

Aus der Klinik für
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DREIER INDIVIDUELL
GEFORMTER, PORÖSER MATRIZEN ZUR
INTRAMUSKULÄREN ENDOKULTIVIERUNG VON
HARTGEWEBEN UNTER EINSATZ VON REKOMBINANTEM
HUMANEM BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

OLIVER KRAPF
aus Rüsselsheim

Kiel 2010

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Dr. Warnke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hassenpflug
Tag der mündlichen Prüfung:	17.02.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	19.12.2010

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methoden.....	8
2.1.	Auswahl der Versuchstiere.....	8
2.2.	Versuchsaufbau.....	8
2.3.	Tierhaltung.....	8
2.4.	Narkose.....	8
2.5.	Gruppeneinteilung.....	9
2.6.	Operation.....	10
2.7.	Computertomographische Untersuchungen.....	11
2.8.	Polychrome Sequenzmarkierung.....	12
2.9.	Tötung der Tiere.....	12
2.10.	Präparateherstellung.....	12
2.10.1.	Herstellung der Präparate für Hartschliff.....	13
2.10.2.	Herstellung der Paraffinpräparate.....	14
2.11.	Mikroradiographien.....	15
2.12.	Fluoreszenzmikroskopien.....	15
2.13.	Toluidinblaufärbung der Hartschliffe.....	16
2.14.	Färbung der Paraffinpräparate nach Masson-Goldner	16
2.15.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinpräparate.....	16
2.16.	Immunhistochemischer Nachweis von Pecam-1.....	17
3.	Ergebnisse.....	18
3.1.	Klinik.....	18
3.2.	Computertomographie.....	18
3.3.	Mikroradiographien.....	19
3.4.	Fluoreszenzmikroskopien.....	21
3.5.	Toluidinblau.....	21
3.6.	Masson-Goldner.....	22
3.7.	Hämatoxylin-Eosin.....	23
3.8.	Immunhistochemischer Nachweis von Pecam-1.....	23
4.	Diskussion.....	25
5.	Zusammenfassung.....	31
6.	Literaturverzeichnis.....	32
7.	Bildanhang.....	38
	Danksagung.....	53
	Lebenslauf.....	55

1. Einleitung

Die Rekonstruktion ausgedehnter knöcherner Läsionen stellt für die operative Medizin eine große Herausforderung dar. Ossäre Defekte, die nach Trauma, Infektionen oder Tumorresektion verbleiben, bedeuten für den Patienten insbesondere im Bereich des kraniofazialen Skeletts eine massive Einschränkung (Allgöwer 1975). Diese betrifft sowohl die Funktion als auch die Ästhetik. Eine Deckung der Defekte kann auf verschiedene Art und Weise durchgeführt werden. Prinzipiell wird dabei ein Knochentransplantat oder ein Knochenersatzmaterial in den Defekt zur Defektrekonstruktion implantiert. Dabei ist eine größtmögliche funktionelle und ästhetische Wiederherstellung erwünscht, leider jedoch nicht immer erreichbar.

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Erforschung und klinischen Anwendung verschiedener Knochenersatzmaterialien in der rekonstruktiven Chirurgie in den letzten Jahrzehnten bleibt bis heute die Transplantation autologen Knochens der Goldstandard (Giannoudis et al. 2005, Herten et al. 2008, Laurencin et al. 2006). Mögliche Entnahmestellen hierfür sind der Beckenkamm, die Scapula, die Fibula oder auch die Rippe (Warnke et al. 2006b). Je nach Verwendungszweck und Defektgröße werden vaskularisierte oder nicht vaskularisierte Transplantate verwendet (Bauer 2007). An der Eigentransplantation ist jedoch nachteilig, dass durch den zweiten Eingriff an der Entnahmestelle ein zusätzlicher Defekt geschaffen wird. Aus diesem resultiert eine erhöhte Morbidität an der Spenderregion (Giannoudis et al. 2005), unerwünschte Nebenwirkungen sind neben Schmerzen, Schwellungen und Narbenbildung vor allem Infektionen und Mobilitätseinschränkungen (Nkenke et al. 2002, Clavero et al. 2003).

Mit modernen Operationsmethoden sollte es in der Zukunft möglich werden, Defekte zu überbrücken ohne dafür neue knöchernen Läsionen schaffen zu müssen (Warnke et al. 2004). Von Vorteil wäre es, eine echte biologische Geweberegeneration im Gegensatz zur herkömmlichen Reparatur mittels Knochenersatzmaterialien zu induzieren ohne dabei einen Zweitdefekt schaffen zu müssen.

Auf dem Gebiet der regenerativen Medizin wird vor allem in Hinblick auf die Entwicklung von Zellen, Geweben und Organen erheblicher Forschungsaufwand mit dem Ziel betrieben, die biologische Funktion therapeutisch durch eine

Transplantation wiederherzustellen. Mit dem Fachgebiet der Knochengewebszüchtung beschäftigt sich ein Teilaspekt des „Tissue Engineerings“, das „Bone Engineering“. Der generierte Knochen wird anschließend in die Empfängerregion transplantiert. Von elementarer Bedeutung für einen erfolgreichen Einsatz des gezüchteten biologischen Knochenmaterials ist dessen Osseointegration im Sinne einer echten knöchernen Durchbauung des Knochenersatzmaterials.

Die Osteogenese resultiert aus einer komplexen Abfolge verschiedener Ereignisse, bis schließlich aus unreifen Vorläuferzellen Osteoblasten entstehen. Knochengewebe entsteht, wenn die von Osteoblasten gebildete Extrazellulärmatrix mineralisiert.

Um diese Kaskade von Ereignissen induzieren und den Ablauf beeinflussen zu können, sind mehrere Faktoren entscheidend: Die Differenzierung von Osteoblasten, Kontrolle über das voranschreitende Knochenwachstum und die individuelle Formgebung des zu züchtenden Knochentransplantates durch geeignete Matrizen. Diese Matrizen müssen sowohl eine Zellmigration und -adhäsion als auch die Zellproliferation unterstützen (Reddi 2000). Um optimale Umgebungsbedingungen zu schaffen, wurde neben der in vitro-Generierung neuen Knochens in künstlichen Bioreaktoren die Methode einer in vivo-Gewebszüchtung im Patienten selbst entwickelt (Spector 1999). Dabei ist sicherlich die Nutzung des Patientenkörpers als besonders innovativ zu betrachten. Nach intensiver Erforschung in diversen Tiermodellen konnte unter anderem durch Okubo et al. 2000 nachgewiesen werden, dass sich Muskeltaschen für Bone Engineering unter Verwendung von BMP-2 hervorragend eignen.

Im Rahmen der intramuskulären Implantation des Knochenersatzmaterials entsteht eine Entzündungsreaktion infolge derer sich die Gefäßpermeabilität und die Neoangiogenese (Inoda et al. 2007, Goldberg et al. 1987) erhöhen. Daraus resultiert eine Steigerung der Anzahl undifferenzierter Vorläuferzellen im Zielgebiet. Diese können durch spezielle osteoinduktive Proteine, die als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnet werden (Inoda et al. 2007, Kirker-Head 2000), zur Differenzierung in knochenbildende Osteoblasten angeregt werden (Reddi et al. 1987). Durch Gabe solcher Morphogene kann also gezielt Osteoinduktion vermittelt werden.

Die osteoinduktive Wirkung von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wurde bereits 1965 durch Urist entdeckt. 1967 berichteten Buring und Urist von Knochenneubildung in Diffusionskammern, die – mit demineralisierter Knochenmatrix beladen – in abdominale Muskeltaschen von Kaninchen implantiert worden waren. Damit wurde erstmals belegt, dass für die Knochenbildung verantwortliche Zellen im Muskelgewebe vorhanden sein müssen. 1988 gelang die erste Synthese von rekombinantem BMP-2 (Wozney et al. 1988). Bislang konnten über 40 verschiedene BMPs isoliert, charakterisiert und zum Teil gentechnisch hergestellt werden (Ducy, Karsenty 2000).

BMPs gehören biochemisch in die TGF- β -Superfamilie. Sie spielen eine wichtige Rolle bei embryonalen Entwicklungsvorgängen und bei der Knochenbildung (Hogan 1996).

Ein wichtiges Protein aus der Gruppe der BMPs ist das BMP-2 (Gautschi et al. 2007). Durch Signaltransduktion kann BMP-2 das biologische Signal zur Osteogenese initiieren und eine Kaskade von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen in den Zellen auslösen (Sampath et al. 1992). Induziert wird die Signaltransduktion dabei durch Interaktion mit dem heterodimeren Komplex zweier Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren (Gautschi et al. 2007, Yamashita et al. 1996). Es ist die Interaktion der Typ-I-Kinase mit der Typ-II-Kinase, die zur Signalüberleitung führt. Nach Ligandenbindung phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor, welcher nachfolgend ein zur Smad-Protein-Familie gehörendes intrazelluläres Protein phosphoryliert. Verschiedene Smads bilden nun einen Komplex, der in der Lage ist, direkt molekulare Transkriptionsfaktoren zu regulieren (Groeneveld 2000).

Nachgewiesen wurde die stark osteoinduktive Wirkung von BMP-2 zuerst in Tiermodellen (Vogelin et al. 2005, Poynton et al. 2002). BMP-2, BMP-4 und BMP-7 sind in der Lage, in Hunden, Schafen und Primaten zusammen mit einem Träger aus Hydroxylapatit Defekte kritischer Größe zu heilen (Kang et al. 2004). Es ist bedeutsam, dass BMP-2 nicht nur in orthotopen, sondern auch in heterotopen Implantat- bzw. Transplantatlagern zu einer de novo Knochenbildung führt und zwar proportional zum Anstieg seiner Konzentration (Kübler 1997, Wang et al. 1988).

Mit dem Ziel, eine gerichtete Neoosteogenese zu erhalten, werden osteokonduktive und teils bioresorbierbare Matrizen verwendet, die Zellintegration, Proliferation und

Zelladhäsion unterstützen (Arnold et al. 2002, Reddi 2000). Sie dienen einwachsenden Kapillaren und undifferenzierten Vorläuferzellen als Leitschiene. Die Matrizen sollen die BMPs möglichst gleichmäßig aufnehmen, um eine harmonische Durchbauung mit neuem Knochen zu gewährleisten.

Idealerweise wird das eingebrachte Ersatzmaterial während des Knochenbildungsvorganges schleichend auf zweierlei Art und Weise durch neuen Wirtsknochen substituiert (Detsch et al. 2008, Inoda et al. 2007, Reddi et al. 1987). Einerseits kommt es im Rahmen des Remodelings zu osteoklastischer Resorption, andererseits zu physikochemischer Lösung des Knochenersatzmaterials, wobei Ionen für den Aufbau neuen Knochens zur Verfügung gestellt werden (Eppley et al. 2005).

Technologischer Fortschritt und das bessere Verständnis der Biologie der Knochenheilung und -entstehung bei Einbringung alloplastischer Knochenersatzmaterialien haben zu der Entwicklung sehr vieler verschiedener Knochenersatzmaterialien geführt. Sie finden zunehmend in der orthopädischen Chirurgie und in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Anwendung (Giannoudis et al. 2005, Van Heest, Swiontowski 1999, Summers, Eisenstein 1989).

Mineralisierter oder demineralisierter Spenderknochen birgt das Risiko der Übertragung viraler Erkrankungen und wird in einigen Gesellschaftskreisen ethisch abgelehnt (Giannoudis et al. 2005, Hierholzer, Zilch 1980).

Seit Jahren wird xenogenes, bovines Hydroxylapatit (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wollhusen, CH) verwendet. Acil et al. (2000) gelang es nachzuweisen, dass Bio-Oss® im dreidimensionalen Zellkultursystem biokompatible Eigenschaften zeigt und so gut für Bone Engineering geeignet ist. Bestätigt wurden diese Ergebnisse in vivo (Warnke et al. 2004). Es wurde nachgewiesen, dass auf Basis von Bio-Oss® gebildeter Knochen eine vergleichbar hohe Kompressionsstabilität wie natürlicher Knochen besitzt (Warnke et al. 2006a). Janssen et al. (2006) bestätigten, dass Bio-Oss® als anorganisches Biomaterial mit sehr guten osteokonduktiven Eigenschaften und hoher Biokompatibilität aufwarten kann. Dies ist bereits in über 15 randomisierten Studien getestet worden; seitdem gilt Bio-Oss® als eines der am besten erforschten Materialien.

Ein Nachteil dieses Knochenersatzmaterials besteht in seinem bovinen Ursprung, wodurch einerseits Infektionsübertragung bis heute nicht hundertprozentig

ausgeschlossen werden kann. Andererseits ist Bio-Oss® nicht individuell formbar, es wird in Blöcken verschiedener Größe geliefert.

