.]
Journal of Controlled Release. vol. 158, no. 1, pp. 53–62,
- ⁴⁶ Patterson J, Siew R, Herring SW, Lin AS, Guldberg R, Stayton PS. (2010) [Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration]
Biomaterials. Sep;31(26):6772-81.
- ⁴⁷ Huang BX, Kim HY, Dass C. (2004) [Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry.]
J Am Soc Mass Spectrom. Aug;15(8):1237-47.
- ⁴⁸ Determan AS, Trewyn BG, Lin VS, Nilsen-Hamilton M, Narasimhan B (2004) [Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres.]
J Control Release. ;100(1):97-109.

-
- ⁴⁹ Bujacz A. (2012) [Structures of bovine, equine and leporine serum albumin.] *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Oct;68(Pt 10):1278-89.
- ⁵⁰ Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W. (2012) [Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins.] *Mol Immunol.* Oct;52(3-4):174-82.
- ⁵¹ Scheufler C1, Sebald W, Hülsmeier M. (1999) [Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution.] *J Mol Biol.* Mar 19;287(1):103-15.
- ⁵² Gandhi NS1, Mancera RL (2012) [Prediction of heparin binding sites in bone morphogenetic proteins (BMPs).] *Biochim Biophys Acta.* Dec;1824(12):1374-81.
- ⁵³ Keith A. Blackwood, Nathalie Bock, Tim R. Dargaville, and Maria Ann Woodruff (2012) [Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering] *Int J Polym Sci.* Volume 2012, Article ID 174942, 25 pages
- ⁵⁴ King WJ, Krebsbach PH. (2012) [Growth factor delivery: how surface interactions modulate release in vitro and in vivo.] *Adv Drug Deliv Rev.* Sep;64(12):1239-56.
- ⁵⁵ Hajimiri M, Shahverdi S, Kamalinia G, Dinarvand R. (2015) [Growth factor conjugation: strategies and applications.] *J Biomed Mater Res A.* Feb;103(2):819-38.
- ⁵⁶ Martino MM, Briquez PS, Maruyama K, Hubbell JA. (2015) [Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration.] *Adv Drug Deliv Rev.* Nov 1;94:41-52.
- ⁵⁷ Reed S, Wu B. (2014) [Sustained growth factor delivery in tissue engineering applications.] *Ann Biomed Eng.* Jul;42(7):1528-36.
- ⁵⁸ Technisches Datenblatt RESOMER™ RG 203 H, Evonik Industries AG, April (2013)
- ⁵⁹ Technisches Datenblatt RESOMER™ RG 503 H, Evonik Industries AG, April (2013)
- ⁶⁰ RESOMER® Biodegradable Polymers for Medical Device Applications Research (2013), RESOMER Product Table, Sigma Aldrich
- ⁶¹ K. Mäder, S. Nitschke, R. Stösser, H.-H. Borchert, A. Domb (1997) [Nondestructive and localised assesment of acidic microenvironments inside biodegradable polyanhydrides by spectral spatial Electron Paramagnetic Resonance Imaging (EPRI)] *Polymer.* 38, 4785-4794.
- ⁶² Kuberasampath T, Ridge RJ (1992) US Pat. Nr. 5171574
- ⁶³ Depprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kubler, N.R., Wurzler, K.K., 2005, [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 9, 363-368.
- ⁶⁴ Mündl. Mitteilung/email-Korrespondenz Dr. Klaus Zanger, Fachanatom d.A.G. am Universitätsklinikum Düsseldorf
- ⁶⁵ Michler G H (2008) *Electron Microscopy of Polymers*; Kap 8, ISBN (Print) :978-3-540-36350-7
- ⁶⁶ Miller RA, Brady JM, Cutright DE (1977), [Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios]. *J Biomed Mater Res.* 11(5):711-9.

