

IMV01

*H. Böhm, H. Salheen

Evaluation of safety and efficacy of BMP in revision of failed spine fusion

Introduction:The established treatment concept consists of removal of the pseudoarthrotic tissue and reapplication of autologous bone graft. In spite of this, success in respect of achieving solid bony fusion often is not reached. **Objective:**To evaluate the efficacy and safety of BMP in treatment of pseudoarthrosis after spine fusion. **Patients and methods:**This retrospective study was conducted in Zentralklinik BadBerka in between August 2003 and November 2008. 30 patients, 12 females and 18 males, average age 63.4 years old (83-29 years old) after failed spine fusion complicated by pseudoarthrosis. All patients underwent revision of the fusion using BMP 7 and autologous graft. The radiological and clinical data of these patients were retrospectively evaluated to determine the safety and efficacy of using BMP in spine fusion revision surgery. **Results:**From 30 cases, 29 cases were successfully fused within one year after revision, 1 case showed no radiological evidence of solid fusion till the end of the study, without significant clinical manifestations of instability and was conservatively treated

No patient suffered from postoperative spinal canal stenosis or ectopic calcification. No patient had postoperative neurological deficits. No specific manifestations of postoperative allergic reaction to BMP. One diabetic patient had a delayed postoperative wound infection-7 months postoperatively-which was successfully managed by a wound debridement. **Discussion:**Fears of ectopic bone formation or of increased occurrence of infection proved to be unnecessary in our study. Since no ectopic bone was induced over a time period of 3 to 8 years it seems highly unlikely, that something should happen in the long term postoperative course. Administered at the site of failed fusion, BMP7 proved to be very effective in fostering new bone formation. A successful fusion even in "hopeless cases" could be established in 96,6% in this demanding patient group.

Korrespondenzanschrift

Heinrich Böhm
Zentralklinik Bad Berka
Robert Koch Allee 7
99439 Bad Berka
Deutschland

IMV02

*K. Zurlinden, D.-S. Dohle, M. Laub, H.P. Jennissen

Immobilization and controlled release of vascular growth factor (VEGF) on a synthetic bone replacement material

Introduction

The prominent role of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) for angiogenesis and vascularisation in bone development and osseointegration has been shown [1]. Therefore a combination of VEGF and bone replacement materials may be of great interest for the treatment of bony defects. Previously we demonstrated that BMP-2 can be immobilized bioactively on hydroxapatite [2]. Here we show that the amount of immobilized VEGF on a synthetic bone replacement material can be steered by variation of protein concentration in the incubation solution. The bound VEGF is slowly released from the surface with a half-live in the range of several weeks.

Materials and Methods

Adsorption and desorption characteristics of self-prepared VEGF on Artosal[®] (botiss AG, Berlin), a synthetic bone replacement material consisting of 40% tricalciumphosphate and 60% hydroxyapatite, was analyzed. VEGF was labelled radioactively according to the iodide monochloride procedure. Biological activity of VEGF was determined in a cell-migrating-assay (scratch-assay) using HUVEC cells.

Results and Discussion

In vitro- testing of self-prepared VEGF revealed a high biological activity ($K_D \sim 1.8$ pM VEGF) (Fig. 1). Depending on initial protein concentration used for incubation up to 95 µg VEGF per g Artosal[®] could be immobilized (Table 1).

Figure 1: Dose-response curve of self-prepared VEGF as determined by cell-migration-assay (scratch assay)

Initial VEGF concentration [µg/ml]	Immobilized VEGF [µg/g Artosal]
10	32.84 ± 3.98
50	66.47 ± 8.22
100	95.09 ± 15.43

Table 1: Immobilization of VEGF on Artosal[®]

As shown in Figure 2 the release of VEGF occurred in form of a two phase exponential decay. An initial burst phase ($t_{1/2} \sim 0.11$ d) was followed by a prolonged second phase ($t_{1/2} \sim 37$ d). This promising results in biocoating of

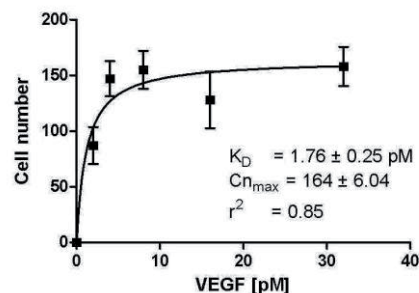
a bone replacement material with VEGF will be further analyzed for a combination of VEGF and BMP-2.

