

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Charakterisierung eines neuartigen Knochenersatzmaterials auf
PLGA-Basis hinsichtlich Immunreaktivität, Zytokompatibilität und
physikalischen Eigenschaften**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Muriel Fabiola Ondreka

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2022

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. Ingo Marzi

**Charakterisierung eines neuartigen Knochenersatzmaterials
auf PLGA-Basis hinsichtlich Immunreaktivität,
Zytokompatibilität und physikalischen Eigenschaften**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Muriel Fabiola Ondreka

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	PD Dr. Maren Janko
Korreferent:	Prof. Dr. Robert Sader
Tag der mündlichen Prüfung:	08.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	- 3 -
Abkürzungsverzeichnis	- 8 -
1. Zusammenfassung	- 11 -
2. Abstract.....	- 13 -
3. Einleitung.....	- 15 -
3.1. Entwicklung von Knochenersatzmaterialien	- 15 -
3.2. PLGA (Polylactid-co-Glycolid)	- 16 -
3.3. Immunreaktion auf ein Implantat	- 18 -
3.4. Knochenheilung.....	- 21 -
3.4.1. Direkte Knochenheilung	- 21 -
3.4.2. Indirekte Knochenheilung.....	- 22 -
3.5. Critical size bone defect	- 24 -
3.6. Masquelet-Technik (induzierte Membrantechnik).....	- 25 -
3.7. Stammzellen.....	- 26 -
3.7.1. Stromale Knochenmarkszellen.....	- 27 -
3.7.2. Mononukleäre Knochenmarkszellen	- 29 -
3.7.3. Aufkonzentriertes Knochenmarksaspirat.....	- 29 -
3.7.4. Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	- 30 -
3.7.4.1. Induktion der osteogenen Differenzierung durch Dexamethason	- 31 -
3.8. Vollblutstimulationstest	- 32 -
3.9. Zentrale Fragestellung.....	- 33 -
4. Material und Methoden	- 35 -
4.1. Apparaturen und Materialien	- 35 -
4.1.1. Verbrauchsmaterialien	- 35 -
4.1.2. Geräte	- 37 -

4.1.3.	Software	- 39 -
4.1.4.	Zellen	- 39 -
4.1.5.	Scaffolds	- 40 -
4.1.6.	Nährmedien.....	- 40 -
4.1.7.	Puffer und Lösungen	- 40 -
4.1.8.	Analyse-KITs	- 42 -
4.1.9.	ELISA	- 42 -
4.1.10.	RT-qPCR	- 43 -
4.2.	Methoden	- 44 -
4.2.1.	Votum der Ethikkommission	- 44 -
4.2.2.	Steriles Arbeiten	- 44 -
4.2.3.	PLGA-Scaffolds.....	- 44 -
4.2.3.1.	Herstellung der PLGA-Scaffolds	- 44 -
4.2.3.2.	Ermittlung des optimalen Beladungsvolumens	- 45 -
4.2.3.3.	Maximale Beladungskapazität der Scaffoldoberfläche.....	- 45 -
4.2.3.4.	Fetales Kälberserum (FCS)-Vorbehandlung von PLGA-Scaffolds-	46 -
4.2.3.5.	Fluoreszenzmikroskopie	- 47 -
4.2.3.6.	Darstellung der Degradation eines PLGA-Scaffolds in wässrigem Milieu mittels Rasterelektronenmikroskopie	- 48 -
4.2.4.	Physikalische und funktionelle Eigenschaften der PLGA-Membran	- 48 -
4.2.4.1.	Biomechanik	- 48 -
4.2.4.2.	Diffusionskapazität für Chemokine.....	- 49 -
4.2.5.	Zellkulturen und Zellsuspension	- 50 -
4.2.5.1.	Stromale Knochenmarkszellen	- 50 -
4.2.5.2.	Mononukleäre Knochenmarkszellen	- 51 -
4.2.5.3.	Aufkonzentriertes Knochenmarksaspirat.....	- 51 -

4.2.5.4.	Methoden der Zellkultivierung	- 52 -
4.2.5.5.	Kryokonservierung und Auftauen.....	- 53 -
4.2.5.6.	Herstellung eines osteogenen Differenzierungsmediums	- 53 -
4.2.6.	Zellfunktion auf der Scaffoldoberfläche	- 53 -
4.2.6.1.	Langzeitüberleben, Zellaktivität und osteogene Differenzierung von MSC und BMC auf PLGA.....	- 53 -
4.2.6.2.	MTT-Test	- 54 -
4.2.7.	Vollblutstimulationstest zur Analyse der immunologischen Signatur-	55 -
4.2.8.	Nachweis der osteogenen Differenzierung.....	- 57 -
4.2.8.1.	Molekularbiologische Untersuchung der Osteogenese	- 57 -
4.2.8.1.1.	RNA-Isolierung	- 58 -
4.2.8.1.2.	cDNA-Synthese	- 59 -
4.2.8.1.3.	Polymerisation der cDNA.....	- 59 -
4.2.8.2.	Direkter Nachweis osteogener Matrix und Enzyme	- 60 -
4.2.8.2.1.	Alizarin-Rot-Färbung (ARF).....	- 60 -
4.2.8.2.2.	Alkalische Posphatase-Aktivitäts-Test.....	- 60 -
4.2.9.	Statistik.....	- 61 -
5.	Ergebnisse.....	- 62 -
5.1.	Physikalische Eigenschaften der PLGA-Membran	- 62 -
5.1.1.	Biomechanische Eigenschaften im Bruchtest	- 62 -
5.1.2.	Diffusionskapazität der PLGA-Membran für Chemokine.....	- 62 -
5.1.3.	Resorption des Scaffolds in wässriger Lösung.....	- 63 -
5.2.	Maximale Beladungskapazität der PLGA-Scaffolds	- 64 -
5.2.1.	Beladungskapazität mit MSC	- 64 -
5.2.2.	Beladungskapazität mit BMC	- 65 -
5.2.3.	Metabolische Aktivität von BMAC auf dem PLGA-Scaffold und dem Kulturgefäßboden.....	- 65 -

5.3. Einfluss der FCS-Vorbehandlung auf Zelladhärenz und metabolische Aktivität auf PLGA-Scaffolds	- 66 -
5.3.1. MSC-Zellzahl und -morphologie im Zeitverlauf	- 66 -
5.3.2. Metabolische Aktivität CFSE-gefärbter MSC auf dem Scaffold	- 67 -
5.4. Zellüberleben auf der Scaffoldoberfläche nach zwei Wochen	- 67 -
5.4.1. Metabolische Aktivität von MSC auf dem Scaffold und am Kulturgefäßboden	- 67 -
5.4.2. Metabolische Aktivität von BMC auf dem Scaffold	- 68 -
5.4.3. Metabolische Aktivität von BMC auf dem Kulturgefäßboden	- 69 -
5.5. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf das inflammatorische Potential von MSC und BMC	- 70 -
5.5.1. IL-6- und IL-8-Genexpression	- 70 -
5.5.2. Immunologische Signatur im Vollblutstimulationstest	- 70 -
5.6. Osteogene Differenzierung auf PLGA-Scaffolds	- 74 -
5.6.1. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf die osteogene Aktivität von MSC, Bestimmung osteogener Markergene	- 74 -
5.6.2. Alizarin-Rot-Färbung von Calciumphosphatablagerungen	- 75 -
5.6.3. ALP-Aktivität nach 7 und 14 Tagen	- 76 -
5.7. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf die angiogene Aktivität von MSC und BMC, Bestimmung der VEGF-Genexpression	- 76 -
6. Diskussion	- 78 -
6.1. Physikalische und funktionelle Eigenschaften der PLGA-Membran ...	- 78 -
6.1.1. Methode zur Beladung der Scaffolds mit Zellen	- 78 -
6.1.2. Adhäsionsverhalten von Zellen an der Oberfläche	- 79 -
6.1.3. Diffusionskapazität für Wundheilungsmediatoren	- 81 -
6.1.4. Degradationsverhalten in wässrigem Milieu	- 82 -
6.1.5. Stabilität der PLGA-Membran	- 83 -

6.2. Biokompatibilität der PLGA-Membran	- 83 -
6.2.1. Zellüberleben auf dem Scaffold.....	- 83 -
6.2.2. VBSA zur immunologischen Charakterisierung von Biomaterial	- 84 -
6.2.3. Immunologische Signatur von PLGA im Vergleich.....	- 85 -
6.3. Osteogene Differenzierung auf der Scaffoldoberfläche	- 90 -
6.4. PLGA-Membran zur Abdeckung großer Knochendefekte	- 90 -
6.5. Geplante Analysen, die nicht durchführbar waren	- 91 -
7. Schlussfolgerung	- 92 -
Abbildungsverzeichnis.....	- 94 -
Tabellenverzeichnis.....	- 96 -
Schriftliche Erklärung	- 112 -
Danksagung	- 113 -

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ARF	Alizarin-Rot-Färbung
BMAC	aufkonzentriertes Knochenmark
BMC	Mononukleäre Knochenmarkszellen
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
BTE	<i>bone tissue engineering</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
COL1A1	Kollagen-Typ 1 α 1
CS	Herafill
DLX	<i>drosophila distal-less</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DRK	Deutsches rotes Kreuz
ESC	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKRZ	Fremdkörperriesenzelle
GA	Glykolsäure
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor

Gro-α (CXCL1)	<i>growth regulated alpha protein</i>
GSF	Granulozyten-stimulierender Faktor
HA	Hydroxyapatit
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IFN	Interferon
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
KM	Kontrollmedium
LA	Milchsäure
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
MCP-1 (CCL2)	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MPO	Myeloperoxidase
MSC	Stromale Knochenmarkszelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
OCN (BGLAP)	Osteocalcin
OD	Osteogenes Differenzierungsmedium
OPC	Osteoprogenitorzelle
OPN	Osteopontin
OSX	Osterix
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PGE₂	Prostaglandin E2
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
REM	Rasterelektronenmikroskop

RIA	Reamer-Irrigator-Aspirator
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RUNX	<i>runt-related transcription factor</i>
SD	Standardabweichung
SDF-1α (CXCL12)	<i>stromal cell-derived factor</i>
SPARC	Osteonectin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Umdrehungen
VBSA	Vollblutstimulationstest
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Zusammenfassung

Einleitung:

Knochenersatzmaterialien gewinnen in der regenerativen Medizin immer weiter an Bedeutung. Polylactid-co-Glycolid (PLGA) wird als etabliertes synthetisches Biomaterial bereits vielseitig in der medizinischen Versorgung eingesetzt, häufig in Form von Mikropartikeln oder Platzhaltern beladen mit Antibiotika oder immunaktiven Zellen zur topischen Antibiotikatherapie und Freisetzung von regenerativen Zellen in einer Defektzone. Ziel dieser Studie war die Charakterisierung einer neuen Darbietungsform von PLGA auf ihre physikalischen Eigenschaften, ihre immunologische Signatur und Zytokompatibilität. Dieses Material soll den Einsatz von PLGA in Form einer porösen Membran zur Abdeckung von großen Knochendefekten ermöglichen.

Material und Methoden:

Das PLGA-Gemisch wurde in Form von scheibenförmigen Prüfkörpern und Membranen aufbereitet. Es wurde eine biomechanische Analyse des Materials auf Bruchfestigkeit, Biegesteifigkeit und seine Diffusionskapazität durchgeführt. Die Scaffolds wurden mit Knochenmarkstammzellen (BMC und MSC) besiedelt. Mittels MTT-Tests wurde die Lebensdauer und die Viabilität der Zellen auf der Prüfkörperoberfläche ermittelt. Die Zellen wurden durch PCR-Analyse auf osteogene Differenzierung untersucht. Zur Erfassung der immunologischen Signatur erfolgte ein Vollblutstimulationstest mit anschließender umfassender Auswertung des Sekretoms mittels Proteom Profiler-Analyse.

Ergebnisse:

Das Material wies eine geringe mechanische Stabilität auf. Die PLGA-Membran zeigte sich für Proteine bis 11,4 kDa durchlässig. Es konnte eine stetige Degeneration des Materials in wässrigem Milieu festgestellt werden. In der Sekretom-Analyse des Vollblutstimulationstests zeigte sich eine für die PLGA-Membran charakteristische immunologische Signatur mit Aktivierung von proinflammatorischen Faktoren. Das Zellüberleben auf der Prüfkörperoberfläche nahm während des Erfassungszeitraums konstant ab, während die Zellviabilität

auf dem Wellboden stieg. Es konnte keine signifikante osteogene Differenzierung der Stammzellen festgestellt werden.

Diskussion:

Die schnelle Degeneration des Materials in wässriger Umgebung beeinflusste sowohl die Stabilität der Membran als auch die Zelladhäsion auf den Scaffolds negativ. Das Material wirkte dabei weder toxisch auf die Zellen, noch induzierte es eine osteogene Differenzierung. Die Analyse der Immunsignatur ließ eine frühe und starke Entzündungsreaktion nach Implantation des Materials vermuten.

Schlussfolgerung und Ausblick:

Während das vorgelegte PLGA-Gemisch nicht die mechanischen Eigenschaften eines gewichttragenden Knochenersatzstoffes aufweist, so lässt es sich dennoch erfolgreich mit Stammzellen beladen, die nach Implantation gezielt in der Defektzone freigesetzt werden können. Die Anregung einer starken Immunantwort kann gerade in der frühen Heilungsphase hilfreich sein. Weitere in vivo-Untersuchungen am Tiermodell sind notwendig zur Optimierung möglicher therapeutischer Anwendungen.

2. Abstract

Introduction:

Bone graft substitutes are becoming increasingly important in regenerative medicine. Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) is already widely used as an established synthetic biomaterial in medical care, often in the form of microparticles or placeholders loaded with antibiotics or immunoactive cells for topical antibiotic therapy and release of regenerative cells in a defect zone. The aim of this study was to characterise a new form of PLGA for its physical properties, immunological signature and cytocompatibility. This material should allow the use of PLGA in the form of a porous membrane to cover large bone defects.

Material and methods:

The PLGA mixture was prepared in the form of scaffolds and membranes. A biomechanical analysis of the material for fracture strength, flexural rigidity and its diffusion capacity was performed. The scaffolds were seeded with bone marrow stem cells (BMC and MSC). MTT assay was used to determine the lifespan and viability of the cells on the scaffold surface. The cells were examined for osteogenic differentiation by PCR analysis. A whole blood stimulation assay followed by comprehensive evaluation of the secretome using a Proteome Profiler assay was performed to record the immunological signature.

Results:

The material showed low mechanical stability. The PLGA membrane was permeable for proteins up to 11.4 kDa. A steady degeneration of the material in an aqueous environment was observed. Secretome analysis of the whole blood stimulation assay revealed an immunological signature characteristic of the PLGA membrane with activation of proinflammatory factors. Cell survival on the scaffold surface decreased consistently during the acquisition period, while cell viability on the well bottom increased. No significant osteogenic differentiation of stem cells was detected.

Discussion:

The rapid degeneration of the material in an aqueous environment negatively affected both membrane stability and cell adhesion to the scaffolds. The material neither had a toxic effect on the cells nor did it induce osteogenic differentiation. Analysis of the immune signature suggested an early and strong inflammatory reaction after implantation of the material.

Conclusion and outlook:

While the PLGA mixture presented does not have the mechanical properties of a weight-bearing bone substitute, it can still be successfully loaded with stem cells that can be targeted for release in the defect zone after implantation. Stimulating a strong immune response can be particularly helpful in the early healing phase. Further in vivo studies on animal models are necessary to optimise possible therapeutic applications.

3. Einleitung

3.1. Entwicklung von Knochenersatzmaterialien

Tissue-Engineering-Techniken und synthetische Biomaterialien stehen schon seit Beginn des letzten Jahrhunderts im Fokus der Forschung² und sind mittlerweile in der Medizin etabliert und vielfältig eingesetzt.³ Neben dem Transport und der lokalen Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder Immunzellen am Ort einer Gewebeschädigung³ werden sie auch in der chirurgischen Versorgung von Frakturen und großen Knochendefekten verwendet.^{4,5} Hier können synthetische Knochenersatzmaterialien als stabilisierende Konstruktionen sowie als Leitstrukturen für neugebildeten Knochen eingebaut werden.⁶ Dabei stellen die Entwicklung und der vielfältige Einsatz neuer Biomaterialien eine große Herausforderung dar.^{7,8}

Je nach Einsatzbereich sind die Anforderungen an Biomaterialien unterschiedlich.⁶ Um ein nachhaltiges und stabiles Therapieergebnis zu erzielen, sind einige Schlüsselemente unerlässlich: osteogene Progenitorzellen, eine osteokonduktive Matrix, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und eine ausreichende Blutversorgung.^{4,6} Daneben ist eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem zu ersetzenden Gewebe erforderlich.⁹ Im Falle von Knochengewebe ist dabei besonders auf die Oberflächenrauigkeit, Porosität und Porengröße, Interkonnektivität, Zersetzung, mechanischen Eigenschaften und Biokompatibilität zu achten.¹⁰

Die Biokompatibilität macht eine Aussage über die Interaktion eines implantierten Materials mit dem umgebenden Gewebe und ist essentiell für den Erfolg und Erhalt des Implantats.¹¹ Sie definiert sich über die Intensität der initialen Immunreaktion, welche auf die Implantation folgt. Eine geringe Biokompatibilität ist assoziiert mit einer starken Fremdkörperreaktion, Materialschwäche und Therapieversagen.¹¹

Verschiedene Implantateigenschaften können die Biokompatibilität beeinflussen:⁶

- Spezifisches Implantationstrauma
- Chemische Zusammensetzung des Materials

- Abbau und Degeneration des Materials
- Oberflächenbeschaffenheit
- Porosität/ Durchlässigkeit

Über die Modifikation dieser Eigenschaften kann durch eine Optimierung der Zell- und Proteinadhäsion auf dem Scaffold eine Regulation der individuellen Wirtsreaktion erreicht werden.^{3,10,12} Es liegen allerdings nur wenige allgemein gültige Aussagen über den Einfluss bestimmter Implantateigenschaften auf die Immunantwort vor.¹³ Ein Problem hierbei ist die geringe Vergleichbarkeit bisher existierender Materialstudien in diesem Gebiet. Vorangegangene Studien wurden häufig in vivo an Tiermodellen durchgeführt. Es unterscheiden sich sowohl die Studienbedingungen als auch die gewählten Untersuchungszeiträume. Meist wird vor allem die Spätreaktion betrachtet, während die frühe Reaktion in den ersten 48h kaum in die Analyse eingeht.¹³ Zu diesem Zweck durchgeführte Zellstudien geben zwar einen Teil der Immunantwort wieder, haben aber eine limitierte Aussagekraft über die komplexe Wirtsreaktion. Hier besteht Bedarf an weiteren Studien, sowie an einem vereinheitlichten Teststandard zur Materialcharakterisierung.¹³

3.2. PLGA (Polylactid-co-Glycolid)

Ein mögliches Knochenersatzmaterial stellt PLGA (Polylactid-co-Glycolid) dar. PLGA ist ein Copolymer bestehend aus Milchsäure und Glykolsäure (Abbildung 1), die unter absolutem Vakuum und bei hohen Temperaturen zufällig copolymerisiert werden.¹⁴ Als synthetisches Polymer ähnelt es natürlichen Polymeren wie Polysaccharid, hat jedoch diesen gegenüber beim Einsatz im Bereich des *Bone Tissue Engineering* (BTE) einige Vorteile.

Synthetische Polymere wie PLGA zeichnen kontrollierbare und konsistente Abbaueigenschaften, sowie zuverlässig reproduzierbare mechanische und physikalische Merkmale wie Zugfestigkeit, Elastizität und Abbaugeschwindigkeit aus.^{12,15} Gleichzeitig sind mögliche Risiken wie Toxizität, Immunogenität und infektionsfördernde Bedingungen bei rein synthetischen Polymeren mit monomeren Untereinheiten und einer einfachen Struktur vergleichsweise gering.^{6,16}

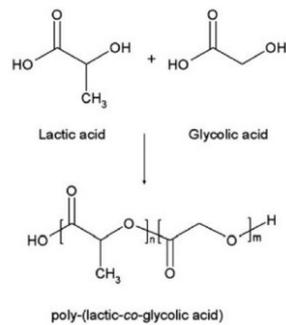


Abbildung 1: Der Polyester PLGA (Poly-(lactic-co-glycolic acid) ist aus den Monomeren Milchsäure und Glykolsäure.¹

PLGA wird in verschiedener Weise therapeutisch eingesetzt, unter anderem in Form von porösen Scaffolds als Distributor von lokal zu applizierenden Medikamenten oder als Alternative zu autologen, allogenen oder xenogenen Knochentransplantaten zum Knochenersatz und zur Induktion der Osteogenese.¹⁴ PLGA besitzt die hierfür erforderlichen Eigenschaften Biokompatibilität, Bioaktivität, Osteokonduktivität und Osteoinduktivität, ist biologisch abbaubar und in jede gewünschte Form zu bringen.^{12,14} Der biologische Abbau erfolgt hauptsächlich über die hydrolytische Zersetzung des Materials mit progredientem Verlust der Integrität und anschließendem Zerfall des Polymers in seine Grundbestandteile.^{14,17}

Abhängig vom Einsatzbereich des PLGA ist die Anpassung der Abbaugeschwindigkeit erforderlich. Diese lässt sich über verschiedene Parameter beeinflussen. So führt ein Molekulargewicht von mehr als 100kDa zu einer längeren Abbauezeit.¹⁴ Wird das Mischungsverhältnis von Milchsäure (LA) und Glykolsäure (GA) zu Gunsten der LA verändert, resultiert daraus eine geringere Hydrophilie des PLGA.^{14,18} Wasser dringt weniger schnell in das Material ein und der Prozess der Zersetzung läuft langsamer ab. Eine Veresterung der Seitengruppen kann ebenfalls zu einem verlangsamten Abbau beitragen¹⁴, wie auch die individuelle Form der Scaffolds.

PLGA zeigt für sich genommen keine ausreichende mechanische Stabilität und wird erst in Kombination mit einem mineralischen Zusatzstoff funktionell einsetzbar.¹² Hierfür werden vorzugsweise Keramik-Nanopartikel wie caliciumbasiertes Hydroxyapatit (HA) verwendet. HA wirkt nicht toxisch, ist

bioaktiv und osteokonduktiv und ähnelt der Mineralstruktur von natürlichem Knochen.^{1,19}

3.3. Immunreaktion auf ein Implantat

Jedes Implantat löst im Wirtskörper eine differenzierte kombinierte Immunreaktion aus. Diese ist vergleichbar mit der Immunreaktion auf eine traumatische Gewebeerletzung. Sie besteht grundsätzlich aus folgenden Anteilen: initialer Kontakt zwischen Blut und Material, Bildung einer provisorischen blutbasierten Matrix, akute Entzündungsreaktion, welche in eine chronische übergehen kann, Bildung von Granulationsgewebe.^{20,21} Die Intensität der initialen Immunantwort ist abhängig von der Größe des beigefügten Traumas, sowie der Anwesenheit von Interleukin (IL)-4 und IL-13²¹ und entscheidet über die Biokompatibilität²², also die Annahme des Implantats und Integration in den Wirt mit Rückgang der entzündlichen Aktivität in der Traumazone oder den Übergang in eine chronische Inflammation mit Fremdkörperreaktion und finaler Abstoßung.

Die Immunreaktion kann in mehrere Phasen eingeteilt werden. Die initiale Adsorptions-Phase ist geprägt durch eine Hämatombildung am Ort der Implantation bzw. Gewebeerletzung mit Aktivierung der Gerinnungskaskade. Es bildet sich eine temporäre komplexe Zell- und Proteinmatrix, welche durch Erythrozyten, Thrombozyten, Fibrinogen, Fibronectin, Albumin, verschiedene Komplementfaktoren, sowie unspezifische Antikörper dominiert wird.²³ Diese Matrix löst eine akute Immunantwort des angeborenen Immunsystems aus und leitet damit die zweite Phase der Immunreaktion ein.²²

An der Inflammations-Phase sind sowohl das Komplementsystem in Form der humoralen Antwort als auch die zelluläre Abwehr beteiligt. Die ersten zellulären Vertreter des Immunsystems sind neutrophile Granulozyten und Mastzellen.²⁴

Neutrophile Granulozyten sorgen für die Phagozytose von Zelldebris und apoptotischen Zellen im geschädigten Gewebe.²⁵ Zusätzlich schütten sie proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , Tumor Nekrose Faktor (TNF) - α oder Interferon (IFN) - γ aus. Durch die Wirkung der Zytokine differenzieren immigrierte Monozyten zu proinflammatorischen Makrophagen.^{26,27} Die ansteigende

Sekretion von proinflammatorischen Botenstoffen wie IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-6, TNF- α , *platelet derived growth factor* (PDGF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und Granulozyten-stimulierender Faktor (GSF) sorgt für eine starke Immunreaktion am Ort der Implantation.²⁷

Gewebemastzellen werden durch den Gewebeschaden zur Degranulation stimuliert und setzen neben Histamin und Fibrinogen auch IL-4 und IL-13 frei.²² Histamin und Fibrinogen haben eine regulierende Wirkung auf die Rekrutierung phagozytierender Zellen sowie deren Adhäsion an der Oberfläche des Fremdkörpers. IL-4 stimuliert proinflammatorische Makrophagen zur Differenzierung in Reparatur-Makrophagen, welche vor allem die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix fördern und das anti-inflammatorisch wirkende IL-10 ausschütten. Unter diesem Einfluss erfolgt eine Down-Regulation der Immunantwort, die vor allem in den ersten 48h hoch inflammatorisch aktiv ist.^{22,28}

Ohne die Implantation eines Fremdkörpers kann die sekundäre Wundheilung weiter fortschreiten und in die Spätphase der Immunreaktion, die Remodelling-Phase des Gewebes übergehen.²² Bei Anwesenheit eines Implantats im geschädigten Gewebe kann eine Down-Regulation des Immunsystems teilweise nicht stattfinden. Die Inflammations-Phase geht über in eine Fremdkörperreaktion mit einer pathologischen chronisch aktiven Entzündung und der möglichen Folge einer Explantation.²⁹

Eine Fremdkörperreaktion zeichnet sich durch die Persistenz adhätierender Makrophagen beziehungsweise Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) auf dem Biomaterial und die Verlängerung der akut inflammatorischen Phase bis hin zur chronischen Inflammation aus.²¹ Eine FKRZ besteht aus multiplen Makrophagen, die über den SNARE-Komplex miteinander fusioniert sind.³⁰ FKRZ können nur über adhärente Proteine oder Komplementfaktoren an implantierten Biomaterialien anhaften. Die Adhäsion von Proteinen und Zellen ist dabei abhängig von der Oberflächenstruktur.³¹ Prinzipiell binden Makrophagen und FKRZ an fast alle Biomaterialien und führen zu deren Abbau.²⁴ Die Fusion von Makrophagen wird besonders in einer pathologischen Mikroumgebung angeregt, beispielsweise im Rahmen einer Fremdkörperreaktion. In vitro ist diese Fusion durch IL-4 und IL-13 induzierbar.²²

Ein Faktor für die Formation einer FKRZ in vivo ist die Partikelgröße des implantierten Biomaterials. Physiologisch erfolgt die Beseitigung von Fremdkörpern wie Bakterien oder Mikropartikel über eine vollständige Resorption durch phagozytierende Makrophagen. Sie können Partikel bis zu einer Größe von 10 µm im Ganzen resorbieren. Partikel mit einer Größe zwischen 10 und 100 µm können nicht von einer einzelnen Makrophage aufgenommen werden und führen zur Bildung einer FKRZ, die nun zur vollständigen Phagozytose des Fremdkörpers in der Lage ist. Partikel größer als 100 µm im Durchmesser können auch von einer FKRZ nicht phagozytiert werden.²⁴ Der Abbau derartiger Fremdkörper erfolgt über extrazelluläre Degradation, wobei über Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies und Säuren eine Zersetzung des Materials bewirkt wird. Mit zunehmender Größe der FKRZ nimmt die Fähigkeit zur Phagozytose ab und die Fähigkeit zur extrazellulären Degradation zu. Sie verlieren zudem die für Makrophagen typische Plastizität und verbleiben lebenslänglich auf dem Implantat.^{20,22} FKRZ sind assoziiert mit verringerter Knochenneubildung und chronischer Inflammation.²⁴ Die chronische Entzündungssituation am Implantat führt zur Bildung von Granulationsgewebe und einer fibrotischen Kapsel, welche sowohl das Biomaterial also auch die anhaftenden FKRZ umschließt.³²

Die Intensität der Fremdkörperreaktion steht in Zusammenhang mit der Oberflächenstruktur und den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Materials. So bevorzugen Makrophagen besonders raue Oberflächen. Auf porösen Materialien finden sich mehr Zellen als auf glatten und in der Folge bildet sich eine dickere fibrotische Kapsel aus.³³ Auch die Größe und die Abstände der einzelnen strukturgebenden Elemente an der Materialoberfläche nehmen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Makrophagen. Es gibt Hinweise darauf, dass über die Oberflächenmodifikation eine Regulation der Fremdkörperreaktion möglich ist. Die Erkenntnisse hierzu sind jedoch spärlich und benötigen weitere Studien.³⁴

Die Adsorptions- und Inflammations-Phase der Wirtsantwort sind entscheidend für die Spätreaktion. Besonders die Proteinexpression der frühen Phase beeinflusst über die Zellrekrutierung, -aktivierung und -polarisation das Fortschreiten zu sekundärer Defektheilung oder einer chronischen Entzündung. Die Regulation der frühen Phase der Immunreaktion über die Modifikation

bestimmter Eigenschaften des implantierten Materials bietet das Potential, ein hoch biokompatibles synthetisches Knochenersatzmaterial zu entwickeln.¹³

3.4. Knochenheilung

Der Prozess der Knochenheilung ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen und wird streng kontrolliert durch eine Vielzahl von Genen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen.³⁵ Knochen ist einer der wenigen Gewebetypen, die im Rahmen der Heilung keine fibrotische Gewebnarbe bilden³⁶, sondern die vollständige Funktionalität des ursprünglichen Gewebes wiederherstellen können. Daher spricht man hier eher von Geweberegeneration.³⁷⁻³⁹

Die Knochenbildung erfolgt durch Osteoblasten, welche den Knochenaufbau leisten. Sie stehen dabei in Konkurrenz zu Osteoklasten, welche für die Resorption der Knochenmasse verantwortlich sind.⁴⁰ Solange ein gesteigerter Knochenaufbau erwünscht ist, beispielsweise im Rahmen der Frakturheilung oder im Wachstum, ist ein Überwiegen der knochenaufbauenden Osteoblasten-Funktion notwendig. Sobald die Wachstumsphase beendet ist, stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau durch Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten ein,³⁸ welches durch externe und interne Prozesse wie beispielsweise mechanische Belastung, die Expression von Wachstumsfaktoren oder hormonelle Schwankungen im Rahmen der Menopause beeinflusst werden kann.^{39,40}

Man unterscheidet zwischen direkter (primärer) und indirekter (sekundärer) Knochenheilung.

