



Abschlussbericht „BioOsteoReg“

Thema:

Entwicklung von Strategien zur alternativen Behandlung lokal ausgedehnter Kno-
chendefekte mit natürlich vorkommenden bioaktiven Stoffgemischen

Projektleitung:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Projektbearbeitung:

Dr.-Ing. Corina Vater
Dr. med. Henriette Bretschneider

Projektlaufzeit:

01.05.2016 – 30.09.2018

Entwicklung von Strategien zur alternativen Behandlung lokal ausgedehnter Knochendefekte mit natürlich vorkommenden bioaktiven Stoffgemischen

Ziel des Forschungsprojektes war es, durch Modifikation mit natürlich vorkommenden, bioaktiven Wachstumsfaktorgemischen (WFG) hoch effektive und kostengünstige Implantate für den Knochenersatz zu entwickeln, die das Einwachsen von Stammzellen aus dem Knochenmark sowie eine Vaskularisierung des Trägermaterials fördern und damit die Therapie ausgedehnter Knochendefekte ermöglichen. Diese WFG sollen eine Alternative zu bisher genutzten rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren bieten, welche in unphysiologisch hohen Dosen appliziert werden müssen, kostenintensiv sind und relevante Nebenwirkungen (z. B. heterotope Ossifikationen, Entzündungsreaktionen) auslösen können. Im Rahmen dieser Studie wurden bioaktive WFG aus Thrombozytenkonzentraten, dem Fettgewebe und aus Zellkulturüberständen hergestellt, charakterisiert und auf Trägermaterialien (Scaffolds) aufgebracht. Schließlich konnten diese funktionalisierten Scaffolds im Tiermodell getestet werden.

AP1 – Herstellung und Charakterisierung nativer WFG

Aus Fettgewebe, welches im Rahmen geplanter plastischer operativer Eingriffe gewonnen wurde (AZ: EK263122004), konnten Fettgewebsextrakte (ATE – „adipose tissue extract“) isoliert und von 5 Spendern vereinigt werden. Plättchenlysate (PL) wurden aus Thrombozytenkonzentraten von 25 Spendern durch 4-fache Einfrier-Auftau-Zyklen hergestellt. Zellkulturüberstände (HCM) wurden von aus dem Knochenmark isolierten mesenchymalen Stromazellen (BM-MSCs), welche unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) für 5 Tage kultiviert wurden, gewonnen. Die Bestimmung des Proteinprofils erfolgte mittels Angiogenese- und Zytokin-Array, der Gesamtproteingehalt wurde nach der Methode von Bradford ermittelt. Für ausgewählte Proteine wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Der Gesamtproteingehalt der jeweiligen WFG ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Gesamtproteingehalt der Wachstumsfaktorgemische

	MW ± Stabw
PL	11.600,0 ± 150,0 µg/ml
HCM	14,6 ± 6,0 µg/ml
ATE	4.050,0 ± 80,0 µg/ml

Der höchste Proteingehalt zeigte sich dabei mit 11.600,0 ± 150,0 µg/ml in PL, gefolgt von ATE mit 4.050,0 ± 80,0 µg/ml und HCM mit 14,6 ± 6,0 µg/ml. Anhand eines Angiogenese- und Zytokin-Arrays konnte ein Proteinprofil der Wachstumsfaktorgemische erstellt werden (Abb. 1 und Abb. 2). Dabei war in der Proteinanalyse Angiogenin das Protein mit der höchsten gemessenen Konzentration in HCM und ATE, IGFBP-1 (*insulin-like-growth-factor-binding-protein-1*) das in PL. PDGF-BB (*platelet-derived growth factor BB*) konnte in PL, nicht jedoch in HCM und ATE nachgewiesen werden. IL-6 (Interleukin 6) war nur in HCM und ATE nachweisbar.

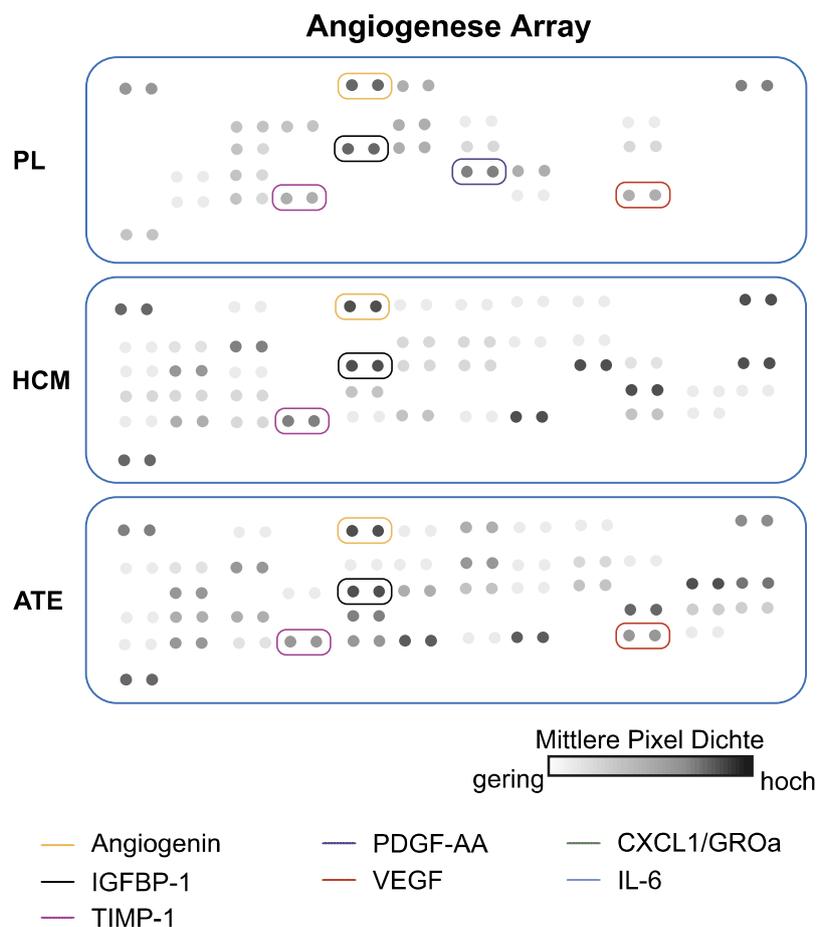


Abb. 1: Proteinprofil des Angiogenese-Arrays der drei Wachstumsfaktorgemische (PL, HCM und ATE); je dunkler der Punkt, desto höher der Proteingehalt; exemplarische Markierung einzelner Proteine, welche nachfolgend im ELISA quantifiziert wurden.

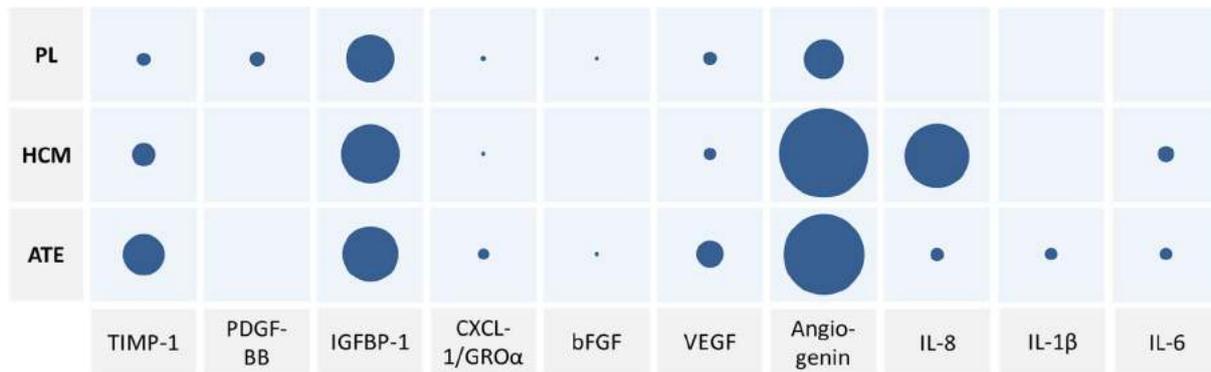


Abb. 2: Ergebnisse des Angiogenese- und Zytokin-Arrays; Darstellung der mittleren Pixeldichte ausgewählter Proteine der drei Wachstumsfaktorgemische; je größer der Punkt, desto höher der Proteingehalt, kein Nachweis bei leerem Feld

Im ELISA lag in allen drei Wachstumsfaktorgemischen TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) als Angiogenese-Suppressor in der höchsten Konzentration vor. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und Angiogenin waren die proangiogenen Proteine mit der höchsten Konzentration.