Deshalb wird aus medizinischer Sicht zunehmend die Verwendung synthetischer Knochenersatzmaterialien gefordert, die nicht mit den beschriebenen Nachteilen behaftet sind (Seitz 2008).

Synthetisch hergestelltes Hydroxylapatit als ein alloplastisches Knochenersatzmaterial ist eine häufig genutzte Biokeramik mit guter Hartgewebsbiokompatibilität und Bioaktivität (Turhani et al. 2007). Die Osteokonduktivität von Hydroxylapatit ist trotz geringer Raten an Biodegradation hoch (Rodriguesa et al. 2003) und es ist auch nachweisbar gut als Träger von Bone Morphogenetic Proteins geeignet (Ono et al. 1995). Das Material ist dem menschlichen Knochen ähnlich, die Druckfestigkeit liegt zwischen humaner Spongiosa und kortikalem Knochen (An 2000). Es kann synthetisch mit knochenähnlichen Porengrößen von 200-400 µm hergestellt werden (Rodriguesa et al. 2003, Suchanek 1998).

β-Tricalciumphosphat (β-TCP) hat als Knochenersatzmaterial ebenfalls große Ähnlichkeit zu Knochenvorstufen und es fördert osteoblastische Knochenneubildung (Giannoudis et al. 2005, McAndrew et al. 1988). Schon lange sind auch bei diesem Knochenersatzmaterial die hohe Biokompatibilität, die Fähigkeit zur Biodegradation und die starke Osteokonduktivität nachgewiesen worden (Lee et al. 2000, Merten et al. 2001, Ono et al. 1995, Szabo et al. 2005). Beispielsweise konnte belegt werden, dass β-TCP in der Lage ist, zusammen mit rhBMP-2 in Skelettmuskeltaschen ektopen Knochen zu bilden (Jingushi et al. 2002) und dass dieser sich gleichmäßig über die gesamte Matrizie verteilt (Chen et al. 2004, Matsushita et al. 2004).

Synthetisches Hydroxylapatit und β-TCP unterstützten beide in früheren Untersuchungen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und riefen keine inflammatorischen Reaktionen hervor (Kasten et al. 2003).

2001 wurde durch Terheyden et al. erfolgreich im Minischwein unter Einsatz von Bio-Oss® und BMP-7 ein Transplantat gezüchtet und anschließend eine Mandibular-Rekonstruktion durchgeführt. Infolgedessen etablierte sich die Technik der intramuskulären Endokultivierung. Als wichtiger Vorteil dieser Technik ist zu nennen, dass durch die Nutzung des eigenen Organismus als Bioreaktor optimale

Wachstumsbedingungen generiert werden können. Die Transplantatnahrung wird gewährleistet, das Risiko einer Fremdkörperreaktion bei Transplantation sinkt erheblich (Spector 1999). Eine echte Gewebsregeneration wird erreicht.

Aufsehen erregenden Erfolg erlangten 2006 Warnke und Mitarbeiter, denen es gelang, die in zahlreichen Tierversuchen gewonnen Erkenntnisse in ein humanes Projekt umzusetzen (Warnke et al. 2006b). Es glückte, ein zuvor im M. latissimus dorsi erfolgreich präfabriziertes Mandibulartransplantat in einen Unterkieferdefekt zu transplantieren. Zur Formgebung des Transplantates, welches auf Bio-Oss®-Basis gezüchtet worden war, kam ein stabiler Titaniumkäfig zum Einsatz, der eine ausreichende dreidimensionale Stabilität ermöglichte.

Eine individuelle, dem Defekt angepasste Formgebung ist zweifellos von größter Bedeutung. In der Erforschung individueller Designmethoden gewinnt zunehmend das dreidimensionale Druckverfahren an Bedeutung (Seitz 2008). Aus computertomographischen Daten des Patienten kann heute über eine Segmentierungssoftware ein Defektmodell errechnet werden. Dieses wird in einem dreidimensionalen Druckverfahren in einen keramischen Grünkörper umgesetzt, der dann bei 1250 °C gesintert wird (Sachs et al. 1992, Seitz et al. 2005). Durch den Sinterungsprozess werden die während der Fertigung eingesetzten organischen Binderkomponenten vollständig ausgebrannt (Sachs et al. 1992). Aus diesem Grund siedeln osteogene Zellen auf gesinteter Hydroxylapatitkeramik mit höheren Proliferations-, Differenzierungs-, und Mineralisationsraten als auf nicht gesintertem Hydroxylapatit (Villareal et al. 1998).

Mit einer in dieser Technik individuell geformten Matrize könnte es in der Zukunft möglich sein, komplexe Defekte durch auf dem Musculus latissimus dorsi gezüchtete Transplantate zu rekonstruieren. Die Transplantate sollten zukünftig mechanisch widerstandsfähiger sein, so dass sie auch ohne externe Stabilisierung eine ausreichende mechanische Festigkeit besitzen.

Aufgabe der vorliegenden Versuchsreihe ist es, unter Einsatz von BMP-2 im Rattenmodell die Biokompatibilität und Osteokonduktivität verschiedener, im dreidimensionalen Druckverfahren speziell hergestellter Hydroxylapatit- und β -Tricalciumphosphat-Blöcke zu testen, wobei bovines Hydroxylapatit als Referenz dient. In der Studie soll ferner evaluiert werden, ob ein neues Design der Blöcke mit

Zentralkanal Vorteile gegenüber dem Design ohne Zentralkanal bringt. Dieser Zentralkanal könnte zur gleichmäßigeren Applikation von BMP-2 genutzt werden und eine Perfusion des Transplantates über Anschluss eines Zentralgefäßes erleichtern.

2. Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein – V31 Tierschutz – nach sorgfältiger Prüfung gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Nr. V-742-72241.121-14 [39-5/04]).

2.1. Auswahl der Versuchstiere

12 weibliche Ratten vom Lewis-Stamm (Ch. River-WIGA®, Sulzfeld, D) mit einem mittleren Gewicht von ca. 200 g und einem Alter von 4 Monaten wurden für diese Studie genutzt.

2.2. Versuchsaufbau

In einer auf dem Musculus latissimus dorsi liegenden Tasche wurde auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien definierter Form in einem Zeitraum von 8 Wochen heterotoper Knochen gezüchtet. Als osteoinduktiver Differenzierungsfaktor kam rhBMP-2 (Wyeth Pharma GmbH, Münster, D) zum Einsatz. Es bestand Kontakt zu dem Musculus latissimus dorsi. Das Wachstum innerhalb verschiedener Matrizen wurde dabei im Verlauf der Zeit mit bovinem Hydroxylapatit (Geistlich Pharma, Wollhusen, CH) verglichen.

2.3. Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen der Größe von 37x22cm (825 cm²) mit einer Höhe von 15 cm (Typ PC 3108, Ehret, Schönwalde, D). Ein ausreichendes Nahrungsangebot ermöglichte den Tieren, zu jeder Zeit ausreichend zu fressen und zu trinken. Im Tagesrhythmus wurde der Haltungsraum mit Glühlampenlicht beleuchtet, die Temperatur betrug ca. 20°C.

2.4. Narkose

Alle operativen Eingriffe und alle Computertomographien erfolgten unter Allgemeinanästhesie.

Vor Einleitung der Narkose wurden die Tiere gewogen und das Gewicht dokumentiert. Die Allgemeinanästhesie wurde gewichtsadaptiert intraperitoneal mit Ketamin (10%, 1 µl/g Körpergewicht, Ketavet®, Fa. Upjohn GmbH, Heppenheim, D) und Xylazalin (2%, 0,6 µl/g Körpergewicht, Rompun®, Fa. Bayer AG, Leverkusen, D) vorgenommen.

Zum Schutz der Augen während der Narkose wurde Bepanthen®-Augensalbe (Fa. Bayer AG, Leverkusen, D) verwendet. Der Zustand der Tiere wurde durch Kontrolle des Lidschlussreflexes und der Atemtiefe beurteilt.

2.5. Gruppeneinteilung

Die zu testenden Matrizen wurden in die in Tabelle 1 angegebenen Präparategruppen unterteilt und zufällig auf die 12 Ratten aufgeteilt. Insgesamt erfolgte eine Implantation von sechs Präparaten je Gruppe.

Präparategruppe	Knochenersatzmaterial
A	Bio-Oss®
B	Bio-Oss® mit Zentralkanal
C	Hydroxylapatit
D	β-Tricalciumphosphat

Tabelle 1: Aufteilung der Knochenersatzmaterialien in Präparategruppen

Alle Blöcke hatten die gleiche Größe von ca. 2 x 1 x 1 cm. Bovines Hydroxylapatit (Bio-Oss®, Geistlich Pharma, Wolhusen, CH) diente als Kontrolle. Als Variante des Designs wurden bovine Hydroxylapatit-Blöcke mit Zentralkanal inseriert. Hydroxylapatit- und β-Tricalciumphosphat-Matrizen wurden speziell entwickelt (Seitz et al. 2005, Seitz 2008), in einem 3D-Verfahren gedruckt und anschließend gesintert. Ausgangsmaterialien waren Granulate vom Typ HA 19 und TCP 4 (BioCer Entwicklungs-GmbH, Bayreuth, D). Das dreidimensionale Druckverfahren ist ein pulverbasierter Prozess, bei dem direkt aus Computerdaten ein Modell erstellt wird. Dünne Schichten des Ausgangspulvers wurden auf eine Grundplatte aufgetragen und dann entsprechend des dreidimensionalen Computermodells durch gezielte Binderzugabe aus einem Druckkopf tröpfchenweise verfestigt (Seitz et al. 2005, Seitz 2008). Das gebundene Pulver stellte das Gerüst der späteren Keramik dar, das lose

Pulver übernahm die Stützfunktion der Konstruktion. Schicht für Schicht wurde nun das dreidimensionale Modell gedruckt. Es resultierte ein keramischer Grünkörper, der im nächsten Schritt bei einer Temperatur von 1250 °C und Umgebungsluftdruck gesintert wurde. Durch die Sinterung wurde eine hohe Endfestigkeit erreicht und die nicht gebundenen organischen Binderkomponenten konnten ausgebrannt werden. Die Sinterschrumpfung betrug 27-30%.

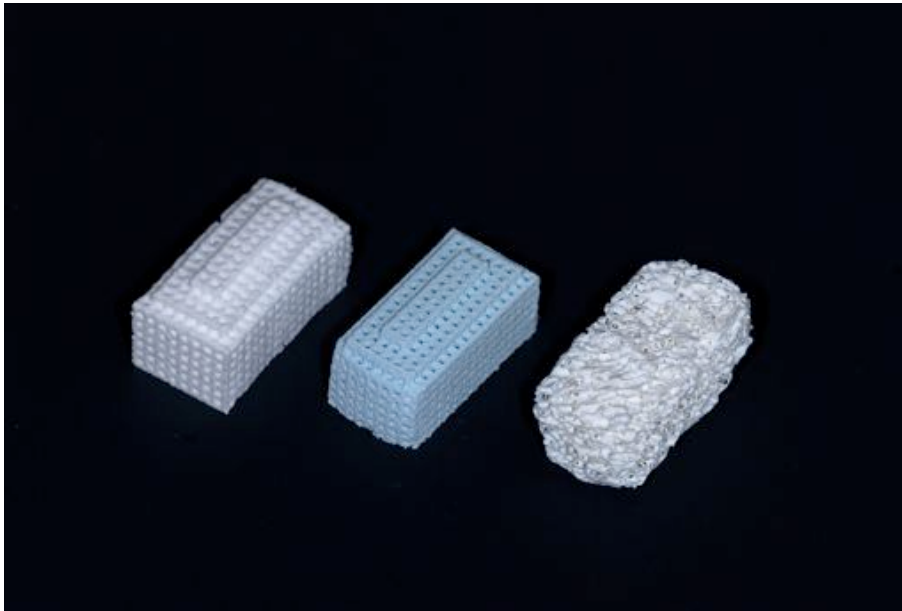


Abbildung 1: Eingesetzte Materialien von links nach rechts. β -Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit, Bio-Oss®. Größe der Blöcke ca. 10 x 10 x 20 mm. Als Variante des Designs wurde im Bio-Oss®-Block (rechts) der Länge nach ein Zentralkanal geschaffen.

2.6. Operation

Nach erfolgter Allgemeinanästhesie wurde die Haut der Ratten im Bereich des Operationsfeldes rasiert und desinfiziert. Eine mediane Inzision über der Wirbelsäule wurde als Zugang zum Musculus latissimus dorsi beider Seiten gewählt. Nach Darstellung des Muskels wurde auf beiden Seiten eine Tasche präpariert. Anschließend wurden bei jedem Tier zwei Blöcke Knochenersatzmaterial implantiert. Jeder Block wurde mit 1 ml rhBMP-2 (200 μ g BMP-2, Wyeth Pharma GmbH, Münster, D) aus einer Spritze beträufelt. Bei den Bio-Oss®-Blöcken mit Zentralkanal wurde das rhBMP-2 direkt in den Kanal appliziert. Die Muskeltaschen wurden nun separat vernäht, der mediane Zugang wurde ebenfalls verschlossen. Fünf Tiere verstarben während der Operation, sie wurden ersetzt.