3.4.1. Direkte Knochenheilung

Direkte Knochenheilung wird in der Regel nur durch anatomisch korrekte Adaptation der Fraktarenden und stabile Fixierung^{39,41} erzielt und steht daher meist in Zusammenhang mit einer operativen Frakturversorgung. Hierbei passiert die Heilung über eine direkte Regeneration des Lamellenknochens, der Havers-

Kanäle und der Blutgefäße ohne Bildung eines intermediären Kallus.⁴² Zwei Arten von direkter Knochenheilung werden unterschieden.

Von Kontaktheilung spricht man, wenn der nach Frakturposition bestehende Restspalt weniger als 0,01 mm beträgt und die interfragmentäre Belastung geringer als 2% ist. Unter diesen Bedingungen können sich Stanzkegel mit Osteoklasten an der Spitze ausbilden, welche den Frakturspalt überschreiten und longitudinale Kanäle zurücklassen.^{39,41} Diese Kanäle werden anschließend von Osteoblasten ausgefüllt, die so den Frakturverschluss erzielen und später zu Lamellenknochen reifen. Gleichzeitig regeneriert sich das Havers-Kanalsystem und ermöglicht so das Einwachsen von Blutgefäßen in den neu gebildeten Knochen.³⁷

Der Unterschied von Spaltheilung zu Kontaktheilung besteht vor allem in der zeitlichen Versetzung von Frakturverschluss und Regeneration der Haverskanäle. Der Spalt darf maximal zwischen 800 µm bis maximal 1 mm betragen. Es bildet sich zunächst im Frakturspalt Lamellenknochen, der perpendicular zur Längsachse des Knochens angeordnet und mechanisch instabil ist. Dieser muss sekundär durch longitudinal ausgerichteten Lamellenknochen ersetzt werden.³⁷ Die Mineralisierung erfolgt anschließend entlang der longitudinal ausgerichteten Kollagenfasern.³⁹

3.4.2. Indirekte Knochenheilung

Indirekte Knochenheilung ist die häufigste Form der Frakturheilung und erfordert keine stabilen Bedingungen oder anatomische Reposition.⁴¹ Mikrobewegung und mechanische Belastung sind dem Heilungsprozess sogar zuträglich.³⁶ Es können zwei Heilungsprozesse unterschieden werden. Im Markkanal und der Interkortikalregion des Frakturspalts findet enchondrale Knochenheilung statt, wobei ähnlich dem embryonalen Knochenwachstum mittels Knorpelbildung zunächst ein weicher Kallus entsteht. Die subperiostale Region und der Weichteilmantel um die Fraktur induzieren intramembranöse Knochenheilung und die Bildung eines harten Kallus unterhalb des Periosts.⁴²

Auch zeitlich lässt sich der Prozess der Frakturheilung einteilen. Initial nach dem frakturierenden Trauma bildet sich ein Hämatom im Frakturspalt, welches

gleichzeitig eine grobe Struktur für die Kallusbildung darstellt und eine akute Entzündungsreaktion auslöst.^{37,39} Die Inflammation ist essenziell für den Heilungsprozess.⁴¹ Die wichtigsten Signalmoleküle sind hierbei IL-1,³⁹ IL-6,³⁷ *transforming growth factor* (TGF) - β , *insulin-like growth factor* (IGF), *fibroblast growth factor* (FGF), PDGF und *bone morphogenic proteins* (BMP).^{35,41} Durch Plättchendegranulation im Frakturhämatom werden TGF- β und PDGF ausgeschüttet. Sie wirken chemotaktisch und stimulierend auf stromale Knochenmarkstammzellen (MSC), Osteoblasten und Makrophagen. Die zur Phagozytose des Zelldebris eingewanderten mononukleären Immunzellen setzen IL-1, IL-6 und TNF- α frei, wodurch sowohl die primäre Knorpelbildung und die Angiogenese eingeleitet wird (IL-1) als auch die Differenzierung von MSC in Osteoblasten und Osteoklasten verstärkt (IL-6).³⁷ TNF- α rekrutiert undifferenzierte MSC mit osteogenem Potential und stimuliert in späteren Stadien den Abbau hypertropher Chondrozyten und die Osteoklastenfunktion.³⁵

Innerhalb der ersten Woche nach Trauma ist eine starke Zellproliferation im Frakturspalt zu verzeichnen. Besonders endotheliale Zellen, die zu osteogenen Zellen differenzieren können, subperiostal ansässige Osteoprogenitorzellen (OPC) und undifferenzierte MSC sind nachweisbar.⁴¹ Mithilfe von BMP als Wachstumsfaktoren wird über den intrazellulären BMP-Signalweg die Differenzierung von MSC in Chondrozyten und Osteoblasten sowie von OPC in Osteoblasten induziert und so die Knochenneubildung eingeleitet.³⁵

Das Frakturhämatom wird nun durch frühe Knorpelformationen ersetzt, welche den mechanisch instabilen weichen Kallus bilden. Kollagen und Fibronectin als Bausteine der neuen Knochenmatrix sind bereits vorhanden.⁴¹ Simultan beginnt am proximalen und distalen Frakturende die Bildung eines harten Kallus durch in Osteoblasten differenzierte OPC.⁴² Der harte Kallus dient der Überbrückung des Frakturspalts und der Fixierung und Immobilisierung der Frakturende und möglicher Fragmente.³⁹ Die intramembranöse Ossifikation benötigt als Stimulus Mikrobewegungen. Wird die Fraktur iatrogen stabilisiert und rigide fixiert, findet keine Bildung eines harten Kallus statt.³⁶ Entsprechend kann eine Kallusreaktion im Rahmen einer osteosynthetischen Frakturversorgung als Therapieversagen angesehen werden.

Nach ca. zwei Wochen nimmt die gesteigerte Zellproliferation im harten Kallus ab. Hier ist vermehrt Kollagen Typ II als Grundbaustein der Knochenmatrix sowie Osteocalcin (OCN) nachweisbar.^{36,41,43} Im weichen Kallus beginnen die Chondrozyten zu hypertrophieren. Dadurch wird die Kalzifizierung des Kallus und die Bildung von Spongiosa induziert.³⁷ Sowohl die hypoxischen Bedingungen in der Defektzone als auch die Hypertrophie der Chondrozyten mit verstärkter Ausschüttung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) stimulieren die Neoangiogenese.^{36,39} Dies stellt den Beginn des Umbaus von avaskulärem Knorpelgewebe zu vaskularisiertem kalzifiziertem Knochen dar.

Nach drei Wochen ist der harte Kallus in Geflechtknochen umgewandelt.⁴¹ Gleichzeitig findet unter dem Einfluss von TNF- α die Beseitigung des Knorpelgewebes im weichen Kallus mittels Apoptose und Zellnekrose statt.³⁵ Ein stabiler Schluss des Frakturspalts kann nach ca. fünf Wochen erwartet werden.⁴¹

Nach erreichter Stabilität erfolgt der Knochenumbau von Geflechtknochen zu Lamellenknochen mit Formung des Markraums.³⁷ Dieser Remodellingprozess wird vor allem durch IL-1 und TNF- α reguliert und steht in Abhängigkeit zur mechanischen Belastung des Knochens im Alltag.^{35,44} So erfolgt die Regeneration des verletzten Knochengewebes in einen Prä-Trauma-Zustand ohne Narbenbildung.³⁷ Während die Knochenheilung einen zeitlich begrenzten Prozess darstellt, kann die Remodellingphase über Jahre andauern. Grundsätzlich wird der Knochen abhängig von der alltäglichen Beanspruchung ein Leben lang umgebaut.⁴⁰

Eine erfolgreiche Knochenheilung ist auf eine gute Blutversorgung und schrittweise zunehmende mechanische Stabilität angewiesen. Ist keine der beiden Voraussetzungen gegeben, kommt es zu einer atrophischen fibrotischen Non-Union.³⁷ Bei ausreichender Blutversorgung und Instabilität der Fraktur folgt eine aus dem Knorpelkallus entstandene hypertrophe Non-Union oder eine Pseudarthrose.³⁹

3.5. Critical size bone defect

Von einem Knochendefekt spricht man, wenn es durch äußere Einwirkung zum Verlust der Integrität und Kontinuität des Knochens kommt. Dieser Verlust kann

verschiedene Ursachen haben, wie beispielweise eine Fraktur, einen chirurgischen Eingriff im Sinne einer Tumorresektion oder Infektionen mit nachfolgend erforderlichem radikalem Debridement.

Von einem *critical size bone defect* ist die Rede, wenn trotz chirurgischer Stabilisierung mittels Osteosynthese keine Spontanheilung des Defekts eintritt und weitere chirurgische Maßnahmen – häufig im Sinne einer autologen Knochentransplantation – erforderlich sind.⁴⁵ Es besteht kein Konsens über die Definition von Größe oder Volumen eines *critical size bone defects*. In der Literatur werden Knochendefekte ab einer Länge von mehr als 1-2 cm oder mit einem Knochenverlust von mehr als 50% des Knochenumfangs als kritisch beschrieben.^{46,47} Ob ein vorliegender Knochendefekt als kritisch zu betrachten ist, hängt neben Größe und Volumen vor allem von der anatomischen Lage, den umgebenden Weichteilverhältnissen, sowie Patientencharakteristika und bestehenden chronischen oder akuten Nebenerkrankungen ab.⁴⁵⁻⁴⁷ *Critical size bone defects* erfordern in der Regel immer eine chirurgische Rekonstruktion. Gold-Standard in der Behandlung derartiger Knochendefekte ist die autologe Knochentransplantation mit Entnahme von Beckenkammpongiosa. Für alternative biologische Therapien mit bioaktivem Material gibt es keine ausreichende Evidenz.⁴⁸

Es muss eine Unterscheidung zwischen *critical size bone defect* und Nonunion (fehlender Frakturheilung nach adäquater Rekonvaleszenzzeit) erfolgen. Bei einer Nonunion liegt dysfunktionales Gewebe (atroph oder hypertroph, siehe 3.4.2) vor, welches seine Regenerationsfähigkeit verloren hat. Die Folge ist biomechanisch instabiles Narbengewebe und ein fehlender Frakturverschluss. Im *critical size bone defect* ist die Regenerationsfähigkeit auf zellulärer Ebene erhalten, der Knochenverlust jedoch so groß, dass dieser nicht mehr ersetzt werden kann.⁴⁵⁻⁴⁷

3.6. Masquelet-Technik (induzierte Membrantechnik)

Neben der autologen Knochentransplantation als Goldstandard¹⁹ stehen zur operativen Versorgung von *critical size bone defects* auch Knochentransport, ein freier Fibulatransfer oder bei nicht mehr rekonstruierbarem Defekt die Amputation

zur Verfügung.^{49,50} Bei Entscheidung für eine autologe Knochentransplantation sollte die induzierte Membrantechnik oder Masquelet-Technik in Betracht gezogen werden.⁵¹ Sie ermöglicht ein vernünftiges Totraum-Management, die lokale Infektbehandlung, Stabilisation des Knochens zur Förderung der Weichteilheilung und die Ausbildung einer bioaktiven Membran zur Stimulation des Defektverschlusses.⁴⁸

Es handelt sich um ein zweizeitiges Verfahren zum Verschluss großer Knochendefekte. Im ersten Schritt ist ein radikales Debridement von Knochen und umgebendem Weichteilmantel sowie eine anatomische Rekonstruktion und Stabilisation des Knochens mittels Osteosynthese erforderlich. Anschließend wird ein Polymethylmethacrylat (PMMA) - Zementspacer in den Defekt eingesetzt, welcher gleichzeitig als Platzhalter, als möglicher Distributor für lokal applizierte Antibiotika in einem potenziell infizierten Gebiet und als Induktor einer bioaktiven Fremdkörpermembran um den Defekt dient. Die Bildung einer Membran um den Knochendefekt und Spacer ist in diesem Fall erwünscht, während sie bei anderen Implantaten möglichst vermieden wird.²¹ Im zweiten Schritt nach ca. 6-8 Wochen erfolgt die Explantation des Spacers und Augmentation des Defektes mit autologem Knochenmaterial.^{48,51} Im Tierversuch werden optimale Heilungschancen erzielt durch eine Kombination der bioaktiven Membran, welche bei 2-4 Wochen ihr biologisch höchstes Potential erreicht⁴⁹, mit möglichst zellreichem und regenerationsfähigem Knochenmaterial wie beispielsweise autologem Knochentransplantat aus dem Femur einer Ratte.^{52,53} Mithilfe des Reamer-Irrigator-Aspirator (RIA) – Systems kann hierbei ausreichend Knochenmark entnommen und als Gemisch aus flüssigen Bestandteilen und einem festen Trägerstoff wie Knochenspänen oder Knochenzement-Granulat in den Defekt eingebracht werden.^{54,55} Zur Maximierung der Erfolgsrate ist es erforderlich, jegliche Form der Infektion – lokal oder systemisch – radikal zu behandeln sowie komplizierende Faktoren auf Seiten des Patienten zu identifizieren und zu optimieren.⁴⁸

3.7. Stammzellen

Stammzellen sind ubiquitär im Körper vorhandene Zellen, die durch Zellteilung und Zelldifferenzierung die Entwicklung und Regeneration jedes komplexen Gewebes eines Organismus ermöglichen. Sie können in mehrere Zelltypen

unterteilt werden, welche sich anhand ihrer Verfügbarkeit, ihres Differenzierungspotentials und ihrer Relevanz für die klinische Anwendung unterscheiden.⁵⁶

Embryonale Stammzellen (ESC) sind pluripotente Zellen, die sich prinzipiell in jeden Gewebetypen differenzieren können. Sie werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste eines nicht zur Austragung implantierten Embryos gewonnen und sind dadurch verbunden mit legalen und ethischen Bedenken. Limitationen der Nutzung stellen unter anderem ihre geringe Verfügbarkeit, eine erschwerte Kontrolle der Proliferation und damit einhergehend begrenzte Stabilität der Ausdifferenzierung sowie ein hohes onkogenes Potential dar.⁵⁶

Adulte Stammzellen sind hingegen ethisch weniger bedenklich einzusetzen und daher auch klinisch von Relevanz. Es handelt sich hierbei um multipotente Zellen, die sowohl zu einer stabilen Integration in ihre Umgebung neigen als auch immunkompatibel sind. Das ubiquitäre Vorhandensein in nahezu allen Gewebeformen des Körpers macht sie zu einer attraktiven Zellquelle und geeignetem Biomaterial für den therapeutischen Einsatz. Dabei finden sie auch in der regenerativen Behandlung von Knorpel, Knochen oder Menisken Anwendung. Einen großen Anteil der adulten Stammzellen stellen MSC dar, welche vor allem ein chondrogenes, adipogenes oder osteogenes Differenzierungspotential besitzen. Sie werden aufgrund ihres weiten Differenzierungsspektrums bevorzugt zu Forschungszwecken und zur klinischen Nutzung verwendet.^{56,57}

3.7.1. Stromale Knochenmarkszellen

Stromale Knochenmarkszellen (MSC) sind multipotente Stromazellen, welche sich aufgrund ihres allgemeinen Vorkommens aus nahezu allen Gewebetypen im Körper isolieren lassen. Sie können sich unter anderem in die drei Zelltypen Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren. Sie besitzen zudem auch Differenzierungspotential in neuronale, epitheliale und endotheliale Zellen.⁵⁷ Das ubiquitäre Vorkommen von MSC bedingt vielfältige Erscheinungsformen. Zur besseren Vergleichbarkeit von Forschungsarbeiten mit

derartigen Zellen publizierte das Mesenchym- und Gewebekomitee der International Society for Cellular Therapy ein Kriterienkatalog für MSC:

- MSC zeigen in unter Standard-Kulturbedingungen eine Adhärenz an Kunststoffoberflächen.
- MSC besitzen in vitro ein trilineares Differenzierungspotential (osteogen, chondrogen, adipogen).
- MSC exprimieren vor allem *cluster of differentiation* (CD) 105, CD73 und CD90 und nicht CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR (Marker hämatopoetischer Zellen).⁵⁸

MSC werden bevorzugt aus dem Knochenmark isoliert, da sie hier über eine Knochenmarksaspiration leicht zugänglich sind und besonders im Beckenknochen ein hohes Knochenmarkvolumen entnommen und dementsprechend eine hohe Zellzahl isoliert werden kann. Hohe Zellzahlen versprechen eine größere Erfolgsrate durch verstärkte Zellkommunikation und -interaktion.⁵⁶ Für therapeutische Erfolge mit MSCs sind hohe Zellzahlen nötig. So werden laut einer Übersichtsarbeit von Chen et al. beispielsweise für die Therapie eines Non-union Knochendefekts zwischen 40 und 100 Millionen MSC pro Patient benötigt.^{59,60}

Weitere mögliche Gewebetypen zur MSC-Entnahme sind Fettgewebe, Menstruationsblut, Synovialgewebe- oder Flüssigkeit, Bänder oder Sehnen, wobei der Ursprungsort scheinbar einen Einfluss auf die Differenzierungspräferenz der Stammzelle hat. Entsprechend lassen sich Varianzen in der Ausprägung MSC-spezifischer Markerproteine nachweisen.^{56,57}

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass aus dem Knochenmark isolierte MSC ein großes Potential zur Knochenreparatur und -regeneration aufweisen.⁶⁰ Dabei können sie nicht nur entlang der osteogenen Zelllinie zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren, sondern über eigenständige Sekretion von stimulierenden Faktoren und die Interaktion mit der Umgebungsmatrix die Immunantwort lokal modulieren und so den Regenerationsprozess am Traumaort beeinflussen. Dies macht MSC zu geeignetem biologischem Material für Untersuchungen zu osteogenem Potential und zur Immunmodulation im Rahmen eines Implantationstraumas.^{27,28,43}

3.7.2. Mononukleäre Knochenmarkszellen

Mononukleäre Knochenmarkszellen (BMC) sind im Knochenmark enthaltene mononukleäre Zellen.⁶¹ Sie können mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aus „buffy coat“ (Grenzschicht zwischen Gradientenmedium und Blutplasma) gewonnen werden.^{56,62} Darunter fallen mononukleäre Zellen des Immunsystems, hämatopoetische Stammzellen (HSC) wie auch endotheliale Vorläuferzellen (EPC), Adipozyten, Fibroblasten und Osteoblasten/-klasten und zu einem geringen Prozentsatz auch MSC.^{56,61} Dieses komplexe Gemisch aus Zellen schafft eine stabile Mikroumgebung für die Osteogenese.⁶³ Es gibt Hinweise darauf, dass gemischte Zellpopulationen ein höheres Knochenregenerationspotential besitzen als Zellpopulationen eines bestimmten Zelltyps.^{64,65}

BMC werden aktuell im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung knöcherner Non-Union mit einer autologen Knochentransplantation eingesetzt, weniger aber in der Therapie kritisch großer Knochendefekte.⁶³ Studien haben gezeigt, dass das große osteogene Potential von BMC auch bei großen Knochendefekten zu sehr guten klinischen Ergebnissen führt.⁶⁶ Daher eignen sich BMC gut für die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung auf einem Scaffold im Vergleich mit MSC.^{61,65,66}

3.7.3. Aufkonzentriertes Knochenmarksaspirat

Aufkonzentriertes Knochenmarksaspirat (BMAC) umfasst nachweislich mehrere Untergruppen mit regenerativem Potenzial wie (unreife) Monozyten und HSC, eine mutmaßliche Quelle von EPC, und Vorläufer von MSC.⁶¹

Während MSC vor ihrer Verwendung aufwendig im Labor vermehrt werden müssen und auch BMC eine Aufarbeitung im Labor benötigen, kann BMAC problemlos im Operationssaal hergestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass das an Progenitorzellen reiche Knochenmarkkonzentrat in derselben Operation erzeugt und appliziert werden kann.^{67,68}

Die Entnahme des Knochenmarks wird in Lokalanästhesie des auf der Seite liegenden Patienten vorgenommen. Nach tiefem Einführen einer abgeschrägten Nadel von 6 bis 8 cm Länge und 1,5 mm Innendurchmesser in den spongiösen Knochen des Beckenkamm, wird das Mark in eine 10 ml-Kunststoffspritze aspiriert. Bei einer bestimmten Tiefe wird die Nadel bei aufeinanderfolgenden Aspirationen um 45° gedreht, um die Abschrägung neu auszurichten, so dass eine Aspiration um 360° möglich ist. Das aspirierte Knochenmark ist noch reicher an Stammzellen, wenn es in kleinen Fraktionen aspiriert wird. Alle Aspirationsfraktionen werden in Plastikbeuteln mit Zellkulturmedium und einer Antikoagulanzlösung (Zitronensäure, Natriumcitrat, Dextrose) zusammengeführt. Die gepoolten Aspireate werden dann filtriert, um Zellaggregate und Fett abzutrennen und können so direkt weiterverwendet werden.^{53,67}

Konzentriertes Knochenmarkaspirat enthält eine vergleichsweise hohe Konzentration an OPC, welche zur Teilnahme an der Osteogenese in der Lage sind.^{67,69}

3.7.4. Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Eine MSC ist durch ihr osteogenes Differenzierungspotential in der Lage, sich zu einem Osteoblast zu entwickeln und die Knochenformation einzuleiten.^{4,70} Ein reifer Osteoblast produziert Knochenmatrix am Ort des größten Stimulus. Bei sinkendem Bedarf an Knochenneubildung kann die Zelle einen von drei möglichen Wegen einschlagen: die Entwicklung zu einem Osteozyt, welcher als reife Knochenzelle die stabile Knochenstruktur bildet, zu einer Knochenbelegzelle, welche einen natürlichen Schutzschild gegenüber Osteoklasten darstellt und so das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau wahrt oder den Weg der Apoptose.⁷¹

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung sind bestimmte Umgebungsfaktoren notwendig. Hierzu zählen unter anderem die Wachstumsfaktoren *basic* und *acidic fibroblast growth factor* (bFGF und aFGF), IGF-I und IGF-II, PDGF und Mitglieder der TGF- β -Familie wie BMP.^{6,60} Die Reifung einer MSC zum Osteoblasten lässt sich in eine frühe und eine späte Phase unterteilen und wird engmaschig durch die osteogenen

Transkriptionsfaktoren *runx-related transcription factor 2* (RUNX2), *osterix* (OSX), *drosophila distal-less 5* (DLX5) und β -Catenin kontrolliert.^{71,72}

Zunächst differenziert sich die MSC zu einer gemeinsamen Osteo-Chondroprogenitor-Zelle. Durch den Einfluss von RUNX2 wird die chondrogene und adipogene Differenzierung blockiert und die Umwandlung zum Präosteoblast festgelegt.⁷² Durch RUNX2 wird die Expression von frühen osteogenen Genen wie Alkalische Phosphatase (ALP) und *collagen1 α 1 chain* (COL1A1) neben anderen Osteoblasten-Markern wie Osteopontin (OPN), *bone sialoprotein II* (BSP II) und OCN zur Knochenmatrixbildung reguliert und der Osteoblast in einem unreifen Vorstadium behalten.^{71,72} Die Expression von RUNX2 und die Promoter-Aktivität des RUNX2-Gens wird durch die Anwesenheit von β -Catenin noch verstärkt.⁷² Die Wirkung von RUNX2 in der Frühphase der Differenzierung ist messbar durch die ALP-Aktivität.⁷³

Die Spätphase ist geprägt durch die Reifung vom Präosteoblast zum Osteoblast und wird dominiert von OSX, welches unter dem Einfluss von RUNX2 vermehrt exprimiert wird.⁷² Der reife Osteoblast exprimiert ebenfalls Gene zur Bildung von Knochenmatrixproteinen.^{71,72} Als Kennzeichen der Spätphase lassen sich Calcium-Ablagerungen als Zeichen des beginnenden Mineralisierungsprozesses heranziehen.^{71,73}

Die Aktivierung von RUNX2 erfolgt mittels Phosphorylierung und kann von Signalwegen wie dem ERK/MAP-Kinase (extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases) - Signalweg und dem BMP-Signalweg^{74,75} ausgelöst werden. β -Catenin ist durch den *wingless-related integration site* (Wnt) - Signalweg reguliert.^{71,76}

3.7.4.1. Induktion der osteogenen Differenzierung durch Dexamethason

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung von MSC eignet sich das Glukokortikoid Dexamethason, welches nachweislich zur Ausreifung einer MSC zu einer funktionsfähigen Osteoblast-ähnlichen Zelle führt.⁷⁷ Zur Herstellung eines die Osteogenese begünstigenden Mediums werden dabei zusätzlich zu Dexamethason noch Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat hinzugefügt.⁷⁸

Dieses sogenannte osteogene Differenzierungsmedium (OD) wird mittlerweile in Studien als osteogenes Standardmedium verwendet,^{64,78,79} wobei der ursprüngliche Zweck der osteogenen Differenzierung von MSC entsprach.⁴³

3.8. Vollblutstimulationstest

Der Vollblutstimulationstest (VBSA) wurde erstmals 1995 von Prof. Dr. Dr. med. Thomas Hartung und Prof. Dr. Albrecht Wendel publiziert. Als Forschende am biochemisch-pharmakologischen Institut der Universität Konstanz ansässig, waren sie unter anderem im Feld der Qualitätssicherung und Produkttestung von intravenös zu verabreichenden Medikamenten tätig und befassten sich mit der Testung von Arzneimitteln auf pyrogene Substanzen. Das damalige Standardverfahren sah die Testung im Tiermodell an Kaninchen oder alternativ eine direkte Endotoxinbestimmung mittels Limulus-Test vor.⁸⁰ Die Limitationen beider Testverfahren wie tierschutzrechtliche Bedenken⁸¹, Vergleichbarkeit, zu hohe Sensitivität⁸² oder eingeschränktes Erfassungsspektrum⁸⁰ sollten mit der Einführung des Vollblutsystems umgangen werden. Hier sei die physiologische Zusammensetzung des Blutes aus zellulären und humoralen Komponenten erhalten und alle relevanten Blutbestandteile könnten ähnlich der in vivo-Situation interagieren.⁸¹

Hartung et al. entnahmen Vollblut von gesunden Spendern, was anschließend heparinisiert wurde, und versetzten es mit verschiedenen exogenen Pyrogenen wie Lipopolysacchariden (LPS) von Salmonellen oder abgetöteten *Staphylococcus aureus*. Nach einer Inkubationszeit von 24h und anschließender Zentrifugation untersuchten sie den Überstand mittels ELISA-Kits auf die vier endogenen Pyrogene IL-1, IL-6, TNF und PGE₂.⁸¹

Mit dieser Methode konnten die Autoren erfolgreich die primäre Immunantwort auf einen exogenen Stimulus in vitro simulieren und abhängig vom Stimulus verschieden hohe Konzentrationen an endogenen Pyrogenen nachweisen.⁸¹ Das Vollblutsystem erwies sich damit als dem Kaninchenmodell gleichwertige und dabei zeit- und kostengünstige Methode, um eine in vitro-Simulation der frühen Inflammationsphase eines Wirts zu erzeugen. Im Laufe der Jahre konnte gezeigt werden, dass der Test mit jeglicher Form von flüssigen Komponenten sowie

Feststoffen angewandt werden kann.⁸³ Als Direktor des *Center vor Alternatives to Animal Testing* (CAAT) der Johns Hopkins University in Baltimore setzt Hartung sich auch weiterhin für den Ersatz von Tierversuchen durch Methoden wie den VBSA in der Toxizitätstestung ein.⁸³

3.9. Zentrale Fragestellung

Die Entwicklung neuartiger synthetischer Biomaterialien zur Verwendung im Bereich des Tissue Engineering, der operativen Versorgung komplexer Knochendefekte oder als Trägermedium zur lokalen Applikation von Antibiotika, Wachstumsfaktoren oder immunaktiven Zellen in einer Defektzone gewinnt stetig an Bedeutung. Bei der Konzeption neuer oder der Optimierung altbewährter Materialien ist der Aspekt der Biokompatibilität und damit die Erhaltungswahrscheinlichkeit des Implantats von besonderer Relevanz.