-
- ⁶⁷ Handschel, J., Berr, K., Depprich, R., Naujoks, C., Kubler, N.R., Meyer, U., Ommerborn, M., Lammers, L., (2009) [Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials.] *J Biomater Appl.* 23, 549-560.
- ⁶⁸ Athanasiou, K. A.; Niederauer, G. G.; Agrawal, C. M. (1996), [Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers]. *Biomaterials.* 17, 93.
- ⁶⁹ Smith LA, Liu X, Hu J, Ma PX. (2009) [The influence of three-dimensional nanofibrous scaffolds on the osteogenic differentiation of embryonic stem cells.] *Biomaterials.* May;30(13):2516-22.
- ⁷⁰ Serro AP, Bastos M, Pessoa JC, Saramago B. (2004) [Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization.] *J Biomed Mater Res A.* Sep 1;70(3):420-7.
- ⁷¹ Zhang Q, He QF, Zhang TH, Yu XL, Liu Q, Deng FL. (2012) [Improvement in the delivery system of bone morphogenetic protein-2: a new approach to promote bone formation.] *Biomed Mater.* Aug;7(4):045002.
- ⁷² Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. (2009) [Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering.] *Biotechnol Lett.* Dec;31(12):1825-35.
- ⁷³ Martino MM, Briquez PS, Güç E, Tortelli F, Kilarski WW, Metzger S, Rice JJ, Kuhn GA, Müller R, Swartz MA, Hubbell JA. (2014) [Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing.] *Science.* Feb 21;343(6173):885-8. doi: 10.1126/science.1247663.
- ⁷⁴ Geiger M, Li RH, Friess W. (2003) [Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2.] *Adv Drug Deliv Rev.* Nov 28;55(12):1613-29.
- ⁷⁵ Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, García AJ, Guldberg RE. (2011) [Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration.] *Biomaterials.* Aug;32(22):5241-51.
- ⁷⁶ W. Friess, H. Uludag, S. Foskett, R. Biron, C. Sargeant, (1999) [Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers,] *Int. J. Pharm.* 187 (1) 91–99
- ⁷⁷ Sieron AL, Louneva N, Fertala A. (2002) [Site-specific interaction of bone morphogenetic protein 2 with procollagen II.] *Cytokine.* May 21;18(4):214-21.
- ⁷⁸ Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J(2007) [Homogenous osteogenesis and bone regeneration by demineralised bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2.] *Biomaterials.* 28:1027 – 1035
- ⁷⁹ P.Q. Ruhe, O.C. Boerman, F.G.M. Russel, A.G. Mikos, P.H.M. Spauwen, J.A. Jansen (2006) [In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin,] *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (10) 919–927.
- ⁸⁰ H. Uludag, D. D'Augusta, J. Golden, J. Li, G. Timony, R. Riedel, J.M. Wozney, (2000) [Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model,] *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2) 227–238.
- ⁸¹ Schiller AA, Schayer RW, Hess EL. (1953) [Fluorescein-conjugated bovine albumin; physical and biological properties.]

- ⁸² Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. (2001) [Polymeric system for dual growth factor delivery.]
Nat Biotechnol. Nov;19(11):1029-34.
- ⁸³ Bilati U, Allémann E, Doelker E. (2005) [Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles.]
Eur J Pharm Biopharm. Apr;59(3):375-88.
- ⁸⁴ Madsen CG, Skov A, Baldursdottir S, Rades T, Jorgensen L, Medlicott NJ (2015) [Simple measurements for prediction of drug release from polymer matrices - Solubility parameters and intrinsic viscosity.]
Eur J Pharm Biopharm. May; 92:1-7.
- ⁸⁵ Li B, Yoshii T, Hafeman AE, Nyman JS, Wenke JC, Guelcher SA. (2009) [The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora.]
Biomaterials. Dec;30(35):6768-79
- ⁸⁶ Huber E, Pobloth AM, Bormann N, Kolarczik N, Schmidt-Bleek K, Schell H, Schwabe P, Duda GN, Wildemann B. (2017) [Demineralized Bone Matrix as a Carrier for Bone Morphogenetic Protein-2: Burst Release Combined with Long-Term Binding and Osteoinductive Activity Evaluated In Vitro and In Vivo.]
Tissue Eng Part A. Apr 28. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0005. [Epub ahead of print]
- ⁸⁷ Chen L, Lin J, Li J, Wang X, Zhuang J, Wang H, Cheng K, Weng W. (2016) [Spatially-controlled distribution of HACC in mineralized collagen coatings for improving rhBMP-2 loading and release behavior.]
Colloids Surf B Biointerfaces. Sep 1; 145:114-121
- ⁸⁸ Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. (2012) [Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration.]
Adv Drug Deliv Rev. Sep;64(12):1292-309.
- ⁸⁹ Agarwal R1, García AJ2.(2015) [Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair.]
Adv Drug Deliv Rev. Nov 1; 94:53-62.
- ⁹⁰ Horváthy DB, Vác G, Szabó T, Szigyártó IC, Toró I, Vámos B, Hornyák I, Renner K, Klára T, Szabó BT, Dobó-Nagy C, Doros A, Lacza Z. (2016) [Serum albumin coating of demineralized bone matrix results in stronger new bone formation.]
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. Jan;104(1):126-32.
- ⁹¹ Huang X, Brazel CS. (2001) [On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems.]
J Control Release. Jun 15;73(2-3):121-36.
- ⁹² Amir E, Antoni P, Campos LM, Damiron D, Gupta N, Amir RJ, Pesika N, Drockenmuller E, Hawker CJ. (2012) [Biodegradable, multi-layered coatings for controlled release of small molecules.]
Chem Commun (Camb). May 18;48(40):4833-5.
- ⁹³ Lo CT, Van Tassel PR, Saltzman WM. (2009) [Simultaneous release of multiple molecules from poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles assembled onto medical devices.]
Biomaterials. Oct;30(28):4889-97.
- ⁹⁴ Strobel C, Bormann N, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B (2011) [Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants.]
J Control Release. Nov 30;156(1):37-45.
- ⁹⁵ Becker JM, Pounder RJ, Dove AP. (2010) [Synthesis of Poly(lactide)s with Modified Thermal and Mechanical Properties.]