Tab. 2: ELISA-Ergebnisse – Proteinkonzentrationen der einzelnen WFG und ihre entsprechende Funktion

Protein/ Zytokin	PL (pg/ml)	HCM (pg/ml)	ATE (pg/ml)	Funktion
TIMP-1	19.844,0	5.276.467,8	362.785.015,3	Angiogenese Suppression
PDGF	14.384,6	0	45,4	Blutgefäßbildung
IGFBP-1	2.785,6	3.002,3	1.448,5	Zellmigration und Metabolismus
CXCL-1/ GRO α	1.962,4	1.554,0	1.817,9	Steigerung der Zellmigration
bFGF	801,2	8,5	278,6	aktiviert im Rahmen der Wundheilung
VEGF	634,1	3.044.125,5	425,1	Blutgefäßbildung
Angiogenin	68,9	1.477,9	930,6	Proliferation und Bildung tubulärer Strukturen
IL-1 β	29,5	2,7	122,7	Zellprozesse (Proliferation, Differenzierung und Apoptose)
IL-6	0	786,8	654,4	proinflammatorisches Zytokin und antiinflammatorisches Myokin
IL-8	18,3	553,8	822,3	Immunantwort
IL-10	133,8	14,6	199,3	Immunregulation und Inflammation

➤ **Ziel AP1: homogene Charge von nativen WFG**

Es konnten erfolgreich homogene Wachstumsfaktorgemische hergestellt und charakterisiert werden, welche im nächsten Schritt zur Scaffoldfunktionalisierung verwendet wurden.

AP2 - Funktionalisierung von Scaffolds mit WFG

Gammasterilisierte, mineralisierte Kollagenscaffolds (MCH-Scaffolds), welche mit 30 mg/g Heparin modifiziert wurden um die Protein-/Zytokinfreisetzung zu verzögern, wurden mit den hergestellten Wachstumsfaktorgemischen funktionalisiert. Dazu wurden 2 mm lange Scaffolds mit einem Durchmesser von 1 mm hergestellt, deren Beladungskapazität 10 µl betrug. Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration auf den Scaffolds zu erzielen, welche auch nach Freisetzung aus den Scaffolds zuverlässig im ELISA detektierbar ist, wurden die WFG vor dem Beladen der Scaffolds aufkonzentriert (siehe AP3). Jeweils 10 µl des aufkonzentrierten WFG wurden auf die Scaffolds gegeben, welche nachfolgend gefriergetrocknet wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Scaffolds im Zellkulturmedium über 14 Tage. Während dieser Inkubation wurden Proben der Zellkulturüberstände gewonnen und mittels ELISA hinsichtlich ihres Proteingehaltes analysiert. Dabei zeigte sich bei allen drei untersuchten Wachstumsfaktorgemischen innerhalb der ersten 3 Tage die höchste Wachstumsfaktorfreisetzung (Abb. 3). In Bezug auf PDGF konnte eine verzögerte Freisetzung über einen Zeitraum von 14 Tagen festgestellt werden.

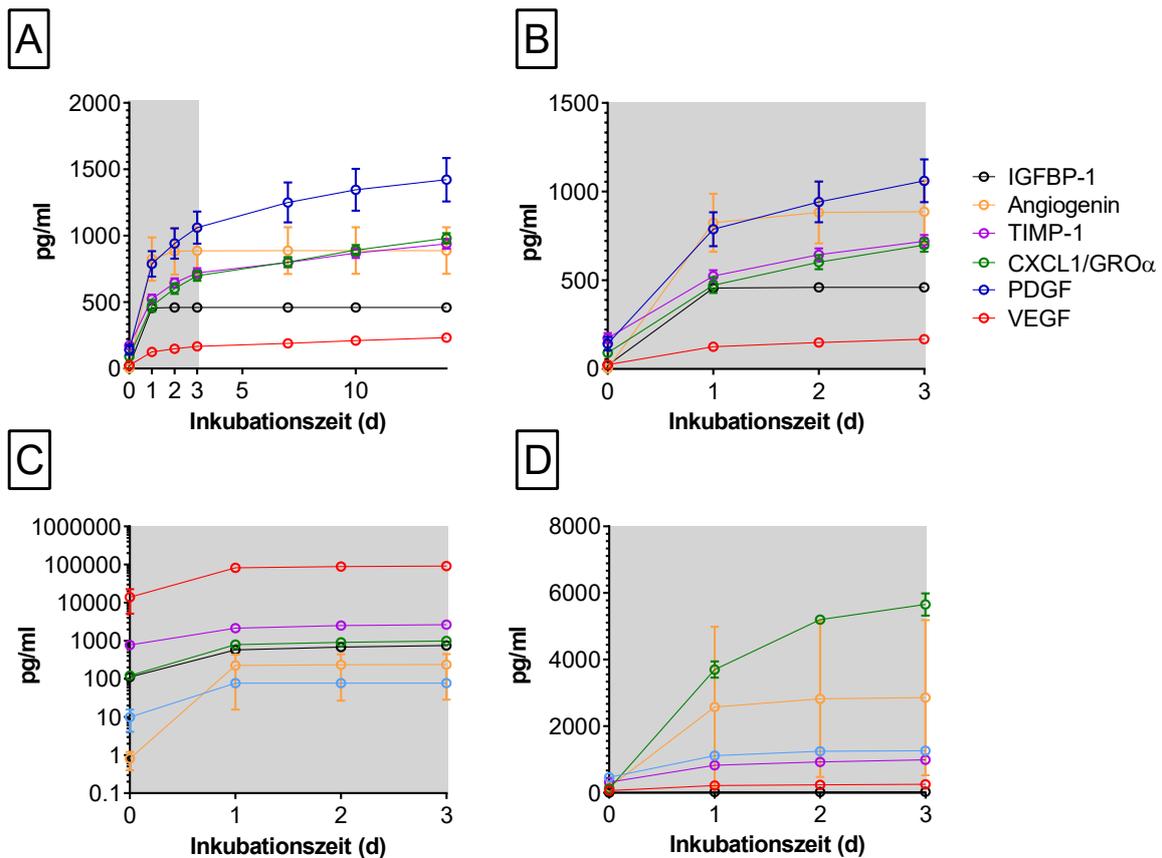


Abb. 3: ELISA-Ergebnisse der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus PL-, HCM- und ATE-funktionalisierten MCH-Scaffolds ($MW \pm Stabw$), (A) PL-funktionalisierte Scaffolds, Freisetzung über 14 Tage; (B) PL-funktionalisierte Scaffolds; (C) HCM-funktionalisierte Scaffolds; (D) ATE-funktionalisierte Scaffolds, (B-D) Freisetzungverhalten über 3 Tage

➤ **Ziel AP2: Scaffoldfunktionalisierung und kontrollierte Freisetzung**

Im Rahmen des Projektes ist es gelungen Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen und Heparin mit den unterschiedlichen Wachstumsfaktorgemischen zu funktionalisieren. Hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens zeigte sich für einen Großteil der untersuchten Wachstumsfaktoren ein „burst release“ im Sinne einer nahezu vollständigen Freisetzung der Wachstumsfaktoren an den ersten 3 Tagen nach Funktionalisierung. Ziel weiterer Studien könnte es sein, dieses Freisetzungsverhalten hinsichtlich einer verzögerten Abgabe zu optimieren.

AP3 - In vitro Testung der funktionalisierten Scaffolds

Um eine optimale Wirkung der Wachstumsfaktorgemische hinsichtlich Zellmigration, Osteogenese und Vaskularisierung zu erzielen, erfolgte eine Aufkonzentrierung der

WFG mittels Gefriertrocknung (Abb. 4). Aufgrund des unterschiedlichen Proteingehaltes der nativen Wachstumsfaktorgemische war eine 10-fache Aufkonzentrierung des PL, eine 20-fache Aufkonzentrierung des HCM und eine 40-fache Aufkonzentrierung des ATE bis zur Löslichkeitsgrenze möglich. Weiterhin wurde ein Mix aus allen drei Wachstumsfaktorgemischen (PL, HCM und ATE zu gleichen Teilen, jeweils 10-fach konzentriert) hergestellt und getestet.