Abbildung 2: Operativer Eingriff mit Implantation des ersten Blockes (Bio-Oss®) in die subfasziale, auf dem Musculus latissimus dorsi liegende Tasche.

2.7. Computertomographische Untersuchungen

Die Tiere wurden unter Allgemeinanästhesie nach der Operation und nach 8 Wochen computertomographisch untersucht (Somatom, Siemens AG, München, D; 120 kV, 210 mAs, 46,82 mGys, Schichtstärke 0,5 mm).

Die Auswertung des Knochenvolumens und der Knochendichte erfolgte durch Volumenmessung mit der Software Syngo (Siemens AG, München, D). Als untere Auswertungsgrenze wurden 150 Hounsfield Units (HU) gewählt, die obere Auswertgrenze lag bei 3000 HU. So sollte sichergestellt werden, dass kein Weichgewebe, sondern nur Knochen detektiert wurde. Mittels graphischer Markierung der zu detektierenden Areale wurde schichtweise das zu untersuchende Areal markiert und daraus das Volumen des Knochens sowie die Dichte berechnet. Aus der Differenz der Dichtewerte nach der Operation und nach 8 Wochen konnte so der Dichtezuwachs durch Mineralisation bestimmt werden. Die Auswertung fand verblindet statt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA (multifaktorielle Varianzanalyse) nach den Faktoren *Gruppe* (bovines HA, bovines HA mit Zentralkanal, gedrucktes HA, gedrucktes TCP), *Zeit* (nach der Operation und nach 8 Wochen) und als Kombination von beidem (*Gruppe x Zeit*). Die mittleren kleinsten Quadrate und die 95%-Konfidenzintervalle wurden bestimmt und in Tabellen und Abbildungen angegeben. Statistische Signifikanz bestand bei $p < 0,05$.

2.8. Polychrome Sequenzmarkierung

Die Fluorochrominjektionen zur Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Knochenbildung erfolgten jeweils intraperitoneal ab der zweiten postoperativen Woche. Die Dosierungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Fluorochrom	Darbietungsform	Zeitpunkt (Woche) post implantationem
Xylenol-orange (orange)	6% in NaHCO ₃ , 1,5 ml/kg Körpergewicht; Sigma-Aldrich, Steinheim, D	2,7
Calcein-green (grün)	1% in 2% NaHCO ₃ , 5 ml/kg Körpergewicht; Sigma-Aldrich, Steinheim, D	3,6
Alizarin (rot)	3% in 2% NaHCO ₃ , 0,8 ml/kg Körpergewicht; Sigma-Aldrich, Steinheim, D	4
Tetrazyklin (braun)	1mg/kg Körpergewicht; Doxycyclin Ratiopharm SF, Ratiopharm, Ulm, D	5

Tabelle 2: Fluorochrominjektion in den Wochen nach Implantation

2.9. Tötung der Tiere

Nach einem Versuchszeitraum von 8 Wochen wurden die Ratten mittels Kohlendioxid getötet.

2.10. Präparateherstellung

Die Entnahme der gezüchteten Gewebesteile mit umgebendem Weichgewebe fand unmittelbar statt, nachdem die Tiere getötet worden waren.

Anschließend wurden alle Proben auf 4 Gruppen verteilt (vgl. Kapitel 2.5):

- Gruppe A: Bio-Oss®
- Gruppe B: Bio-Oss® mit Zentralkanal

- Gruppe C: Hydroxylapatit
- Gruppe D: β -Tricalciumphosphat

Nach 14-tägiger Fixierung der Präparate in 10 %igem Formalin wurden sie in der Mitte durchtrennt. Die eine Hälfte wurde für Hartschliffhistologien aufbereitet, die andere Hälfte für Paraffinhistologien, siehe Abbildung 3.

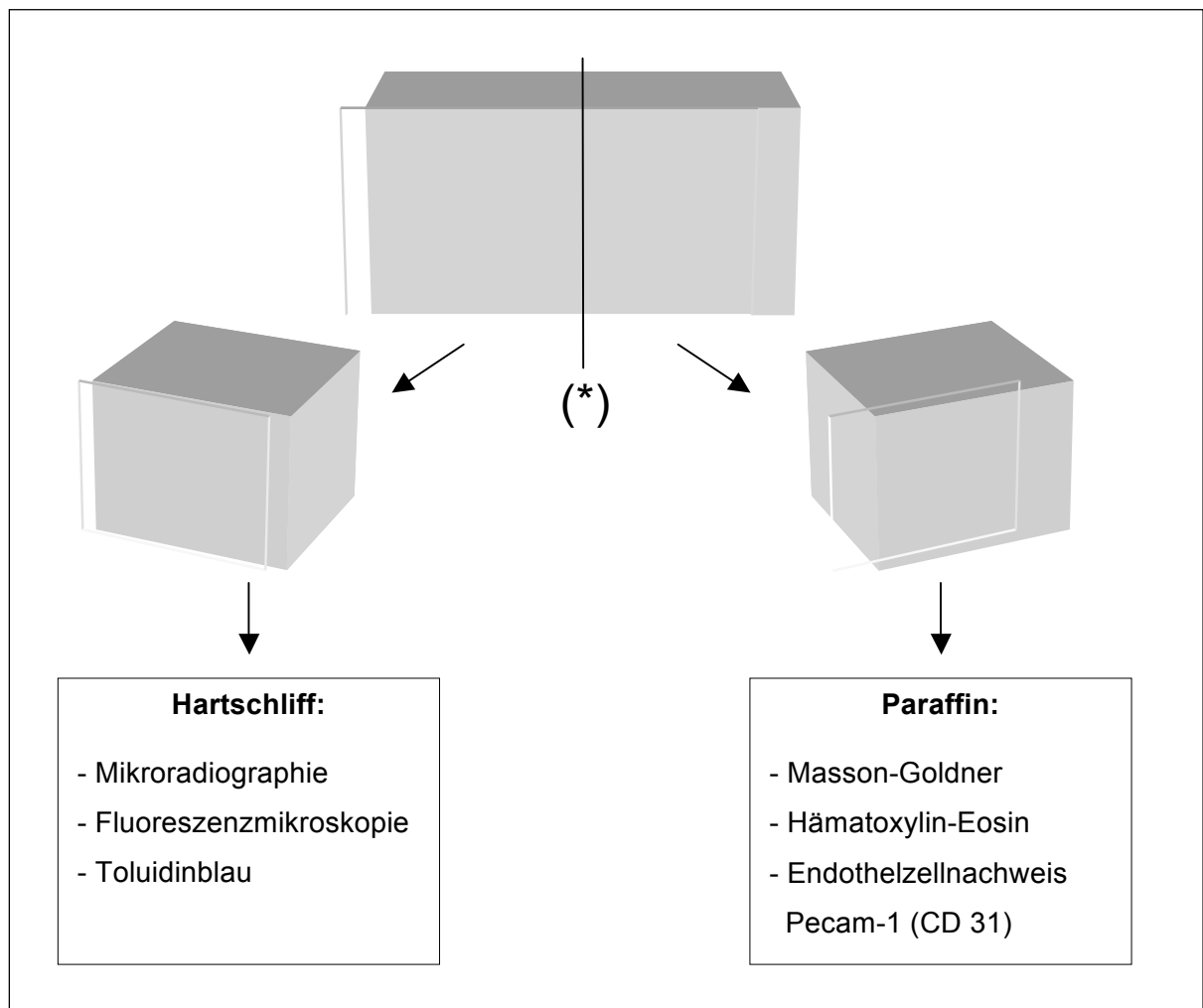


Abbildung 3: Aufteilung der Proben für die unterschiedlichen histologischen Verfahren. Ausgangsgröße der Blöcke 2 x 1 x 1 cm, Zerteilung in 2 Blöcke mit je 1 x 1 x 1 cm.

(*) Die jeweils angeschnittene Seite zur Mitte des Präparates wurde zur Herstellung der Präparate verwendet.

2.10.1. Herstellung der Präparate für Hartschliff

Die geteilten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach vollständiger Dehydratation begann die Einbettung in Methylmethacrylat (PMMA) im

Einbettautomaten (Tissue Processor TPC 15, Medite®, Burgdorf, D). Das Einbettmedium bestand aus folgender Zusammensetzung:

- 500 g Methacrylsäuremethylester (Fa. Fluka®, Neu-Ulm, D)
- 3 g 2,2 Azobis (2-Methylpropionitril; Fa. Merck®, Darmstadt, 12432, D)
- 100 ml Nonylphenol-polyethylenglycolacetat (Fa. Walter, Kiel, D)
- 5 ml Phtalsäuredibutylester (Fa. Merck®, Darmstadt, D)

Jede Probe wurde nach Einbettung im 37°C Wasserbad polymerisiert. Nach vollständiger Aushärtung des PMMA- Einbettmediums wurden die Proben mit einer Tischbandsäge (Fa. Metabo®, Nürtingen, D) zurechtgesägt und schließlich am Schleifgerät DP-U4 (Fa. Struers®, Erkrath, D) mit Silikonkarbitpapier in aufsteigender Körnung (500 - 4000) hochglanzpoliert.

Die angeschnittene Stelle der Präparate befand sich rechtwinklig zur Längsrichtung in der Mitte des Präparates.

Die Präparate wurden auf Plastikobjektträger, die vorher mit beidseitig klebender Folie versehen worden waren, aufgeklebt und anschließend mit der Exakt-Säge (Fa. Exakt, Norderstedt, D) auf eine Stärke von ca. 200 µm reduziert. Danach wurde mit der Exakt-Schleifmaschine (Fa. Exakt, Norderstedt, D) die Schichtstärke auf 90 µm verringert und die Präparate mit dem Schleifgerät DP-U4 (Fa. Struers®, Erkrath, D) mit Silikonkarbitpapier (Körnung 2000-4000) hochglanzpoliert. Anschließend wurden die Präparate von den Objektträgern gelöst und mit der umgekehrten Seite nach unten auf den Mikroradiographieplatten mit Klebestreifen befestigt. Nach der Herstellung von Mikroradiographien (vgl. Kap. 2.11) wurden die Präparate auf Plastikobjektträger aufgeklebt und mit den beschriebenen Schleifgeräten auf 40 µm reduziert und poliert. Nun konnten Fluoreszenzmikroskopien (vgl. Kap. 2.12) angefertigt werden. Anschließend erfolgte die Färbung der Präparate mit Toluidinblau (vgl. Kap. 2.13).

2.10.2. Herstellung der Paraffinpräparate

Die in der Mitte geteilten Präparate für die Paraffinhistologien wurden zunächst für ca. 4-6 Wochen mit einer 12,5 %igen Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA, pH 7,4) entkalkt (Ultraschall-Entkalker USE 33, Medite®, Burgdorf, D), um sie schneidbar zu machen. Nach schrittweiser Dehydratation in aufsteigenden

Alkoholreihen wurde nun über das Intermedium Methylbenzoat die Einbettung in Paraffin (TES 99, Medite®, Burgdorf, D) vorgenommen, um schließlich die Präparate am Mikrotom HM 430 (Microm International GmbH, D) in ca. 5 µm dicke Schnitte zu schneiden, im Wasserbad zu strecken und anschließend zu trocknen. Es folgten Färbungen nach Masson-Goldner (vgl. Kap. 2.14) und HE (vgl. Kap. 2.15) und ein immunhistochemischer Endothelzellnachweis (vgl. Kap. 2.16).

2.11. Mikroradiographien

Die angefertigten Sägeschnitte der Hartschliffpräparate (Dicke ca. 90 µm) wurden mitsamt Folie von den Objektträgern gelöst und auf den Mikroradiographieplatten mit Klebefolie spaltfrei adaptiert (High Definition Plate HD2, Auflösung: 2000 Linien/mm, Michrome Technology Inc®, USA). Die anschließende Belichtung erfolgte mit einem Röntgengerät (Cabinet X-Ray System, Faxitron Series®, Fa. Hewlett Packard GmbH, Böblingen, D) mit einer Stromstärke von 3 mAs, einer Spannung von 25 kV und einer Belichtungszeit von 10 min bei einem Fokus-Film-Abstand von 16 cm. Zur Entwicklung und Fixierung der Präparate fanden Entwickler ([Verdünnung 1:1], Periomat intra, Dürr Dental®, Bietigheim-Bissingen, D) und Fixierkonzentrat (Kodak RA 3000, Fa. Kodak®, USA) Anwendung.