Um bessere Ergebnisse in der Entwicklung zu erzielen kann es sinnvoll sein, ein Material früh hinsichtlich seiner individuellen physikalischen Eigenschaften, immunologischen Signatur und Biokompatibilität zu charakterisieren. Ein standardisiertes Analyseprotokolls oben genannter Komponenten kann zu einer verbesserten Vergleichbarkeit solcher Materialstudien beitragen und ermöglicht letztlich allgemein gültige Rückschlüsse auf den Einfluss bestimmter Implantateigenschaften auf die Immunreaktion des Wirts nach Implantation.

Gegenstand unserer Studie ist die Analyse einer neuartigen Darbietungsform des bereits vielfältig eingesetzten Biomaterials PLGA zur Produktion einer porösen Membran zur Abdeckung von großen Knochendefekten. Laut unserer Hypothese ermöglicht die neue Zusammensetzung des PLGA-Gemischs die Herstellung einer Membran zur Abdeckung des Defektes und trägt zu einer verbesserten Defektheilung bei. Dies könnte eventuell den Einsatz dieses Materials als Ersatz der induzierten Membran im Rahmen der Masquelet-Technik ermöglichen. Im Sinne der Materialcharakterisierung sind besonders die oben genannten Punkte von Interesse.

In Bezug auf die physikalischen Eigenschaften der PLGA-Membran soll untersucht werden, wie stabil die Membran in wässrigem Milieu ist. Zur Dokumentation der Degradation werden Analysen unter dem

Rasterelektronenmikroskop (REM) durchgeführt. Mithilfe eines Dreipunktbiegetests sollen mechanische Eigenschaften der Membran erfasst werden. Um die Permeabilität der Membran für Peptidfaktoren zu bestimmen, wird ein Diffusionstest durchgeführt.

Weiterhin ist fraglich, ob das Material zytokompatibel ist und osteoinduktiv wirkt. Beide Eigenschaften sind entscheidend für die effektive Verstärkung von Knochenneubildung in einer Defektzone. Hierzu erfolgt die Analyse der Bioaktivität von MSC, BMC und BMAC im Zeitverlauf. Dazu angewandte Methoden umfassen MTT-Tests sowie Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Zellen auf der Oberfläche. Aus der Analyse der Expression osteogener Gene können Rückschlüsse auf eine mögliche osteogene Differenzierung der Zellen gezogen werden.

Daran schließt sich die Frage an, ob die PLGA-Membran im Vergleich zu anderen Biomaterialien eine veränderte immunologische Reaktion auslöst. Um dies zu beantworten, wird ein VBSA kombiniert mit einer Sekretom-Analyse durchgeführt. Wir vermuten, dass sich so die frühe Immunreaktion der ersten 24h erfassen lässt. Ob sich aus der somit erfassten immunologischen Signatur Rückschlüsse ziehen lassen auf den Verlauf der Fremdkörperreaktion und den Erfolg des implantierten Materials, kann in dieser Untersuchung allerdings nicht geklärt werden und erfordert weitere Langzeituntersuchungen im Tiermodell.

4. Material und Methoden

4.1. Apparaturen und Materialien

4.1.1. Verbrauchsmaterialien

Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Cellstar Tubes</i> 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Cellstar Tubes</i> 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Stripette</i> Serologische Pipette 5 ml	Corning Incorporated Costar, Corning NY, USA
<i>Stripette</i> Serologische Pipette 10 ml	Corning Incorporated Costar, Corning NY, USA
<i>Stripette</i> Serologische Pipette 25 ml	Corning Incorporated Costar, Corning NY, USA
TC-Flasche T25, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flasche T75, Cell+, Bel. Kap.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpipettenspitzen 10/20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB, International GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>S-Monovette</i> Serum 7,5ml, 92 x 15 mm, Lithium-Heparin, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Safety-Multifly</i> 21G	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
C-Chip/Neubauer Einweg-Zählkammer	NanoEnTek, Pleasanton CA, USA
TC-Platte 4 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

TC-Platte 12 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 24 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 48 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>BD Microlane</i> 3 Sonderkanülen	Megro, Wesel, Deutschland
Einweg-Standardskalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
<i>Stiefel Biopsy Punch</i> Biopsiestanzen 5mm	MSG, Wuppertal, Deutschland
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
1,8 ml Kryoröhrchen	Starlab, Nümbrecht, Deutschland
Kryo-Boxen aus Karton 133x133x32 mm, weiß	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Rastereinsatz für Kryo-Boxen, 133x133x25 mm, Raster 16x16 mm	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Standard-Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<i>Multipoly-Pro</i> Gefäß 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Teststreifen	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>Peha-soft nitrile fino powderfree</i> Schutzhandschuhe, M	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Abdecktuch, <i>OPS Essential</i>	Medline International Germany GmbH, Kleve, Deutschland

<i>Omnifix 100 Duo</i> Insulinspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Chirurgische Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
<i>Dowsil 3140 RTV</i> Silikon-Schutzbeschichtung, kaltvernetzend	Dow Chemical, Midland, Michigan, USA

4.1.2. Geräte

<i>ErgoOne</i> Einkanal-Pipette 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab, Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipetus</i> (Akku-betriebene Pipettierhilfe für alle Pipetten von 0,1-200 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
<i>HERAcell 150i</i> CO ₂ -Inkubator mit Edelstahlkammer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
<i>Infinite M200</i> Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan AG, Männedorf, Schweiz
<i>Rotamax 120</i> Schüttelgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
<i>NanoVue Plus</i> Spectrophotometer	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
<i>SI-8001</i> Analysewaage	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
<i>Biofuge Fresco</i> gekühlte Mikroliter-Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Basic Meter PB-11</i> Ph-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland

IKA Magnetrührer <i>RET control-visc</i>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
VWB2 26 Wasserbad	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Mega Star 1.6R</i> Tischzentrifuge, belüftet/gekühlt	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>RS-VA 10</i> Regelbarer Vortexer	Phoenix Instruments GmbH, Garbsen, Deutschland
Mikroskop <i>Primo Star</i>	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
<i>2540EL</i> Laborautoklav	Systec, Linden, Deutschland
Kühlschrank +4°C bis -20°C	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Sterilbank <i>Antares 38</i>	Anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland
<i>Hitachi SEM S4500</i> Rasterelektronenmikroskop	Hitachi AG, Düsseldorf, Deutschland
<i>Fusion FX7 Imaging System</i>	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Realtime Thermocycler <i>Mx3005p</i>	Stratagene Corp., La Jolla, USA
<i>Axio Observer Z1</i> Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
<i>AxioCam MRm</i> Kamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

4.1.3. Software

ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
BiAS. für Windows, Version 11.05	Dr. Hanns Ackermann, Epsilon-Verlag, Darmstadt, Deutschland
testXpert®	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland
Photoshop CS4	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republic of Ireland
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magellan™	Tecan AG, Männedorf, Schweiz

4.1.4. Zellen

Stromale Knochenmarkzellen (MSC)	Anonymisierte Knochenmarksaspirate, bereitgestellt vom DRK Baden -Württemberg -Hessen, Frankfurt am Main, Deutschland
Mononukleäre Knochenmarkzellen (BMC)	Anonymisierte Knochenmarksaspirate, bereitgestellt vom DRK Baden -Württemberg -Hessen, Frankfurt am Main, Deutschland
Aufkonzentriertes Knochenmarkspirat (BMAC)	Anonymisierte Knochenmarksaspirate, bereitgestellt vom DRK Baden -Württemberg -

	Hessen, Frankfurt am Main, Deutschland
--	---

4.1.5. Scaffolds

TAOS – Membran (PLGA), Ø 5 mm	Locate Bio Ltd., Nottingham, UK
Herafill Granulat (CS), Ø 3-5 mm	Heraeus Medical, Wehrheim, Deutschland
Palacos R (PMMA)	Heraeus Medical, Wehrheim, Deutschland

4.1.6. Nährmedien

<i>MesenCult MSC Basal Medium</i> (Human)	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
<i>MesenCult MSC Stimulatory</i> Supplement (Human)	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Gibco DMEM (1X) + GlutaMAX-I	Fisher scientific, Schwerte, Deutschland
Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fisher scientific, Schwerte, Deutschland

4.1.7. Puffer und Lösungen

<i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
<i>DPBS (-/-), Dulbecco's Phosphate</i> <i>Buffered Saline (-CaCl₂/-MgCl₂)</i>	Gibco/ Life Technologies Limited, Paisley, UK

Accutase Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
<i>Fetal bovine serum</i> (FCS), qualifiziert, hitzeinaktiviert	Gibco/ Life technologies Limited, Paisley, UK
Alizarin-Rot-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Formaldehydlösung 2%, <i>Shandon™</i> <i>Zinc Formal-Fixx™</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Türks Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Solubilisierungspuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) von Escheria coli O111:B4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
B-Glycerophosphat- Disodiumsalzhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>CellLytic M</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Rekombinantes Human/Rhesus Macaque/Feline CXCL12/SDF-1 alpha	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Rekombinantes Human CCL2/MCP-1 Protein	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Vollblut von 3 Probanden	Anonymisierte Spenden

4.1.8. Analyse-KITs

<i>Alkaline Phosphatase Assay Kit</i> (Colorimetric)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit</i>	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
<i>CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>FastGene RNA Basic Kit</i>	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
<i>FastGene Scriptase II cDNA Synthesis Kit</i>	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland

4.1.9. ELISA

Human CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
---	------------------------------------

Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
---------------------------------------	------------------------------------

4.1.10. RT-qPCR

RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (24)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human GAPDH	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human BMP2	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human COL1A1	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human BGLAP	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human RUNX2	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human SPARC	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human VEGFA	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human IL6	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RT ² qPCR Primer Assay for Human IL8	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

4.2. Methoden

4.2.1. Votum der Ethikkommission

Die Verwendung von anonymisierten Restknochenmarkspalten für Forschungszwecke ist durch das Ethikvotum 329/10 gedeckt.

Die Abnahme von Vollblut von gesunden Probanden ist durch das Ethikvotum 89/19 gedeckt.

4.2.2. Steriles Arbeiten

Zur Gewährleistung einer keimfreien Arbeitsumgebung wurden alle Versuche sowie die Kultivierung und Verarbeitung der Zellpopulationen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Dabei wurde auf gründliches Händewaschen vor Arbeitsbeginn, das Tragen von Handschuhen und die Händedesinfektion mit Ethanol 70% geachtet. Vor Beginn und nach Abschluss der Versuche wurde alle Oberflächen der Werkbank sowie die genutzten Gerätschaften mit Ethanol 70% desinfiziert. Nicht sterile Materialien wurden vor Verwendung mit Zellen autoklaviert.

4.2.3. PLGA-Scaffolds

4.2.3.1. Herstellung der PLGA-Scaffolds

Zur Herstellung der Scaffolds wurde das pulverförmige Polymer PLGA mit einer Suspension des mineralischen Zusatzstoff für 30s vermischt und anschließend in einer sterilen Form zu einer Membran mit den Maßen 2 cm x 5 cm x 2 mm gepresst. Mit einer Hautbiopsiestanze mit einem Durchmesser von 5 mm (Fläche: 20 mm², Abbildung 2) wurden nach einem 30-minütigen Trockenintervall Probekörperchen ausgestanzt und mithilfe einer kleinkalibrigen Kanüle zum vollständigen Aushärten in einer 24-Well-Platte platziert.



Abbildung 2: PLGA-Scaffolds zur Aushärtung, Durchmesser 5mm

4.2.3.2. Ermittlung des optimalen Beladungsvolumens

Zur Ermittlung des optimalen Beladungsvolumens der Scaffolds wurde Knochenmark in 5 μ l-Schritten auf bereits ausgehärtete Scaffolds aufgetropft und optisch bestimmt, ab welchem Volumen das Knochenmark nicht mehr von der Testoberfläche absorbiert wurde. Das Annäherungsverfahren ergab ein optimales Beladungsvolumen von 12 μ l.

4.2.3.3. Maximale Beladungskapazität der Scaffoldoberfläche

Zur Bestimmung der maximalen Beladungskapazität wurden PLGA-Scaffolds mit unterschiedlichem Aushärtegrad (15 min, 24 h) mit MSC und BMC beladen. Hierzu wurden Probekörperchen wie bereits beschrieben hergestellt und nach 15 min Aushärtezeit in einer 48-Well-Platte ausplattiert. Bereits am Vortag hergestellte Scaffolds wurden nach 24 h Aushärtezeit ebenfalls ausplattiert. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz (Tabelle 1).

Je 5 MSC- und BMC-Zellpopulationen wurden in Nährmedium resuspendiert und in aufsteigender Zellkonzentration in einem Beladungsvolumen von je 12 μ l mittels Pipette auf die Testoberflächen aufgebracht. Nach 30 min Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37°C und 100% Luftfeuchte wurden die mit Scaffolds besetzten Wells mit 300 μ l Nährmedium befüllt und für sieben Tage bei 37°C im Inkubationsschrank belassen.

Tabelle 1: Beladungsschema zur Bestimmung der maximalen Beladungskapazität in Abhängigkeit der Aushärtezeit; n=5

	MSC	MSC	BMC	BMC	MSC	MSC	BMC	BMC
4 x 10 ² Zellen/cm ²	X	X	X	X	X	X	X	X
2 x 10 ³ Zellen/cm ²	X	X	X	X	X	X	X	X
1 x 10 ⁴ Zellen/cm ²	X	X	X	X	X	X	X	X
4 x 10 ⁴ Zellen/cm ²	X	X	X	X	X	X	X	X
	15 min				24 h			

In einem weiteren Ansatz wurde die Entwicklung der Zelldichte auf der Scaffoldoberfläche im Zeitverlauf unabhängig vom Aushärtegrad bestimmt. Hierzu wurde BMAC isoliert und auf bereits ausgehärtete Scaffolds gegeben. Entsprechend dem geschilderten Procedere wurden die Ansätze mit Nährmedium befüllt und für sieben Tage inkubiert.

Ein vollständiger Mediumswechsel erfolgte an D4. An D1, D3 und D7 erfolgte eine Erfassung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Tests auf dem Scaffold und auf dem Wellboden zur annäherungsweise Bestimmung der Zelldichte und Zellaktivität. Die Bestimmung der Zellaktivität auf dem Wellboden dient dazu, das Ausmaß der Zellablösung vom Scaffold im Zeitverlauf zu bestimmen.

4.2.3.4. Fetales Kälberserum (FCS)-Vorbehandlung von PLGA-Scaffolds

Entgegen der hier geschilderten Aufbereitung der Scaffolds für die Versuche ist in den Angaben des Herstellers Locate ein Waschvorgang der PLGA-Scaffolds mit FCS-haltigem Medium beschrieben. Zur Erfassung des Einflusses einer FCS-Vorbehandlung auf die Zelladhäsion und Zellaktivität wurde die metabolische Aktivität von MSC auf der Scaffoldoberfläche nach Vorbehandlung mit FCS-haltigem Medium bestimmt.

Es wurde die Hälfte der Scaffolds zweimal je 1 min mit FCS-haltigem Nährmedium gewaschen, die andere Hälfte mit reinem DMEM + Glutamax. Anschließend wurden die Prüfkörper mit einer Pinzette für ein 15-minütiges Trockenintervall in eine 48-Well-Platte überführt.

Um den Nachweis vitaler Zellen auf der Scaffold-Oberfläche via Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurde eine Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) -Färbung der MSC mithilfe des CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. CFSE wird hierbei von intrazellulären Esterasen gespalten, was in einer unspezifischen Cytoplasma-Fluoreszenz resultiert. Das Nährmedium wurde entfernt und die adhären MSC in der Zellkulturflasche mittels Accutase gelöst. Für BMC entfiel dieser Schritt, da sie für den Versuch frisch aus Knochenmark isoliert wurden und suspendiert vorlagen. Die jeweilige Zellsorte wurde in einem Falconröhrchen mit der *loading solution*, bestehend aus CFSE-Stammlösung und DPBS +/- resuspendiert. Nach Inkubation bei 37°C und wiederholten Waschvorgängen wurde die *loading solution* entfernt, 300 µl Nährmedium eingefüllt, die Zellkonzentration eingestellt, Zellen auf den Scaffolds wie beschrieben ausgesät (Tabelle 1) und die Ansätze für sieben Tage bei 37°C im CO₂-Schrank inkubiert. Ein Mediumswechsel erfolgte am vierten Tag.

Die Zellen an D1, 3 und 7 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mittels Auszählung von 4-5 Gesichtsfeldern wurde die relative Zelldichte auf Scaffold sowie Wellboden bestimmt. Zur Bestimmung der Zellaktivität wurde ein MTT-Test durchgeführt.

4.2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Als Fluoreszenzmikroskop wurde das Axio Observer Z1 mit der Kamera AxioCam MRm (beide Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eingesetzt. Es wurden Mikroskopaufnahmen mit den Zeiss Filter-Sets # 10 und # 15 mit einer 5 x und 20 x Vergrößerung durchgeführt und mit der Software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) bearbeitet.

4.2.3.6. Darstellung der Degradation eines PLGA-Scaffolds in wässrigem Milieu mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zum Nachweis des Verhaltens der PLGA-Scaffolds in wässriger Lösung wurden Scaffolds in DPBS +/- über sieben Tage bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. An D1, 3 und 7 wurden je zwei Scaffolds aus der Lösung entnommen und in einem trockenen Well platziert. Nach vollständiger Austrocknung wurden die Scaffolds mit Gold bedampft und die Degradation in einem Hitachi SEM S4500 REM dokumentiert.

4.2.4. Physikalische und funktionelle Eigenschaften der PLGA-Membran

4.2.4.1. Biomechanik

Es wurden die Biegefestigkeit und Bruchsteifigkeit einer PLGA-Membran der Größe 22 x 10 x 2 mm analysiert. Die Membran wurde wie oben beschrieben hergestellt und für 24h trocken gelassen. Unter Verwendung einer *zwickiLine* Z5.0 Material-Prüfmaschine (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) wurde die Membran einem 3-Punkt-Belastungstest unterzogen. Der Stempel wurde hierbei mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,1 mm/s auf das Material abgesenkt und der auftretende Widerstand wurde durch eine hochsensitive Messsonde kontinuierlich aufgezeichnet. Mittels der Software testXpert® (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) wurde die maximale Kraft bis zum Bruch des Materials (=maximale Bruchlast, definiert als rapider Kraftabfall >50%) ermittelt. Anhand der Steigung im linearen Bereich der Kraft-Deformationskurve wurde zudem die Biegesteifigkeit des Materials ermittelt.⁸⁴

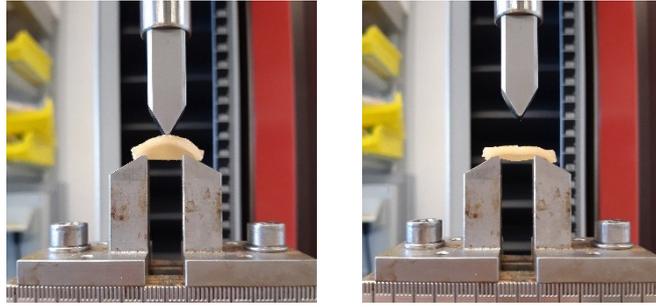


Abbildung 3: PLGA-Membran im Bruchtest, Membrandicke 2mm; links: Membran vor Kraftausübung, rechts: Membran nach Bruch

4.2.4.2. Diffusionskapazität für Chemokine

Zur Bestimmung der Diffusionseigenschaften der PLGA-Membranen wurde ein Diffusionstest mit den Peptidfaktoren *Stromal Derived Factor* CXCL12/SDF-1 α und *Monocyte Chemoattractant Protein* CCL2/MCP-1 durchgeführt. SDF-1 α umfasst 72 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 8,5 kDA, MCP-1 umfasst 99 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 11 kDA.

Es wurden PLGA-Membranen der bereits beschriebenen Größe mithilfe von *Dowsil* Silikon-Schutzbeschichtung mittig in das Well einer 12-Well-Platte eingepasst und an den Kontaktflächen vollständig versiegelt. Das Silikon wurde zur vollständigen Aushärtung 24h trocknen gelassen.

Zur Prüfung der Dichtigkeit der Membran an den Kontaktflächen wurde in beide Kompartimente gleichermaßen DPBS +/- eingefüllt, wobei eine Hälfte mit Methyleneblaulösung versetzt wurde. Mögliche Pegelunterschiede wurden ausgeglichen. Visuell zeigte sich nach 24h kein Eindringen des Farbstoffs in das zweite Kompartiment (Abbildung 4). Daher wurde dieses Verfahren angewendet, um die Diffusion von Chemokinen durch die PLGA-Membran zu untersuchen.

In eines der beiden mit 1 ml DPBS +/- gefüllten Kompartimente wurden die Chemokine SDF-1 α oder MCP-1 in einem Volumen von je 10 μ l mit einer Endkonzentration von 1×10^6 pg/ml gegeben. Als Negativkontrolle diente ein gekammertes Well, welches nicht mit Proteinen versetzt wurde, als Positivkontrolle ein Well ohne Kompartimentierung durch eine PLGA-Membran, befüllt mit 2 ml DPBS +/- sowie dem Chemokingemisch. Letzterer Ansatz simuliert den Konzentrationsausgleich des jeweiligen Chemokins bei vollständiger Diffusion in das zweite Kompartiment.

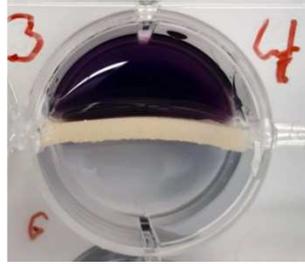


Abbildung 4: Überprüfung der Dichtigkeit. Das Well ist durch die PLGA-Membran in zwei Kompartimente getrennt. Ein Kompartiment wurde mit PBS-Lösung gefüllt, das andere Kompartiment wurde mit dem gleichen Volumen PBS/Methylenblau gefüllt. Es wurde für 24h beobachtet

Zu den Messzeitpunkten $T=1h$, $T=6h$, $T=24h$ und $T=72h$ wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ aus der peptidarmen Kammer entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch direktes Wiederauffüllen des Entnahmekompartiments mit $100\ \mu\text{L DPBS}$ -/- ausgeglichen zur Vermeidung eines hydrostatischer Druckgradienten. Die entnommenen Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Messung der diffundierten Peptidfaktoren wurden mit dem *Quantikine* ELISA Kit für SDF-1 α und MCP-1 durchgeführt. Hierzu wurden nach Herstellerangaben alle zu verwendenden Lösungen auf RT gebracht. $200\ \mu\text{l}$ der Proben sowie der Kontrollen wurde in die vorbereitete 96-Wellplatte gegeben, abgedeckt und für 2h bei RT inkubiert. Nach Aspiration und dreimaligem Waschen der Wells wurden $200\ \mu\text{l}$ in die Wells gegeben und gleichermaßen verschlossen und für 2 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und nach dreimaligem Waschen $200\ \mu\text{l}$ Substratlösung hinzugegeben. Nach lichtgeschützter Inkubation für 30 min bei RT wurde die Reaktion mit $50\ \mu\text{l}$ Stop-Lösung beendet und innerhalb von 30 min bei einer Wellenlänge von $450\ \text{nm}$ mit dem Infinite M200 Mikrotiterplatten-Lesegerät ausgewertet. Die Werte werden als Prozentanteil der Positivkontrolle angegeben.

4.2.5. Zellkulturen und Zellsuspension

4.2.5.1. Stromale Knochenmarkszellen

Zur Gewinnung von MSC wurden je 1-3 ml einer anonymisierten Knochenmarkprobe vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) verwendet.

Zur Isolation der MSC wurde die Probe 1:1 mit angewärmtem DPBS -/- verdünnt und anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll (1,077 g/ml) im Verhältnis 1:1 bei 800 g und RT für 25 min aufgetrennt. Der „buffy coat“, in welchem sich die mononukleären Zellen des Knochenmarks befinden⁵⁶, wurde mittels Pasteurpipette entnommen und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml angewärmtem DPBS -/- gewaschen und bei 600 g und RT für 8 min zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstands wurde das im Röhrchen verbleibende Zellpellet in 5 ml angewärmtem MesenCult + Supplements resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension in einem Eppendorf-Gefäß mit 20 µl Türcks-Lösung mithilfe des Vortexers gut durchmischt. Aus dem Gemisch wurden 10 µl entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Die Zellzahl wurde bestimmt anhand der Formel: Zellzahl/ml = Mittelwert der ausgezählten Quadrate x 10000 x Verdünnungsfaktor.

Nach Bestimmung der Zellzahl folgte die Kultivierung der Zellen zur Isolation von MSC (- 52 -4.2.5.4).