Abb. 4: Wachstumsfaktorgemische nach Gefriertrocknung (links) und Resuspension in ddH₂O (rechts; PL: 10-fache-, HCM: 20-fache-, ATE: 40-fache-Aufkonzentrierung)

Das chemoattraktive Potential der WFG wurde mittels Membran-basiertem Migrations-Assay (Transwell-Assay) sowohl nach direkter Zugabe der einfach konzentrierten WFG (Abb. 5A), als auch nach Freisetzung der aufkonzentrierten WFG aus den Scaffolds (Abb. 5B) getestet und die Anzahl migrierter humaner mesenchymaler Stromazellen (hMSCs) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die WFG nicht nur bei systemischer Zugabe ein chemotaktisches Potential haben, sondern dieses auch nach Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Scaffolds aktiv bleibt. Nach systemischer Zugabe zeigte sich sowohl für PL, als auch für den Mix ein zur Positiv- und Negativkontrolle signifikant höheres chemoattraktives Potential ($p < 0,001$). Auch die Zellkulturüberstände der PL-funktionalisierten Scaffolds wiesen gegenüber der Negativkontrolle ein deutlich höheres chemoattraktives Potential auf ($p < 0,001$). ATE zeigte in unserem Versuch das geringste Potential hinsichtlich Chemoattraktivität. Mittels Kristallviolett färbung wurden die durch die Membran migrierten Zellen visualisiert (Abb. 6).

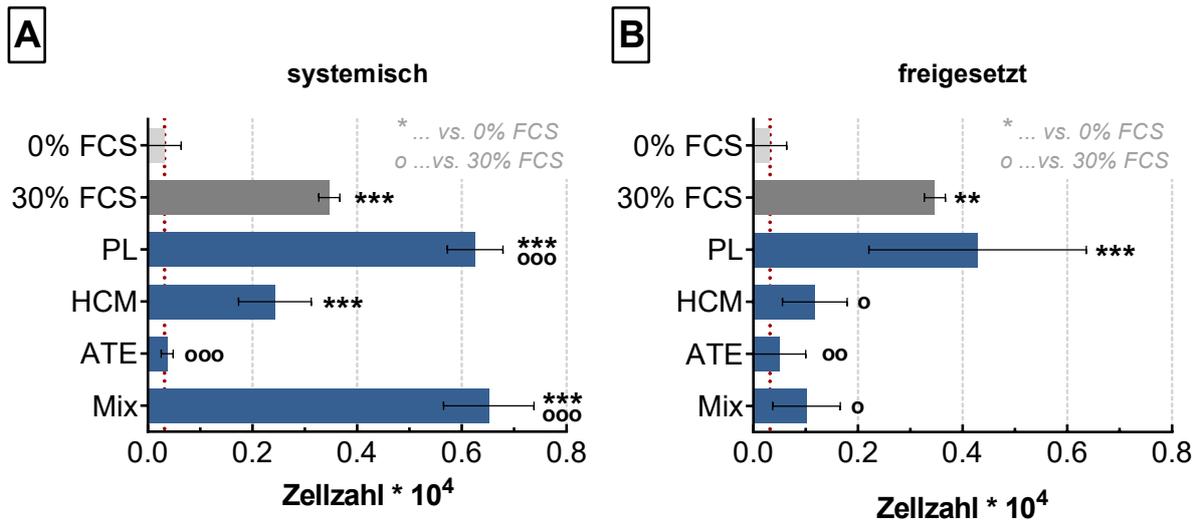


Abb. 5: Anteil migrierter hMSCs (MW \pm Stabw) durch die Transwellmembran innerhalb von 48 h nach Zugabe von nativen Wachstumsfaktorgemischen (A) bzw. Zellkulturüberständen der funktionalisierten Scaffolds (B) in die untere Kammer (0 % FCS: Negativkontrolle, 30 % FCS: Positivkontrolle; * $p < 0,05$ **/ $^{\circ}$ $p < 0,01$, ***/ $^{\circ\circ}$ $p < 0,001$)

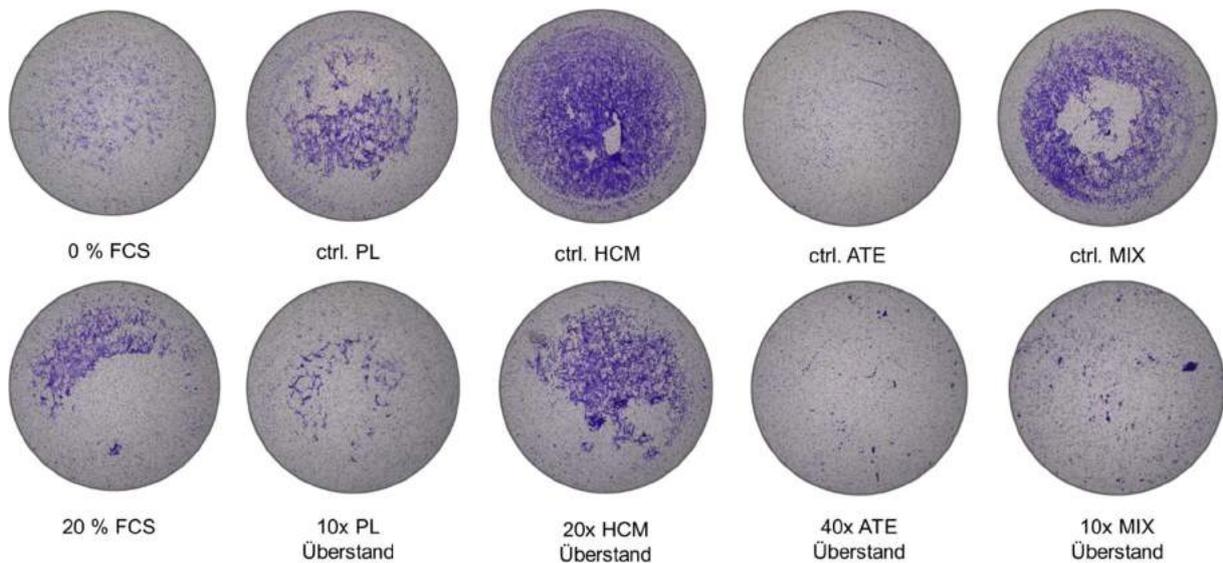


Abb. 6: Kristallviolettffärbung migrierter hMSCs nach 48 h Migrationszeit; systemische WFG-Zugabe (obere Reihe) und Zugabe von Zellkulturüberständen funktionalisierter Scaffolds im Vergleich (untere Reihe)

Weiterhin wurde untersucht inwieweit die funktionalisierten Scaffolds die osteogene Differenzierung von hMSCs beeinflussen (Abb. 7B). Als Kontrolle dienen Zellen, die in Zellkulturplatten kultiviert und bei denen die WFG systemisch zugegeben wurden (Abb. 7A). Dabei zeigte eine Scaffoldfunktionalisierung mit PL unter Zugabe von osteogenen Supplementen (+ OS; 100 nM Dexamethason, 10 nM β -Glycerophosphat, 50 μ M Ascorbinsäure) eine signifikant höhere Zellzahlzunahme nach 21 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Scaffolds ohne Funktionalisierung). Eine Kombination aller

drei 10-fach aufkonzentrierten WFG zu gleichen Teilen (Mix) ergab ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferation. Demgegenüber stand bei 14-tägiger Kultivierung eine geringere Proliferation der in Zellkulturplatten kultivierten Zellen.

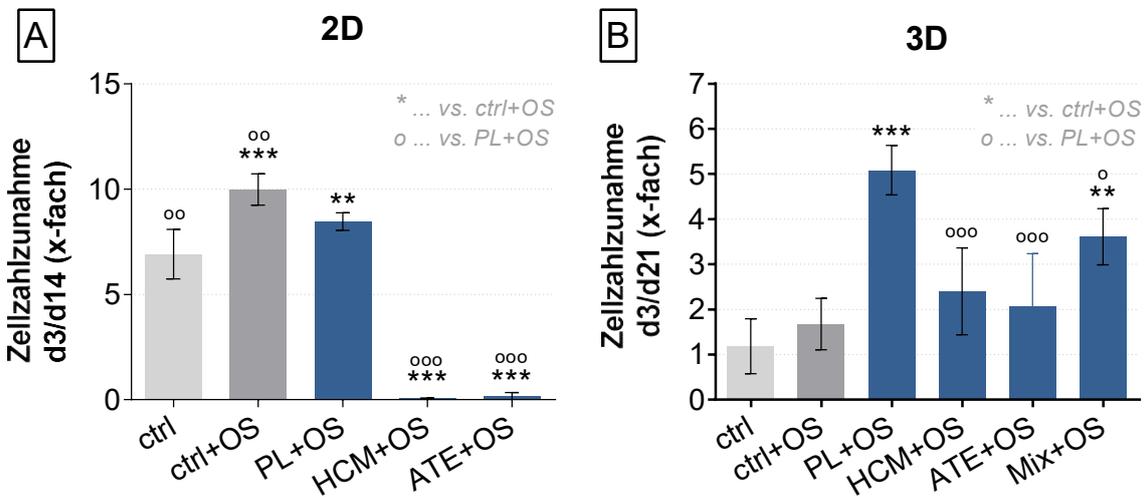


Abb. 7: Zellzahlzunahme (MW \pm Stabw) nach systemischer Zugabe einfach konzentrierter WFG in das Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen (+OS; A) sowie auf funktionalisierten Scaffolds (B); Kultivierung der Zellen in Zellkulturplatten (2D), Kultivierung der Zellen auf funktionalisierten Scaffolds (3D), Kontrolle (ctrl): Zellkulturmedium ohne osteogene Supplemente, sowie mit osteogenen Supplementen (ctrl +OS); Kontrolle in 2D ohne FCS-Zugabe, in 3D mit 10 % FCS im Zellkulturmedium; **/^{oo} $p < 0,01$; ***/^{ooo} $p < 0,001$

Hinsichtlich der spezifischen Aktivität des Differenzierungsmarkers alkalische Phosphatase (ALP) zeigte sich bei den Zellen in Zellkulturplatten (2D) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere ALP-Aktivität bei HCM- ($p < 0,0001$) und ATE-Zugabe ($p < 0,0021$; Abb. 8A). Nach Funktionalisierung der Scaffolds (3D) konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ALP-Aktivität festgestellt werden (Abb. 8B).