Um quantitativ die Bildung neuen Knochens beurteilen zu können, wurden von den Präparaten mikroskopische Aufnahmen bei zweifacher Vergrößerung angefertigt (Mikrophot-FXA, Fa. Nikon®, Tokyo, J) und diese mittels einer Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop, Fa. Adobe®, San Jose, USA) zu Gesamtkollagen zusammengefügt. Die Kollagen konnten daraufhin mit einer Analysesoftware für histologische Präparate (Leica QWin®, Leica Microsystems, Wetzlar, D) auf neugebildeten Knochen hin vermessen werden. Es wurde die gesamte Knochenfläche markiert und die Fläche in Quadratmillimetern notiert, um anschließend über die selektive Auswahl dunklerer Areale nur neugebildeten Knochen auszuwählen und die Menge neugebildeten Knochens im Verhältnis zum Gesamtknochen zu berechnen. Die Bildung neuen Knochens innerhalb der Präparate wurde mittels Varianzanalyse geprüft ($\alpha=0,05$).

2.12. Fluoreszenzmikroskopien

Im Anschluss an die Herstellung der Mikroradiographien wurden die Präparate auf Plastikobjektträger geklebt (Technovit®, Fa. Exact, Norderstedt, D) und von der Folie

getrennt. Die Präparate wurden daraufhin von ursprünglich 90 µm Schichtstärke auf 40 µm mit den in Kap. 2.10.1 genannten Geräten heruntergeschliffen und poliert. Anschließend folgte die Fluoreszenzmikroskopie unter Licht einer Quecksilberdampflampe mit dem Mikrophot-FXA®-Mikroskop (Fa. Nikon, Tokyo, J). Es wurden verschiedene Vergrößerungsstufen (2-fach, 4-fach, 10-fach, 20-fach) angewendet und fotografiert. Mittels einer Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop, Fa. Adobe®, San Jose, USA) wurden Kollagen hergestellt. Die Analyse der Präparate erfolgte qualitativ.

2.13. Toluidinblaufärbung der Hartschliffe

Der Anfertigung der Fluoreszenzmikroskopien folgte die Färbung der Präparate. Nach oberflächlicher Entkalkung der Präparate durch 0,1%ige Ameisensäure erhielten die Schliffe für 4 min eine Färbung in filtrierter Toluidinblau-Färbelösung und anschließend unter dem Mikroskop eine Nachdifferenzierung mit HCL-Alkohol und Toluidinblau-Lösung. Nach dem Färbevorgang wurden die Präparate schließlich mit Eukitt® (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und Deckgläschen eingedeckelt. Beim Anfertigen der Fotografien wurde darauf geachtet, nach Möglichkeit die gleichen Ausschnitte wie in den Fluoreszenzmikroskopien und den Mikroradiographien auszusuchen und zu fotografieren.

2.14. Färbung der Paraffinpräparate nach Masson-Goldner

Die hergestellten Paraffinpräparate wurden für 5 min in Weigert's Eisenhämatoxylin getaucht und anschließend einer Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Lösung ausgesetzt. Nach Färbung mit Phosphormolybdänsäure-Orange-G (7 min), 0,1%igem Lichtgrün und Entwässerung erfolgte die Eindeckelung mit Mountex® (Fa. Medite, Nunningen, CH).

Von den Präparaten wurden unter dem Mikroskop Fotografien in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen (2-fach, 4-fach, 10-fach) angefertigt und qualitativ bewertet.

2.15. Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Paraffinpräparate

Die hergestellten Paraffinpräparate wurden mit Xylol entparaffinisiert und nach Rehydrierung zur Kernfärbung für 3 min in Hämalaun nach Mayer inkubiert. Anschließend erfolgte für 10 min ein Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser. Die Plasmafärbung erfolgte für 30 sec in alkoholischer Eosin-

Lösung, anschließend wurden die Proben nach Dehydrierung mit Mountex® (Fa. Medite, Nunningen, CH) eingedeckelt.

Es wurden Fotografien der Präparate in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen (2-fach, 4-fach, 10-fach) angefertigt.

2.16. Immunhistochemischer Nachweis von Pecam-1

Im Rahmen der Immunhistochemie ist mit dem Antikörper gegen Pecam-1 (auch CD-31 genannt) ein Endothelzellnachweis in den Präparaten möglich (Newman et al. 2004). Eine Vaskularisierung der Knochenersatzmaterialien kann so nachgewiesen werden.

Die für die Immunhistochemie vorgesehenen Präparate wurden nach Entparaffinisierung mit TEC-Puffer für 3,5 min behandelt. Nach Rehydrierung wurden die Präparate für 20 min in 4%iges Donkey-Normal-Serum (in PBS-Waschpuffer) gegeben und anschließend mit dem Primär-Antikörper gegen PECAM-1 (M-20, Ziegen-IgG, 20 µl/ml, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) für 45-60 min inkubiert. Nach Waschung wurden die Präparate dem Sekundärantikörper (Affen-IgG-B maus-/menschens- adsorbiert, Biotin konjugiert 5 µl/ml, Santa Cruz Biotechnology CA, USA) ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun (1:4, 5 min) und das Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser. Nach Rehydrierung wurden die Präparate mit Mountex® (Fa. Medite, Nunningen, CH) eingedeckelt.

Es wurde eine Negativkontrolle und die Positiv-Immunhistochemie angefertigt. Beide Präparate wurden schließlich unter Anwendung der in Kapitel 2.11 genannten Methoden mit verschiedenen Vergrößerungen (2-fach, 4-fach, 10-fach) fotografiert.

3. Ergebnisse

3.1. Klinik

Die Ratten haben die Operation gut toleriert. Zwei Wochen später entwickelten zwei Tiere kleine Wundstellen jeweils über dem linken Block, die aber schnell verheilten. Im Verlauf des Experiments nahmen die Ratten im Mittel um 220 g zu und wogen dementsprechend zum Versuchsende ca. 420 g. Die fünf Tiere, die die Narkose am Operationstag nicht überlebt hatten, wurden durch entsprechende Tiere ersetzt, bei denen es zu keinerlei Komplikationen kam.

3.2. Computertomographie

Der Mittelwert der 48 Dichtemessungen aus allen CT-Untersuchungen betrug 1008 HU. Diagramm 1 zeigt die Entwicklung der Knochendichte über die Zeit. Ausgehend von unterschiedlichen Anfangswerten war der Anstieg der Knochendichte deutlich höher in der HA-Gruppe (um 220 HU innerhalb von 8 Wochen) verglichen mit der TCP-Gruppe (18 HU). In der Bio-Oss®-Gruppe betrug der Anstieg 198 HU im Vergleich zu 184 HU in der Bio-Oss®-Gruppe mit Zentralkanal. Am stärksten stieg die Dichte folglich in den HA-Blöcken an, gefolgt von den beiden Bio-Oss®-Präparaten. Der p-Wert der Effekte „Gruppe und Zeit“ war $< 0,0001$, die Kombination „Gruppe x Zeit“ hatte $p = 0,07$. R^2 betrug 0,91, welches eine hohe Übereinstimmung zwischen angewandtem Modell und den Einflussgrößen erklärt. Eine Aufstellung der Parameter ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Einen Überblick über alle Tiergruppen zum zweiten CT nach 8 Wochen gibt Abbildung 4.

Bei der Analyse der CT-Bilder fiel bei einigen Ratten die Entstehung einer Knochenbrücke zwischen den Blöcken der linken und der rechten Seite auf (vgl. Abbildung 5).

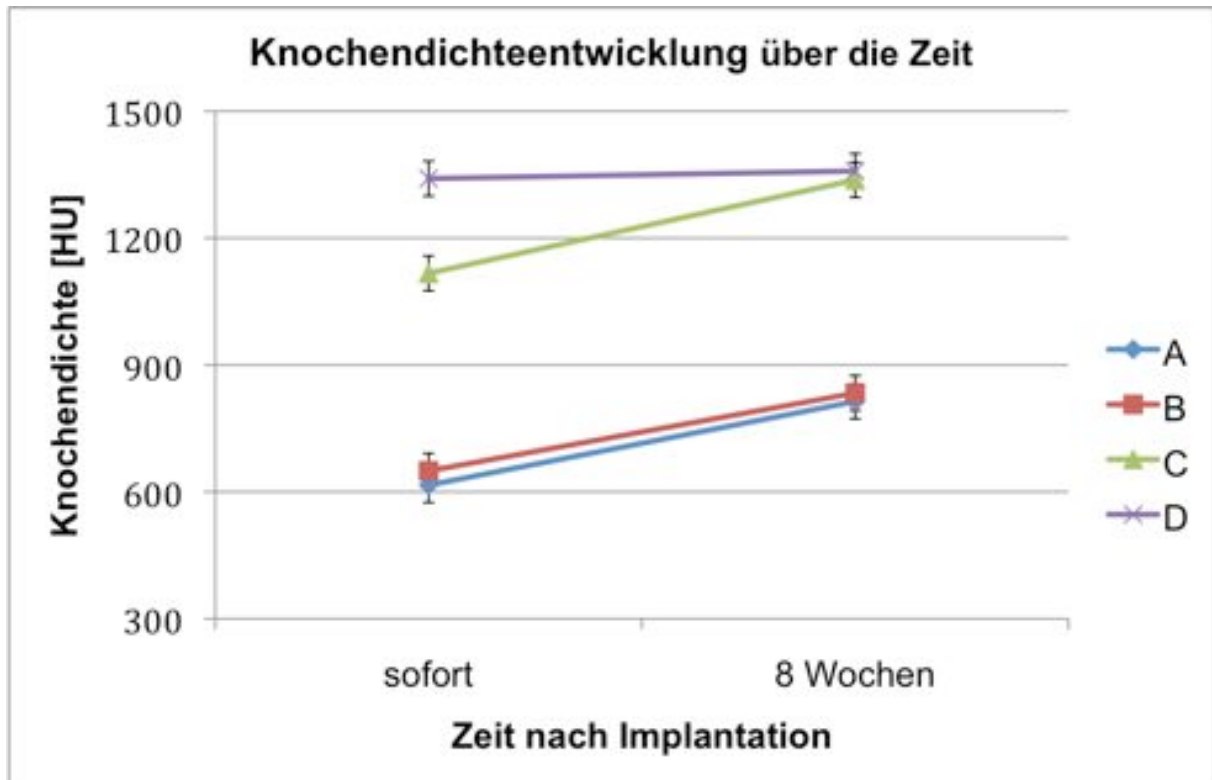


Diagramm 1: Dichteentwicklung innerhalb von 8 Wochen nach Implantation der Blöcke mit gleichzeitiger Applikation von rhBMP-2.

A = Bio-Oss®, B = Bio-Oss® mit Zentralkanal, C = HA, D = β -TCP

	Bio-Oss®	Bio-Oss® mit Zentralkanal	HA	β -TCP
Dichte nach Operation [HU]	615,87	649,48	1116,87	1341,07
Dichte nach 8 Wochen [HU]	813,78	833,58	1337,75	1358,80
mittlerer Anstieg [HU]	197,92	184,10	220,88	17,73
Standardfehler	20,68	20,68	20,68	20,68
untere 95% Konfidenz	150,74	137,7	175,86	-30,82
obere 95% Konfidenz	244,32	231,27	269,43	62,76

Tabelle 3: Dichteentwicklung und statistische Parameter der CT-Untersuchungen

3.3. Mikroradiographien

Die Auswertung der Mikroradiographien zeigte, dass sich in allen Präparaten Knochen gebildet hatte. Der entstandene Knochen verteilte sich gleichmäßig über

das gesamte Präparat und lag den implantierten Materialien direkt auf oder befand sich in den Poren des Materials (vgl. Abbildung 6). Keines der Knochenersatzmaterialien war zerfallen oder zerbrochen, allerdings wiesen einige Bio-Oss®-Blöcke in Randbereichen kleinere Frakturareale auf. Der histologische Nachweis, dass es sich bei dem detektierten Knochen um neu gebildeten Knochen handelt, konnte erbracht werden. In der Abbildung 7 ist der Ausschnitt eines Bio-Oss®-Präparates in Mikroradiographie und Toluidinblau dargestellt. Klar erkennbar ist, dass sich der frische Knochen mit einer Kittlinie direkt dem bovinen Hydroxylapatit aufgelagert hat.

Diagramm 2 zeigt die mittlere Knochenneubildung nach achtwöchigem Versuchszeitraum. Es waren bei den verschiedenen Knochenersatzmaterialien keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,59$) in der Größe der Fläche, auf der es zu Knochenbildung gekommen war, zu erkennen. Die Fläche an neu gebildetem Knochen betrug bei den Bio-Oss®-Präparaten durchschnittlich $6,15 \text{ mm}^2$, bei bovinem Hydroxylapatit mit Zentralkanal $7,22 \text{ mm}^2$. In den Hydroxylapatit-Blöcken bildete sich $5,38 \text{ mm}^2$ neuer Knochen und in den β -Tricalciumphosphat-Präparate $6,13 \text{ mm}^2$ (vgl. Tabelle 4).