⁹⁶ Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. (1999) [Polymeric systems for controlled drug release.]
Chem Rev. Nov 10;99(11):3181-98.

⁹⁷ Gharibjanian NA, Chua WC, Dhar S, Scholz T, Shibuya TY, Evans GR, Calvert JW. (2009) [Release kinetics of polymer-bound bone morphogenetic protein-2 and its effects on the osteogenic expression of MC3T3-E1 osteoprecursor cells.]
Plast Reconstr Surg. Apr;123(4):1169-77.

⁹⁸ Duggirala SS, Mehta RC, DeLuca PP. (1996) [Interaction of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with poly(d,l lactide-co-glycolide) microspheres.]
Pharm Dev Technol. Apr;1(1):11-9.

⁹⁹ Schrier JA, DeLuca PP. (2001) [Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: polymer binding and in vitro release.]
AAPS PharmSciTech. Oct 7;2(3):E17.

¹⁰⁰ Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. (2006) [Bone graft substitutes.]
Expert Rev Med Devices. Jan;3(1):49-57.

¹⁰¹ Spiller KL, Vunjak-Novakovic G. (2015) [Clinical translation of controlled protein delivery systems for tissue engineering.]
Drug Deliv Transl Res. Apr;5(2):101-15.

¹⁰² Bishop GB, Einhorn TA. (2007) [Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery.]
Int Orthop. Dec;31(6):721-7.

¹⁰³ Kim YH, Tabata Y. (2015) [Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration.]
Adv Drug Deliv Rev. Nov 1; 94:28-40.

¹⁰⁴ H. Uludag, D. D'Augusta, J. Golden, J. Li, G. Timony, R. Riedel, J.M. Wozney, (2000) [Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model]
J. Biomed. Mater. Res. 50 (2) 227–238.

¹⁰⁵ T. Gao, N. Kousinioris, S.R. Winn, J.M. Wozney, H. Uludag, (2001) [Enhanced retention of rhBMP-2 in vivo by thermoreversible polymers,]
Materwiss Werksttech. 32 (12) 953–961.

¹⁰⁶ Wöhl-Bruhn S, Badar M, Bertz A, Tiersch B, Koetz J, Menzel H, Mueller PP, Bunjes H. (2012) [Comparison of in vitro and in vivo protein release from hydrogel systems.]
J Control Release. Aug 20;162(1):127-33.

¹⁰⁷ D.H.R. Kempen, L. Lu, T.E. Hefferan, L.B. Creemers, A. Maran, K.L. Classic, W.J.A. Dhert, M.J. Yaszemski, (2008) [Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering.]
Biomaterials. 29 (22) 3245–3252.

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Professor Dr. Dr. N. Kübler dafür die experimentelle Arbeit im Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie realisiert haben zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professorin Dr. Dr. R. Depprich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung sowie Auswertung der Experimente.

Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. rer. nat. K. Berr, die mir mit außergewöhnlichem Engagement in allen Fragen der praktischen Umsetzung stets hilfreich zur Seite gestanden hat. Ich danke ihr für die wertvollen Tipps, die mich in allen Phasen der Arbeit vorangebracht haben.