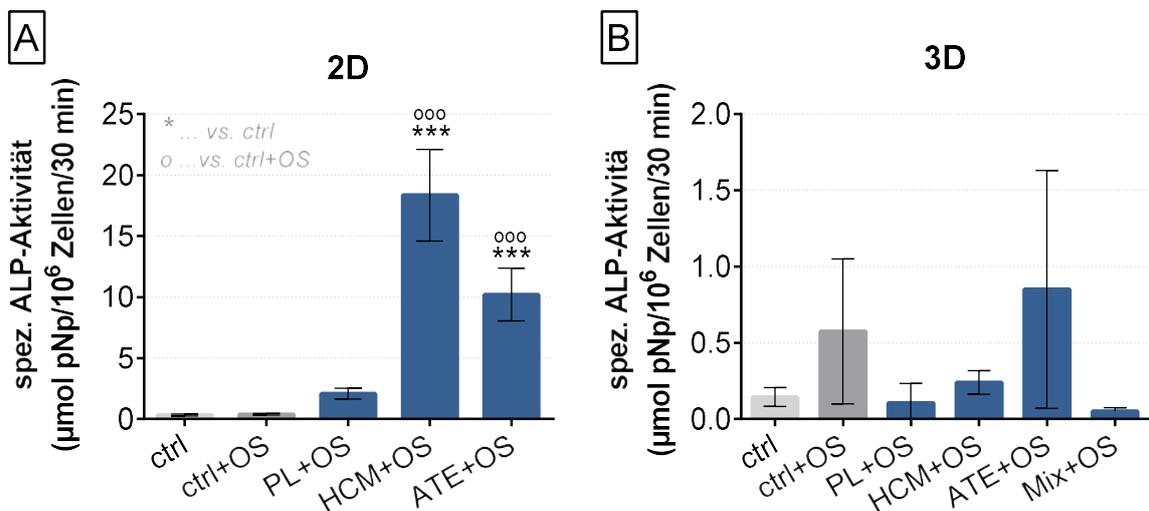


Abb. 8: Spezifische ALP Aktivität (MW \pm Stabw) von hMSCs nach 14-tägiger Kultivierung nach systemischer Zugabe einfach konzentrierter WFG in das Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen (+OS; A) sowie nach 21-tägiger Kultivierung auf funktionalisierten Scaffolds (B); ***/^{ooo} $p < 0,001$

Um das angiogene Differenzierungspotential der WFG zu testen, wurden die verschiedenen WFG dem Zellkulturmedium von Kokulturen (Verhältnis 4:1) aus hMSCs und Endothelzellen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) zugesetzt und die Bildung vaskulärer Strukturen untersucht. Nach Zugabe von ATE konnten im Vergleich zur Positivkontrolle (Zugabe von 20 ng/ml rhVEGF) signifikant längere und stärker verzweigte tubuläre Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 9). Für HCM konnte dies gegenüber der Negativkontrolle bestätigt werden. Die Auszählung tubulärer Strukturen nach Zugabe von PL war aufgrund von Fibrinablagerungen, welche durch Reaktion mit dem im Zellkulturmedium vorhandenen Kalzium entstehen, nicht möglich.

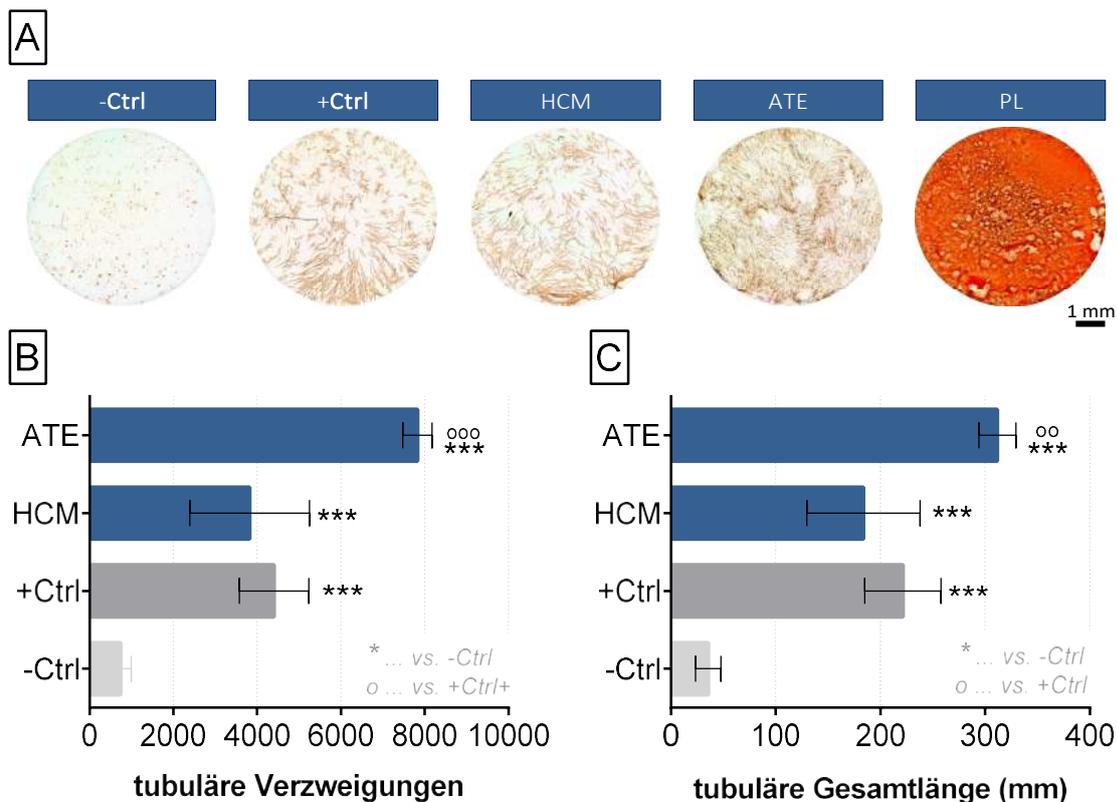


Abb.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kokulturen aus hMSCs und HUVEC. CD31-Färbung mit Darstellung tubulärer Strukturen (A), Anzahl tubulärer Verzweigungen (B; MW ± Stabw) und tubuläre Gesamtlänge (C; MW ± Stabw) nach systemischer Zugabe der WFG in das Zellkulturmedium; **/°° $p < 0,01$; ***/°°° $p < 0,001$

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Zellkulturüberstände der funktionalisierten Scaffolds die Bildung tubulärer Strukturen signifikant unterstützen und damit angiogene Wachstumsfaktoren nach Immobilisierung auf einem Gerüstmaterial weiter aktiv bleiben (Abb. 10).