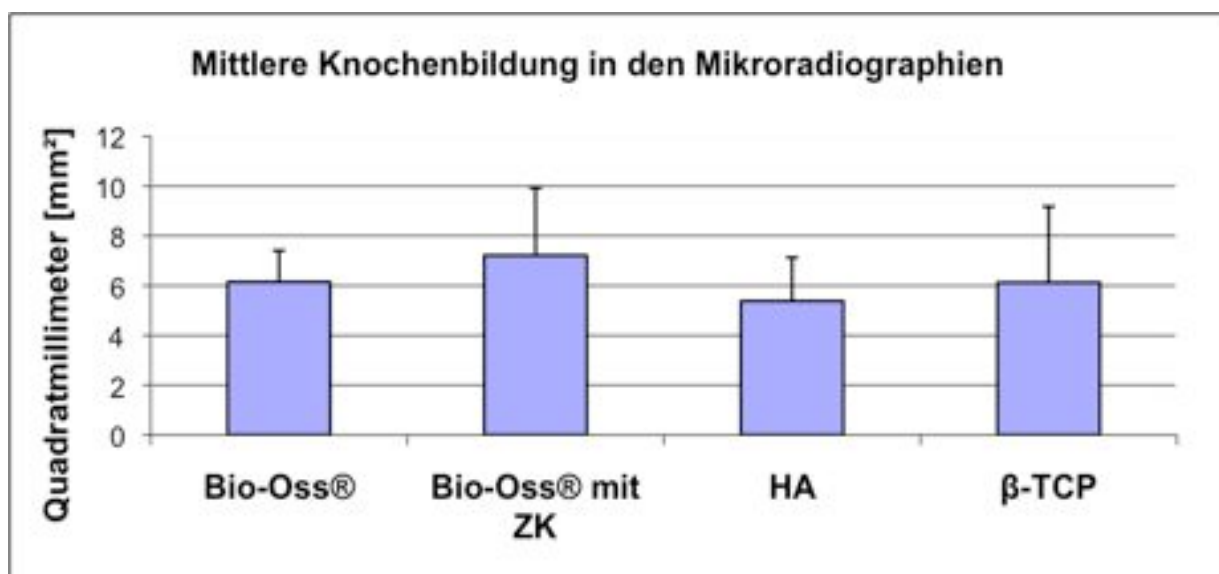


Diagramm 2: Anhand der mikroradiographischen Auswertung bestimmte Fläche an neu gebildetem Knochen (Mittelwert, Standardabweichung): Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,59$) zwischen den einzelnen Materialien erkennbar (ANOVA, $\alpha < 0,05$).

Material	Mittelwert [mm²]	Standardabweichung
Bio-Oss®	6,15	1,26
Bio-Oss® und Zentralkanal	7,22	2,7
Hydroxylapatit	5,38	1,75
β-Tricalciumphosphat	6,13	3,05

Tabelle 4: Mittelwert der Fläche des neu gebildeten Knochens und Standardabweichung in den mikroradiographischen Präparaten

3.4. Fluoreszenzmikroskopien

In den Fluoreszenzmikroskopien fielen Banden aller Fluorochrome auf. Diese Banden waren in allen Präparaten unabhängig vom jeweiligen Knochenersatzmaterial deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 8). Die stärkste Knochenneubildung hat in den Wochen vier bis sieben post implantationem stattgefunden. Abbildung 9 und 10 zeigen die typische Abfolge der Banden innerhalb der Präparate. Mittig begann die Knochenneubildung unter Einlagerung von Alizarin (Woche vier), zu beiden Seiten lagerte sich Tetrazyclin an (Woche fünf), welches in Woche sechs durch ein calceingrünes Farbband umrahmt worden war. In einigen Präparaten wurde dieser wiederum in der siebten Woche von xyleneol-orangefärbtem Knochen umsäumt. Die Präparate enthielten fluoreszierende Banden sowohl innerhalb der Trabekel des Ersatzmaterials als auch am Präparaterand und in einigen Fällen auch deutlich in Bereichen überschüssiger Knochenneubildung. Die Schichten waren teilweise scharf begrenzt (vgl. Abbildung 10) oder lagen aber auch ohne Begrenzung aufeinander (vgl. Abbildungen 9,10). Dies deutete auf Remodeling und simultanes appositionelles Knochenwachstum hin. Im Falle von gedrucktem Hydroxylapatit waren auch fluoreszierende Areale tief im Block zu erkennen. Dies weist auf knöcherne Infiltration des Hydroxylapatit hin (vgl. Abbildung 9). Die Perfusion der Präparate ist ab der dritten bis vierten postoperativen Woche erfolgt, da es ab diesem Zeitpunkt zu deutlichen Einlagerungen von Fluorochromen gekommen ist.

3.5. Toluidinblau

Die Toluidinblau-Präparate zeigten keine Anzeichen für die Bildung entzündlicher Infiltrate als Zeichen von Infektionen.

Das bovine Hydroxylapatit wurde gleichmäßig von neuem Knochen bedeckt. Dabei war kein Unterschied zwischen der Variante mit Zentralkanal im Vergleich zu den

Blöcken ohne Zentralkanal zu erkennen. In beiden Präparategruppen verteilte sich der neu gebildete Knochen über das gesamte Präparat mit Arealen stärkerer und schwächerer Knochenneubildung. Es waren aber auch Areale zu finden, in denen sich kaum Knochen gebildet hatte. Die Knochenbildung entlang der Trabekel entstand in Form dünner Bänder neugebildeten Knochens mit Kittlinien als Anzeichen für frühes Remodeling zwischen den einzelnen Mineralisationsschichten. Havers-Systeme hatten sich bereits im frühen Stadium mit konzentrisch angeordneten Lamellen neuen Knochens gebildet (vgl. Abbildungen 11, 12). Es waren aktive Osteoblasten mit Osteoidsäumen erkennbar. Der nicht knöchern durchbaute Anteil des Knochenersatzmaterials hatte sich mit einer Mischung aus Bindegewebe und Fettgewebe gefüllt (vgl. Abbildungen 11,12).

Im Unterschied zu Bio-Oss® wurde das gedruckte Hydroxylapatit tiefer mit neu gebildetem Knochen infiltriert (vgl. Abbildung 13). Auch in den Hydroxylapatitblöcken waren Havers-Systeme im neuen Knochen mit Osteoblasten und Osteozyten zu erkennen. Als Zeichen des frühen Remodelings hatten sich Kittlinien mit scharfen Übergängen an frisch gebildetem Knochen gebildet. Das eingewachsene Binde- und Fettgewebe enthielt versorgende Gefäße (vgl. Abbildung 13).

β -Tricalciumphosphat wurde ähnlich wie gedrucktes Hydroxylapatit integriert, allerdings erfolgte die knöcherne Infiltration nicht weit in die Poren des Knochenersatzmaterials hinein (vgl. Abbildung 14). Es fanden sich aber auch Areale, die kaum knöchern durchbaut waren.

Die Mehrzahl der Präparate war umgeben von faserreichem Bindegewebe, darin enthalten Fettgewebe und versorgende Gefäße.

Einen vergleichenden Überblick über die angewandten Hartschliff-Histologie-Techniken aus denselben Arealen geben die Abbildungen 15 und 16.

3.6. Masson-Goldner

Bis auf ein Präparat mit bovinem Hydroxylapatit mit Zentralkanal gab es keine Anzeichen von Entzündungen. Diese Probe enthielt ein entzündliches Infiltrat.

Die Bio-Oss®-Blöcke waren von einer faserreichen Bindegewebskapsel umgeben, durch die das Präparat mit Blutgefäßen versorgt wurde. Die Trabekel des Knochenersatzmaterials waren mit frischem Knochen überwachsen. Dieser hatte sich harmonisch den Trabekeln in dünnen Banden aufgelagert. Knochen entstand

aber auch frei zwischen den Trabekeln (vgl. Abbildungen 17, 18). Die eingewachsenen Blutgefäße hatten Bindegewebe um sich herum gebildet. Sie waren zahlreich in allen Präparaten zu finden. Der Zentralkanal zeigte sich durchwachsen mit faserreichem Bindegewebe (vgl. Abbildung 18). Zwischen den Bio-Oss®-Trabekeln und frischem Knochen hatte sich Fettgewebe gebildet.

Gedrucktes Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat zeigten aufgrund des längeren Entkalkungsprozesses „leere“ Areale mit eingewachsenem Knochen. Diese Areale entsprachen dem Knochenersatzmaterial, welches von Fettgewebe umschichtet worden war. Auch hier waren zahlreich Blutgefäße zu finden (vgl. Abbildungen 19, 20). Der frische Knochen hatte sich dem Knochenersatzmaterial harmonisch aufgelagert und war von dort aus eingewachsen (vgl. Abbildung 20). Es fanden sich vitale Osteoblasten und Osteozyten. Die Randbereiche der Präparate waren von einer Bindegewebskapsel umgeben (vgl. Abbildung 19).

3.7. Hämatoxylin-Eosin

Die HE-gefärbten Präparate zeigten vergleichbare Resultate zu den Goldner-Präparaten. Aus diesem Grund werden nicht mehr alle vorgenannten Einzelheiten behandelt beziehungsweise wiederholt (vgl. Kapitel 3.6 Masson-Goldner). Auffällig war, dass in einigen Bio-Oss®-Blöcken in den Trabekeln die Formation früher Havers-Systeme erkennbar war. Diese hatten konzentrisch Knochen mit einer Kittlinie zum Bio-Oss® angelagert (vgl. Abbildung 21). Es waren vitale Osteoblasten und Osteozyten erkennbar. Die Versorgung der Havers-Systeme war über Zentralarterien gesichert. Teilweise war beginnende Resorption des bovinen Hydroxylapatit erkennbar. Es hatten Osteoklasten mit gezackten Rändern und knochenbildende Osteoblasten begonnen, das Bio-Oss® zu durchbauen (vgl. Abbildung 22). Auch im β -Tricalciumphosphat hatten sich Havers-Systeme unterschiedlicher Größe formiert (vgl. Abbildung 21). Allerdings fielen weiterhin zahlreiche Areale faserreichen Bindegewebes mit wenig knöcherner Durchbauung auf.

3.8. Immunhistochemischer Nachweis von Pecam-1

Mit den immunhistochemisch gefärbten Präparaten gelang der Nachweis von Endothelzellen. Sie waren zahlreich in allen Präparaten nachweisbar (vgl. Abbildung 23), eine Auszählung der Anzahl der Gefäße ergab keinen statistisch relevanten

Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Es fiel auf, dass die Endothelzellen etwas häufiger mit faserreichem Bindegewebe assoziiert waren als mit Fettgewebe.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, unter Einsatz welchen Knochenersatzmaterialies es mithilfe von rhBMP-2 gelingt, die höchste Knochenneubildungsrate in acht Wochen zu erzielen. Dabei war eine möglichst gleichmäßige Knochenbildung über das gesamte Präparat erwünscht. Gleichzeitig wurde evaluiert, ob ein neues Matrizendesign mit Zentralkanal zur Injektion von rhBMP-2 Vorteile gegenüber den bereits bewährten Strukturen bringt. Als Kontrolle diente das seit vielen Jahren klinisch eingesetzte und in diversen Studien erfolgreich getestete Knochenersatzmaterial Bio-Oss® (Janssen et al. 2006). Die guten biokompatiblen Eigenschaften von Bio-Oss® wurden bisher sowohl im Zellkultursystem (Acil et al. 2000, Behrens et al. 2000) als auch in vivo belegt (Warnke et al. 2004).

Aus der Fachliteratur sind diverse Untersuchungen zu weiteren Knochenersatzmaterialien bekannt. Allerdings sind diese Untersuchungen durchgeführt worden, um kleinere, künstlich erschaffene Defekte vergleichend mit verschiedenen Materialien zu decken, beispielsweise im Bereich der Implantologie oder Parodontologie. Es ist zum derzeitigen Zeitpunkt keine Studie bekannt, die im Rahmen der Endokultivierung im Musculus latissimus dorsi das Stoffwechselverhalten verschiedener Knochenersatzmaterialien direkt miteinander vergleicht. Eine Vergleichsstudie zwischen gedrucktem Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat und Bio-Oss® als Referenz ist noch nicht durchgeführt worden. Es sind keine Studien mit individuell gestalteten, porösen Matrizen, wie sie in dieser Arbeit verwendet worden sind, bekannt.