4.2.5.2. Mononukleäre Knochenmarkszellen

Die Gewinnung der BMC erfolgte entsprechend der Isolation von MSC ebenfalls aus anonymisiertem Knochenmark mit identischem Vorgehen, wie oben beschrieben. Nach der Dichtegradientenzentrifugation und Aufreinigung der Zellen wurde das Zellpellet mit 5 ml DMEM-Medium resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach oben beschriebener Methodik. Im Anschluss konnte die Zellsuspension direkt zur Anwendung auf dem Versuchsmaterial ohne weitere Kultivierung verwendet werden.

4.2.5.3. Aufkonzentriertes Knochenmarksaspirat

Anonymisierte Knochenmarksaspirate aus dem Blutspendedienst des DRK wurden 1,5 ml 600 g und RT für 10 min zentrifugiert. Das Volumen des rötlich gefärbten hämolytischen Überstandes und des Zellpellets wurden bestimmt und der Konzentrierungsfaktor berechnet. Im Mittel zeigte sich das BMAC-Pellet um

den Faktor 3 gegenüber dem Ausgangsmaterial aufkonzentriert. Anschließend wurde das BMAC-Pellet in DMEM-Medium resuspendiert. Es folgte eine Zellzahlbestimmung. Bei hoher Zellzahl war eine starke Verdünnung des Zellpellets um mindestens Faktor 20 notwendig.

4.2.5.4. Methoden der Zellkultivierung

Die in Selektionsmedium Mesencult + Supplements suspendierten BMC wurden mit einer Dichte von 2×10^6 BMC/25cm² und einem Suspensionsvolumen von 5 ml in einer 25cm² Zellkulturflasche ausgesät und im CO₂-Inkubator bei 37°C kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Mittels regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle konnten der Selektionsprozess und das Wachstum der Zellpopulation beobachtet werden. Das Passagieren der Zellkultur erfolgte bei einem Zellkonfluenz von etwa 80%.

Dazu wurden die Zellen mit 5ml angewärmtem DPBS +/- für 5 min inkubiert und gewaschen. Nach dem Absaugen des DPBS +/- wurde die Zellkultur mit 3 ml Accutase (Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen) bedeckt und für weitere 10 min zur Lösung der am Flaschenboden adhären MSC inkubiert.

Die proteolytische Wirkung der Accutase wurde mit Mesencult + Supplements im Verhältnis 1:1 abgestoppt. Die vollständige Ablösung und Suspension der Zellen im Medium wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Ruckeln an der Zellkulturflasche sowie vorsichtigem Spülen des Flaschenbodens herbeigeführt. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 600 g RT für 8 min zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in angewärmtem Nährmedium resuspendiert und mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/25cm² in einer 75cm² Zellkulturflasche ausplattiert. Die Zellexpansion wurde wiederholt, bis die benötigte Zellmenge erreicht wurde. Überzählige Zellkulturen wurden zur späteren Verwendung kryokonserviert.

Für die Verwendung der MSC im Versuch wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend die Zellsuspension auf die benötigte Zellkonzentration aufkonzentriert oder verdünnt und auf das Versuchsmaterial

aufgetragen. Dazu wurde die Formel „Zellkonzentration= Zellzahl/Volumen des Mediums ($c = N/V$)“ angewandt.

4.2.5.5. Kryokonservierung und Auftauen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie beschrieben aus den Zellkulturflaschen abgelöst und mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/500 μ l in einem Gefriermedium aus 90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig im Wasserbad bei 37°C. Die Zellen wurde sofort in ein 15 ml Falkon-Röhrchen überführt und mit 10 ml nicht vorgewärmtem MesenCult + Supplements bei 500 g und RT für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben in Kultur genommen. Hierzu wurde eine der Zellzahl angemessene Zellkulturflasche gewählt.

Die Zellen wurden einige Tage vor Versuchsbeginn aufgetaut, um ein angemessenes Zellwachstum in der Flasche und Zellaktivität zu gewährleisten.

4.2.5.6. Herstellung eines osteogenen Differenzierungsmediums

Zur Herstellung des Kontrollmediums (KM) wurden 434 ml DMEM + GlutaMax mit 50 ml FCS im Verhältnis 10:1 gemischt und mit 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Durch Zugabe von β -Glycerophosphat [Endkonzentration 10 mM], Ascorbinsäure [Endkonzentration 50 μ M] und Dexamethason [Endkonzentration 10 nM] wurde ein standardmäßig verwendetes OD hergestellt.^{43,78}

4.2.6. Zellfunktion auf der Scaffoldoberfläche

4.2.6.1. Langzeitüberleben, Zellaktivität und osteogene Differenzierung von MSC und BMC auf PLGA

Zur Bestimmung des Langzeitüberlebens, der Zellaktivität und der osteogenen Differenzierung wurden je 5 MSC- und 5 BMC-Zellkulturen wie beschrieben aufbereitet. Vollständig ausgehärtete Scaffolds wurden in einer 48-Well-Platte

vorgelegt und mit einer Zellkonzentration von 50.000 Zellen/12 µl beladen. Dies entspricht einer Dichte von 10.000 Zellen/cm². Der Versuch erfolgte im Doppelansatz. Es wurde je eine Hälfte des Ansatzes mit KM, die andere Hälfte mit OD kultiviert. Pro Messzeitpunkt an D1, 7 und 14 wurde je eine Wellplatte besetzt. BMC und MSC wurden nach dem gleichen Schema angesetzt.

Die Analyse der ALP-Aktivität erfolgte an D7 und 14. Die Alizarin-Rot-Färbung (ARF) wurde an D14 durchgeführt. In Tabelle 2 ist der schematische Versuchsaufbau unabhängig der Messzeitpunkte dargestellt.

Tabelle 2: Beladungsschema Langzeitüberleben von MSC und BMC; Genex. = Genexpression, ALP = Alkalische Phosphatase, ARF = Alizarin-Rot-Färbung, KM = Kontrollmedium

	MTT		Genex.		ALP		ARF	
OD	X		X		X		X	
OD	X		X		X		X	
KM	X		X		X		X	
KM	X		X		X		X	

Die Beladung der Scaffolds erfolgte unter Zuhilfenahme eines Vortexers zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Zellverteilung in der Zellsuspension. Die beladenen Scaffolds wurden nach 30 min Latenzzeit bei 37°C und 100% Luftfeuchte im CO₂-Inkubator mit 300 µl angewärmtem Kontrollmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium umgeben. Die Platten wurden für 14 Tage bei 37°C im CO₂-Schrank inkubiert. Es wurden adhärenente Zellen auf dem Scaffold und auf dem Wellboden untersucht. Vollständige Mediumswechsel fanden an D4, 7 und 11 statt.

4.2.6.2. MTT-Test

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde ein MTT-Test durchgeführt. So können Rückschlüsse auf das Zellüberleben und Zellwachstum geschlossen werden.⁸⁵ Hierzu wurde das *Cell Proliferation* Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden dazu nach Herstelleranleitung mit dem gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) behandelt, welcher von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen in blau-violette, wasserunlösliche Formazankristalle umgewandelt wird. Dieser Prozess ist mittels photometrischer Analyse quantifizierbar.

Das Nährmedium wurde zunächst aus den Wells entfernt und die mit Zellen beladenen Scaffolds mithilfe einer Pinzette in eine 96-Well-Platte umgesetzt. Die Wells wurden mit 100 µl Nährmedium und 10 µl MTT-labeling-Reagenz befüllt. Die leeren Wells der 48-Well-Platte wurden ebenfalls mit 200 µl Nährmedium und 20 µl MTT-labeling-Reagenz befüllt, um adhärente Zellen auf dem Wellboden zu erfassen, die sich im Laufe der Inkubation vom Scaffold gelöst haben.

Gemäß Herstellerangaben wurden die Platten 4h bei 37°C im CO₂-Inkubator belassen. Nach 4h wurde die Reaktion mittels 100 µl bzw. 200 µl Solubilisierungspuffer gestoppt und die Platten für weitere 24h inkubiert.

Nach 24h wurden jedem Ansatz jeweils 100 µl entnommen und in einer weiteren 96-Well-Platte mittels Infinite M200 Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 570 nm gemessen.

4.2.7. Vollblutstimulationstest zur Analyse der immunologischen Signatur

Um spezifische Unterschiede der immunologischen Signatur verschiedener Materialien zu erfassen, wurden PLGA-Scaffolds mit Herafill Knochenzement-Granulat (Heraeus, Hanau, Deutschland, Durchmesser: 3-5 mm) und Palacos-Scaffolds (Heraeus, Hanau, Deutschland, Durchmesser: 5 mm) verglichen. Als Negativkontrolle diente ein Standardmedium (DMEM), als Positivkontrolle LPS von *Escherichia coli* in DMEM (Tabelle 3).

Die Testkörper mit einem näherungsweise Volumen von 100 µL wurden in 500 µL Medium gegeben und mit jeweils 1,5 ml heparinisiertem Blut gesunder Spender (n=3, Tabelle 4) versetzt.

Table 3: Vergleichsmaterialien/-substanzen

Nr.	Material/Substanz
1	Kontrolle (nur Medium)
2	LPS (10µg/mL, Positivkontrolle)
3	PLGA
4	Herafill
5	Palacos

Table 4: Vollblutentnahme bei gesunden Probanden, n=3

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	Männlich	37
2	Weiblich	26
3	Männlich	50

Die Ansätze wurden für 24h bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 4°C und 800 g für 15 min zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bis zur Analyse bei -80°C in Kryoröhrchen gelagert. Für den semiquantitativen Nachweis der Proteine im Überstand wurde das *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet.

Nach Anweisung des Herstellers wurden alle Komponenten auf RT gebracht und vorbereitet. Pro Probanden wurden jeweils fünf Analyse-Membranen (1 pro Testmaterial/-substanz) verwendet. Die Membranen wurden ausschließlich mit einer stumpfen Pinzette und Handschuhen bewegt.

Die Profiler-Membranen wurden mit dem Array Puffer 6 als Blockpuffer in einer 4-Wellplatte für 1h bei RT auf einem Schüttelgerät inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der verdünnten Serumprobe eines Probanden bei geschlossenem Well-Deckel für 24h bei 4°C inkubiert.

Nach 24h wurde die Membran dreimal für 10 min mit 20 ml Waschpuffer in einem sauberen Glasgefäß auf dem Schüttelgerät gewaschen und nachfolgend mit 1,5 ml *Detection Antibody Cocktail* in einem gereinigten und trockenen Well für 1h bei RT auf dem Schüttelgerät inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran in ein Gemisch aus Streptavidin-HRP und Array Puffer 6 überführt, für 30 min bei RT auf dem Schüttelgerät inkubiert und erneut gewaschen.

Die behandelte Membran wurde mithilfe eines Papiertuchs getrocknet und auf eine transparente Folie gegeben. Auf die Membran wurde der im Kit befindliche *Chemie Reagent Mix* pipettiert, die Membranoberfläche mit der übrigen Hälfte der transparenten Folie bedeckt und blasenfrei glattgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 1 min konnte das überschüssige Reagenz mithilfe eines Papiertuchs vorsichtig herausgestrichen und die Membran mit den Überständen der transparenten Folie vollständig umhüllt werden.

Es folgte die Belichtung und Entwicklung der Membran mit dem Fusion Fx7 Gel Scanner (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland). Nach Empfehlung des Herstellers wurde eine Belichtungszeit von 1-10 min mit mehrfacher Wiederholung durchgeführt.

Die Auswertung der Spots auf der entwickelten Membran erfolgte mittels ImageJ (Bestimmung der Intensität: Größe in Pixel x mittlerer Grauwert).

Aufgrund der starken Varianz der Intensität der Detektionspunkte auf der Membran erfolgte die Analyse der Grauwerte in zwei Schritten, wobei im zweiten Schritt die schwachen Punkte isoliert betrachtet wurden. Die nachgewiesene Proteinkonzentration wurde über die Verrechnung der ausgegebenen Fläche und der korrelierenden Grauintensität quantifiziert und in Relation zu den Kontrollspots gesetzt.

4.2.8. Nachweis der osteogenen Differenzierung

4.2.8.1. Molekularbiologische Untersuchung der Osteogenese

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung von MSC auf der Scaffoldoberfläche bzw. auf dem Wellboden wurden die osteogenen Marker BMP-2, COL1A1, RUNX2, Osteocalcin (BGLAP) und Osteonectin (SPARC) auf der Genexpressionsebene analysiert.^{41,43} Als interne Kontrolle wurde die Expression des *housekeeping*-Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH) untersucht. Weitere exprimierte Gene wie VEGF (proangiogen), IL-6 und IL-8 (proinflammatorisch) wurden zur Charakterisierung der langfristigen Immunreaktion auf den PLGA-Scaffold bestimmt.³⁷

4.2.8.1.1. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das *Fast Gene RNA Basic* Kit (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland) verwendet. Vor Anwendung wurde der RNA-Lysepuffer (RL) nach Anweisung des Herstellers mit 2-Mercaptoethanol versetzt.

Das Nährmedium wurde entfernt und die Scaffolds mit 350 µl Puffer RL (RT) auf einem Schüttelgerät inkubiert. Das in Puffer RL gelöste Zelllysate wurde unter gründlichem Spülen des Scaffolds mittels Pipette entnommen und nach DNA-Scherung mithilfe einer Insulinspritze (26G) zur Vermeidung von störender cDNA in einem Kryoröhrchen bei -80°C bis zur Analyse eingefroren.

Zur Analyse wurde das aufgetaute Zelllysate nach dem Verfahrensprotokoll des *Fast Gene RNA Basic* Kit auf die cDNA-Erststrang-Synthese vorbereitet. Alle Reagenzien wurden bei RT unter nicht sterilen Bedingungen an einem gut belüfteten Arbeitsplatz verwendet.

Das aufgetaute Zellgemisch wurde mit 70%igem Ethanol verdünnt und in einem Filtergefäß bei 7800 g bei RT für 1 min zentrifugiert. Die an die Filtermembran gebundene RNA wurde schrittweise mit Puffer RW1 und RW2 zentrifugiert und so entmineralisiert und von Proteinen befreit. Der Überstand wurde regelmäßig verworfen. Nach einer Trocknungsphase der Filtermembran in der Zentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (13000 g) bei RT für 1 min wurde die RNA mittels Elutionspuffer von der Membran gelöst und in ein zweites Filterröhrchen überführt.

Zum DNA-Verdau wurde 10x DNase I-Reaktionspuffer und Dnase I zu dem RNA-Lysat hinzugegeben und vollständig homogenisiert für 10 min bei RT inkubiert. Nach Resuspension des Verdau-Ansatzes in RBD-Puffer wurde die RNA auf einer gekühlten Filtermembran durch Zentrifugation fixiert. Es erfolgte ein zweiter Waschvorgang mit RW2-Puffer sowie eine Trocknungsphase bei 13000 g für 1 min bei RT.

Die aufgereinigte RNA wurde in 20 µl Elutionspuffer aus der Filtermembran gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoVue 4282 V2.0.4 Spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, USA) ermittelt.

4.2.8.1.2. cDNA-Synthese

Die Vervielfältigung der Erststrang-cDNA wurde mittels *FastGene Scriptase II cDNA Synthesis* Kit (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland) durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde in einer für alle Proben gleich definierten Konzentration und Menge mit 1 µl oligo-dT-Primer und 2 µl dNTP versetzt und mit Aqua_{dest.} auf 12,5 µl aufgefüllt. Nach der initialen Denaturierung für 5 min bei 65°C wurden dem Gemisch auf Eis 4 µl FastGene Scriptase II Puffer, 2 µl 0,1M DTT und 0,5 µl Rnase Inhibitor zugesetzt.

Nach Inkubation bei 42°C für 2 min und anschließender Lagerung auf Eis erfolgte die Hinzugabe von 1 µl FastGene Scriptase II. Zur cDNA-Amplifikation wurde das Gemisch bei 42°C für 50 min inkubiert. Die vollständige Enzymdeaktivierung wurde durch weitere Inkubation bei 70°C für 15 min erreicht. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.2.8.1.3. Polymerisation der cDNA

Die Polymerisation der cDNA wurde mittels Reverse Transkriptase quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Unter Verwendung der *RT²qPCR Primer Assays* für BMP-2, COL1A1, RUNX-2, BGLAP und SPARC für VEGF-A, IL-6 und IL-8 wurden die Genexpressionslevel bestimmt und in Relation zur Expression von GAPDH (*housekeeping-Gen*) unter Verwendung der Δ cT-Methode gesetzt.

Die RT-qPCR wurde mit dem *RT² SYBR Green qPCR Mastermix* Kit durchgeführt. Der Mastermix wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit der mit Aqua_{dest.} verdünnten cDNA im Verhältnis 4:1 auf einer vorgekühlten Metall-Wellplatte gemischt. Die RTqPCR erfolgte unter Verwendung des folgenden Thermalprofils: 1x 10 min bei 95°C, 40x 15 sec 95°C und 1 min 60°C. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

4.2.8.2. Direkter Nachweis osteogener Matrix und Enzyme

4.2.8.2.1. Alizarin-Rot-Färbung (ARF)

Ein später Marker osteogener Differenzierung ist der Nachweis von Calciumablagerungen als Zeichen der beginnenden Mineralisierung.⁷¹ Ein visueller Nachweis der Kalziumablagerungen gelingt mit dem Anthrachinon-Derivat Alizarin-Rot-S, welches durch Chelatbildung mit Calcium-Ionen rötliche Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe bildet. Die rötliche Verfärbung gibt Hinweise auf osteogene Aktivität der Zellen auf den Scaffolds.⁶⁴

Das Nährmedium wurde gründlich abgesaugt. Zur Fixierung der Zellen auf dem Scaffold wurde dieser für 30s in 350 µl Formaldehyd-Lösung 2% inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung entfernt und der Zellrasen dreimal gründlich mit Aqua_{dest.} gespült. Die Scaffolds wurden mit 350 µl des eigens angesetzten Alizarin-Rot-Farbstoffs in Lösung [Endkonzentration: 10 mg/ml] bedeckt und lichtgeschützt bei RT für 15 min inkubiert.

Nach 15 min wurde die Färbelösung entfernt und der Scaffold gründlich mit Aqua_{dest.} gespült. Zum Trocknen wurden die Scaffolds im Well bei halb geöffnetem Plattendeckel in einem lichtgeschützten Schrank platziert.

Nach vollständiger Austrocknung wurden die Scaffolds unter identischen Lichtbedingungen und Kameraeinstellungen fotografiert. Die Quantifizierung der Mineralisierung erfolgte durch elektronische Auswertung der Intensität des Rotkanals mittels Photoshop CS4 (Adobe) an fünf randomisiert ausgewählten Stellen auf der Scaffoldoberfläche als Mittelwert einer 11x11 Pixel Matrix.

4.2.8.2.2. Alkalische Posphatase-Aktivitäts-Test

Das Enzym ALP ist unter anderem am Knochenstoffwechsel beteiligt und stellt einen RUNX2-abhängigen frühen Marker der Osteogenese und osteogenen Differenzierung dar.⁷³ Sie lässt Rückschlüsse auf die Aktivität von osteogen differenzierten Zellen zu.⁶⁴ Zur Quantifizierung der ALP wurde das *Alkaline Phosphatase Assay Kit* (Colorimetric) (abcam, Cambridge, UK) verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur

gebracht. Die ALP-Lösung wurde zur Verzögerung der enzymatischen Aktivität auf Eis gelagert.

Das Nährmedium aus den Wellplatten wurde entfernt und die mit Zellen beladenen Scaffolds mithilfe einer sterilen Pinzette in eine 96-Well-Platte überführt. Zur Lyse der Zellen und Freisetzung der in den intrazellulär vorhandenen ALP wurden 100 µl CellLytic M – Puffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) für 10 min mit den Scaffolds auf dem Schüttelgerät bei RT inkubiert.

Nach mehrfacher Spülung der Scaffolds mit dem Zellysat wurden je 50 µl des Zellysats in ein separates Well überführt. Nach Anleitung wurden die Proben mit ALP Assay Puffer aufgefüllt und homogenisiert. Zu dem Gemisch wurde nun je 50 µl para-Nitrophenylphosphat-Lösung (pNPP) hinzugegeben und homogenisiert.

Die Erstellung einer Standardreihe erfolgte nach Anleitung mit einer 1mM pNPP-Standardlösung. Anschließend wurde zeitgleich der Standardreihe 10 µl ALP sowie dem Zellysat pNPP-Substrat hinzugefügt. Nach 60 min Inkubation lichtgeschützt bei RT erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit jeweils 20 µl *Stopping Solution*. Die ALP-Aktivität wurde anschließend im Infinite M200 Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgewertet.

4.2.9. Statistik

Zur statistischen Auswertung aller Messergebnisse wurde ein nach Bonferroni-Holm korrigierter Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Werte mit $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant angesehen. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der Alizarin-Rot-Färbung wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet.

Die Ausführung der Tests erfolgte mit BiAS. für Windows, Version 11.05 (Epsilon-Verlag, Darmstadt, Deutschland).

5. Ergebnisse

5.1. Physikalische Eigenschaften der PLGA-Membran

5.1.1. Biomechanische Eigenschaften im Bruchtest

Die maximale Bruchlast der Probenkörper lag in einem Bereich von 1,5 bis 4,8 N, der Mittelwert betrug $3,1 \text{ N} \pm 1,1$ (SD), der Median betrug 3,5 N.

Die Biegesteifigkeit unterlag einem größeren Schwankungsbereich (0,35 N/mm bis 6,4 N/mm), der Mittelwert betrug $3,4 \text{ N/mm} \pm 1,7$ (SD), der Median 3,9 N/mm.

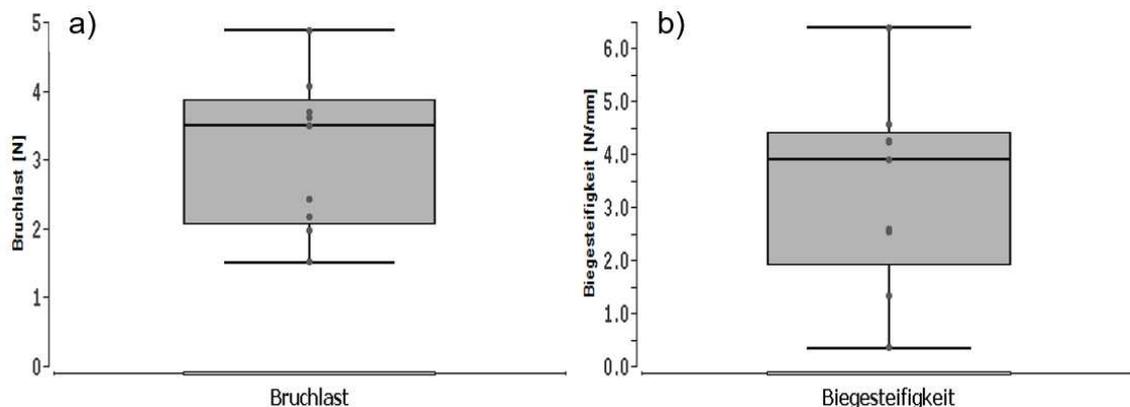


Abbildung 5: a) Bruchlast und b) Biegesteifigkeit der PLGA-Membran im 3-Punkt-Biegeversuch.

5.1.2. Diffusionskapazität der PLGA-Membran für Chemokine

Es konnte eine stetige signifikante Zunahme der SDF-1 α - bzw. MCP-1-Konzentration im 2. Kompartiment im Zeitverlauf gemessen werden. Bereits innerhalb der ersten Stunde diffundierten ca. 15% (SDF-1 α) bzw. 33% (MCP-1) in das 2. Kompartiment, nach 6h ca. 50% beider Chemokine (100% = max. nachweisbares Peptid in der Positivkontrolle). Weitergehende Analysen unter Einbeziehung der Positivkontrolle ergaben, dass nach 72h der Konzentrationsausgleich zwischen 1. und 2. Kompartiment über die PLGA-Membran stattgefunden hat.

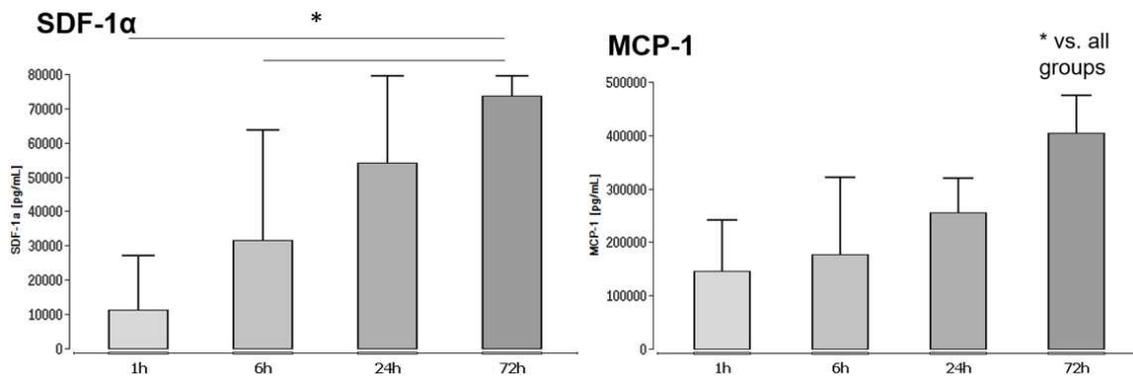


Abbildung 6: Diffusionstest mit den Chemokinen SDF-1 α und MCP-1. Ausgangskonzentration: 1 μ g/mL; n=5/Zeitpunkt. * = signifikant im Vergleich zu allen Gruppen oder durch Strich angezeigt.

5.1.3. Resorption des Scaffolds in wässriger Lösung

Es zeigten sich insbesondere an D7 deutliche Änderungen der Oberflächenstruktur. Die Anzahl an Poren stieg um den Faktor 2,4 an (Abbildung 7). Darüber hinaus wirken die Oberflächenstrukturen kleinteiliger an D7 im Vergleich zu D1 (Abbildung 8a). Abbildung 8b zeigt hochaufgelöste Ansichten (200-fache Vergrößerung) der Probenkörpermitte im Verlauf der Inkubation. Deutlich ist der Materialverlust im Zeitverlauf zu erkennen: Während an D1 und D3 die Oberfläche der Probenkörper geschlossen ist, sind an D7 tiefe, durchgängige Poren zu verzeichnen. Auch scheinen die Höhenunterschiede auf dem Probenkörper an D7 deutlicher ausgeprägt zu sein.

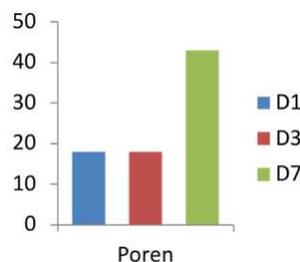


Abbildung 7: Anzahl der sichtbaren Poren im REM nach 1,3 und 7 Tagen in wässrigem Milieu.

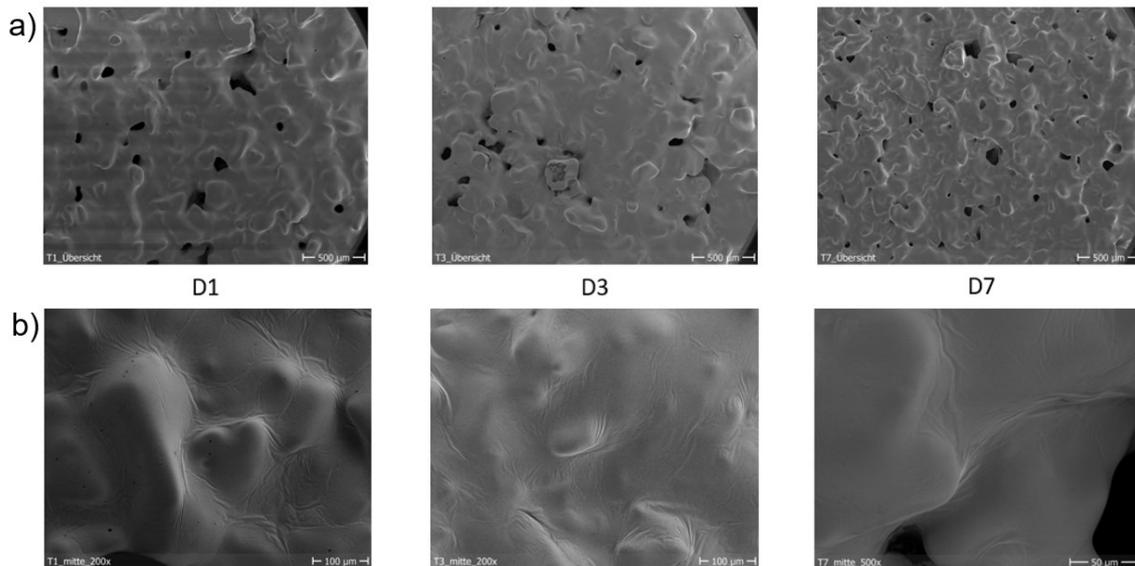


Abbildung 8: Detaillierte Scaffoldansicht nach Inkubation in wässrigem Milieu (PBS) für die angegebenen Zeitpunkte. a) Übersicht, b) 200x/500x Vergrößerung.