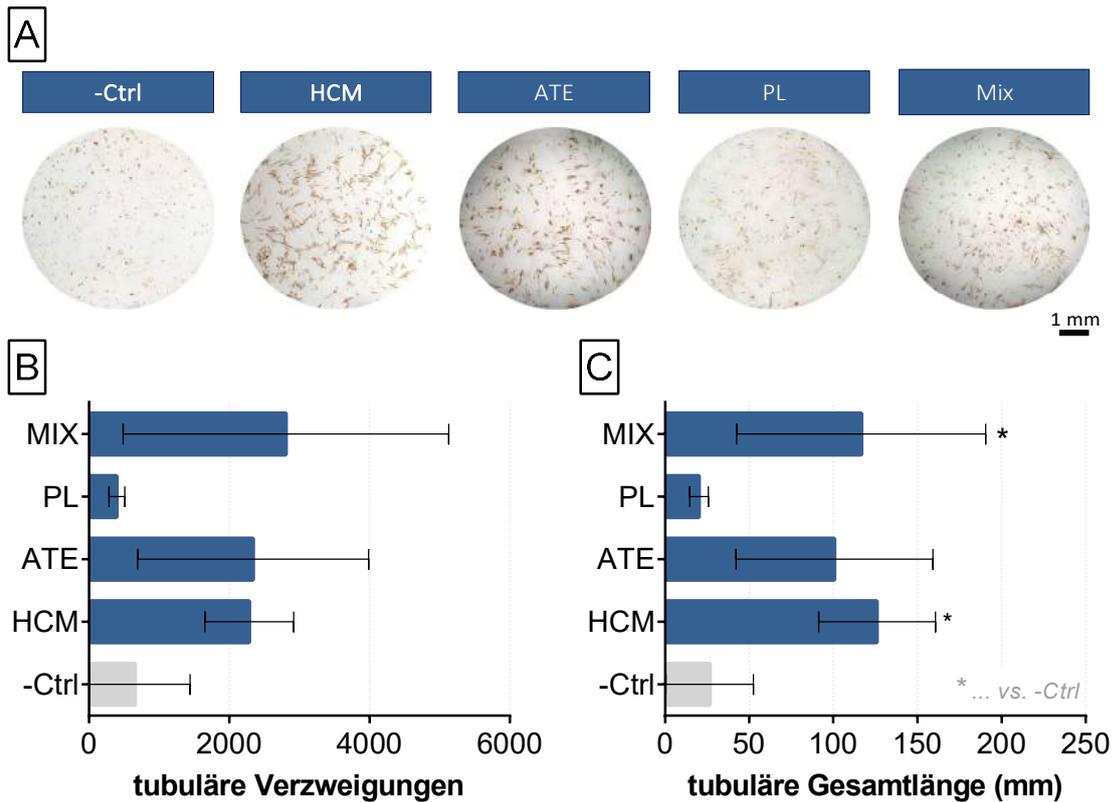


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kokulturen aus hMSCs und HUVEC. CD31-Färbung mit Darstellung tubulärer Strukturen (A), Anzahl tubulärer Verzweigungen (B; MW \pm Stabw) und tubulärer Gesamtlänge (C, MW \pm Stabw) nach Zugabe von Zellkulturüberständen der funktionalisierten Scaffolds; * $p < 0,05$

Im dritten Schritt wurden MCH-Scaffolds, welche zuvor mit den WFG funktionalisiert wurden, mit hMSCs und HUVEC besiedelt und die Bildung tubulärer Strukturen innerhalb des Scaffolds analysiert (Abb. 11). Es bestätigte sich der Trend der meisten tubulären Strukturen bei den mit ATE oder HCM funktionalisierten Scaffolds.

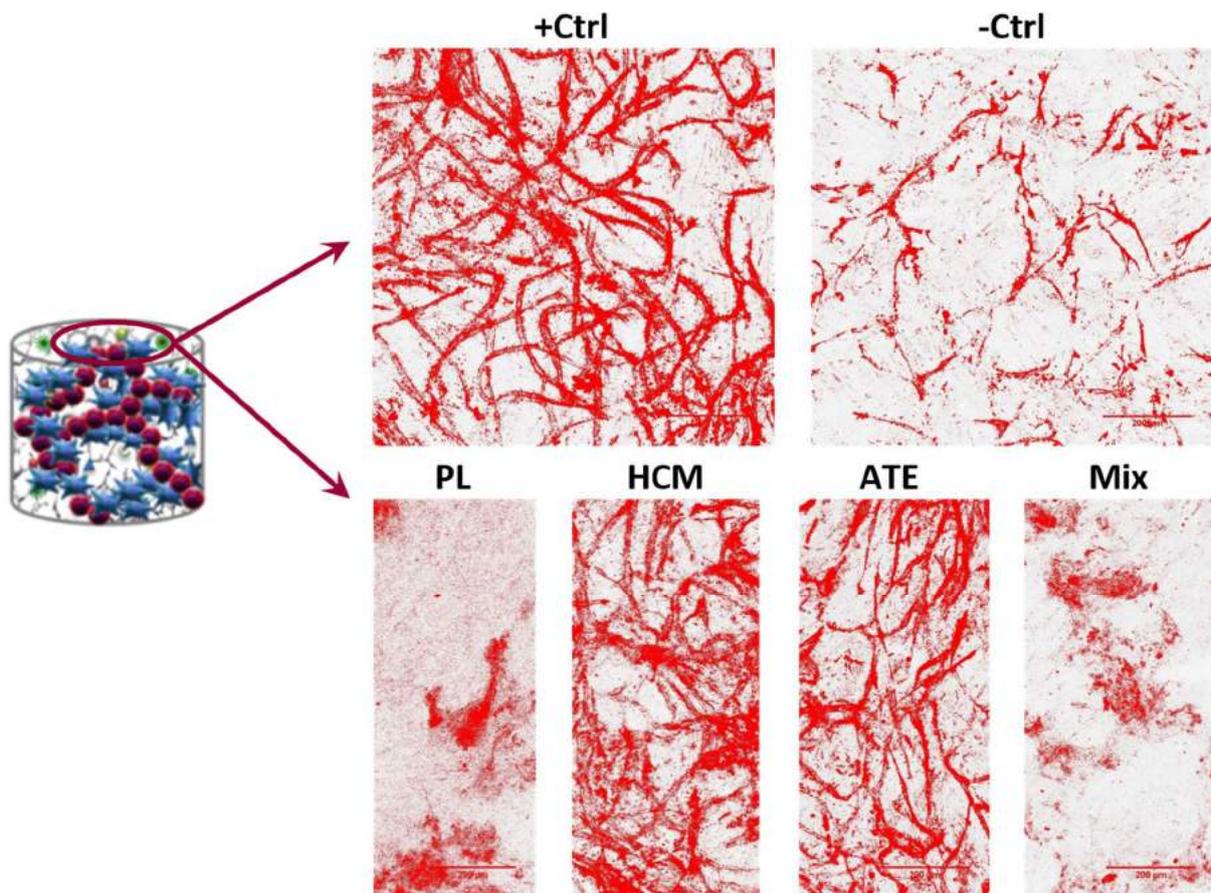


Abb. 11: Darstellung tubulärer Strukturen gebildet von Kokulturen aus hMSCs und HUVEC auf WFG-funktionalisierten Scaffolds (CD31-Färbung, Laserscanning-Mikroskopie)

Zur weiteren Analyse des angiogenen Differenzierungspotentials wurde Stickstoffmonoxid sowohl nach systemischer Zugabe der WFG, als auch nach Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Scaffolds bestimmt. Stickstoffmonoxid spielt bei vaskulären Remodellingprozessen der Angiogenese eine Rolle. In unseren Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Erhöhung nach systemischer Zugabe von PL. Bei Analyse der Zellkulturüberstände der funktionalisierten Scaffolds ergaben sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12).

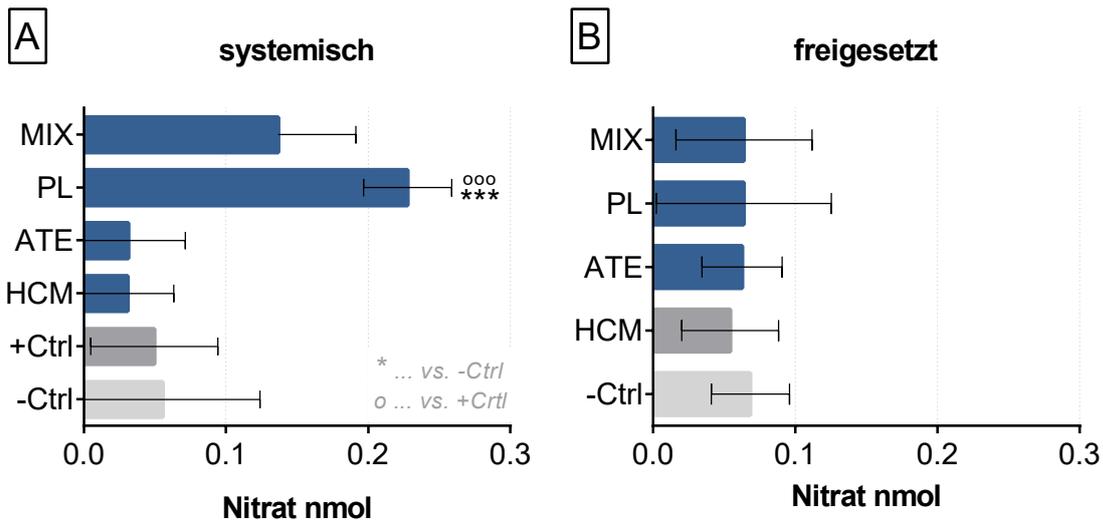


Abb. 12: Nitratgehalt ($MW \pm Stabw$) nach systemischer Zugabe der WFG zur hMSC-HUVEC-Kokultur (A) sowie nach Zugabe von Zellkulturüberständen funktionalisierter Scaffolds (B); ***^{ooo} $p < 0,001$

Die biochemisch gewonnenen Messwerte wurden durch Genexpressionsanalysen osteogener und angiogener Marker verifiziert. Nach Kultivierung der mit Wachstumsfaktoren funktionalisierten und mit hMSCs besiedelten Scaffolds im Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen über 21 Tage zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Transkriptionsfaktors RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) für PL und Mix. Weiterhin zeigte sich nach Mix-Zugabe der Trend einer erhöhten Genexpression von IBSP (*bone sialoprotein 2*), welches für ein Strukturprotein der Knochenmatrix codiert. Hinsichtlich der Genexpression der alkalischen Phosphatase (ALPL) ergaben sich, wie bereits in der biochemischen Messung, keine signifikanten Unterschiede.