Die vorliegende Studie versucht, einen Teil dazu beizutragen, ein biokompatibles Knochenersatzmaterial für das Bone Engineering zu finden. Eine geeignete Matrize könnte in einer vorgefertigten Form Vorteile in der chirurgischen Rekonstruktion bieten. Hierdurch käme es nicht zu der bereits beschriebenen erhöhten Morbidität als Folge der Gewinnung autologer Transplantate. Dem Patienten bliebe eine höhere Lebensqualität nach Tumor-Resektion oder Trauma durch Vermeidung des zusätzlichen Eingriffes (Turhani et al. 2007, Herten et al. 2008).

Als Versuchstiere wurden Ratten ausgewählt. Sie stellen durchaus einen geeigneten Bioreaktor dar, obgleich Unterschiede zum menschlichen Knochenstoffwechsel bestehen. Rattenosteoklasten haben eine den menschlichen Osteoklasten vergleichbare Lebensdauer. Allerdings findet das Remodeling in einer deutlich höheren Geschwindigkeit statt (Cesnjaj et al. 1991). Genauso ist die Knochenneubildung bei Ratten um ein Vielfaches stärker (Simmons, Kunin 1970). Hervorzuheben ist, dass in relativ kurzer Versuchszeit von einer quantifizierbaren Menge an Knochenneubildung ausgegangen werden kann. Die Ergebnisse aus einem Tierversuch können von daher nie direkt auf den Menschen übertragen werden, aber sie dienen als Anhalt.

In der vorliegenden Studie wurde neben dem bereits als Referenz erwähnten bovinen Hydroxylapatit (Bio-Oss®) gedrucktes Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat verwendet. Die exzellente Biokompatibilität und Bioaktivität der beiden letztgenannten ist hinreichend beschrieben (Turhani et al. 2007, Szabo et al. 2005). Es liegen bereits Untersuchungen vor, die zeigen, dass β -Tricalciumphosphat in der Lage ist, in der Hüftmuskulatur von Hasen unter Einsatz von rhBMP-2 ektopen Knochen zu bilden (Jingushi et al. 2002). Die Eignung von Hydroxylapatit als Träger von Bone Morphogenetic Proteins ist erwiesen (Ono et al. 1995). Auch wurden Kombinationen aus beiden Materialien bereits in präklinischen Studien genutzt (Alam et al. 2001, Janssen et al. 2006).

Die in der Literatur beschriebene hohe Biokompatibilität konnte im Versuch bestätigt werden. Keines der Tiere wies Immunreaktionen gegen die Präparate auf, es traten nur in einem einzigen Transplantat vermehrt Entzündungszellen auf. Allerdings wurden auch in diesem Fall keinerlei klinische Auffälligkeiten beobachtet.

In der vorliegenden Studie kam es bei allen Präparaten jeder Gruppe zu einem computertomographisch ermittelten Anstieg der Knochendichte. Der höchste Anstieg wurde in den Hydroxylapatitpräparaten registriert, der mit Abstand geringste in den β -Tricalciumphosphat-Präparaten. Die gefundenen Differenzen waren statistisch signifikant. Die Knochendichteentwicklung von Bio-Oss® war etwas geringer als die von Hydroxylapatit, wobei die Designvariante ohne Zentralkanal geringfügig mehr Knochenneubildung lieferte. Der Einfluss eines Zentralkanales ist bei Präparaten dieser Größe scheinbar gering.

Zur besseren Einheilung und geringeren Traumatisierung der Versuchstiere wurde bei Implantation der Knochenersatzmaterialien ein medianer Zugang gewählt, da es in Vorversuchen bei lateralen Zugängen zu Wundheilungsstörungen gekommen war. Die präparierten Muskeltaschen wurden beidseitig selektiv verschlossen. Dennoch kam es bei einigen Tieren zur Bildung von ektopen Knochenbrücken zwischen den Präparaten beider Seiten. Der Verschluss der Muskeltaschen konnte offensichtlich nicht sicher die vollständige räumliche Trennung beider Seiten gewährleisten. Da jedoch mit gleichen Konzentrationen an BMP-2 gearbeitet wurde, beeinflusste dies das Versuchsmodell nicht. In zukünftigen Modellen wäre ein paramedianer Zugang beidseits der Wirbelsäule ebenfalls möglich um die Knochenbrückenbildung zu unterbinden. Somit läge die Inzision nicht direkt über dem implantierten Areal, aber die Seiten wären sicher voneinander getrennt.

Mikroradiographisch wurde neu formierter Knochen in allen Präparaten beobachtet. Es fielen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien auf. Die ermittelte Fläche an neu gebildetem Knochen war bei den Bio-Oss®-Präparaten etwas höher im Vergleich zu den anderen Mikroradiographien. Dies kann allerdings auch Folge des aus der geringeren Materialdichte resultierenden kleineren Graustufenunterschieds in den Bio-Oss®-Präparaten im Vergleich zu den anderen Knochenersatzmaterialien sein. HA und β -TCP erschienen durch die stärkere Absorption der Röntgenstrahlen deutlich heller. Zur Quantifizierung dieses Fehlers wurde eine Übersichtskollage eines nicht implantierten Bio-Oss®-Blockes angefertigt und auch in diesem ließ sich „Knochenneubildung“ detektieren. Die Sensitivität der mikroradiographischen Auswertung ist somit deutlich niedriger als die der CT-Untersuchung. Ferner wird hier im Gegensatz zur zweidimensionalen Auswertung einzelner Schnitte einer Mikroradiographie das gesamte Volumen erfasst, wodurch die Genauigkeit der Messungen erheblich steigt.

In den Fluoreszenzmikroskopien zeigte sich deutlich, dass die Produktion neuen Knochens verstärkt ab der dritten bis vierten postoperativen Woche begonnen hatte und die Präparate ab diesem Zeitpunkt als perfundiert anzusehen waren. Pautke et al. (2005) testeten mehrere verschiedene Fluorochrome in Bezug auf ihre Eignung zur Dokumentation von Knochenbildungsprozessen und fanden heraus, dass bis zu

einer Dicke von 5 μm neu formierter Knochen chronologisch sicher nachgewiesen werden kann.

Die Knochenbildung geschah relativ gleichmäßig in allen Präparaten in Form dünner Bänder auf den Knochenersatzmaterialien im Sinne harmonischer Apposition. Von einem beginnenden knochenphysiologischen Stoffwechsel kann ausgegangen werden, da die Fluoreszenzmikroskopie Aussagen zu ersten Umbauprozessen erlaubte. Diese Erkenntnisse konnten histologisch und immunhistochemisch verifiziert werden.

Neu gebildeter Knochen und Havers-Systeme sowie vitale Osteoblasten mit Osteoidablagerungen und Osteozyten waren in allen Proben erkennbar. Die Präparate zeigten damit vitales Knochengewebe mit physiologischem Knochenumbau und frühem Remodeling. Eine schleichende Substitution des Knochenersatzmaterialies (Detsch et al. 2008, Inoda et al. 2007, Reddi et al. 1987) wurde nur in einigen Bio-Oss®-Präparaten entdeckt. In diesen wurden vereinzelt Trabekel von Havers-Systemen durchsetzt und anresorbiert, so dass eine schleichende Substitution belegt ist. Ebenfalls konnten osteoklastische Resorptionslakunen entdeckt werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen damit, dass unter Verwendung von rhBMP-2 auf den im Versuch verwendeten osteokonduktiven Matrizen Knochenbildung hervorgerufen wurde.

Bereits 1987 wurde berichtet, dass bei der Deckung kleinerer metaphysärer Defekte mit autologem Knochen, Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat die Knochenersatzmaterialien vergleichbare Ergebnisse zu autologem Knochen liefern können (Bucholz et al. 1987). β -Tricalciumphosphat, Bio-Oss® und autologer Knochen sind in ähnlichem Maße zur vollständigen knöchernen Integration fähig (Jensen et al. 2006).

Mit den Jahren setzte sich zunehmend die Auffassung durch, dass Oberflächenbeschaffenheit und Größe der interkonnektierenden Areale entscheidende Einflußfaktoren für erfolgreiches Knochenwachstum sind (Seitz 2008; Hertz, Bruce 2007). Moderne anorganische Materialien, die die Knochenoberfläche gut imitieren und die ein Porenvolumen größer als 100 μm besitzen, fördern Zellinfiltration, Differenzierung und Vaskularisation. Kortikaler Knochen hat Porengrößen bis 100 μm , spongioser 200-400 μm (Cheng et al. 2003). Die eingesetzten Matrizen erfüllen diese Kriterien (Gazdac 1995, Giannoudis 2005;

Rodriguesa et al. 2003; Suchanek, Yoshimura 1998), wodurch das Einwachsen von Knochenzellen stark beschleunigt wird. Sie haben eine Porengröße von 480 µm.

In der Anwendung von Hydroxylapatit am Patienten konnten Heliotis et al. 2006 erfolgreich eine Unterkieferrekonstruktion durchführen. Aus drei Hydroxylapatit-Einzelblöcken wurde ein L-förmiges Transplantat im Rückenmuskel gezüchtet und nach sechseinhalb Monaten transplantiert. Als problematisch erwies sich jedoch die Stabilisierung des Ersatzes mittels eines externen Fixateurs. Einen früheren Erfolg konnten bereits Warnke et al. 2004 durch eine großflächige Unterkieferrekonstruktion unter Verwendung von Bio-Oss® in einer Titanmatrize erzielen. Externe Titangerüste sind jedoch als suboptimal anzusehen, da sie nicht mehr entfernt werden können und in situ verbleiben müssen.

Vielversprechend für die Zukunft des Bone Engineering ist, dass die mechanische Festigkeit von gezüchtetem Knochen und natürlichem Knochen vorangegangener Untersuchungen zufolge einander vergleichbar zu sein scheint (Warnke et al. 2006a). Auch moderne Knochenersatzmaterialien erreichen mittlerweile diese Festigkeiten. Die Druckfestigkeit gesinterter Testgeometrien aus Hydroxylapatit liegt zwischen humaner Spongiosa und kortikalem Knochen (An 2000). In dem vorliegenden Fall scheinen sich β -Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit als stabiler gegenüber bovinem Hydroxylapatit erwiesen zu haben, da es keine Frakturen in den Randbereichen wie unter Einsatz von Bio-Oss® gab.

Auf dem Weg, individuell passende Knochentransplantate ohne externe Stabilisation durch Bone Engineering für den Patienten zu präfabrizieren, stellt das bereits charakterisierte dreidimensionale Druckverfahren einen wichtigen Schritt dar, bei dem besser passende Transplantate mit höherer Stabilität als in den oben genannten klinischen Fällen gezüchtet werden könnten.

Die in dieser Arbeit implantierten Präparate hatten eine Größe von 2 x 1 x 1 cm. Ob die gleichen Ergebnisse auch bei deutlich größeren Präparaten erzielt werden können, wird die Zukunft in anderen Tiermodellen beweisen müssen. Das vorgestellte Design der Blöcke mit Zentralkanal könnte bei größeren Präparaten einen entscheidenden Vorteil bringen, da durch ihn osteoinduktive Proteine gleichmäßig injiziert und auch zeitversetzt zur Implantation oder mehrmals in alle Areale des Transplantates eingebracht werden können. Ferner ist eine

Gefäßanastomosierung des Präparates über Kanäle denkbar, um schnell eine großflächige Perfusion sicherzustellen. In Erwägung zu ziehen ist auch eine computertomographische Kontrolle der Dichtezunahme des Präparates mit gezielter Nachinjektion von BMP in langsamer wachsenden Arealen.

Im vorliegenden Fall war die Bildung neuen Knochens mit Hydroxylapatit als günstiger zu betrachten als mit β -Tricalciumphosphat, da der Dichteanstieg viel größer war und die Präparate tiefer durchbaut worden sind. Die knochenbildenden Eigenschaften des Hydroxylapatits in Verbindung mit BMP-2 sind in der vorliegenden Studie sogar noch stärker als unter Verwendung des schon lange bewährten Bio-Oss® (Janssen et al. 2006). Ferner sind die höhere Stabilität und Festigkeit von Hydroxylapatit gegenüber Bio-Oss® Erfolg versprechende Faktoren. Ein zusätzlicher Vorteil von industriell hergestelltem Hydroxylapatit gegenüber Bio-Oss® liegt in der Sicherheit, keine Infektionserkrankungen zu übertragen, da es nicht biologischen Ursprunges ist. Es kann im Gegensatz zu Bio-Oss® individuell in jeder Größe hergestellt werden.

Hydroxylapatit erfüllt die Kriterien eines geeigneten Trägermaterials wie beispielsweise kontinuierliche Abgabe von BMP-2 oder Unterstützung der Angiogenese (Ripamonti 1991, Ripamonti et al. 2000).

Aufgrund der positiven Ergebnisse im vorliegenden Versuch ist gedrucktes Hydroxylapatit als geeignetes Material zur Endokultivierung von Knochen in Hinblick auf Deckung größerer Areale anzusehen. Bei individueller Herstellung größerer Transplantate aus Hydroxylapatit könnte ein Zentralkanal als sinnvolle Ergänzung in Erwägung gezogen werden.