5.2. Maximale Beladungskapazität der PLGA-Scaffolds

5.2.1. Beladungskapazität mit MSC

Mit steigender Konzentrationsstufe konnte eine signifikante Zunahme adhärerender MSC gemessen werden. Für das frisch angesetzte Scaffold (15 min) konnte ein signifikanter Anstieg adhärerender MSC ausgehend von den ersten zwei Konzentrationsstufen (400, 2000 MSC) gegenüber der höchsten Konzentrationsstufe (40.000 MSC) berechnet werden. Für die Konzentrationsstufe 10.000 MSC wurde das Signifikanzniveau nur beinahe erreicht ($p=0,054$). Wurde das Scaffold vor Zellaussaat mindestens 24h getrocknet, so wurde ebenfalls eine signifikante Zunahme adhärerender MSC ausgehend von den ersten zwei Konzentrationsstufen (400, 2000 MSC) gegenüber der höchsten Konzentrationsstufe (40.000 MSC) verzeichnet. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Zellbeladung zwischen Scaffolds, die nach 15 min beladen wurden, und Scaffolds, die nach 24h Trocknungszeit mit Zellen besiedelt wurden.

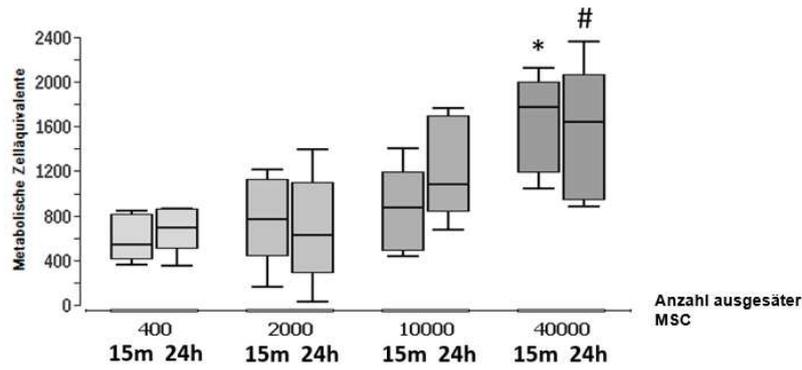


Abbildung 9: Ermittlung der MSC-Zellbeladungskapazität mittels MTT-Tests. „15m“=15 min Trocknungszeit, „24h“=24h Trocknungszeit. N=5. * = $p < 0,05$ vs. 400, 2000 MSC; # = $p < 0,05$ vs. 400, 2000 MSC.

5.2.2. Beladungskapazität mit BMC

Es konnte eine Zunahme adhärerender BMC bei der höchsten Konzentrationsstufe im Vergleich zu den geringeren Zelldosierungen gemessen werden. Diese Zunahme war nur signifikant bei Verwendung der frisch angesetzten Scaffolds (15 min). Es ist jedoch festzuhalten, dass die Anzahl adhärerender BMC auf den Scaffolds nach 24h Trocknungsphase in allen Konzentrationsstufen deutlich (signifikant für die Gruppen 400, 2000, 10.000 BMC) gegenüber den korrespondierenden 15 min-Gruppen erhöht waren.

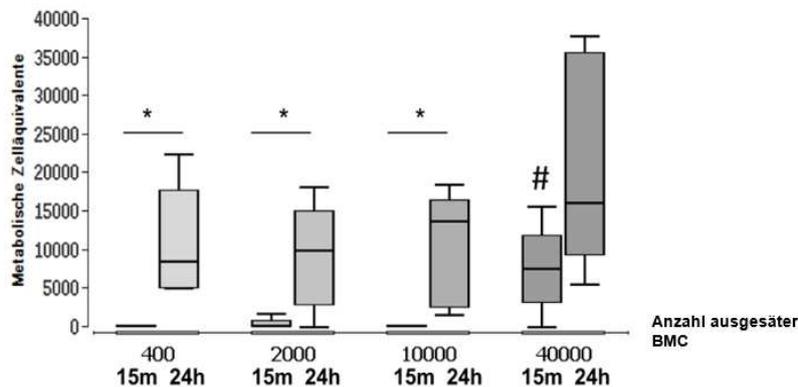


Abbildung 10: Ermittlung der BMC-Zellbeladungskapazität mittels MTT-Tests. „15m“=15 min Trocknungszeit, „24h“=24h Trocknungszeit. N=5. # = $p < 0,05$ vs. 400, 2000, 10000 BMC.

5.2.3. Metabolische Aktivität von BMAC auf dem PLGA-Scaffold und dem Kulturgefäßboden

Auf den Scaffolds ist eine stetige Aktivitätsabnahme über den Beobachtungszeitraum zu verzeichnen, die jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Die metabolische Aktivität des BMAC auf dem Boden des Zellkulturgefäßes sank von D1 zu D3 leicht ab und blieb konstant bis D7, ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Insgesamt wurde eine sehr hohe Zellaktivität gemessen im Vergleich zu BMC und MSC.

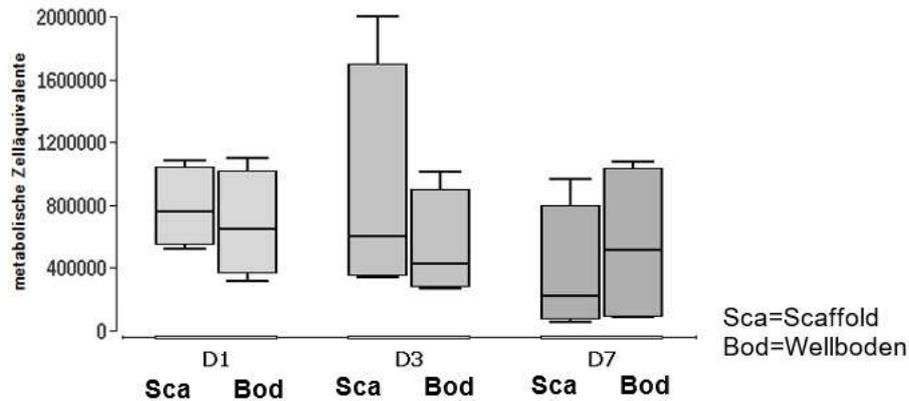


Abbildung 11: Zelläquivalente, bestimmt über die metabolische Aktivität via MTT-Test für BMAC. Es wurden BMAC auf dem Scaffold (Sca) und auf dem Well-Boden (Bod) getrennt untersucht.

5.3. Einfluss der FCS-Vorbehandlung auf Zelladhärenz und metabolische Aktivität auf PLGA-Scaffolds

5.3.1. MSC-Zellzahl und -morphologie im Zeitverlauf

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von CFSE-gefärbten MSC ergab eine signifikante Zunahme der Dichte adhärierender MSC auf Scaffolds, die mit FCS-haltigem Medium behandelt wurden im Vergleich zu nicht vorbehandelten Scaffolds (n=3). Dies war signifikant für die Kultivierungstage D1 und D3. Die Zelldichte auf FCS-behandelten Scaffolds nahm jedoch zu D7 ab (Trend gegenüber Tag 3).

Generell waren die erzielten Werte der Messung des Wellbodens (n=3) um ein Mehrfaches gegenüber den Werten auf den Scaffolds erhöht. Auch hier zeigte sich eine erhöhte Zelldichte bei FCS-vorbehandelten Scaffolds (nur Tag 1 signifikant). Im Verlauf zu Tag 7 war ein signifikanter Rückgang der Werte zu verzeichnen.

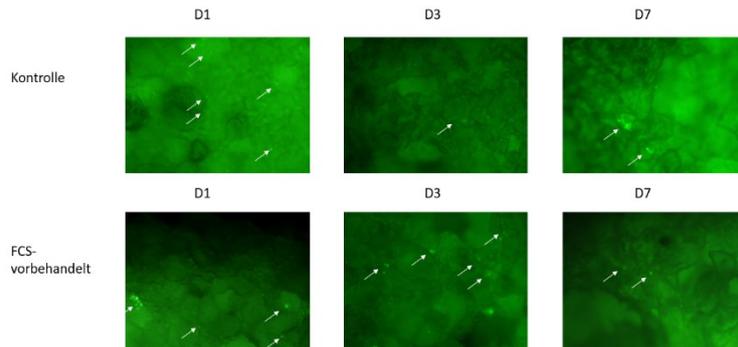


Abbildung 12: CFSE-gefärbte MSC (weiße Pfeile) auf Scaffolds im Zeitverlauf, Vergrößerung 100x.

5.3.2. Metabolische Aktivität CFSE-gefärbter MSC auf dem Scaffold

Dargestellt ist die metabolische Aktivität CFSE-gefärbter MSC auf PLGA-Scaffolds im Zeitverlauf in Abhängigkeit von der Scaffoldvorbehandlung (gewaschen mit Medium ohne FCS=Kon, gewaschen mit FCS-haltigem Medium=FCS, n=3). Die metabolische Aktivität war an D1 auf FCS-vorbehandelten Scaffolds erhöht, jedoch ohne Signifikanz. Im Verlauf (D3, D7) kommt es bei Kontroll- und FCS-vorbehandelten Scaffolds zu einem signifikanten Rückgang der metabolischen Aktivität.

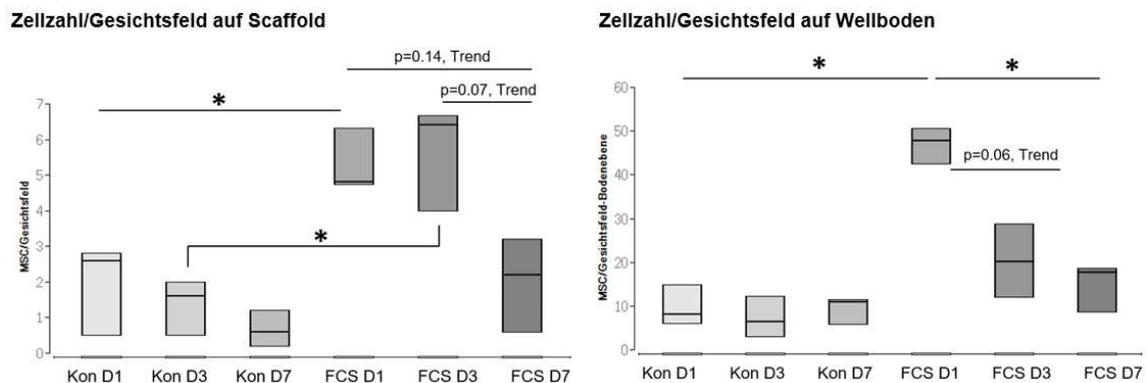


Abbildung 13: Metabolische Aktivität CFSE-gefärbter MSC auf nativen oder auf FCS-vorbehandelten Scaffolds. Der MTT-Test wurde an Tag 1, 3 und 7 (D1, D3, D7) durchgeführt. * = $p < 0,05$ vs. D1.

5.4. Zellüberleben auf der Scaffoldoberfläche nach zwei Wochen

5.4.1. Metabolische Aktivität von MSC auf dem Scaffold und am Kulturgefäßboden

Es konnte eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität adhärerender MSC auf dem Wellboden im Zeitverlauf sowohl unter Kontrollbedingungen als

auch unter osteogenen Bedingungen verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität adhärerender MSC auf den Scaffolds. Es konnten keine Signifikanzen zwischen Kontroll- und osteogenen Kulturbedingungen an den jeweiligen Untersuchungstagen gefunden werden. Dagegen zeigten MSC auf dem Wellboden eine Aktivitätssteigerung.

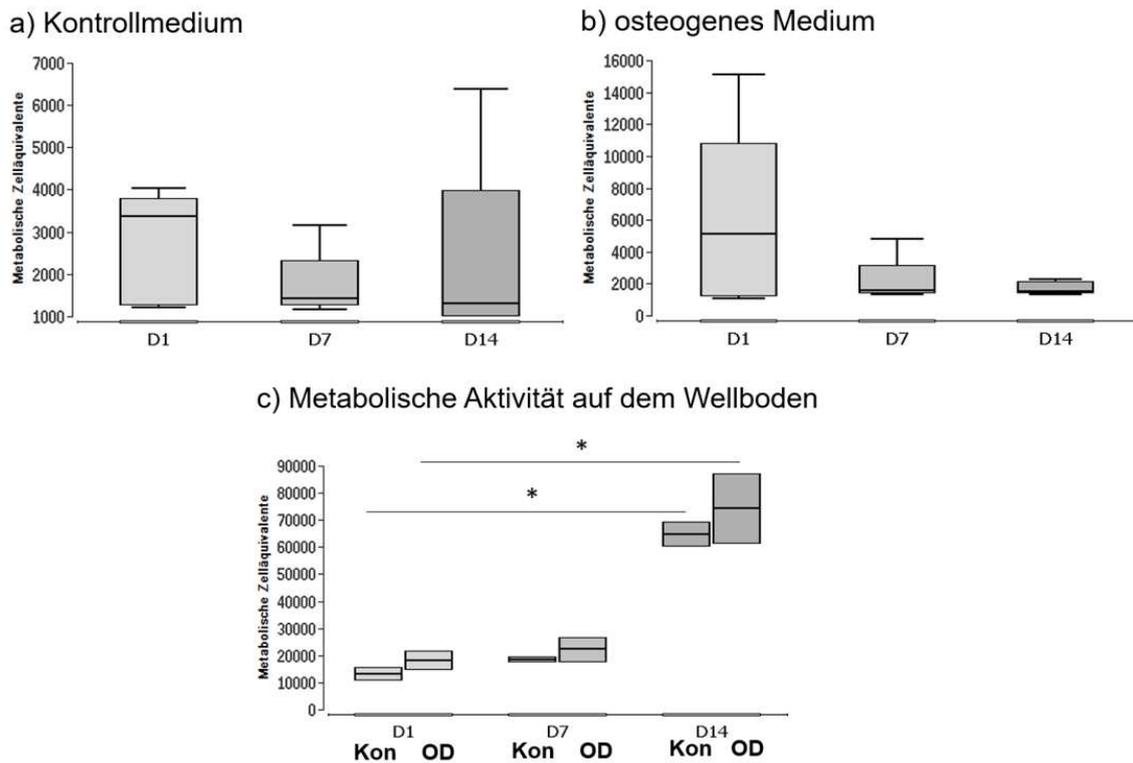


Abbildung 14: Metabolische Aktivität von MSC am Scaffold nach Inkubation in a) Kontrollmedium (Kon), b) osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für 14 Tage und auf dem c) Wellboden. Die metabolische Aktivität wurde an D1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf (Bonferroni-Holm korrigierter Kruskal-Wallis-Test). * = signifikant gegenüber allen Gruppen oder durch Strich angezeigt. Mittelwerte +/- SD, n=3.

5.4.2. Metabolische Aktivität von BMC auf dem Scaffold

Es konnte eine Abnahme der metabolischen Aktivität adhärerender BMC auf den Scaffolds im Zeitverlauf sowohl unter Kontrollbedingungen (signifikant) als auch unter osteogenen Bedingungen (statistischer Trend), verzeichnet werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und osteogenen Kulturbedingungen an den jeweiligen Untersuchungstagen gemessen werden.

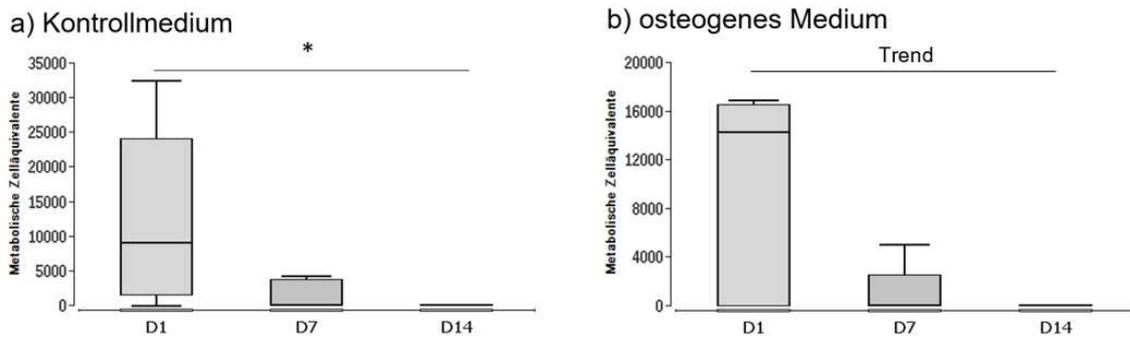


Abbildung 15: Metabolische Aktivität von BMC am Scaffold nach Inkubation in a) Kontrollmedium (Kon) oder b) osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für insgesamt 14 Tage. Die metabolische Aktivität wurde an D1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. * = $p < 0,05$ D1 vs. D14. N=5.

5.4.3. Metabolische Aktivität von BMC auf dem Kulturgefäßboden

Es konnte eine Zunahme der metabolischen Aktivität adhärerender BMC auf dem Wellboden im Zeitverlauf sowohl unter Kontrollbedingungen (statistischer Trend D1 vs. D7) als auch unter osteogenen Bedingungen (statistischer Trend D1 vs. D7) verzeichnet werden. Es konnten keine Signifikanzen zwischen Kontroll- und osteogenen Kulturbedingungen an den jeweiligen Untersuchungstagen gefunden werden.

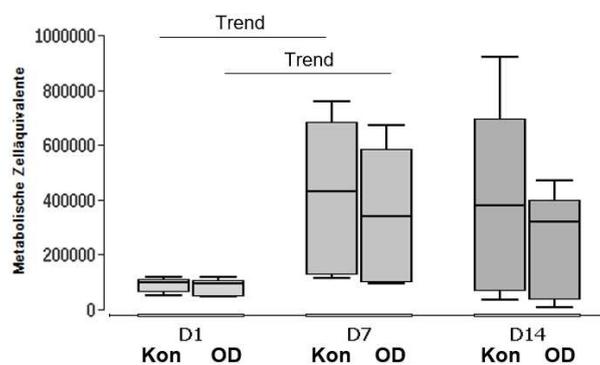


Abbildung 16: Metabolische Aktivität von BMC am Wellboden. Die Inkubation erfolgte entweder in Kontrollmedium (Kon) oder in osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für insgesamt 14 Tage. Die metabolische Aktivität wurde an Tag 1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. N=5.

5.5. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf das inflammatorische Potential von MSC und BMC

5.5.1. IL-6- und IL-8-Genexpression

Für die MSC-Reihen ließ sich bis D7 eine IL-6 Genexpression auf sehr niedrigem Niveau nachweisen. IL-8 wurde verstärkt exprimiert, jedoch mit großer Varianz.

Bei den BMC zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine nachweisbare IL-6-Genexpression, gegenüber den MSC an allen Untersuchungstagen erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die IL-8-Genexpression war gegenüber der IL-6-Genexpression erniedrigt, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz. In der Gruppe der BMC war ebenfalls ein Rückgang der IL-6-/IL-8-Genexpression im Zeitverlauf feststellbar.

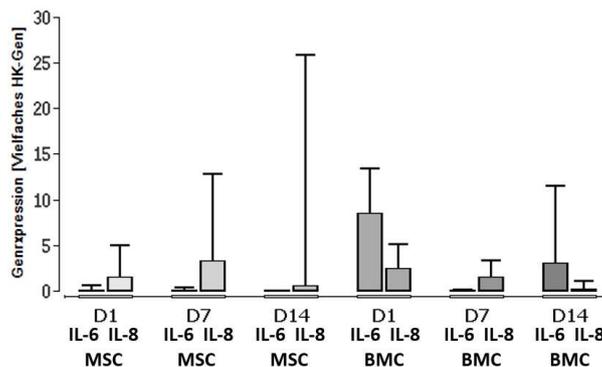


Abbildung 17: Expression der IL-6- und IL-8-Gene unter Kontrollbedingungen (kein Differenzierungsmedium) in MSC und BMC, die auf dem PLGA-Scaffold ausgesät wurden. Die Messung erfolgte nach 1, 7 und 14 Tagen mittels RT-qPCR (ΔC_T -Methode). $N=5$.

5.5.2. Immunologische Signatur im Vollblutstimulationstest

In diesem Experiment wurden Vollblutproben gesunder Probanden mit PLGA oder anderen Biomaterialien für 24h inkubiert und die sezernierten Mediatoren im Überstand semiquantitativ mit Proteom-Profiler-Membranen analysiert. Nach Inkubation mit PLGA konnte für sechs Proteine eine teilweise gegenüber allen anderen Vergleichsgruppen signifikant höhere Freisetzung festgestellt werden. Diese Faktoren sind Gro- α , IL-5, IL-8, Lipocalin, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) und Myeloperoxidase (MPO) (Abbildung 19).

Bei weiteren Parametern wurden sogenannte lokale statistische Signifikanzen detektiert. Dies bedeutet eine statistische Signifikanz im direkten Paarvergleich mit p-Wert < 0,05, nach erfolgter α -Korrektur jedoch keine Signifikanz mit höherem p-Wert. Da die Gruppengröße nur n=3 betrug und die Anzahl der Vergleichsgruppen mit n=5 relativ hoch war, ist es statthaft, auch diese explorativen Signifikanzen zu betrachten. Es sei jedoch aufgrund der fehlenden α -Korrektur darauf hingewiesen, dass ein Risiko für eine falsch positive Signifikanz besteht. Die Parameter IFN- γ , IGFBP-2, PGFBP-3, IL-1 α , IL-17A, IL-24, Kallikrein, MIP-3a, PECAM (CD31), Pentraxin-3, PF-4, SHGB und VCAM-1 sind im Gruppenvergleich in Tabelle 5 aufgelistet.

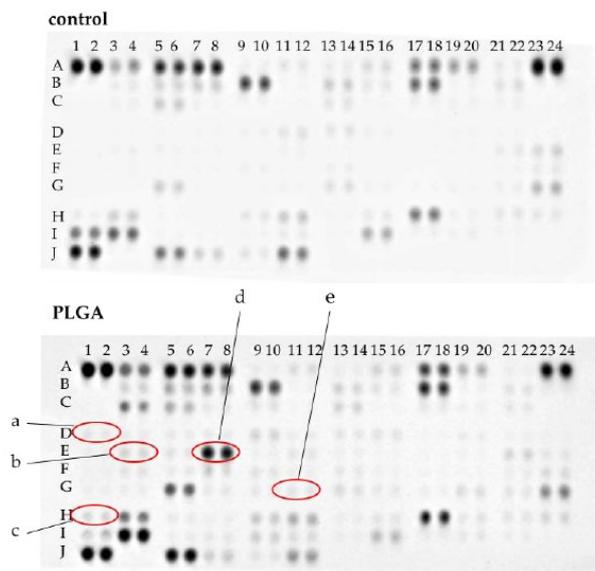


Abbildung 18: Repräsentative Proteom-Profiler-Membranen nach VBSA, die exemplarisch mit Medium (Negativkontrolle, control) oder PLGA inkubiert wurden. Proteine mit einer signifikant erhöhten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle wurden markiert. a) GRO- α (D1-2), b) IL-5 (E3-4), c) MPO (H1-2), d) IL-8 (E7-8), e) M-CSF (G11-12).

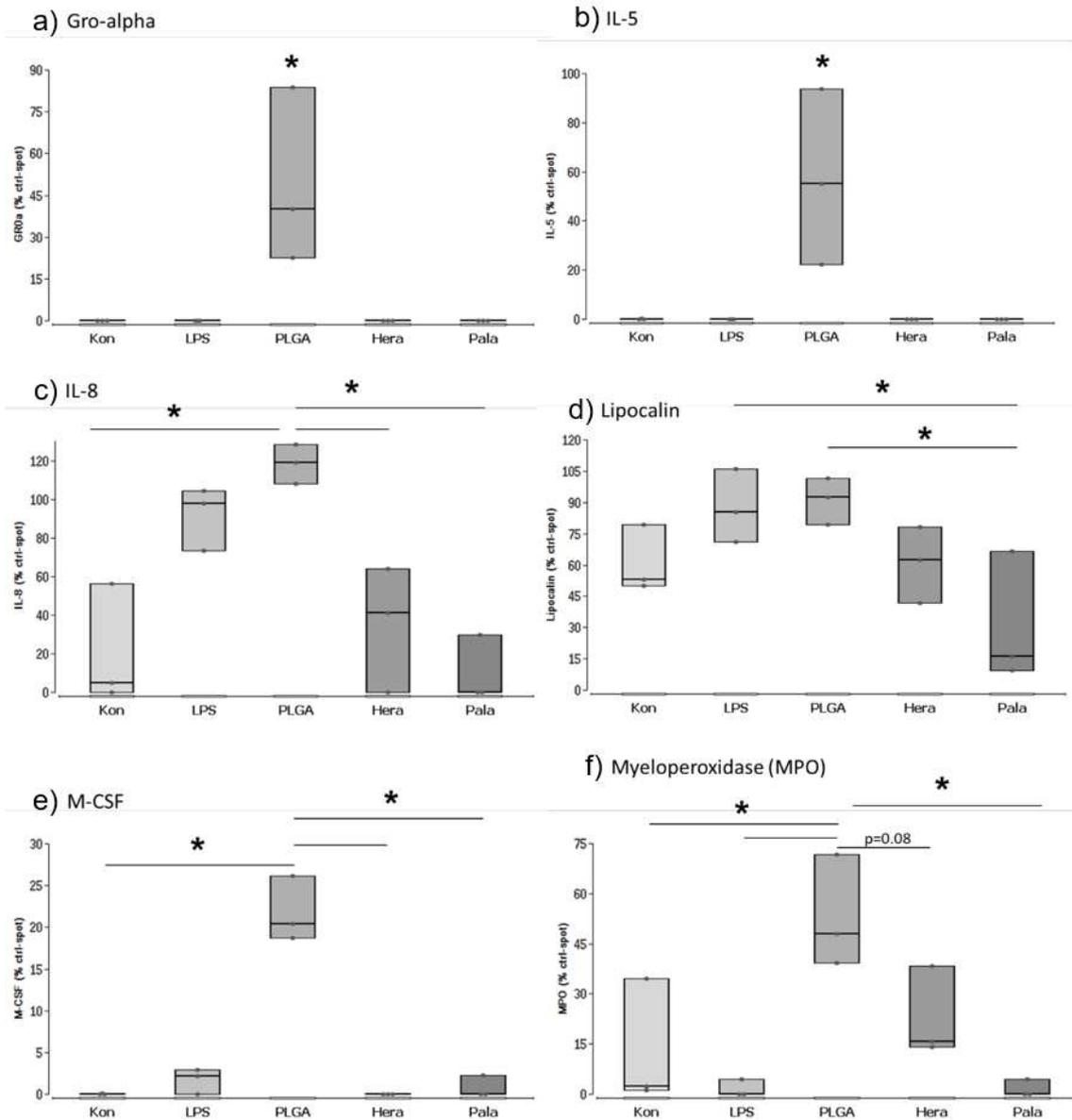


Abbildung 19: Parameter mit signifikanten Gruppenunterschieden im VBSA (Kruskal-Wallis-Test + Bonferroni-Holm adjustierte α -Korrektur). Für PLGA zeigen sich Gro- α , IL-5, IL-8, Lipocalin, M-CSF und MPO signifikant erhöht. * zeigt signifikante Unterschiede an. * = signifikant im Vergleich zu allen Gruppen oder durch Strich angezeigt.