Figure 2: Two-phase exponential release of ¹²⁵I-VEGF from Artosal

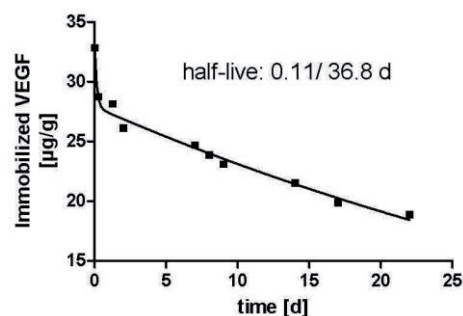
References

- [1] Mayr-Wohlfart, U., Waltenberger, J., Hausser, H., Kessler, S., Guenther, K.P., Dehio, C., Pulh, W., Brenner, R.E. (2002). Bone **30**, 472-477.
- [2] Zurlinden, K., Laub, M., Jennissen H.P. (2005) *Materialwiss. Werkstofftech.* **36**, 820- 827

Anhang 1



Anhang 2



Korrespondenzanschrift

Kristin Zurlinden
MorphoPlant GmbH
Universitätsstr. 136
44799 Bochum
Deutschland

IMV03

*W. Meyer, S. Engelhardt, E. Novosel, N. Seiler, K. Borchers, P. Kluger, G. Tovar, B. Elling, M. Wegener, H. Krüger

Photoreactive materials for rapid prototyping, building up a flexible, capillarie blood-vessel-systems.

Content

The limitation in tissue engineering to build up vascularised in vitro tissues or organs is a functional and sufficient blood vessel system[1] with very small (< 2 mm) and smallest (< 1 mm) capillary vessel system. New materials for rapid prototyping processes are needed that fulfill the variety of requirements on the processing side on the one hand and the multifold demands on a medical implant device as well.

Task

Here, we will demonstrate the design of multifunctional polymer materials for the build-up of an artificial 3D-blood vessel system optimized to different rapid prototyping methods: Stereolithography (SL), multiphoton polymerisation (MPP)[2] and 3D-Inkjet process. The developed photo-curable materials fit both the parameters of the chosen process e.g. viscosity and surface tension, as well as the products properties like mechanical flexibility, elongation strength, swelling behavior and biocompatibility.

Experiments

A homologues serie of α,ω -hydroxy-oligoethers with polymerisable endgroups have been synthesized and characterized by NMR, IR and GPC. Viscosity and surface tension of the polymerisable ink were adapted to the needs of the chosen process. Post-cured materials were studied in regard to their elastic modulus, elongation strength and swelling behavior. Primary human endothelial cells were seeded on the material. The viability, morphology, adhesion and functionality of the cells were examined by cell proliferation assay (WST-1).

1. Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews; In Press, Accepted Manuscript

2. Engelhardt S, Hu Y, Seiler N, Riestler D, Meyer W, Krüger H, Wehner M, Bremer-Koebberling E, Gillner A. 3D-Microfabrication of Polymer-Protein Hybrid Structures with a Q-Switched Microlaser. JLMN 2011;6(1):54-58

Korrespondenzanschrift

Wolfdietrich Meyer
Fraunhofer Institut für angewandte Polymerchemie (IAP)
Geiselbergstr. 69
14469 Potsdam
Deutschland

IMV04

*N. Dongowski, O. Kilian, R. Schnettler

Ist das Neurotrophin BDNF (brain derived nerve factor) ein wichtiger pro- angiogener und pro- osteogener Faktor in der humanen Frakturheilung?

Fragestellung

Jüngste umfangreiche tierexperimentelle Untersuchungen haben zeigen können, das Neurotrophine neu entstandene Blutgefäßformationen nach Trauma stabilisieren. Desweiteren fördern sie im Tiermodell die Formation von mineralisiertem Gewebe. BDNF hat einen stimulierenden Effekt auf die Angiogenese durch Förderung der VEGF Rezeptor Aktivierung in Mäusen. Beeinflusst BDNF und sein spezifischer Rezeptor TrkB als wichtiger Faktor auch die humane Frakturheilung?