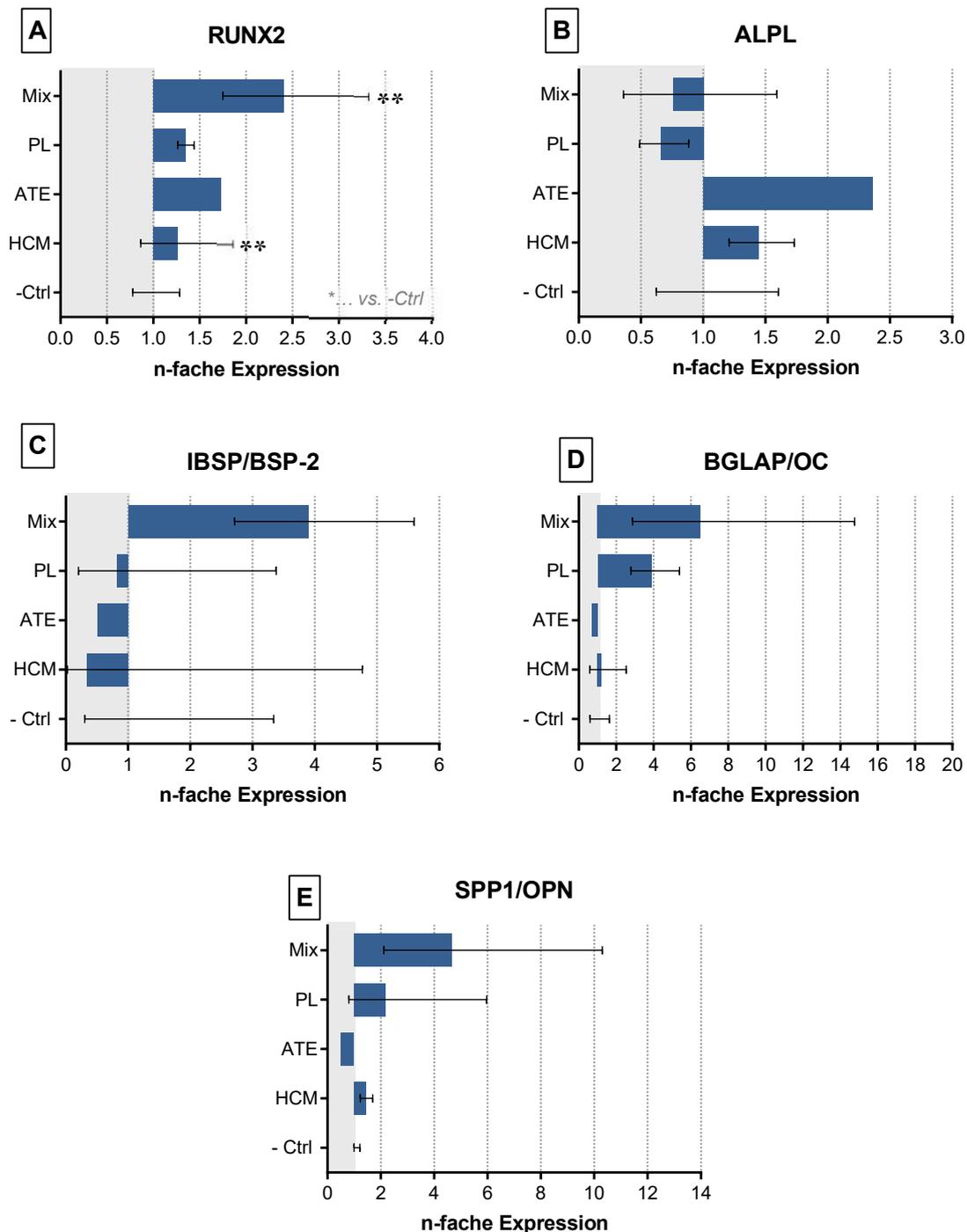


Abb. 13: Genexpression der osteogenen Marker RUNX2, ALPL, IBSP, BGLAP (Osteocalcin) und SPP1 (Osteopontin) in hMSCs, die mit osteogenen Supplementen im Zellkulturmedium für 21 Tage auf WFG-funktionalisierten Scaffolds kultiviert wurden (MW \pm oberes und unteres Limit, n = 2, ** p < 0,01)

Hinsichtlich der angiogenen Differenzierung bestand in der Genexpressionsanalyse sowohl nach systemischer als auch nach Zugabe der Zellkulturüberstände in die hMSC-HUVEC-Kokultur für HCM eine signifikante Erhöhung von KDR/VEGFR2 (kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2). Wie sich

bereits auf Proteinebene gezeigt hatte (Abb. 10), war nach Zugabe der Zellkulturüberstände in die Kokultur auch CD31 signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht (Abb. 13). Für ATE zeigte sich in der Genexpressionsanalyse kein signifikanter Unterschied.