Tabelle 5: Parameter mit lokalen statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (ohne α -Korrektur). Statistik auf PLGA bezogen, wenn nicht anders angegeben, $*=p<0,05$ vs. PLGA, Mittelwerte \pm SD.

Protein	Kontrolle	LPS	PLGA	Herafill	Palacos	Kategorie
IFN- γ	8.32 \pm 14.41 *	10.77 \pm 15.7 *	136.1 \pm 115.6	11.05 \pm 19.13 *	9.09 \pm 12.69 *	Inflammation
IGFBP-2	61.57 \pm 29.08 *	14.34 \pm 24.85	13.57 \pm 12.27	44.09 \pm 15.34	47.50 \pm 37.95	Regulierung

IGFBP-3	62.85 ± 37.69 *	30.63 ± 42.93	2.96 ± 4.44	79.38 ± 45.71 *	28.14 ± 16.7	Regulierung
IL-1α	0.0 ± 0.0 *	0.14 ± 0.24 *	12.58 ± 2.37	5.94 ± 10.30	2.62 ± 2.27	Inflammation
IL-17A	46.54 ± 37.86	41.04 ± 38.21	54.67 ± 27.29	113.9 ± 79.22 *vs Palacos	10.75 ± 9.61	Inflammation
IL-24	8.36 ± 14.48 *	17.92 ± 15.9	64.03 ± 32.11	6.35 ± 10.99 *	5.6 ± 9.71 *	Inflammation, Wundheilung
Kallikrein	6.25 ± 5.97 *	13.21 ± 13.99	52.91 ± 19.19	24.58 ± 42.57	33.45 ± 14.21	Inflammation
MIP-3a	0.0 ± 0.0 * vs LPS, PLGA	43.72 ± 41.88	48.38 ± 43.82	25.19 ± 43.64	1.07 ± 1.85 *	Chemotaxis
PECAM (CD31)	47.83 ± 38.05	52.81 ± 43.77	100.8 ± 26.84	54.72 ± 27.73	51.68 ± 27.48	Adhäsion
Pentraxin-3	24.35 ± 26.22 *	38.86 ± 33.65	94.48 ± 24.71	41.10 ± 56.97	47.0 ± 12.86	Komplement- aktivierung
PF-4	74.81 ± 20.19	91.91 ± 5.82 * vs Palacos	106.7 ± 61.51	75.59 ± 4.12	49.22 ± 14.65	Chemotaxis
SHBG	88.88 ± 5.62	90.38 ± 9.61 * vs Herafill	95.41 ± 13.7	72.99 ± 3.52 *	118.8 ± 38.68	Regulierung
VCAM-1	89.33 ± 1.86	114.6 ± 6.0 ** vs PLGA, Herafill	57.51 ± 45.24	68.14 ± 30.66	140.2 ± 59.59 * vs PLGA, Herafill	Adhäsion

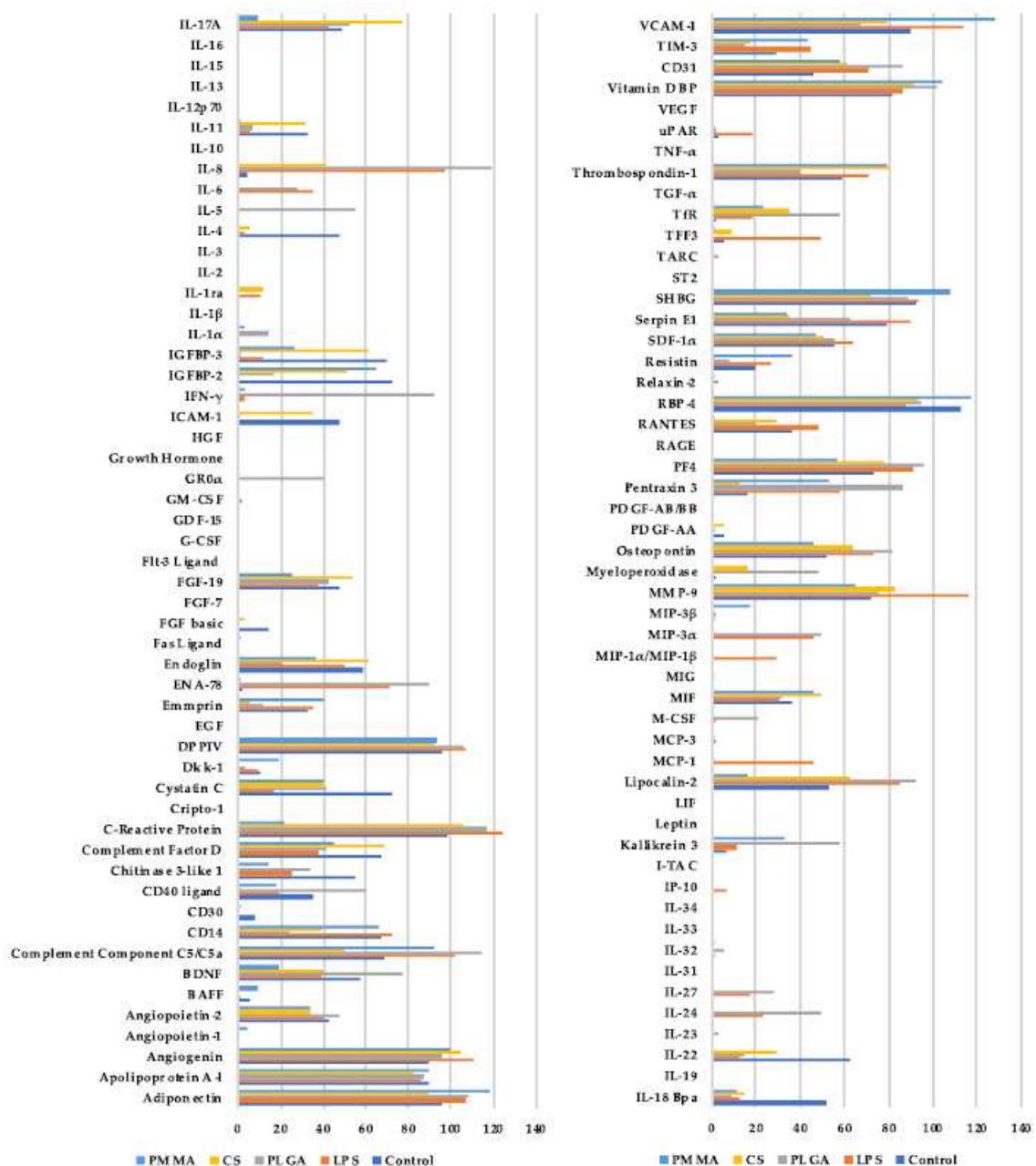


Abbildung 20: Übersicht über alle gemessenen Parameter. Die Medianwerte der drei Probanden sind dargestellt. Control (Kontrolle), PLGA (Polylactid-co-Glykolid), CS (Herafill), PMMA (Polymethylmethacrylat), LPS (Lipopolysaccharid).

5.6. Osteogene Differenzierung auf PLGA-Scaffolds

5.6.1. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf die osteogene Aktivität von MSC, Bestimmung osteogener Markergene

Generell unterlagen die Messwerte großen Schwankungen. Es konnte ein Trend zu verstärkter Genexpression unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu osteogenen Bedingungen beobachtet werden, jeweils in Anwesenheit des

Prüfmaterials. Die maximale Genexpression konnte an D7 unter Kontroll- und an D1 unter osteogenen Kulturbedingungen gemessen werden. Aufgrund der hohen Varianzen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und OD sowie im Zeitverlauf berechnet werden.

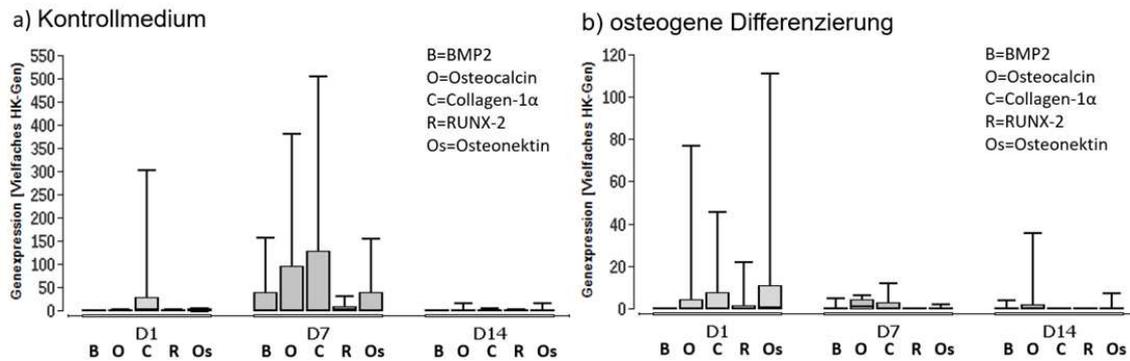


Abbildung 21: Expression osteogener Markergene von MSC, die auf dem Scaffold siedelten, unter a) Kontroll-Kulturbedingungen oder unter b) osteogenen Kulturbedingungen. N=5.

5.6.2. Alizarin-Rot-Färbung von Calciumphosphatablagerungen

In der Rotkanalanalyse zeichneten sich Stellen mit hoher Calciumphosphatabscheidung durch einen hohen Wert aus. Es zeigte sich eine erhöhte Calciumphosphatabscheidung nach osteogener Stimulierung (statistischer Trend). Erfolgt eine Normalisierung auf die jeweiligen Kontrollwerte (=100%), so war die Steigerung nach osteogener Differenzierung signifikant (=145% +/- 25, $p < 0,05$).

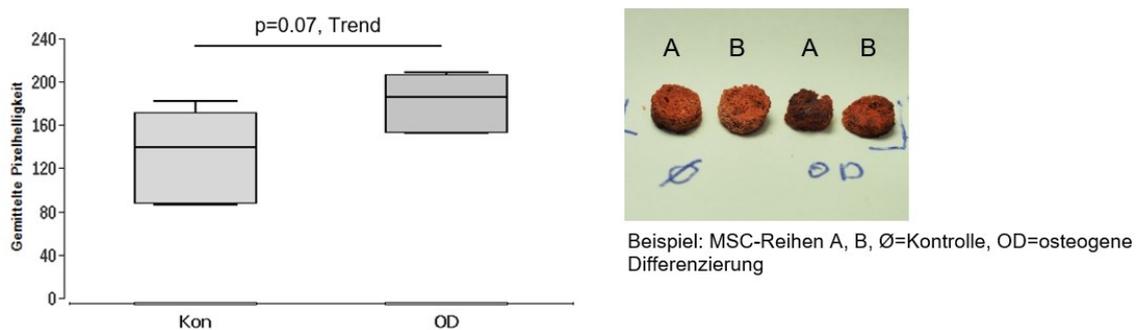


Abbildung 22: Nachweis der Calciumabscheidung von MSC auf PLGA-Scaffolds nach 14 Tagen. Inkubiert wurde in Kontrollmedium (Kon) und osteogenem Differenzierungsmedium (OD). Kon vs. OD: $p=0,07$ (Trend); OD, D7 vs. D14: $p=0,65$; Bei Normalisierung auf Kontrolle: Kon=100% vs. OD=145%: $p=0,008$. Beispielhafte Darstellung von PLGA-Scaffolds nach ARF.

5.6.3. ALP-Aktivität nach 7 und 14 Tagen

Die ALP-Aktivität als früher Osteogenesemarker wurde photometrisch mithilfe des *Alkaline Phosphatase Assay Kit* bestimmt. Sowohl für MSC als auch BMC konnten weder an Tag 7 noch an Tag 14 signifikante Unterschiede zwischen Kon- und OD-Ansatz gefunden werden.

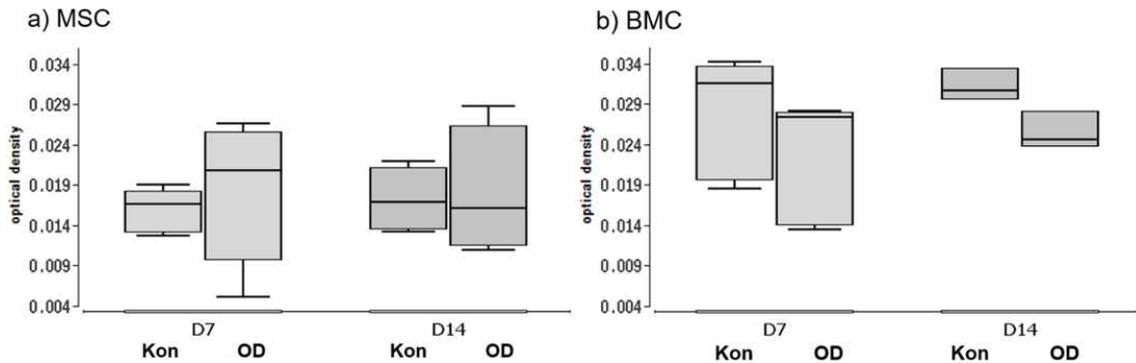


Abbildung 23: Photometrische Ermittlung der ALP-Aktivität in a) MSC und b) BMC anhand der Umsetzung von *p*-nitrophenyl-Phosphat (pNPP) in Anwesenheit des Prüfmaterials. Hierbei wurde die optische Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Inkubiert wurde in Kontrollmedium (Kon) und osteogenem Differenzierungsmedium (OD). MSC: N=5, BMC: N=3.

5.7. Einfluss des PLGA-Scaffolds auf die angiogene Aktivität von MSC und BMC, Bestimmung der VEGF-Genexpression

Generell unterlagen die Messwerte in der Gruppe der MSC großen Schwankungen. Die maximale Genexpression konnte an D7 gemessen werden. An D14 kam es zu einem nahezu vollständigen Rückgang der VEGF-Genexpression. Die VEGF-Genexpression in BMC war über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht nachweisbar. Aufgrund der hohen Varianzen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen MSC und BMC, sowie im Zeitverlauf berechnet werden.

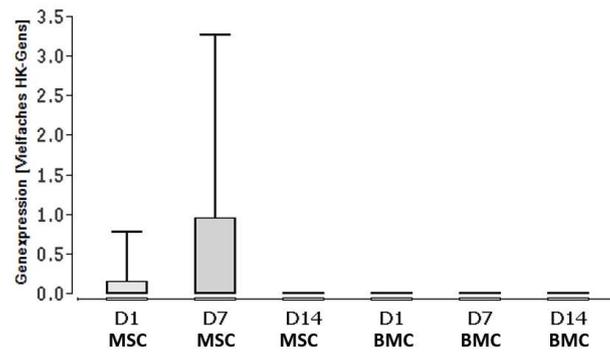


Abbildung 24: Expression des VEGF-Gens unter Kontrollbedingungen (kein Differenzierungsmedium) in MSC und BMC, die auf dem PLGA-Scaffold ausgesät wurden. Die Messung erfolgte nach 1, 7 und 14 Tagen mittels RT-qPCR (ΔcT -Methode). N=5.

6. Diskussion

Als Gegenstand dieser Arbeit wurden die Materialcharakteristiken des von Locate Bio Ltd. (Nottingham, UK) entwickelten PLGA-Gemischs analysiert und der Frage nachgegangen, ob sich daraus gefertigte PLGA-Membranen zur Abdeckung großer Knochendefekte im Sinne der Masquelet-Technik eignen könnten. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Biokompatibilität, osteoinduktive Eigenschaften, biomechanische Beschaffenheit und Stabilität sowie proinflammatorisches Potential gelegt.

6.1. Physikalische und funktionelle Eigenschaften der PLGA-Membran

6.1.1. Methode zur Beladung der Scaffolds mit Zellen

Das in dieser Arbeit verwendete Zellaussaatverfahren wich von häufig gebrauchten materialintensiveren Verfahren früherer Arbeiten ab. Statische Aussaatverfahren, bei denen ein Scaffold über einen definierten Zeitraum in einer Zellsuspension inkubiert und anschließend mit Medium umgeben wird, führen häufig zu ineffizienter und inhomogener Zellbesiedlung auf dem Scaffold.⁸⁶ Dynamische Prozesse, in welchen der Scaffold maschinell in einer Zellsuspension geschwenkt wird,⁸⁷ erreichen eine homogenere Zellverteilung⁸⁸, sind allerdings sehr zeitintensiv.⁸⁷ Die Effizienz der Zellbesiedelung ist von großer Relevanz für den regenerativen Erfolg des implantierten Materials und die Qualität des induzierten Gewebes.^{89,90}

Durch das Auftropfen der Zellen in einem Volumen von 12 µl Medium konnte ein Großteil der Scaffoldoberfläche benetzt und ein Abfließen der Zellsuspension an den Seiten verhindert werden. Mit dieser Methode sollte eine homogenere und reproduzierbare Zellbeladung des Prüfkörpers erreicht werden, was eine Streuung der Ergebnisse verringert. Darüber hinaus war durch das limitierte Volumen des Testmaterials die zielgerichtete Beladung der Scaffolds notwendig, um die Untersuchungen vollumfänglich durchführen zu können.

6.1.2. Adhäsionsverhalten von Zellen an der Oberfläche

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine initial höhere Zellzahl bei der Aussaat auch zu einer größeren Zelldichte auf dem Scaffold führte. Sowohl die Anzahl vitaler MSC als auch BMC im Well nahm an Tag 1 nach Aussaat zu. Dennoch zeigte sich, dass die metabolische Aktivität der auf der Oberfläche adhärenen Zellen an Tag 1 deutlich niedriger war, als erwartet. Eine Verhundertfachung der ausgesäten Zellen führte nach 24h lediglich zu einer Verdopplung der adhärenen Zellen auf dem Scaffold.

Durch die Besiedelung der Scaffolds mit BMAC konnte belegt werden, dass grundsätzlich eine hohe Zellzahl pro Flächeneinheit auf der Oberfläche erreicht werden kann. Das aus Knochenmark gewonnene BMAC enthält neben MSC, EPC und HSC jedoch auch große Anteile an Zelltypen mit fraglicher regenerativer Kapazität (Retikulozyten, Erythrozyten, Fibroblasten, reife Adipozyten, etc.).⁹¹ Diese nicht regenerativen Zellen könnten ebenfalls zu der hohen metabolischen Gesamtaktivität beigetragen haben, welche in den BMAC-Ansätzen gemessen wurde.

Es ist darauf hinzuweisen, dass das hier eingesetzte, unter Laborbedingungen und im Kleinmaßstab produzierte BMAC sich in folgenden Punkten von BMAC unterscheidet, welches unter Verwendung von professionellen Systemen aus Knochenmark erzeugt wurde. Im Rahmen der Aufkonzentrierung wurde ungefähr ein Faktor 3 erreicht, professionelles BMAC erreicht ca. Faktor 3-6 (HARVEST-Verfahren).⁶⁸ Die mittlere Ausbeute nukleärer Zellen beträgt ca. 40-91 Mio. Zellen/ml BMAC bei professionellen Systemen. Diese Konzentrationen sind in dem hier verwendeten experimentellen BMAC nicht erreicht worden.

Weitere Untersuchungen ergaben bereits an Tag 1 eine hohe Zelldichte auf dem Wellboden. So konnte im Zeitverlauf ein deutlicher, teilweise statistisch signifikanter Abfall der Zelldichte auf dem Scaffold und ein Anstieg vitaler Zellen auf dem Wellboden gemessen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Adhärenz der aufgebrachtten Zellen auf dem Scaffold gering und zeitlich limitiert ist. Eine mögliche zytotoxische Wirkung der Scaffolds ist angesichts der hohen metabolischen Aktivität im gesamten Well nicht wahrscheinlich. PLGA als biokompatibles Material ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben.^{1,12,16}

Ein möglicher Grund für den Rückgang der Zellbesiedelung auf der Scaffoldoberfläche könnte die fortschreitende Degradation der Scaffolds mit Zunahme der Porosität des Scaffolds im wässrigen Milieu sein. Yagi et al. konnten zeigen, dass MSC, die auf einem porösen Polymilchsäure (PLA)-Honigwabenfilter mit einer Porengröße von 20 µm ausgesät wurden, sich in den Poren sammelten und signifikant mehr MSC durch die Poren des PLA-Films fielen im Vergleich zu einer Porengröße von 5 µm. MSC auf der großporigen Oberfläche produzierten außerdem weniger Knorpelmatrix als auf kleinen Poren.⁹² In den vorliegenden PLGA-Scaffolds wurde an Tag 7 eine Porengröße von mehr als 50 µm gemessen werden, was einen zunehmenden Adhäsionsverlust und abnehmendes regeneratives Potential der MSC vermuten lässt. Durch die Adhäsion abgefallener MSC am Wellboden ist dort weiterhin eine hohe metabolische Aktivität vitaler Zellen messbar.

Der Einfluss des Trocknungsgrades der Scaffolds auf die Zelladhäsion erwies sich für stärker adhätierende Zellen (MSC) als wenig relevant, jedoch kritisch für schwach adhätierende Zellen (BMC). Für die MSC ergab sich zu Beginn ein signifikanter Anstieg adhätierender Zellen mit steigender Anzahl ausgesäter Zellen, der nicht durch den Trocknungsgrad beeinflusst wurde. Bei den BMC ließen sich insgesamt signifikant erhöhte Zellzahlen auf den Scaffolds der 24h-Gruppe im Vergleich zu Scaffolds der 15 min-Gruppe feststellen. Für BMC scheint eine trockene Oberflächenstruktur die Zelladhäsion zu erleichtern. Der Einfluss der Hydrophilie und Benetzbarkeit einer Materialoberfläche ist in der Literatur vielfach beschrieben. Für MSC zeigt sich tendenziell eine bessere Zelladhäsion auf hydrophilen Oberflächen.^{23,93,94}

Die Vorbehandlung mit FCS-haltigem Medium kann die Zelladhäsion ebenfalls verbessern. Im Vergleich zu in DPBS -/- gewaschenen Scaffolds konnte eine erhöhte Zahl an adhätierenden MSC auf der Oberfläche gemessen werden. Blaudez et al. beschreiben eine signifikante Steigerung der Zelladhäsion auf einem 3D-Scaffold nach Inkubation für 1h in 100% FCS-Medium.⁸⁹ Vermutlich lagern sich dabei im FCS-Medium befindliche Proteine auf der Scaffoldoberfläche ab, welche essenziell für die Zelladhäsion sind. Im Gegensatz dazu wurden die Scaffolds in dieser Arbeit nur für insgesamt 2 min inkubiert.

Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit wäre möglicherweise eine weitere Verbesserung der geringen Zelladhärenz zu erreichen.

Die Vorbehandlung mit FCS scheint zusätzlich einen Einfluss auf die Zellproliferation zu haben. Bei initial gleicher Zellzahl ließen sich nach 7 Tagen absolut mehr Zellen auf den FCS-vorbehandelten Scaffolds nachweisen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DPBS -/-. FCS wird standardmäßig als Teilkomponente des Basalmediums zur Isolierung und Kultivierung von MSC eingesetzt.⁹⁵

6.1.3. Diffusionskapazität für Wundheilungsmediatoren

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass eine PLGA-Membran mit einer Dicke von 2 mm von Chemokinen passiert werden kann. Dabei ist die Permeabilität nicht auf einen Integritätsverlust der Membran in wässriger Lösung zurückzuführen, die Membran an sich ist durchlässig. Es diffundierten ca. 50% der Peptide innerhalb der ersten 6 h durch die Membran. Es ist anhand der Literaturlage schwer einzuschätzen, ob diese Durchlässigkeit hoch oder niedrig ist, da vergleichende Arbeiten nicht zugänglich oder nicht vorhanden sind. Inwieweit die Chemokine am Kulturgefäß oder dem Scaffold adhären, konnte nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in einer möglichen klinischen Anwendung als eine defektumhüllende Membran der Stoffaustausch mit dem umgebenden Gewebe möglich ist und Peptidmediatoren die PLGA-Membran passieren können. Immunologische und regenerative Signale können so verzögert mit der Umgebung ausgetauscht werden. Dies könnte zu einer lokalen Akkumulation von regenerativen Faktoren führen.

Die Kinetik der Mediatorenlage nach Operation in einem Frakturhämatom ist gut beschrieben. In der Frühphase (bis 72 h) überwiegen proinflammatorische Mediatoren, wobei gleichzeitig ein hohes osteogenes Potential aufgebaut wird.⁹⁶ Es ist auf Basis der Untersuchungen wahrscheinlich, dass bis zu diesem Zeitpunkt die Membranintegrität erhalten ist, sodass zumindest in der Frühphase lokal erhöhte Mediatorkonzentrationen in der Defektzone möglich wären. Die

Permeabilität für kleine Peptide könnte gerade in der Frühphase der Knochendefektheilung die Zellrekrutierung ermöglichen.

SDF-1 α (aus Stammzellen) und MCP-1 (aus Monozyten) sind wichtige Chemokine für die Zellattraktion und -immigration. Ihre Molekülmasse bewegt sich zwischen 8,4 kDa (SDF-1 α) und 11,4 kDa (MCP-1).⁹⁷ Es ist wahrscheinlich, dass größere Proteine wie IL-6 mit einem Molekulargewicht von 18-21,5 kDa die Membran passieren können, dies muss jedoch überprüft werden.

Ob sich die lokale Konzentration von Mediatoren positiv oder negativ auf die Knochenheilung auswirkt, lässt sich an dieser Stelle nicht abschätzen. Eine zu starke Akkumulation proinflammatorischer Mediatoren könnte sich möglicherweise advers auswirken,^{98,99} eine Anreicherung regenerativer Faktoren wie BMP-2 hingegen positiv.⁹⁸ Um hier Klarheit zu erlangen, müssen entsprechende Tierversuchsstudien durchgeführt werden.

6.1.4. Degradationsverhalten in wässrigem Milieu

Die REM-Aufnahmen zeigten einen zunehmenden Materialverlust im Zeitverlauf. Die deutlich verstärkte Porosität der abgebildeten Scaffolds an Tag 7 spricht für einen stetigen Auflösungsprozess in wässriger Umgebung.

PLGA ist ein tendenziell hydrophiles Material und unterliegt damit einem hydrolytischen Abbauprozess.¹⁴ Die Geschwindigkeit des Abbaus in vitro ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. So spielen das individuelle Molekulargewicht¹⁰⁰, das Mischungsverhältnis der beiden Anteile LA und GA sowie die Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit des Materials¹⁰¹ eine Rolle. Auch externe Faktoren wie der pH-Wert des genutzten Mediums oder die Inkubationstemperatur beeinflussen die Degradation. In vivo sind zusätzlich noch gesteigerte Enzym- oder Zellaktivität und ein veränderter pH-Wert in einem entzündlichen Milieu in Betracht zu ziehen.¹⁰²

Im Kontext des *Tissue engineering* ist die Degradation des Scaffold sogar erwünscht. So regt der Scaffold als Träger von regenerativen Zellen durch geringgradige Stimulation einer Entzündungsreaktion zur Wundheilung an und dient als Leitstruktur für neue Gewebeformation.¹⁵ Letztlich verbleibt durch die

Resorption und Degradation des Biomaterials nur noch neu gebildetes Gewebe ohne Anteile des synthetischen Polymers im Körper. Dabei sollte die Degradationszeit des Scaffolds auf die Dauer der Geweberegeneration in der Defektzone angepasst sein.¹⁰² Ein zu schneller Abbau des Scaffolds könnte daher Heilungskomplikationen durch mangelnde Stabilität der Wundverhältnisse und fehlende Leitstrukturen zur Folge haben.