5. Zusammenfassung

Die Rekonstruktion größerer knöcherner Defektareale ist in der wiederherstellenden Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bei Trauma- oder Tumorpatienten aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von autologen Transplantaten, die bislang den Goldstandard darstellen, schwierig. Extraskelletal in Muskeltaschen kultivierter Knochen könnte die chirurgischen Optionen sinnvoll erweitern.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, welche osteokonduktive Matrize unter Einsatz von rhBMP-2 die beste Eignung zur Endokultivierung von Hartgeweben aufweist. Dazu wurden bei 12 Lewis-Ratten verschiedene Knochenersatzmaterialien in präparierte Taschen auf dem Musculus latissimus dorsi implantiert und über 8 Wochen auf unterschiedlich starke Knochenbildung hin untersucht. Gedrucktes poröses Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat wurden mit bovinem Hydroxylapatit (Bio-Oss®) als Referenz verglichen. Als Variante eines neuen Matrizendesigns wurden zusätzlich Bio-Oss®-Matrizen mit Zentralkanal eingesetzt. Die Tiere wurden während der achtwöchigen Versuchszeit computertomographisch untersucht und erhielten Fluorochrome zur zeitlichen Detektion der Knochenbildung. Die histologische Auswertung erfolgte an Hartschliffpräparaten und an entkalkten Paraffinschnitten. Die Computertomographien und Mikroradiographiehistologien wurden statistisch ausgewertet.

Die Studie hat gezeigt, dass mit allen Knochenersatzmaterialien Bone Engineering unter Verwendung von rhBMP-2 möglich ist. Eine Verknöcherung wurde bei allen Proben beobachtet. Signifikant höher zeigte sich die Knochenbildung mit Hydroxylapatit im Vergleich zu β -Tricalciumphosphat, da der Knochendichteanstieg deutlich größer war und die Osseointegration der Matrize am intensivsten stattgefunden hat. Das neue Design der Blöcke mit Zentralkanal hatte bei der vorliegenden Präparategröße keine signifikant veränderte Knochenverteilung oder stärkere Dichteentwicklung zur Folge.

In weiteren Studien sollte die Stabilität der Matrizen für die Verwendung als Scaffold zur Endokultivierung untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

Acil, Y., Terheyden, H., Dunsche, A., Fleiner, B., Jepsen, S. (2000): Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res*, 51, 703-710

Alam, M.I., Asahina, I., Ohmamiuda, K., Takahashi, K., Yokota, S., Enomoto, S. (2001): Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. *Biomaterials*, 22, 1643-1651

Allgöwer, M. (1975): Grundsätzliches zur Osteosynthese. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 19, 1-3

An, Y.H. (2000): Mechanical properties of bone. In: An, YH, Draughn, R.A., *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton, 41-63

Arnold, U., Lindenhayn, K., Perka, C. (2002): In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials*, 23, 2303-2310

Bauer, TW. (2007): Bone graft substitutes. *Skeletal Radiol*, 36, 1105-1107

Behrens, P., Wolf, E., Bruns, J. (2000): In vitro formation of human autologous osteoblast like-cells on natural bone mineral. *Orthopaede*, 29, 1431-1433

Bucholz, R.W., Carlton A., Holmes R.E. (1987): Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*, 18, 323-34

Cesnjjaj, M., Stavljenić, A., Vukicević, S. (1991): In vivo models in the study of osteopenias. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 29, 211-219

Chen, W.J., Jingushi, S., Hirata, G., Matsumoto, Y., Iwamoto, Y. (2004): Intramuscular bone induction by the simultaneous administration of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and bisphosphonate for autobone graft. *Tissue Eng*, 10, 1652-1661

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M. (2003): Osteogenic activity of the 14 types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85, 1544-1552

Clavero, J., Lundgren, S. (2003): Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*, 5, 154-160

Detsch, R., Uhl, F., Deisinger, U., Ziegler, G. (2008): 3D-Cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique. *J Mater Sci Mater Med*, 19, 1491-1496

Ducy, P., Karsenty, G. (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, 57, 2207-2214

Eppley, B. L., Pietrzak, W. S., Blanton, M. W. (2005): Clinical studies: Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon, *J Craniofac Surg*, 16, 981-989

Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R. (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *Anz J Surg*, 77, 626-631

Gazdag, A.R., Lane, J.M., Glaser, D., Forster, R.A. (1995): Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*, 3, 1—8

Giannoudis P. V., Dinopoulos H., Tsiridis E. (2005): Bone substitutes: An update. *Injury*, 36, 20—27

Goldberg, V.M., Stevenson, S. (1987): Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res*, 225, 7–16

Groeneveld, E. H. J., Burger, E. H. (2000): Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142, 9-21

Heliotis, M., Lavery, K.M., Ripamonti, U., Tsiridis, E., Di Silvio, L. (2006): Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35, 265-269

Herten, M., Rothamel, D., Schwarz, F., Friesen, K., Kogler, G., Becker, J. (2008): Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig*, 10.1007, 784-788

Hierholzer, G. Zilch, H. (1980): Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren. Springer, Berlin, Deutschland

Hogan, B.L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, 10, 1580–1594

Inoda, H., Yamamoto, G., Hattori, T. (2007): Rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36, 39-44

Janssen, F.W., Oostra, J., Oorschot, A., van Blitterswijk, C.A. (2006): A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*, 27, 315-323

Jensen, S.S., Brogini, N., Hjørtting-Hansen, E., Schenk, R., Buser, D. (2006): Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipig. *Clin Oral Implants Res*, 17, 237-243

- Jingushi, S., Urabe, K., Okazaki, K., Hirata, G., Sakai, A., Ikenoue, T. (2002):** Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft. *J Orthop Sci*, 7, 490–494
- Kang, Q., Sun, M.H., Cheng, H. (2004):** Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*, 11, 1312–1320
- Kasten, P., Luginbühl, R., van Griensven, M., Barkhausen, T., Krettek, C., Bohner, M., Bosch, U. (2003):** Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials*, 24, 2593-2603
- Kirker-Head, C.A. (2000):** Potential application and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 43, 65–92
- Kübler, N.R. (1997):** Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 1, 2-25
- Laurencin, C., Khan, Y., El-Amin, S.F. (2006):** Bone graft substitutes., *Expert Rev Med Devices*, 3, 49-57
- Lee, Y.M., Park, Y.J., Lee, S.J., Ku, Y., Han, S.B., Choi, S.M., Klokkevold, P.R., Chung, C.P. (2000):** Tissue engineered bone formation using chitosan/ tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*, 71, 410–417
- Matsushita, N., Terai, H., Okada, T., Nozaki, K., Inoue, H., Miyamoto, S. (2004):** A new bone-inducing biodegradable porous betatricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res*, 70, 450–458
- McAndrew, M.P., Gorman, P.W., Lange, T.A. (1988):** Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma: preliminary report. *J Orthop Trauma*, 2, 333–339
- Merten, H.A., Wiltfang, J., Grohmann, U., Hoenig, J. (2001):** Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *J Craniofac Surg*, 12, 59–68
- Nkenke, E., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G., Neukam, F.W. (2002):** Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*, 13, 514–521
- Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Lizuka, T. (2000):** Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 29, 62–66

Ono, I., Gunji, H., Kaneko, F., Saito, T., Kuboki, Y. (1995): Efficacy of hydroxyapatite ceramics as a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg*, 6, 238-244

Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H., Milz, S., Schieker, M., Kolk, A. (2005): Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone*, 37, 441-445

Poynton, A.R., Lane, J.M. (2002): Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine*, 27, 40–48

Reddi, A.H. (2000): Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*, 6, 351–359

Reddi, A.H., Wientroub, S., Muthukumar, N. (1987): Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am*, 18, 207-212

Rodrigues, C. V. M., Serricellab, P., Linharesc, A. B. R., Guerdess, R. M., Borojevicb, R., Rossie, R. M., Duarte, M. E. L., Farinac, M. (2003): Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4987–4997

Sachs, E., Cima, M., Williams, P., Brancazio, D., Cornie, J. (1992): Three dimensional printing: rapid tooling and prototypes directly from a CAD model. *J Eng Ind*, 114, 481-488

Sampath, T. K., Maliakal, J. C., Hauschka, P. V., Jones, W. K., Sasak, H., Tucker, R. F., White, K.H., Coughlin, J. E., Tucker, M. M., Pang, R. H. (1992): Recombinant human osteogenetic protein-1 (rhOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem*, 267, 20352-20362

Seitz, H., Rieder, W., Irsen, S., Leukers, B., Tille, C. (2005): Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 74, 782-788

Seitz, H. (2008): Dreidimensionales Drucken von patientenindividuellem Knochenersatz. *RTEjournal - Forum für Rapid Technologie*, 5, 1614-1623

Simmons, D. J., Kunin, A. S. (1970): Development and healing of rickets in rats. II. Studies with tritiated proline. *Clin Orthop Relat Res*, 68, 261-272

Spector, M. (1999): Basic principles of tissue engineering. Quintessence, Chicago, USA

Suchanek, W., Yoshimura, M. (1998): Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res*, 13, 94–117

Summers, B.N., Eisenstein, S.M. (1989): Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg*, 171, 677—680

Szabo, G., Huys, L., Coulthard, P., Maiorana, C., Garagiola, U., Barabas, J.(2005): A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20, 371-381

Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., Rueger, D.R. (2001): Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 30, 373-379

Turhani, D., Weissenbock, M., Stein, E., Wanschitz, F., Ewers, R. (2007): Exogenous recombinant human BMP-2 has little initial effects on human osteoblastic cells cultured on collagen type I coated/noncoated hydroxyapatite ceramic granules. *J Oral Maxillofac Surg*, 65, 485-493

Urist, M.R. (1965): Bone formation by autoinduction. *Science*, 150, 893—894

Van Heest, A., Swiontowski, M. (1999): Bone-graft substitutes. *Lancet*, 353, 28—29

Villareal, D.R., Sogal, A., Ong, J.L. (1998): Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Implantol*, 21, 67—73

Vogelin, E., Jones, N.F., Huang, J.I., Brekke, J.H., Lieberman, J.R. (2005): Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am*, 87, 1323—1331

Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kritz, M. J., Luxenburg, D. P., Sibley, B. S., Wozney, J. M. (1988): Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci*, 85, 9484-9488

Warnke, P.H., Springer, I.N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M. (2004): Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*, 364, 766-770

Warnke, P.H., Springer, I.N., Acil, Y., Julga, G., Wiltfang, J., Ludwig, K. (2006a): The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials*, 27, 1081-1087

Warnke, P.H., Wiltfang, J., Springer, I.N., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M. (2006b): Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*, 27, 3163-3167

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 16, 1528-1534

Yamashita, H., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., Miyazono, K. (1996): Bone morphogenetic protein receptors. *Bone*, 19, 569–574

7. Bildanhang

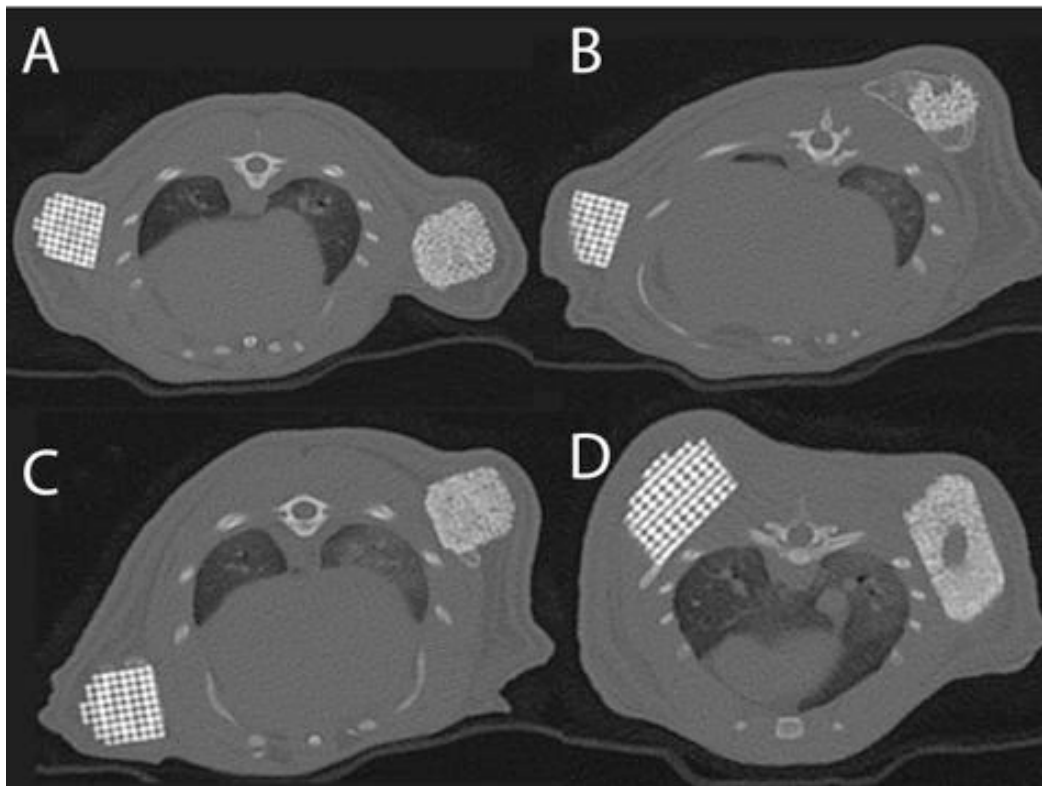


Abbildung 4: Computertomographische Bilder aller Gruppen. Projektionsbedingt fallen die unterschiedlichen Größen der Knochenersatzmaterialien auf, auch sind nicht alle Präparate auf gleicher Höhe angeschnitten. A = links HA und rechts Bio-Oss®, B = links HA und rechts Bio-Oss® mit Zentralkanal C = links β -TCP und rechts Bio-Oss®, D = links β -TCP und rechts Bio-Oss® mit Zentralkanal