Methodik

Es wurden Biopsien aus dem Frakturspalt von diaphysären Frakturen entnommen (Frakturhämatom, Granulationsphase, Ossifikationsphase/ je n= 6). Ebenso physiologische Spongiosa aus Hüftköpfen (n= 6). Diese wurden dann mittels RT-PCR, Immunhistochemie und Doppelimmunhistochemie bezüglich des Expressionsmuster von BDNF bzw. TrkB untersucht. Als Kontrollen dienten humanes Astrozytombgewebe, HUVEC und humane transformierte osteoblastäre Zell-Linien (Osteosarkomzell-Linien).

Ergebnisse

Im Knochen mit physiologischen Remodeling konnte BDNF nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis von TrkB hingegen, konnte in Gefäßen erbracht werden. Beim Eintreten einer Fraktur wurden bereits im Frakturhämatom sowohl BDNF als auch TrkB in hämatopoetischen Zellen detektiert. In der Granulationsphase konnte immunhistochemisch die Expression von BDNF und TrkB in sich neu formierenden Gefäßen und vereinzelt in Bindegewebszellen nachgewiesen werden.

Im Ossifikationsstadium zeigten aktive Osteoblasten sowie junge Osteozyten immunhistochemische Aktivität für BDNF und TrkB. Es konnte ein deutlicher Rückgang der Expression für BDNF in Gefäßen aufgezeigt werden. In den humanen Nabelschnurvenenendothelzellen konnte der Nachweis von BDNF und TrkB bei gesteigerter angiogener Aktivität erbracht werden. In der humanen transformierten osteoblastären Zell-Linie wurde der Nachweis beider Proteine bei gesteigerter osteogener Aktivität aufgezeigt.

Schlussfolgerung

Die Untersuchungen liefern erste Hinweise, das BDNF als parakriner und/oder autokriner Faktor in der humanen Frakturheilung eine Rolle spielt. Es tritt nur in aktiven Prozessen auf und könnte somit pro-angiogen sowie auch pro-osteogen die Frakturheilung beeinflussen. Es stellt sich nun die Frage ob exogen zugefügtes BDNF zu einer Verbesserung der Geweberegeneration durch Förderung der Neoangiogenese und der Osteogenese nach Gewebeverletzung führt.

Korrespondenzanschrift

Nicole Dongowski
Universitätsklinik Gießen
Rudolf-Buchheim Strasse 7
35358 Gießen
Deutschland

IMV05

*C. Lurtz, H.W. Rohm, J. Wegmann, E.K. Odermatt, D. Behrend, K.-P. Schmitz, K. Sternberg

Neuartiger biodegradierbarer Gewebekleber auf der Basis eines 1,2-Ethylenglykol-bis(dimilchsäure)-Derivats

Hintergrund

Gegenstand der Untersuchungen war die Entwicklung und Charakterisierung eines biodegradierbaren Zweikomponentenklebersystems auf der Basis eines Derivats der 1,2-Ethylenglykol-bis(dimilchsäure) (ELA), das mit Chitosanchlorid als zweiter Komponente unter Vernetzung reagiert und das Verkleben von Gewebeteilen, insbesondere im Weichgewebekontakt, gewährleistet.

Material und Methoden

Die Synthese von ELA ($M = 350,3 \text{ g/mol}$) und die anschließende Derivatisierung mit Hexamethylendiisocyanat (HDI) zum Reaktionsprodukt ELA-NCO (ELA/HDI 1/2 n/n) sowie dessen Verdünnung mit Dimethylsulfoxid erfolgte entsprechend Sternberg *et al.* (2010) [1]. Die Klebereaktion mit Chitosanchlorid ($M_w = 270.000 \text{ g/mol}$, DD 86 %) wurde entsprechend Rohm *et al.* (2011) [2] unter den dort beschriebenen Bedingungen bei 37 °C durchgeführt. Zur Charakterisierung der Einzelkleberkomponenten und des Klebersystems wurden NMR- und FTIR-spektroskopische Untersuchungen, rheologische Oszillationstests (Ermittlung der Viskosität und des Gelpunktes), quasistatische uniaxiale Zugversuche an bovinem Muskelgewebe (Ermittlung der Klebefestigkeit nach 10 min und 48 h Expositionszeit im Vergleich zum Fibrinkleber) sowie Biokompatibilitätsstudien *in vitro* (L929-Mausfibroblasten) und *in vivo* (intra- und perimuskulär, Ratte) durchgeführt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Für das sterile Klebersystem ELA-NCO/Chitosanchlorid wurde eine im Vergleich zum Referenzkleber signifikant höhere Klebefestigkeit ($p < 0,001$ mit $n = 12$ Einzelmessungen) bei 37 °C nach 10 min ($\sim 4.720 \pm 1.700 \text{ N/mm}^2$) und 48 h ($\sim 11.640 \pm 3.100 \text{ N/mm}^2$) Expositionszeit festgestellt. In den rheologischen Tests konnte der Sol-Gel-Übergang bei $196,4 \text{ s} \pm 40,1 \text{ s}$ ($n = 5$) ermittelt werden, was dem Kliniker nach Kleberapplikation ausreichend Verarbeitungszeit, beispielsweise zur Fixation der zu verklebenden Gewebeteile und zur Positionierung von Defektdeckungsmaterialien, ermöglicht.