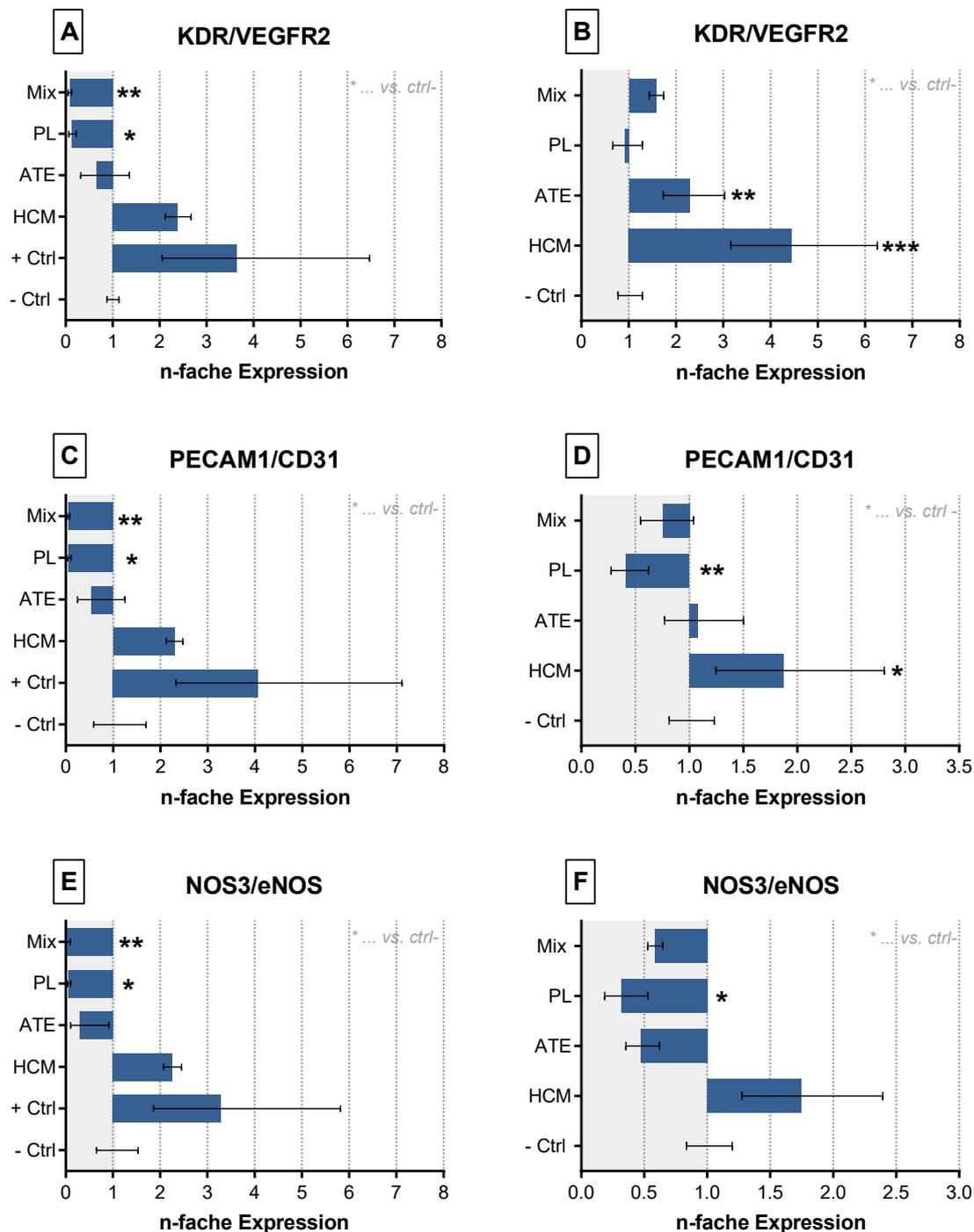


Abb.14: Genexpression der angiogenen Marker KDR/VEGFR2, PECAM1/CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule/cluster of differentiation 31) und NOS3 (nitric oxide synthase 3) nach systemischer Zugabe der WFG zur hMSC-HUVEC-Kokultur (A, C, E) sowie nach Zugabe von Zellkulturüberständen funktionalisierter Scaffolds zur hMSC-HUVEC-Kokultur (B, D, F); MW \pm oberes und unteres Limit, n = 2, * p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001

- **Ziel: Bestimmung der optimalen WFG-Dosis für die Zellmigration, Osteogenese und Vaskularisierung**

Mittels Gefriertrocknung war eine Aufkonzentrierung der Wachstumsfaktorgemische (PL: 10-fach, HCM: 20-fach, ATE: 40-fach) bis zur Löslichkeitsgrenze möglich. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere PL und Mix ein gutes chemotaktisches Potential haben, welches auch nach Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Scaffolds erhalten bleibt. Nach systemischer Zugabe der WFG in das Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen wurde für HCM und ATE eine signifikant geringere Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Demgegenüber steht ein signifikanter Anstieg der spezifischen ALP-Aktivität für diese beiden Wachstumsfaktorgemische unter osteogenen Kultivierungsbedingungen. Die Genexpressionsdaten der osteogenen Markergene RUNX2, ALPL, IBSP, BGLAP und SPP1 zeigten keine signifikante Änderung der Genexpression bei Kultivierung der funktionalisierten Scaffolds mit osteogenen Supplementen im Zellkulturmedium.

Weiterhin zeigte sich bei Zugabe von HCM und ATE zur hMSC-HUVEC-Kokultur eine signifikant höhere Anzahl tubulärer Strukturen als ein Hinweis auf ein hohes angiogenes Differenzierungspotential. In der Genexpressionsanalyse der angiogenen Markergene KDR/VEGFR2, PECAM1/CD31 und NOS3 zeigte sich nach systemischer Zugabe von PL oder Mix zur Kokultur eine signifikante Reduktion der Genexpression während nach Zugabe von HCM die Expression von KDR/VEGFR2 und PECAM1/CD31 signifikant anstieg. Dies wird durch die Ergebnisse aus der Auszählung der tubulären Strukturen und Verzweigungen nach Lichtmikroskopie bestätigt.

AP4 - *In vivo* Testung der funktionalisierten Scaffolds

Abschließend wurde das osteogene und angiogene Regenerationspotential der WFG mittels funktionalisierter MCH-Scaffolds in einem kritischen Femurdefekt der Nacktmaus getestet (AZ: DD24.1-5131/394/88). Hierfür wurde ein 2 mm großer Femurdefekt im Bereich des rechten Femurs mithilfe eines *Fixateurs externe* stabilisiert und nachfolgend ein funktionalisierter Scaffold eingebracht (Abb. 15). Als Negativkontrolle diente ein MCH-Scaffold ohne Wachstumsfaktorfunktionalisierung (Ctrl). Insgesamt wurden 50 Tiere (10 Tiere/Gruppe) operiert. Ein Tier verstarb während des 6-wöchigen postoperativen Observationszeitraumes. Die Knochendefektheilung wurde mittels

Mikrocomputertomographie (μ CT, Abb. 16) und histologisch (Abb. 17 und Abb. 18) analysiert.

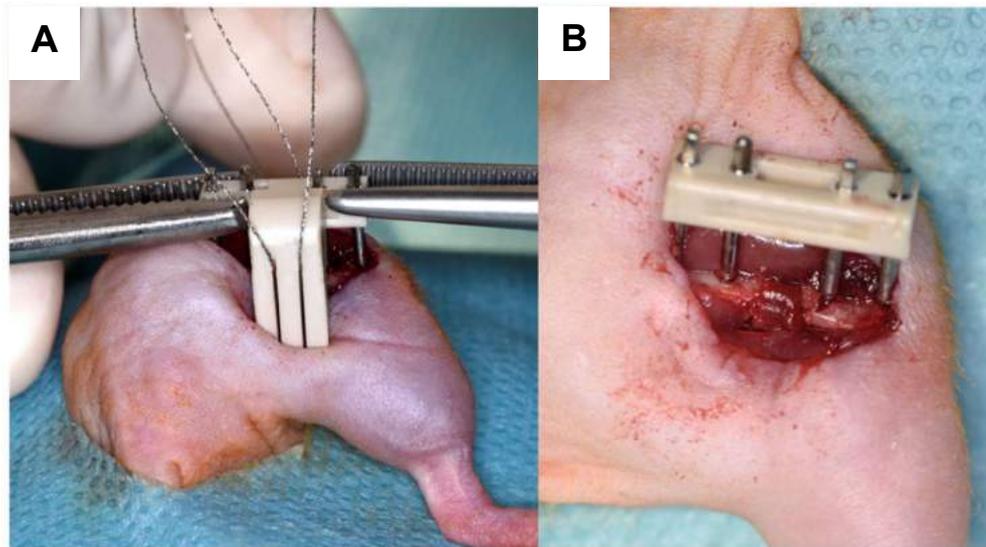


Abb. 15: Intraoperative Darstellung des kritischen Femurdefektes an der Nacktmaus; (A) Femurosteotomie mithilfe einer 2 mm breiten Sägelehre nach vorherigem Anbringen des Fixateurs externe und (B) Femurschaftdefekt mit einliegendem mineralisiertem Kollagenscaffold.

Anhand der μ CT-Untersuchungen zeigte sich signifikant mehr neugebildetes Knochenvolumen bei Funktionalisierung der Scaffolds mit HCM (Abb. 16A). Hinsichtlich der Dichte des neugebildeten Knochens ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16B).