6.1.5. Stabilität der PLGA-Membran

Mit einer medianen Bruchlast von 3,5 N und einer medianen Biegesteifigkeit von 3,9 N/mm weist die PLGA-Membran im Test eine wesentlich geringere mechanische Stabilität im Vergleich zu Knochen (Femur der Ratte, mediane Bruchlast: 170 N, mediane Biegesteifigkeit: 220 N/mm) auf.⁸⁴ Es ist bereits beschrieben, dass PLGA abhängig von seiner Zusammensetzung schwankende mechanische Eigenschaften besitzt und aufgrund mangelnder Stabilität meist nicht isoliert als gewichttragendes Element in der Frakturversorgung zum Einsatz kommt.¹ In wässrigem Milieu nimmt die mechanische Stabilität noch weiter ab. Gerade für den Einsatz des Materials in vivo zur Frakturversorgung darf dieser Aspekt nicht außer Acht gelassen werden.^{18,103}

6.2. Biokompatibilität der PLGA-Membran

6.2.1. Zellüberleben auf dem Scaffold

Im MTT-Test zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der MSC über 14 Tage auf der Scaffoldoberfläche, gleichzeitig jedoch ein signifikanter Anstieg der Zellzahl auf dem Wellboden. Das OD hatte hierbei keinen erkennbaren Einfluss auf die Zelladhäsion.

Trotz Abnahme der Zellzahl auf dem Scaffold konnte eine steigende metabolische Aktivität im Well, besonders auf dem Wellboden, nachgewiesen werden. Wie oben bereits erläutert, sprechen diese Ergebnisse gegen eine zytotoxische Wirkung von PLGA auf Zellen in der Umgebung. Sie lassen eher die Vermutung zu, dass es zu einem Haftungsverlust der MSC auf der Oberfläche kommt. Dieser Haftungsverlust könnte auf die zügige Degradation des Materials

in wässriger Lösung zurückzuführen sein, wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert.

6.2.2. VBSA zur immunologischen Charakterisierung von Biomaterial

Unbestritten entscheidet die erste Wirtsreaktion über den Erfolg eines Implantats und ebnet schon früh den Weg für eine mögliche Abstoßungsreaktion.²¹ Bestimmte Eigenschaften von Biomaterialien können diese Reaktion im Sinne der Therapie beeinflussen.³³ Trotz diesem Wissen existiert bisher noch kein standardisiertes Verfahren zur Erfassung der Biokompatibilität unterschiedlicher Materialien. In konventionellen Untersuchungen werden zumeist nur wenige Indikatorproteine der akuten Inflammation oder Polarisation der Makrophagen gemessen.^{104,105} Umso mehr wird hier ein vereinheitlichtes System mit guter Reproduzierbarkeit und schnellen Ergebnissen benötigt, wodurch letztlich ein besseres Verständnis der Implantat-Wirts-Interaktion gewonnen werden kann.¹⁰⁶

Der VBSA ist ein in vitro-Modell, mit dem die Immunreaktion auf jegliche flüssige oder feste Substanz simuliert werden kann.⁸³

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass mit dem VBSA in Kombination mit einer Proteom Profiler-Analyse ein materialspezifisches Genexpressionsprofil gemessen werden kann. Durch die Analyse eines Großteils der initial freigesetzten Proteine wie Rezeptoren, Zytokinen, Hormonen, Zellaktivatoren, Komplementfaktoren und weiteren war ein genaueres Verständnis der frühen Immunantwort möglich.¹⁰⁷ Die interindividuell gute Reproduzierbarkeit lässt den Schluss zu, dass Materialunterschiede als Unterschiede in der Sekretom-Expression dargestellt werden können.

Ob die spezifische immunologische Signatur mit dem langfristigen Heilungsverlauf oder dem Auftreten von Komplikationen wie einer übermäßigen Fremdkörperreaktion in vivo korreliert, ist derzeit nicht bekannt und erfordert weitere Untersuchungen im Tierversuchsmodell.

6.2.3. Immunologische Signatur von PLGA im Vergleich

Die materialspezifischen Unterschiede wurden anhand von drei chemisch und strukturell sehr unterschiedlichen Materialien (PLGA, PMMA, Herafill (CS)) deutlich gemacht, von denen zwei täglich in der chirurgischen Versorgung von Knochendefekten zum Einsatz kommen. Alle drei weisen elektronenmikroskopisch eine individuelle Oberflächenstruktur auf, von weich, nur leicht strukturiert (PLGA) über rau und zerklüftet (CS) bis hin zu sphärisch (PMMA). Dabei variieren die Strukturdimensionen über einen großen Bereich von 3 µm bis 124 µm im Durchmesser. Bei PMMA finden sich zusätzlich porenähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern.

Es ist bekannt, dass Rauigkeit der Oberfläche, die chemische Struktur und besonders die Porengröße für die Bioaktivität eines Materials und die Wirtsreaktion eine entscheidende Rolle spielen.^{21,25} Sie modulieren die Benetzbarkeit und regulieren damit die Adhäsion von Blutplättchen und Proteinen. Hydrophile Oberflächen bieten hierbei eine ungünstige Adhäsionsfläche im Vergleich zu hydrophoben. Sie sind häufig von einem Wasserfilm bedeckt. Das stark gebundene Wasser führt zu einer Hydratisierung der Proteine und damit zu einer Abstoßung. Im Gegensatz dazu kommt es an hydrophoben Oberflächen zu starken hydrophoben Wechselwirkungen mit Anlagerung der Proteine auf der Oberfläche.¹⁰⁸

Die Hydrophilie eines Materials kann anhand des statischen Kontaktwinkels gemessen werden, wobei ein Winkel $>90^\circ$ Hydrophobie und $<90^\circ$ Hydrophilie charakterisiert. Der Kontaktwinkel wird ebenfalls durch die Oberflächenmorphologie beeinflusst.¹⁰⁹ Der Kontaktwinkel von PMMA wird in der Literatur mit 76° beziffert, CS mit 119° und PLGA mit $77-100^\circ$.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Dabei überrascht die Hydrophobie von CS, welches als eine Hauptkomponente das mineralische Substrat Calciumsulfat enthält und daher aufgrund seiner ionischen Struktur stark hydrophil sein sollte. Die Hydrophilie eines Materials wird allerdings von der chemischen Struktur beeinflusst. Da CS kein rein mineralisches Material ist und als Bindemittel Tripalmitin enthält, kann angenommen werden, dass die ionische Struktur des Calciumsulfats vom Tripalmitin abgeschirmt und so die Hydrophilie reduziert wird.¹¹² Dadurch ist eine Steigerung der Adhärenz von Plättchen und Proteinen zu erwarten.¹⁰⁹

Mit einem Kontaktwinkel von 76° ist PMMA hydrophil und damit gut biokompatibel.¹¹³ Fraglich ist, ob der resultierende Wasserfilm auf der Materialoberfläche die Adhäsion von Molekülen und letztlich auch Zellen einschränkt. Von Dinnes et al. wurde über einen direkten Zusammenhang zwischen freiliegender Oberfläche und Makrophagen-/Monozyten-Adhärenz sowie der Expression von Proteinen wie IL- 1β , TNF- α und IL-6 berichtet.¹¹⁴

Die PLGA-Scaffolds bestehen aus mit Gentamicin beladenen Mikropartikeln, die wie oben beschrieben hergestellt wurden.¹¹⁵ In wässriger Lösung erfolgt innerhalb von Tagen bis Wochen die hydrolytische Degeneration in seine Bestandteile LA und GA. Auch in vivo tritt die Degeneration auf. Hier ist sie enzymvermittelt und findet beschleunigt statt. Der beschriebene Kontaktwinkel von $77-100^\circ$ weist auf einen tendenziell hydrophilen Charakter hin, welcher sich vermutlich im Laufe der Degeneration verändert. Erwartungsgemäß liegt die Protein- und Zelladhärenz zwischen den beiden anderen Materialien.

Im Vergleich zu PMMA-Knochenzement und dem CS-Scaffold führt der PLGA-Scaffold im VBSA zu einem signifikanten Anstieg proinflammatorischer und chemotaktischer Moleküle. Anhand des Expressionsmusters konnte insbesondere eine Aktivierung der sogenannten ersten Verteidigungslinie des Immunsystems gegen eingedrungene Pathogene in Form von Monozyten und Granulozyten festgestellt werden. Indikatorproteine hierfür sind hohe Konzentrationen von GRO- α , IL-8, M-CSF, MPO und IL-5, welche teilweise von Monozyten und Granulozyten sekretiert werden. Die Chemokine GRO- α und IL-8 wirken stark chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten.^{69,116} M-CSF ist ein von Monozyten ausgeschüttetes Zytokin, was vor allem auf Makrophagen einwirkt und unter anderem eine gesteigerte Phagozytose und chemotaktische Aktivität stimuliert.¹¹⁷ Die MPO ist stark antimikrobiell aktiv als Katalysator der Konversion von Chlorid-Ionen in Hypochlorid. Dieses Enzym ist essenzieller Bestandteil der mikrobiellen Abwehr neutrophiler Granulozyten^{118,119} und weist auf eine starke Aktivierung neutrophiler Granulozyten hin. Dafür spricht auch das nachgewiesene IL-5, welches unter anderem von aktivierten Mast-Zellen ausgeschüttet wird, einer Untergruppe der Granulozyten.¹²⁰

PLGA stimuliert vermutlich auch Lymphozyten-Populationen. IL-5 wird unter anderem auch von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet, der Mediator IFN- γ von

bestimmten T-Zell-Populationen wie auch von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).^{121,122} IFN- γ aktiviert umfassende Immunzellen wie Monozyten und verstärkt die Antigen-Präsentation.¹²³ Das Zytokin IL-24 wird sowohl von myeloischen (Monozyten, Granulozyten) als auch lymphoiden Zellen freigesetzt und wirkt zellaktivierend, proinflammatorisch und fördert die Wundheilung.¹²⁴ Auch Kallikrein spielt hier eine Rolle, da seine gefäßerweiternde Wirkung einen verstärkten Blutfluss und damit eine bessere Versorgung der Defektzone und des Implantats zur Folge haben könnte.¹²⁵

Die gegenseitige Zellaktivierung kann auf Basis der Ergebnisse nur vermutet werden. Während initiale, kurzlebige Signalstoffe wie TNF- α und IL-1 β nur in Spuren nachzuweisen waren, waren sekundäre proinflammatorische und chemotaktische Mediatoren myeloischen und lymphoiden Ursprungs klar detektierbar. PLGA ist eines der am häufigsten untersuchten Materialien im Bereich des *Tissue engineering* und der Medikamentenapplikation und wird in der Literatur gleichzeitig als immunstimulierend und als nicht aktivierendes Material eingestuft. Diese widersprüchlichen Resultate sind nur unter Einbeziehung der Morphologie des PLGA und der Abbaueigenschaften abhängig vom Mischungsverhältnis der Copolymere, der molaren Masse, Porosität, u.a. erklärbar.^{33,102} Eine hoch poröse Scaffoldoberfläche begünstigt einen schnellen hydrolytischen Abbau. Bereits wenige dadurch freigesetzte PLGA-Partikel können einen starke Immunantwort auslösen. Diese PLGA-Mikropartikel können nach aktuellen Erkenntnissen durch die Aktivierung des NALP3-Inflammasom in myeloiden Zellen zu einem Anstieg von IL-1 β führen, was bedeuten könnte, dass diese Partikel intrinsische immunogene Eigenschaften besitzen.¹²⁶⁻¹²⁸ Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von Waeckerle-Men et al. und Lewis et al., dass PLGA-Mikropartikel nicht stimulierend, sondern möglicherweise sogar supprimierend auf das Immunsystem wirken.^{126,128,129} Die Partikelgröße könnte hierbei einen Einfluss auf die Intensität der Immunantwort haben. Es konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel wesentlich besser phagozytiert werden als Mikropartikel, welche stattdessen durch Bindung an die Zellmembran und Aufnahme in die Zelle einen umso stärkeren Entzündungsreiz auslösen.¹²⁸

Charakteristisch für den mit Gentamicin versetzten CS-Scaffold ist eine hohe Expression IGFB-3. Für die Proteine FGF-19, IL-17a und V-CAM-1 ergaben sich

explorative Signifikanzen (siehe 5.5.2) im Vergleich zu PMMA-Knochenzement. Im Vergleich zu PLGA wurden signifikant niedrigere Konzentrationen an DPPIV, GRO- α , IFN- γ , IL-5, IL-8, IL-24, MCS-F, MPO und SHBG gemessen. Daraus lässt sich eine immunmodulatorische Wirkung des CS-Scaffolds ableiten, die zu einer wesentlich geringeren Entzündung führt als PLGA-Scaffolds. Auch CS unterliegt einem Abbauprozess und zerfällt in die Ionen Ca^{2+} , SO_4^- und CO_3^- . Diese kommen physiologisch im Körper vor und wirken hochkonzentriert immunmodulatorisch.¹³⁰ Im Gegensatz zu PLGA entsteht durch den Abbau von CS kein saures Milieu. Hierin könnte die nur lokale Entzündungsreaktion und die daraus folgende gute Biokompatibilität von CS begründet sein.

Der PMMA-Knochenzement ist ein Polymer, was auf einem mit Gentamicin versetzten Polymethylmethacrylat basiert. Die raue, geschlossene Oberfläche der Prüfkörper in Kombination mit der geringen Polarität erschweren die Adhäsion von Proteinen und Zellen auf der Oberfläche. Da das Material physiologisch reaktionsunfähig ist und nicht von Makrophagen phagozytiert werden kann, resultiert eine Fremdkörperreaktion mit der Bildung von Granulationsgewebe.⁵⁰ PMMA löst eine milde Aktivierung aller Anteile des Immunsystems aus. Es lassen sich signifikant geringere Protein-Konzentrationen von ENA-78 (CXCL5), FGF-19, Gro- α , IFN- γ , IL-5, IL-8, IL-17a, IL-24, Lipocalin, MCSF, MIP-3a, MPO, SHBG und VCAM-1 nachweisen. PMMA-Mikropartikel haben jedoch in vitro auf Fibroblasten oder Monozyten durchaus eine proinflammatorische Wirkung und führen zur Freisetzung von IL-1, IL-6, MIP-1, MCP-1 und TNF- α in den ersten 24h.^{131,132} Die Makrophagen-Polarisation hin zum inflammatorischen M1-Subtyp führt letztlich zur chronischen Entzündung.

Trotz der Zugabe von Gentamicin zu allen drei Materialien ist die Freisetzungsrate von Gentamicin nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass die strukturierte Oberfläche von PLGA- und CS-Scaffolds zu einer höheren Freisetzung führt, was möglicherweise eine erhöhte Immunantwort zur Folge gehabt haben könnte.⁵⁰ Eine endgültige Klärung dieser Frage erfordert weitere Untersuchungen.

Die Bindung von Blutplättchen und Zellen an eine Oberfläche wird maßgeblich von adhärentem Fibrin unterstützt. Im Nanobereich hoch strukturierte Oberflächen behindern dabei tendenziell die Adhäsion von Zellen, Komplement-

und Gerinnungsfaktoren, da sich die entsprechenden Epitope nicht ausreichend entfalten können.¹³³ Glatte Oberfläche bieten eine deutlich günstigere Angriffsfläche.¹³⁴ Der Einfluss auf diese Arbeit ist dennoch als gering einzuschätzen, da das verwendete Blut voll heparinisiert und die Gerinnungskaskade entsprechend ausgeschaltet war.¹³⁵

Einige wichtige Einschränkungen sind zu benennen. Um interindividuelle Unterschiede in den Ergebnissen auszugleichen, wurden native Blutproben von drei verschiedenen Personen entnommen. Liebers et al. berichten über große interindividuelle Varianzen in den Resultaten verschiedener Testpersonen.¹³⁶ Durch Mittelung der Resultate aller Testpersonen können diese Varianzen jedoch ausgeglichen werden. Laut Wouters et al. sind nur geringe intraindividuelle Abweichungen zu erwarten, weswegen lediglich ein VBSA pro Testperson angefertigt wurde.¹³⁷ Auch in unserer kleinen Studie konnten wir zeigen, dass alle Ergebnisse der Probanden dem gleichen Trend folgten.

Durch die Interaktion einer nativen Blutprobe mit dem Blutentnahmeröhrchen kommt es prinzipiell zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und des Immunsystems. Da dies für jegliche Materialtestung gilt, handelt es sich hierbei um einen systematischen Fehler. In dieser Arbeit ist die Nutzung des VBSA vorteilhaft, da auch geringe materialspezifische Unterschiede in der Immunreaktion auf das implantierte Material nachgewiesen werden können, unabhängig vom Implantationstrauma. Allerdings gleicht das in diesem Modell betrachtete Hämatom mehr einem Weichteilhämatom als einem Frakturhämatom¹³⁸ und lässt dadurch nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die in vivo-Situation zu.

Der endgültige Einfluss von Protein- und Plättchen-Adhäsion auf die Fremdkörperreaktion wurde hier nicht geklärt und ist nicht Teil dieser Untersuchungen.²⁵ Unsere Ergebnisse bestärken vor allem die These, dass die Kombination eines VBSA mit einem Proteom Profiler-Test als einfach zu implementierendes System zum Screening und zur Charakterisierung von Biomaterialien im Bereich des *Tissue engineering* eingesetzt werden kann. Voraussetzung hierfür sind klare Unterschiede in der initialen Fremdkörperreaktion.

Der VBSA stellt ein in vitro-Modell dar, mit dem die Implantat-Wirt-Reaktion entsprechend einem möglichen therapeutischen Einsatz simuliert werden kann.^{81,105} Mit der Proteom Profiler-Analyse ist anschließend die qualitative und semi-quantitative Analyse der exprimierten Proteine möglich.

6.3. Osteogene Differenzierung auf der Scaffoldoberfläche

Die Untersuchungen lieferten Hinweise, dass MSC auf der Oberfläche eines PLGA-Scaffold zur osteogenen Differenzierung in der Lage sind. Während die ALP-Aktivität keine signifikanten Änderungen im Zeitverlauf unter osteogenen Bedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen aufwies, konnte eine deutliche Zunahme der Calciumabscheidung nach 14 Tagen unter osteogenen Bedingungen nachgewiesen werden. Die Calciumproduktion fand vermutlich bereits in den ersten sieben Tagen statt. Aufgrund der oben erläuterten starken Abnahme der Zellzahl auf der Scaffoldoberfläche ist anzunehmen, dass nach einer Woche die Anzahl adhärierender MSC auf dem Scaffold zu gering ist, um eine nennenswerte Calciumabscheidung zu generieren.

Es ist jedoch bereits beschrieben worden, dass auch schon nach sieben Tagen und osteogenen Kulturbedingungen der Calciumgehalt in den MSC stark ansteigt und die Abscheidung einer calciumhaltigen Matrix erfolgen kann.⁶⁰

Das Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruch zu den durchgeführten Genexpressionsanalysen. Hier konnte weder unter osteogenen noch unter Kontrollbedingungen eine Zunahme der osteogenen Genaktivität gemessen werden.

6.4. PLGA-Membran zur Abdeckung großer Knochendefekte

Das vorgelegte Material ließ sich leicht verarbeiten und in jede gewünschte Form bringen. Die Herstellung von porösen Prüfkörpern aus einem initial flüssigen PLGA-Gemisch bei RT und ohne Einsatz von Hochdruckmaschinen wurde bereits von Wu et al. beschrieben.¹³⁹ Dies lässt vermuten, dass eine individuelle Anpassung des Materials an jede mögliche Form eines Knochendefektes grundsätzlich möglich und zeitnah im Rahmen einer Operation durchzuführen ist.

Allerdings benötigten die Scaffolds eine Aushärtungszeit von mindestens 24h, um vollständig stabil zu werden.¹³⁹ Nach unseren Versuchsergebnissen ist anzunehmen, dass nicht getrocknete Scaffolds, implantiert in ein wässriges Milieu wie eine Wunde, keine vollständige mechanische Stabilität erreichen.¹⁰³ Zur Sicherung dieser Annahme sind allerdings weitere Untersuchungen in einem geeigneten Tiermodell notwendig.

6.5. Geplante Analysen, die nicht durchführbar waren

Aufgrund der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials konnten keine REM-Aufnahmen von zellbesiedelten Scaffolds zur Dokumentation der Morphologie adhärenter MSC und BMC angefertigt werden. Die Analyse von histologischen Schnittpräparaten war ebenfalls nicht durchzuführen. Die organischen Lösungsmittel zur Entwässerung und Fixierung der Zellen auf dem Scaffold führten zu einer beschleunigten Degradation und zu einer Auflösung des Materials, wie Wu et al. ebenfalls zeigen konnten.¹⁸ REM-Untersuchungen der nativen Scaffolds nach Goldbedampfung waren hingegen möglich.

7. Schlussfolgerung

PLGA als biologisch abbaubares Polymer wird im medizinischen Bereich bereits vielfältig eingesetzt, so zum Beispiel als Trägersubstanz für Medikamente¹⁴ oder in Form von resorbierbarem Nahtmaterial.¹ Seine einfache Anwendung und individuelle Formbarkeit wie auch seine vielfältig zu manipulierenden physikalischen und chemischen Eigenschaften machen PLGA auch für *Bone tissue engineering* zu einem attraktiven Ausgangsmaterial.¹²

Die effektive Versorgung kritischer Knochendefekte stellt nach wie vor eine Herausforderung für die moderne Medizin dar. Standardverfahren wie autologer Knochentransfer sind mit einer hohen Begleitmorbidität verbunden und auch die induzierte Membrantechnik birgt als Platzhaltertherapie das Risiko von zwei Operationen. Die Suche nach therapeutischen Alternativen liegt daher nahe.

Ziel dieser Arbeit war es, das vorgelegte Material hinsichtlich seiner Immunreaktivität, Zytokompatibilität und physikalischen Eigenschaften zu charakterisieren. Hierbei zeigte sich das Material als stark proinflammatorisch innerhalb der ersten 24h, wobei keine relevanten antiinflammatorischen Kompensationsmechanismen (bspw. IL-10) induziert wurden. Eine starke lokale Entzündungsreaktion nach Implantation ist daher möglich.

Aufgrund der schnellen Degradation in wässrigem Milieu ist der Einsatz als gewichttragendes Element in der Frakturversorgung oder als osteokonduktive Leitstruktur zur Heilung eines Knochendefektes als unwahrscheinlich anzunehmen, da besonders für die Osteokonduktion die Abstimmung der Degradation auf die Regenerationszeit des Gewebes die erfolgsbestimmende Größe darstellt.¹⁰² Zellen lassen sich dennoch in hoher Dichte auf die Oberfläche aufbringen und werden nicht negativ durch PLGA beeinflusst. Die zeitlich limitierte Adhäsion kann durch eine Vorbehandlung mit serumhaltigem Medium verbessert werden. Die Durchlässigkeit der PLGA-Membran für Peptide macht eine lokale Anreicherung von Mediatoren gerade in der Frühphase der Knochenheilung wahrscheinlich, wenn die Membran zur Defektabdeckung im Sinne der induzierten Membrantechnik nach Masquelet verwendet werden würde.

In Zusammenschau der Ergebnisse liegt hier ein Material vor, was besonders in der Frühphase der Knochenheilung zu einem besseren Heilungsmilieu in einem Knochendefekt beitragen könnte. Besonders chemotaktische, immunstimulierende und teilweise proangiogene Faktoren werden durch PLGA induziert. Diese Faktoren könnten in der frühen Phase helfen, notwendige Zellpopulationen zu rekrutieren. Die Zellrekrutierung ist eine wichtige Komponente der Frühphase der Defektheilung. Als „*Cell carrier*“ könnten zusätzlich regenerative Zellen auf PLGA-Scaffolds in die Defektzone eingebracht werden, welche möglicherweise in dem konzentrierten Mediatorenmilieu besser ihre Wirkung entfalten würden. Die rasche Freisetzung der Zellen von der Oberfläche könnte dabei zu einer schnellen Einwanderung in die Defektzone führen.

Für eine erfolgreiche Knochenheilung ist auch die zeitnahe Herunterregulation der Entzündungsreaktion (innerhalb einer Woche)⁹⁶ notwendig. Der zügige hydrolytische Materialabbau könnte dies ermöglichen. Über die Wahl geeigneter Membrandimensionen (Membrandicke) könnten die Degradation und somit die Zellfreisetzung wie auch die Mediatorinduktion den Erfordernissen des Knochendefekts angepasst werden. Die Membran hätte in diesem Fall vermutlich keine mechanische Stabilisierungsfunktion, sondern würde als „biologischer Modulator“ funktionieren. Hierzu sind jedoch weiterführende Analysen unter Verwendung geeigneter Tiermodelle notwendig.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Polyester PLGA (Poly-(lactic-co-glycolic acid) ist aus den Monomeren Milchsäure und Glykolsäure. ¹	- 17 -
Abbildung 2: PLGA-Scaffolds zur Aushärtung, Durchmesser 5mm.....	- 45 -
Abbildung 3: PLGA-Membran im Bruchtest, Membrandicke 2mm; links: Membran vor Kraftausübung, rechts: Membran nach Bruch	- 49 -
Abbildung 4: Überprüfung der Dichtigkeit. Das Well ist durch die PLGA-Membran in zwei Kompartimente getrennt. Ein Kompartiment wurde mit PBS-Lösung gefüllt, das andere Kompartiment wurde mit dem gleichen Volumen PBS/Methylenblau gefüllt. Es wurde für 24h beobachtet.....	- 50 -
Abbildung 5: a) Bruchlast und b) Biegesteifigkeit der PLGA-Membran im 3-Punkt-Biegeversuch.....	- 62 -
Abbildung 6: Diffusionstest mit den Chemokinen SDF-1 α und MCP-1. Ausgangskonzentration: 1 μ g/mL; n=5/Zeitpunkt. * = signifikant im Vergleich zu allen Gruppen oder durch Strich angezeigt.	- 63 -
Abbildung 7: Anzahl der sichtbaren Poren im REM nach 1,3 und 7 Tagen in wässrigem Milieu.....	- 63 -
Abbildung 8: Detaillierte Scaffoldansicht nach Inkubation in wässrigem Milieu (PBS) für die angegebenen Zeitpunkte. a) Übersicht, b) 200x/500x Vergrößerung.	- 64 -
Abbildung 9: Ermittlung der MSC-Zellbeladungskapazität mittels MTT-Tests. „15m“=15 min Trocknungszeit, „24h“=24h Trocknungszeit. N=5. * = p<0,05 vs. 400, 2000 MSC; # = p<0,05 vs. 400, 2000 MSC.	- 65 -
Abbildung 10: Ermittlung der BMC-Zellbeladungskapazität mittels MTT-Tests. „15m“=15 min Trocknungszeit, „24h“=24h Trocknungszeit. N=5. # = p<0,05 vs. 400, 2000, 10000 BMC.	- 65 -
Abbildung 11: Zelläquivalente, bestimmt über die metabolische Aktivität via MTT-Test für BMAC. Es wurden BMAC auf dem Scaffold (Sca) und auf dem Well-Boden (Bod) getrennt untersucht.	- 66 -