Darüber hinaus bestätigten die *in vitro* und *in vivo* Biokompatibilitätsstudien eine gute Verträglichkeit, was abschließend die Eignung des neuartigen biodegradierbaren Klebersystems unterstreicht.

Literatur

- [1] Sternberg K *et al.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010;94(2):318-26.
- [2] Rohm H *et al.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;97(1):66-73.

Korrespondenzanschrift

Claudia Lurtz
Universität Rostock
Friedrich-Barnewitz-Str. 4
18119 Rostock
Deutschland

IMV06

*K. Rischka, S. Ghanaati, M. Mularczyk, M. Kozielc, B. Saldamli, R. Sader

Entwicklung eines Miesmuschel-inspirierten Hybrid-Klebstoffs für die dentale Implantologie

Hintergrund

Ein großes Anwendungsgebiet für einen biokompatiblen Klebstoff liegt im Bereich der dentalen Implantologie. Bei dem Einsatz einer künstlichen Zahnwurzel besteht trotz des Erfolgs ein entscheidender Nachteil, der den weiteren Verlust von oralen Hart- und Weichgewebe begünstigt[1]. Dem transmukösen Weichgewebe-Interface, der sog. biologische Breite, kommt somit eine spezielle Bedeutung zu[2]. Im Gegensatz zu natürlichen Zähnen ist die biologische Breite um Zahnimplantate nur lose ohne direkten Kontakt um das Biomaterial angelagert.

Im Rahmen eines Verbundprojektes wurde ein Klebstoff mit einem Miesmuschel-basierenden Peptid dahingehend entwickelt, dass dieser durch seine Biokompatibilität und seine Verbundkraft nicht nur eine effektive Barriere gegen das Eindringen von Bakterien ausbilden, sondern auch die Langzeitstabilität von transmukösen Implantaten entscheidend verbessern könnte.

Methoden

In einem Schlüsselexperiment wurden die Biokompatibilität und klebtechnischen Eigenschaften des Verbundklebstoffs ermittelt. Die *in vitro* Tests wurden gemäß DIN EN ISO 10993 durchgeführt. Hierfür wurden sowohl die tierische Fibroblastenzelllinie L-929 als auch primäre humane Fibroblasten eingesetzt. Die *in vivo* Untersuchungen des Klebstoffs wurden an einem subkutanen Implantationsmodell an CD-1 Mäusen durchgeführt. Anschließend wurden Gewebeschnitte angefertigt und immunhistologisch gefärbt. Die verwendeten Peptide wurden mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Zur Bestimmung der Zugfestigkeit wurde Schweinegingiva an Titan mit dem erzielten Biomaterial verbunden.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Das Biomaterial zeigt eine hervorragende Biokompatibilität mit einer nur sehr geringgradigen Ausprägung bzw. Induktion von inflammatorischen Zellkomponenten. Das Einwachsen von Bindegewebsbrücken in das Material lässt einen baldigen Abbau des Biomaterials erwarten. Durch das geringgradige Auftreten eines Gewebesaaumes um die Implantate herum und die Standzeit der Materialien innerhalb der ersten 15 Tage nach der Implantation scheint das Biomaterial für den Zweck der Gewebeför-

derung und Verhinderung des Eindringens bakterieller Komponenten gut geeignet.

Die Peptidmodifikation des Biomaterials zeigte eine Verbesserung der klebtechnischen Eigenschaft im Modell.

[1] Rompen E. et al. *Clin. Oral Implants Res.* **2006**; 17 Suppl 2:55

[2] Moon I.S. et al. *J. Clin. Periodontol.* **1999**; 26: 658

Korrespondenzanschrift

Klaus Rischka
Fraunhofer IFAM
Wiener Str. 12
21255 Bremen
Deutschland