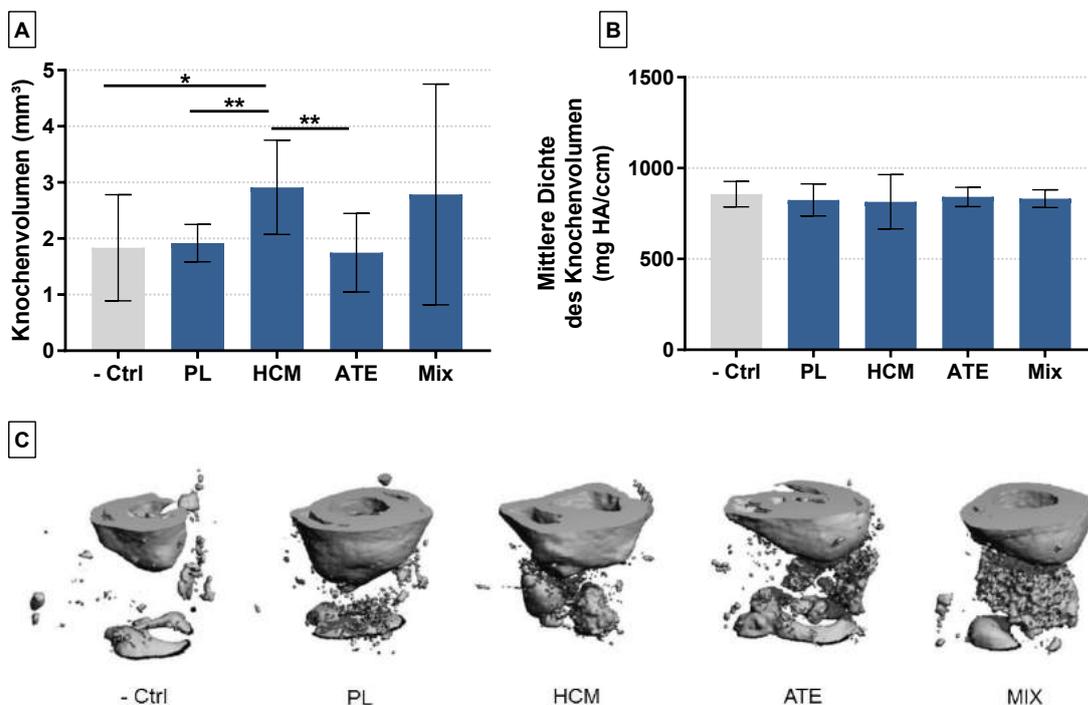


Abb. 16: μ CT-Analyse der explantierten Femora nach 6-wöchiger Observationszeit. (A) Bestimmung des neugebildeten Knochenvolumens [mm³] und (B) der mittleren Knochenichte des neugebildeten Knochenvolumens [mg HA/ccm] sowie (C) repräsentative 3D-Rekonstruktionen des Femurdefektbereiches; MW \pm Stabw, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Histologisch wurde der Grad der Defektheilung anhand des Scores nach Huo *et al.* (Huo *et al.*, 1991; DOI: 10.1002/jor.1100090310) quantifiziert (Abb. 17B). Dabei zeigte sich für die PL-, ATE- und Mix-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant höherer Score (bessere Defektheilung). Die Anzahl der Gefäße im Defektbereich unterschied sich nach 6 Wochen nicht signifikant (Abb. 17A).

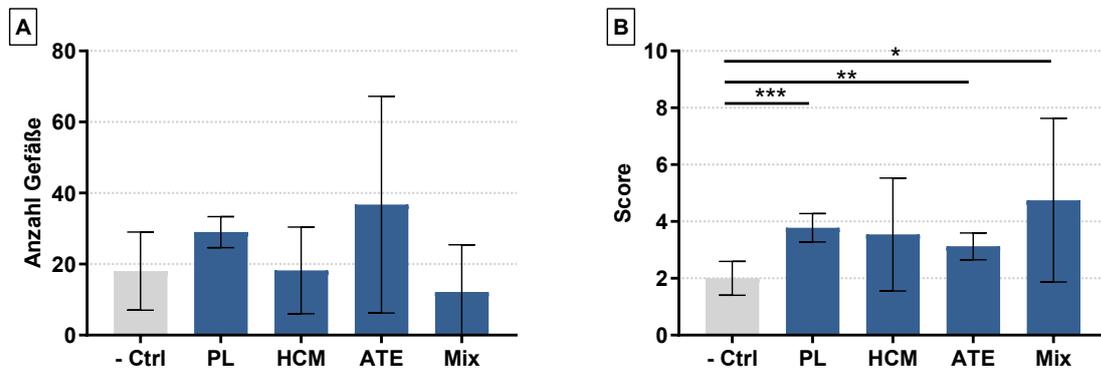


Abb. 17: Histologische Beurteilung der Knochenheilung. (A) Grad der Defektheilung modifiziert nach Huo *et al.* nach Masson-Goldner Färbung und (B) Anzahl der Gefäße im Defektbereich; MW ± Stabw, * $p < 0,05$.

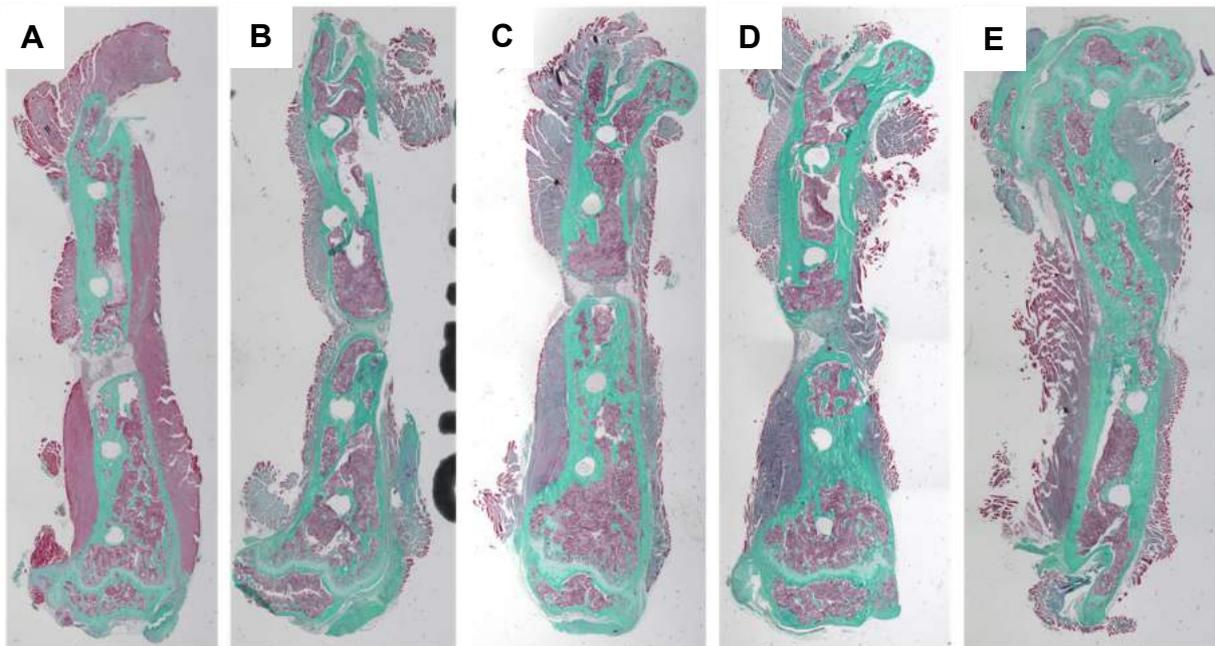


Abb. 18: Masson-Goldner Färbung der explantierten Mausfemora im Längsschnitt nach 6-wöchiger Observationszeit, (A) Kontrolle, (B) PL, (C) HCM, (D) ATE und (E) Mix.

➤ **Ziel: Knochendefektheilung im Mausmodell**

Die verschiedenen WFG konnten die Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrolle (Scaffold ohne WFG-Funktionalisierung) verbessern. Die Knochendichte war dabei in allen Studiengruppen vergleichbar. Damit stellen die einfach und autolog herstellbaren Wachstumsfaktorgemische eine potenzielle Ergänzung oder Alternative zu den bisher verwendeten rekombinanten Wachstumsfaktoren für die Therapie kritischer Knochendefekte dar. Diese Ergebnisse müssen in weiteren Studien noch vertiefend evaluiert werden.

Zusammenfassung

Arbeitspaket	Ziel	Ergebnis
AP 1 Herstellung und Charakterisierung nativer WFG	homogene Charge von nativen WFG	homogene, charakterisierte WFG ✓
AP 2 Funktionalisierung von Scaffolds mit WFG	Scaffoldfunktionalisierung und kontrollierte Freisetzung	Freisetzung aktiver Wachstumsfaktoren aus funktionalisierten Scaffolds ✓
AP 3 <i>In vitro</i> Testung der funktionalisierten Scaffolds	Bestimmung der optimalen WFG-Dosis für die Zellmigration, Osteogenese und Vaskularisierung	WFG-Dosierungen, welche die Zellmigration, Osteogenese und Vaskularisierung fördern ✓
AP 4 <i>In vivo</i> Testung der funktionalisierten Scaffolds	Knochendefektheilung im Mausmodell	Trend zur verbesserten Knochendefektheilung <i>in vivo</i> bei Kombination der WFG ✓

Abkürzungsverzeichnis

ALPL	alkalischen Phosphatase liver/bone/kidney
AP	Arbeitspaket
ATE	adipose tissue extract, Fettgewebsextrakt
BGLAP	bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein, Osteocalcin
BM-MSCs	bone marrow mesenchymal stromal cells
Crtl	Kontrolle
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
bFGF	basic fibroblast growth factor
HCM	hypoxiekonditioniertes Medium
hMSC	humane mesenchymale Stromazellen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IBSP	bone sialoprotein
IGFBP-1	insulin-like-growth-factor-binding-protein-1
IL	Interleukin
KDR	kinase insert domain receptor
NOS3	nitric oxide synthase 3
OS	osteogene Supplemente
PDGF-BB	platelet-derived growth factor BB
PECAM1/CD31	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SPP1	secreted phosphoprotein 1
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases-1
TVA	Tierversuchsantrag
VEGF	vascular endothelial growth factor
WFG	Wachstumsfaktorgemische