Abbildung 12: CFSE-gefärbte MSC (weiße Pfeile) auf Scaffolds im Zeitverlauf, Vergrößerung 100x.	- 67 -
Abbildung 13: Metabolische Aktivität CFSE-gefärbter MSC auf nativen oder auf FCS-vorbehandelten Scaffolds. Der MTT-Test wurde an Tag 1, 3 und 7 (D1, D3, D7) durchgeführt. * = $p < 0,05$ vs. D1.....	- 67 -
Abbildung 14: Metabolische Aktivität von MSC am Scaffold nach Inkubation in a) Kontrollmedium (Kon), b) osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für 14 Tage und auf dem c) Wellboden. Die metabolische Aktivität wurde an D1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf (Bonferroni-Holm korrigierter Kruskal-Wallis-Test). * = signifikant gegenüber allen Gruppen oder durch Strich angezeigt. Mittelwerte +/- SD, n=3.	- 68 -
Abbildung 15: Metabolische Aktivität von BMC am Scaffold nach Inkubation in a) Kontrollmedium (Kon) oder b) osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für insgesamt 14 Tage. Die metabolische Aktivität wurde an D1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. * = $p < 0,05$ D1 vs. D14. N=5.....	- 69 -
Abbildung 16: Metabolische Aktivität von BMC am Wellboden. Die Inkubation erfolgte entweder in Kontrollmedium (Kon) oder in osteogenem Differenzierungsmedium (OD) für insgesamt 14 Tage. Die metabolische Aktivität wurde an Tag 1, 7 und 14 nach Zellaussaat auf die Scaffolds mittels MTT-Tests bestimmt. N=5.	- 69 -
Abbildung 17: Expression der IL-6- und IL-8-Gene unter Kontrollbedingungen (kein Differenzierungsmedium) in MSC und BMC, die auf dem PLGA-Scaffold ausgesät wurden. Die Messung erfolgte nach 1, 7 und 14 Tagen mittels RT-qPCR (Δ cT-Methode). N=5.....	- 70 -
Abbildung 18: Repräsentative Proteom-Profiler-Membranen nach VBSA, die exemplarisch mit Medium (Negativkontrolle, control) oder PLGA inkubiert wurden. Proteine mit einer signifikant erhöhten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle wurden markiert. a) GRO- α (D1-2), b) IL-5 (E3-4), c) MPO (H1-2), d) IL-8 (E7-8), e) M-CSF (G11-12).....	- 71 -

Abbildung 19: Parameter mit signifikanten Gruppenunterschieden im VBSA (Kruskal-Wallis-Test + Bonferroni-Holm adjustierte α -Korrektur). Für PLGA zeigen sich Gro- α , IL-5, IL-8, Lipocalin, M-CSF und MPO signifikant erhöht. * zeigt signifikante Unterschiede an. * = signifikant im Vergleich zu allen Gruppen oder durch Strich angezeigt..... - 72 -

Abbildung 20: Übersicht über alle gemessenen Parameter. Die Medianwerte der drei Probanden sind dargestellt. Control (Kontrolle), PLGA (Polylactid-co-Glykolid), CS (Herafill), PMMA (Polymethylmethacrylat), LPS (Lipopolysaccharid). - 74 -

Abbildung 21: Expression osteogener Markergene von MSC, die auf dem Scaffold siedelten, unter a) Kontroll-Kulturbedingungen oder unter b) osteogenen Kulturbedingungen. N=5..... - 75 -

Abbildung 22: Nachweis der Calciumabscheidung von MSC auf PLGA-Scaffolds nach 14 Tagen. Inkubiert wurde in Kontrollmedium (Kon) und osteogenem Differenzierungsmedium (OD). Kon vs. OD: $p=0,07$ (Trend); OD, D7 vs. D14: $p=0,65$; Bei Normalisierung auf Kontrolle: Kon=100% vs. OD=145%: $p=0,008$. Beispielhafte Darstellung von PLGA-Scaffolds nach ARF..... - 75 -

Abbildung 23: Photometrische Ermittlung der ALP-Aktivität in a) MSC und b) BMC anhand der Umsetzung von p-nitrophenyl-Phosphat (pNPP) in Anwesenheit des Prüfmaterials. Hierbei wurde die optische Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Inkubiert wurde in Kontrollmedium (Kon) und osteogenem Differenzierungsmedium (OD). MSC: N=5, BMC: N=3..... - 76 -

Abbildung 24: Expression des VEGF-Gens unter Kontrollbedingungen (kein Differenzierungsmedium) in MSC und BMC, die auf dem PLGA-Scaffold ausgesät wurden. Die Messung erfolgte nach 1, 7 und 14 Tagen mittels RT-qPCR (Δ cT-Methode). N=5..... - 77 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beladungsschema zur Bestimmung der maximalen Beladungskapazität in Abhängigkeit der Aushärtezeit; n=5..... - 46 -

Tabelle 2: Beladungsschema Langzeitüberleben von MSC und BMC; Genex. = Genexpression, ALP = Alkalische Phosphatase, ARF = Alizarin-Rot-Färbung, KM = Kontrollmedium	- 54 -
Tabelle 3: Vergleichsmaterialien/-substanzen	- 56 -
Tabelle 4: Vollblutentnahme bei gesunden Probanden, n=3	- 56 -
Tabelle 5: Parameter mit lokalen statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (ohne α -Korrektur). Statistik auf PLGA bezogen, wenn nicht anders angegeben, $*=p<0,05$ vs. PLGA, Mittelwerte \pm SD.	- 72 -

Literaturverzeichnis

1. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3640-3659. Published February 28, 2014.
2. Langer Robert, Vacanti Joseph P. Tissue Engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-926. doi:10.1126/science.8493529
3. Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007;59(4):249-262. doi:10.1016/j.addr.2007.03.015
4. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase P de, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury.* 2008;39:S9-S20. doi:10.1016/S0020-1383(08)70011-1
5. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury.* 2007;38:S3-S6. doi:10.1016/S0020-1383(08)70003-2
6. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 2011;42:S77-S81. doi:10.1016/j.injury.2011.06.014
7. Langer R. Tissue Engineering. *Molecular Therapy.* 2000;1(1):12-15. doi:10.1006/mthe.1999.0003

8. Langer R. Editorial: Tissue Engineering: Perspectives, Challenges, and Future Directions. *Tissue engineering*. 2007;13(1):1-2. doi:10.1089/ten.2006.0219
9. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, et al. An introduction to bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*. 2019;43(2):69-86. doi:10.1177/0391398819876286
10. Rider P, Kačarević ŽP, Alkildani S, Retnasingh S, Schnettler R, Barbeck M. *Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation*. 2018.
11. Williams D. Biomaterials and biocompatibility. *Medical progress through technology*. 1976;4:31-42.
12. Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;110:110698. doi:10.1016/j.msec.2020.110698
13. Söhling N, Ondreka M, Konradowitz K, Reichel T, Marzi I, Henrich D. Early Immune Response in Foreign Body Reaction Is Implant/Material Specific. *Materials (Basel)*. 2022;15(6). doi:10.3390/ma15062195
14. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(1):41-58. doi:10.4155/tde.14.91
15. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. 2011;2011:1-19. doi:10.1155/2011/290602
16. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003;5:1-16; discussion 16. doi:10.22203/ecm.v005a01
17. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3(3):1377-1397. doi:10.3390/polym3031377

18. Wu L, Zhang J, Jing D, Ding J. "Wet-state" mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2006;76A(2):264-271. doi:10.1002/jbm.a.30544
19. Hannouche D, Petite H, Sedel L. Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83:157-164. doi:10.1302/0301-620X.83B2.12106
20. Anderson J. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31:81-110.
21. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
22. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials (Basel).* 2015;8(9):5671-5701. doi:10.3390/ma8095269
23. Wilson C, Clegg R, Leavesley D, Percy M. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue engineering.* 2005;11:1-18. doi:10.1089/ten.2005.11.1
24. Xia Z, Triffitt J. A review on macrophage response to biomaterials. *Biomedical materials (Bristol, England).* 2006;1:R1-9. doi:10.1088/1748-6041/1/1/R01
25. Boehler RM, Graham JG, Shea LD. Tissue engineering tools for modulation of the immune response. *BioTechniques.* 2011;51(4):239-254. doi:10.2144/000113754
26. David W.H. Riches, Edward D. Chan, Brent W. Winston. TNF- α -induced Regulation and Signalling in Macrophages. *Immunobiology.* 1996;195(4):477-490. doi:10.1016/S0171-2985(96)80017-9
27. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology.* 2018;233(9):6425-6440. doi:10.1002/jcp.26429
28. Amitava Das, Mithun Sinha, Soma Datta, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *The American Journal of Pathology.* 2015;185(10):2596-2606. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.001

29. Anderson JM. Inflammatory Response to Implants. *ASAIO Journal*. 1988;34(2).
https://journals.lww.com/asaiojournal/Fulltext/1988/04000/Inflammatory_Response_to_Implants.5.aspx
30. Jeremic A, Kelly M, Cho JA, Cho S-J, Horber J, Jena BP. Calcium drives fusion of SNARE-apposed bilayers. *Cell Biology International*. 2004;28(1):19-31. doi:10.1016/j.cellbi.2003.11.004
31. Anderson J, Defife K, McNally A, TO C, CR J. Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 1999;10:579-588. doi:10.1023/A:1008976531592
32. Williams D. Tissue-biomaterial interactions. *Journal of Materials Science*. 1987;22:3421-3445. doi:10.1007/BF01161439
33. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*. 2009;8(1):15-23. doi:10.1038/nmat2344
34. DeFife KM, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson J. Spatial regulation and surface chemistry control of monocyte/macrophage adhesion and foreign body giant cell formation by photochemically micropatterned surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;45:148-154. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199905)45:2<148:AID-JBM10>3.0.CO;2-U
35. Dimitriou R, Tsiridis E, FGiannoudis, Peter V, Giannoudis PV. *Current Concepts of Molecular Aspects of Bone Healing*.
36. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*. 1978;60-B(2):150-162. doi:10.1302/0301-620X.60B2.350882
37. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
38. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(1):45-54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164
39. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral*

- Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 1996;82(6):594-606.
doi:10.1016/S1079-2104(96)80431-8
40. Huang W, Yang S F Shao, Jianzhong, Shao J F Li, Yi-Ping, Li YP. *Signaling and Transcriptional Regulation in Osteoblast Commitment and Differentiation.*
41. Phillips AM. *Overview of the Fracture Healing Cascade.*
42. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research.* 1998;(355 Suppl):S7-21.
doi:10.1097/00003086-199810001-00003
43. Jaiswal N, Haynesworth S, Caplan A, Bruder S. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64:295-312. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<295:AID-JCB12>3.3.CO;2-6
44. Andrew C, BASSETT L. Biophysical Principles Affecting Bone Structure. In: 1971:1-76.
45. J F Keating, A H R W Simpson, C M Robin. The management of fractures with bone loss. *Economica.* 2003;70(280):691-697. doi:10.1046/j.0013-0427.2003.00027.x
46. William Obremsky 1 , Cesar Molina, Cory Collinge, Arvind Nana, Paul Tornetta 3rd, Claude Sagi, Andrew Schmidt, Robert Probe, Jaimo Ahn, Bruce D Browner. Current Practice in the Management of Open Fractures Among Orthopaedic Trauma Surgeons.
47. David W. Sanders, MD, Mohit Bhandari, MD, Gordon Guyatt, PhD, Diane Heels-Ansdell, PhD. Critical-sized defect in the tibia: is it critical?
48. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma.* 2018;32 Suppl 1:S7-S11. doi:10.1097/BOT.0000000000001115
49. Henrich D, Seebach C, Nau C, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10):E382-E396.
doi:10.1002/term.1826

50. Nau C, Seebach C, Trumm A, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. 2016;47(2):325-334. Published November 10, 2015.
51. Masquelet AC, Fitoussi F, Bégue T, Muller G. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Annales de chirurgie plastique et esthétique*. 2000;45:346-353.
52. Sagi HC, Young ML, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Tornetta P. Qualitative and quantitative differences between bone graft obtained from the medullary canal (with a Reamer/Irrigator/Aspirator) and the iliac crest of the same patient. *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(23):2128-2135. doi:10.2106/JBJS.L.00159
53. Dirk Henrich, Caroline Seebach, Eva Sterlepper, Christian Tauchmann, Ingo Marzi, Johannes Frank. RIA reamings and hip aspirate: A comparative evaluation of osteoprogenitor and endothelial progenitor cells.
54. Cox G, Jones E, McGonagle D, Dennis D, McGonagle D, FGiannoudis, Peter V, Giannoudis PV. *Reamer-Irrigator-Aspirator Indications and Clinical Results: A Systematic Review*.
55. Kobbe P, Laubach M, Hutmacher DW, Alabdulrahman H, Sellei RM, Hildebrand F. *Convergence of Scaffold-Guided Bone Regeneration and RIA Bone Grafting for the Treatment of a Critical-Sized Bone Defect of the Femoral Shaft*.
56. S. Walzer, D. Stelzeneder, M. Schreiner, R. Windhager. Therapeutic utilization of stem cells in orthopedics.
57. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi:10.3727/096368910X
58. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
59. Chen AK-L, Reuveny S, Oh SKW. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements

- and future direction. *Biotechnology Advances*. 2013;31(7):1032-1046. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.03.006
60. Asha Shekaran, Eileen Sim, Kah Yong Tan, et al. Enhanced in vitro osteogenic differentiation of human fetal MSCs attached to 3D microcarriers versus harvested from 2D monolayers.
61. Henrich D, Verboket R, Schaible A, et al. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int*. 2015;2015:762407. doi:10.1155/2015/762407
62. Alley CD, MacDermott RP. Separation and characterization of human bone marrow mononuclear cells from aspirates and ribs. *J Immunol Methods*. 1980;32(3):223-237. doi:10.1016/0022-1759(80)90188-X
63. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Beaujean F, Rouard H, Rouard H. *Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells*.
64. Kohno Y, Lin T, Pajarinen J, et al. Osteogenic ability of rat bone marrow concentrate is at least as efficacious as mesenchymal stem cells in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019;107(8):2500-2506. doi:10.1002/jbm.b.34340
65. Wise JK, Alford AI, Goldstein SA, Stegemann JP. Comparison of Uncultured Marrow Mononuclear Cells and Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells in 3D Collagen-Chitosan Microbeads for Orthopedic Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2013;20(1-2):210-224. doi:10.1089/ten.tea.2013.0151
66. Du F, Wang Q, Ouyang L, et al. Comparison of concentrated fresh mononuclear cells and cultured mesenchymal stem cells from bone marrow for bone regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(4):598-609. doi:10.1002/sctm.20-0234
67. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87(7):896-902. doi:10.1302/0301-620X.87B7.16289

68. Gessmann J, Köller M, Godry H, Schildhauer TA, Seybold D. Regenerate augmentation with bone marrow concentrate after traumatic bone loss. *Orthop Rev (Pavia)*. 2012;4(1):e14. doi:10.4081/or.2012.e14
69. Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10542-10546. doi:10.1073/pnas.89.21.10542
70. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. 2001;10(2):S96-S101. doi:10.1007/s005860100282
71. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13). doi:10.3390/ijms22136651
72. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006;99(5):1233-1239. doi:10.1002/jcb.20958
73. Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Development of Stepwise Osteogenesis-mimicking Matrices for the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Functions*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(45):31164-31173. doi:10.1074/jbc.M109.054676
74. Afzal F, Pratap J, Ito K, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol*. 2005;204(1):63-72. doi:10.1002/jcp.20258
75. Ge C, Xiao G, Di Jiang, et al. Identification and Functional Characterization of ERK/MAPK Phosphorylation Sites in the Runx2 Transcription Factor*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(47):32533-32543. doi:10.1074/jbc.M109.040980
76. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*. 2009;433(1):1-7. doi:10.1016/j.gene.2008.12.008
77. Cheng S, Yang J, Rifas L, Zhang S, Avioli L. Differentiation of Human Bone-Marrow Osteogenic Stromal Cells in Vitro - Induction of the Osteoblast

- Phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology*. 1994;134:277-286. doi:10.1210/en.134.1.277
78. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(5):117. doi:10.1186/scrt328
79. Volkmer E, Leicht U, Moritz M, et al. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature as carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24(9):2223-2234. doi:10.1007/s10856-013-4966-6
80. Kanoh S, Kawasaki H. Studies on the relationship between the pyrogen test and Limulus test. *Eisei Shikenjo hōkoku. Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*. 1980;98:76-80. doi:10.1016/S0021-5198(19)65474-0
81. Hartung T, Wendel A. *Detection of Pyrogens Using Human Whole Blood*.
82. FUJIWARA H, ISHIDA S, SHIMAZAKI Y, Naito S, Tsuchiya M, MATSUURA S. Measurement of Endotoxin in Blood Products Using an Endotoxin-Specific Limulus Test Reagent and Its Relation to Pyrogenic Activities in Rabbit. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1990;110:332-340. doi:10.1248/yakushi1947.110.5_332
83. Hartung T. The human whole blood pyrogen test - lessons learned in twenty years. *ALTEX*. 2015;32(2):79-100. doi:10.14573/altex.1503241
84. Leppänen O, Sievänen H, Jokihäärä J, Järvinen TL, Pajamäki I, Järvinen TL. *Three-Point Bending of Rat Femur in the Mediolateral Direction: Introduction and Validation of a Novel Biomechanical Testing Protocol*.
85. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
86. Bueno EM, Laevsky G, Barabino GA. Enhancing cell seeding of scaffolds in tissue engineering through manipulation of hydrodynamic parameters. *Journal of Biotechnology*. 2007;129(3):516-531. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.01.005

87. Tan L, Ren Y, Kuijter R. A 1-min Method for Homogenous Cell Seeding in Porous Scaffolds. *Journal of Biomaterials Applications*. 2010;26(7):877-889. doi:10.1177/0885328210389504
88. Burg KJ, Delnomdedieu M, Beiler R J, Beiler RJ, Culberson C R, et al. *Application of Magnetic Resonance Microscopy to Tissue Engineering: A Polylactide Model*.
89. Blaudez F, Ivanovski S, Ipe D, Vaquette C. A comprehensive comparison of cell seeding methods using highly porous melt electrowriting scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;117:111282. doi:10.1016/j.msec.2020.111282
90. Thevenot P, Nair A, Dey J, Jagannath, Dey J, Yang J, Jian, Yang J, Tang, Liping, Tang L. *Method to Analyze Three-Dimensional Cell Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds*.
91. Kim GB, Seo MS, Park WT, Lee GW. *Bone Marrow Aspirate Concentrate: Its Uses in Osteoarthritis*. LID - 10.3390/ijms21093224 [Doi] LID - 3224.
92. Yagi M, Mizuno M, Fujisawa R, et al. *Optimal Pore Size of Honeycomb Polylactic Acid Films for in Vitro Cartilage Formation by Synovial Mesenchymal Stem Cells*.
93. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2007;28(20):3074-3082. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.013
94. Lourenço BN, Marchioli G, Song W, Welong, Song W, Reis, Rui L, et al. *Wettability Influences Cell Behavior on Superhydrophobic Surfaces with Different Topographies*.
95. Infante A, Rodríguez CI. Secretome analysis of in vitro aged human mesenchymal stem cells reveals IGFBP7 as a putative factor for promoting osteogenesis. *Scientific Reports*. 2018;8(1):4632. doi:10.1038/s41598-018-22855-z
96. H. Schell, G. N. Duda, A. Peters, S. Tsitsilonis, K. A. Johnson, K. Schmidt-Bleek. The haematoma and its role in bone healing.

97. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. *The Role of Chemokines in Wound Healing*. LID - 10.3390/ijms19103217 [Doi] LID - 3217.
98. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, et al. *Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing*.
99. Fullerton JN, Gilroy DW. *Resolution of Inflammation: A New Therapeutic Frontier*.
100. Chawla AS, Chang TM. In-vivo degradation of poly(lactic acid) of different molecular weights. *Biomater Med Devices Artif Organs*. 1985-1986;13(3-4):153-162. doi:10.3109/10731198509118848
101. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(dl-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials*. 1995;16(4):305-311. doi:10.1016/0142-9612(95)93258-F
102. Holy CE, Dang SM, Davies JE, Shoichet MS. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. *Biomaterials*. 1999;20(13):1177-1185. doi:10.1016/S0142-9612(98)00256-7
103. Pan Z, Ding J. *Poly(Lactide-Co-Glycolide) Porous Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
104. Abdallah MN, Tran SD, Abughanam G, et al. *Biomaterial Surface Proteomic Signature Determines Interaction with Epithelial Cells*.
105. Mazzotti F, Beuttler J, Zeller R, et al. In vitro pyrogen test—A new test method for solid medical devices. *J Biomed Mater Res*. 2007;80A(2):276-282. doi:10.1002/jbm.a.30922
106. Cornish J, Musson DS. *The Role of in Vitro Immune Response Assessment for Biomaterials*. LID - 10.3390/jfb10030031 [Doi] LID - 31.
107. Vasconcelos DP, Águas AP, Barbosa MA, Pelegrín P, Barbosa JN. The inflammasome in host response to biomaterials: Bridging inflammation and tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2019;83:1-12. doi:10.1016/j.actbio.2018.09.056

108. Xu L-C, Siedlecki CA. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(22):3273-3283. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.03.032
109. Pfüringer D, Harrasser N, Beirer M, et al. *Influence of Absorbable Calcium Sulfate-Based Bone Substitute Materials on Human Haemostasis-in Vitro Biological Behavior of Antibiotic Loaded Implants*. LID - 10.3390/ma11060935 [Doi] LID - 935.
110. Kaga N, Fujimoto H, Morita S, Yamaguchi Y, Matsuura T. *Contact Angle and Cell Adhesion of Micro/Nano-Structured Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Membranes for Dental Regenerative Therapy*. 2021.
111. Brugnara M, Della Volpe C FSiboni S, Siboni S FZeni, Dario, Zeni D. *Contact Angle Analysis on Polymethylmethacrylate and Commercial Wax by Using an Environmental Scanning Electron Microscope*.
112. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*.
113. Tang L, Thevenot P, Hu W. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2008;8(4):270-280. doi:10.2174/156802608783790901
114. Dinnes DL, Marçal H FMahler, Stephen M, Mahler SM FSanterre, J Paul, Santerre JP FLabow, Rosalind S, Labow RS. *Material Surfaces Affect the Protein Expression Patterns of Human Macrophages: A Proteomics Approach*.
115. Qutachi O, Vetsch JR, Gill D, et al. *Injectable and Porous PLGA Microspheres That Form Highly Porous Scaffolds at Body Temperature*.
116. Harada A, Sekido N Fakahoshi, T, Akahoshi T FWada, T, Wada T FMukaida, N, Mukaida N FMatsushima, K, Matsushima K. *Essential Involvement of Interleukin-8 (IL-8) in Acute Inflammation*.
117. NEMUNAITIS J. Macrophage function activating cytokines: potential clinical application. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1993;14(2):153-171. doi:10.1016/1040-8428(93)90022-V

118. Kinkade JM, Pember SO, Barnes KC, Shapira R, Spitznagel JK, Martin LE. Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983;114(1):296-303. doi:10.1016/0006-291X(83)91627-3
119. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):598-625. doi:10.1189/jlb.1204697
120. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 1994;179(2):703-708. doi:10.1084/jem.179.2.703
121. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517(7534):293-301. doi:10.1038/nature14189
122. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-189. doi:10.1189/jlb.0603252
123. Friedrich Felix Hoyer, Kamila Naxerova, Maximilian J. Schloss, et al. Tissue-specific macrophage responses to remote injury impact the outcome of subsequent local immune challenge.
124. Ganesh Kolumam, Xiumin Wu, Wyne P. Lee, Jason A. Hackney, Jose Zavala-Solorio, Vineela Gandham, Dimitry M. Danilenko, Puneet Arora, Xiaoting Wang, Wenjun Ouyang. IL-22R Ligands IL-20, IL-22, and IL-24 Promote Wound Healing in Diabetic db/db Mice.
125. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews*. 1992;44(1):1.
126. Waeckerle-Men Y, Scandella E, Uetz-Von Allmen E, et al. Phenotype and functional analysis of human monocyte-derived dendritic cells loaded with biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres for immunotherapy.
127. Park J, Babensee JE. Differential functional effects of biomaterials on dendritic cell maturation. *Acta Biomater*. 2012;8(10):3606-3617. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.006

128. Roberto Nicolete, Daiane F. dos Santos, Lúcia H. Faccioli. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response.
129. Lewis JS, Roche C, Zhang Y, et al. Combinatorial delivery of immunosuppressive factors to dendritic cells using dual-sized microspheres. *J Mater Chem B*. 2014;2(17):2562-2574. doi:10.1039/c3tb21460e
130. Chen Z, Klein T, Murray R, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. *Materials Today*. 2015;4. doi:10.1016/j.mattod.2015.11.004
131. Gibon E, Córdova LA, Lu L, et al. *The Biological Response to Orthopedic Implants for Joint Replacement. II: Polyethylene, Ceramics, PMMA, and the Foreign Body Reaction*.
132. Yaszay B, Trindade MC FLind, M, Lind M FGoodman, S B, Goodman SB FSmith, R L, Smith RL. *Fibroblast Expression of C-C Chemokines in Response to Orthopaedic Biomaterial Particle Challenge in Vitro*.
133. Apte G FBörke, Julia, Börke J FRothe, Holger, Rothe H FLiefeith, Klaus, Liefeith K FNguyen, Thi-Huong, Nguyen TH AUID- ORCID: 0000-0002-9237-3482. *Modulation of Platelet-Surface Activation: Current State and Future Perspectives*.
134. Koh LB, Rodriguez I FVenkatraman, Subbu S, Venkatraman SS. *The Effect of Topography of Polymer Surfaces on Platelet Adhesion*.
135. Gorbet M, Sperling C, Maitz MF, Siedlecki CA, Werner C, Sefton MV. *The Blood Compatibility Challenge. Part 3: Material Associated Activation of Blood Cascades and Cells*.
136. Liebers V, Kendzia B, Stubel H, et al. *Cell Activation and Cytokine Release Ex Vivo: Estimation of Reproducibility of the Whole-Blood Assay with Fresh Human Blood*.
137. Wouters IM, Douwes J FThorne, Peter S, Thorne PS FHeederik, Dick, Heederik D FDoekes, Gert, Doekes G. *Inter- and Intraindividual Variation of Endotoxin- and Beta(1 --> 3)-Glucan-Induced Cytokine Responses in a Whole Blood Assay*.

138. Schmidt-Bleek K, Schell H FLienau, Jasmin, Lienau J FSchulz, Norma, et al. *Initial Immune Reaction and Angiogenesis in Bone Healing*.
139. Wu L, Jing D, Ding J. A “room-temperature” injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds. *Biomaterials*. 2006;27(2):185-191. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.105

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung eines neuartigen Knochenersatzmaterials auf PLGA-Basis hinsichtlich Immunreaktivität, Zytokompatibilität und physikalischen Eigenschaften“

am Zentrum der Chirurgie, in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. Maren Janko mit Unterstützung durch Dr. Nicolas Söhling ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Nicolas Söhling, Muriel Ondreka, Kerstin Konradowitz, Tobias Reichel, Ingo Marzi und Dirk Henrich, Early Immune Response in Foreign Body Reaction Is Implant/Material Specific, *Materials*, 15(6), 2195, 2022

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an:

- Prof. Dr. Dirk Henrich, für seine tatkräftige Unterstützung, sein Wissen und seine Anteilnahme an unserem Projekt, seine Geduld und Ausdauer auf diesem langen Weg und die stete Gelassenheit, mit der er so manche Schwierigkeit in ein neues Licht zu rücken wusste.
- PD Dr. Maren Janko, für ihre Unterstützung in der Schlussphase und ihr Verständnis.
- Dr. Nicolas Söhling, der immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn mal etwas gehakt hat.
- Heraeus Medical (Wehrheim, Deutschland), meinem kooperierenden Unternehmen, und besonders Tobias Reichel, der trotz Unwegsamkeiten das Projekt weiter vorantrieb.
- Kerstin Wilhelm-Kontradowitz und Katrin Jurida für die umfassende Einarbeitung in alle Labormethoden und die geduldige Beantwortung all meiner Fragen und Folgefragen.
- Besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden: Meinen Eltern Felizitas und David Ondreka, die mich in meiner akademischen wie auch persönlichen Entwicklung immer unterstützt und maßgeblich geprägt haben. Ohne euch wäre ich nicht die, die ich heute bin und würde nicht diese Arbeit in Händen halten. Meinem Freund Christopher Porzig, der mich sowohl mental als auch physisch gestärkt und unterstützt hat, nicht nur mit seinen Word-Fähigkeiten. Meinen Freundinnen Anne Fischer, Hannah Schroeder, Annebirth Steinmann und Christina Zorbach, mit denen ich im Medizinstudium wie auch während dieser Arbeit Freude und Leid teilen durfte und dies glücklicherweise auch weiter tun darf. Die Welt wäre ein wenig dunkler und wesentlich langweiliger ohne euch.