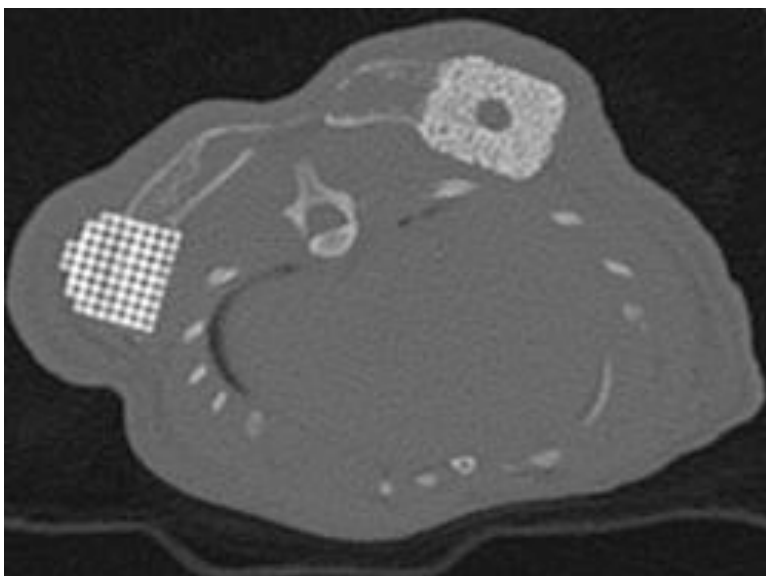


Abbildung 5: Computertomographie: Bildung von Knochenbrücken zwischen den einzelnen Blöcken. Links β -Tricalciumphosphat, rechts Bio-Oss® mit Zentralkanal

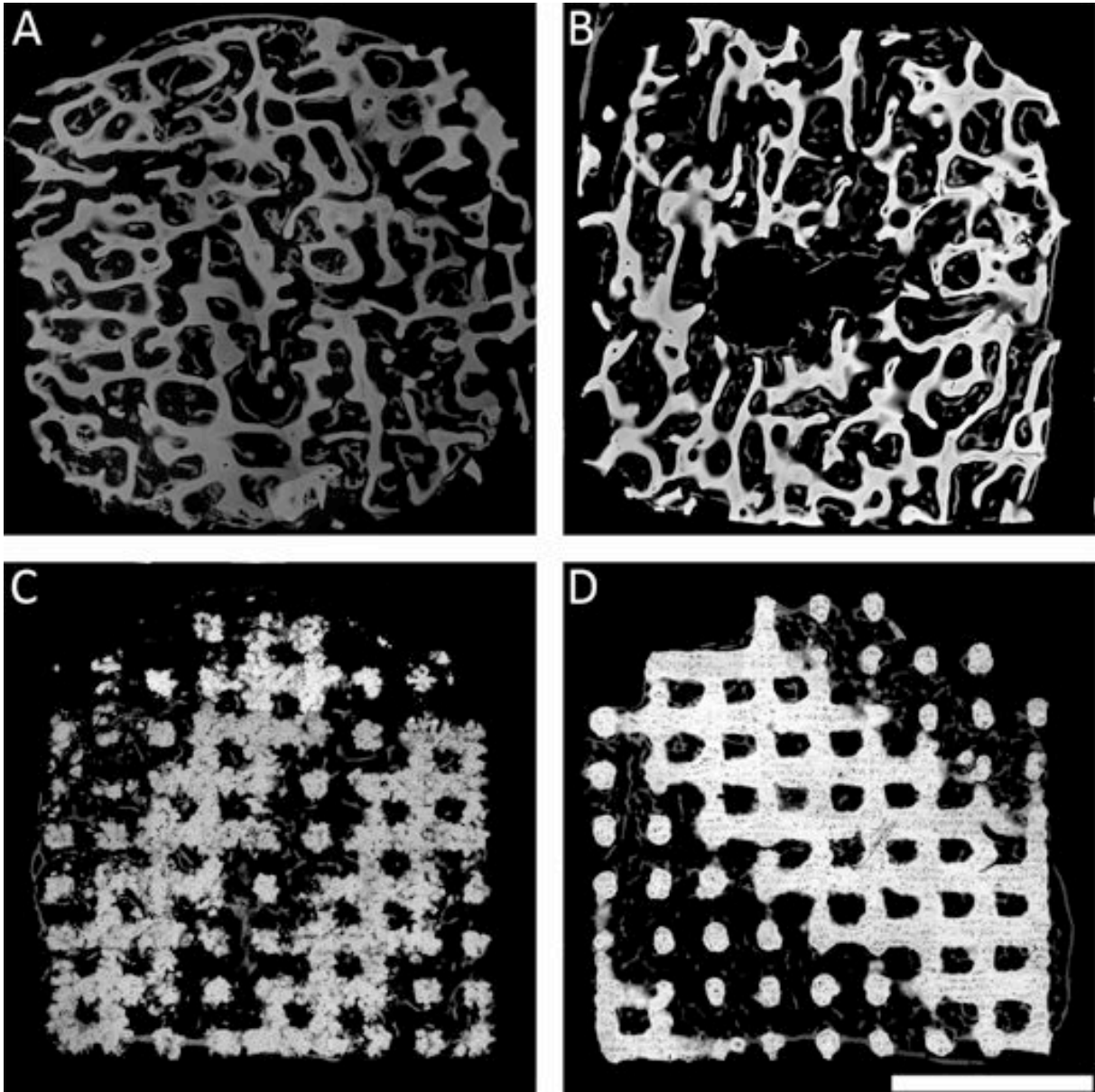


Abbildung 6: Mikroradiographien 8 Wochen post implantationem. In allen Materialien fällt Knochenneubildung auf, verteilt über das gesamte Präparat. A = Bio-Oss®, B = Bio-Oss® mit Zentralkanal, C = Hydroxylapatit, D = β -Tricalciumphosphat. (Balken: 0,5 cm)

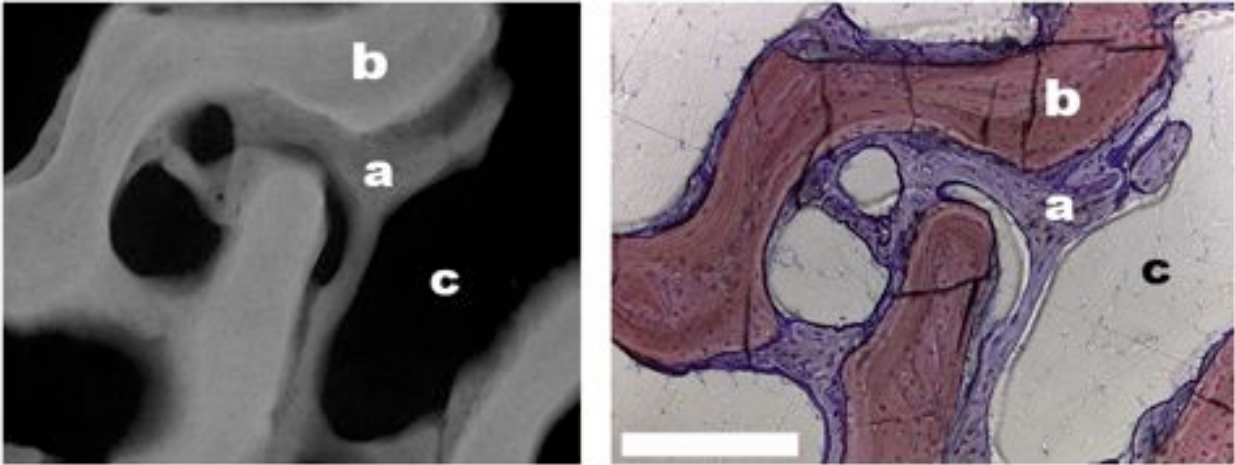


Abbildung 7: Darstellung des kongruenten Areals in Mikroradiographie und Toluidinblau. Das Knochenersatzmaterial *b* (hier Bio-Oss®) ist harmonisch von neu gebildetem Knochen *a* umgebaut worden. Intertrabekulärer Raum *c* wird zunehmend durch neuen Knochen eingeengt. (Balken: 200 µm)

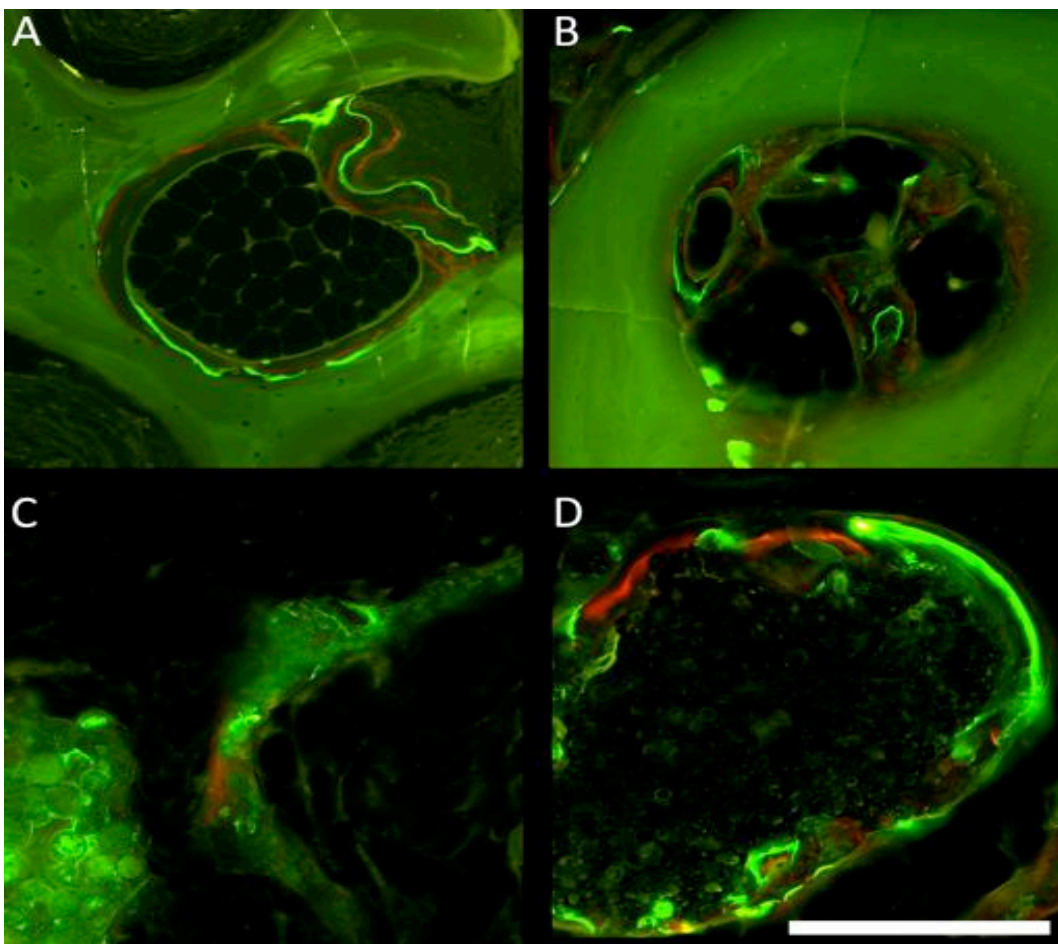


Abbildung 8: Fluoreszenzhistologie 8 Wochen nach Implantation. A = Bio-Oss®, B = Bio-Oss® mit Zentralkanal, C = Hydroxylapatit, D = β -Tricalciumphosphat. Knochenbildung fand vorwiegend in den Wochen 4 bis 7 statt. (Balken: 200 µm)

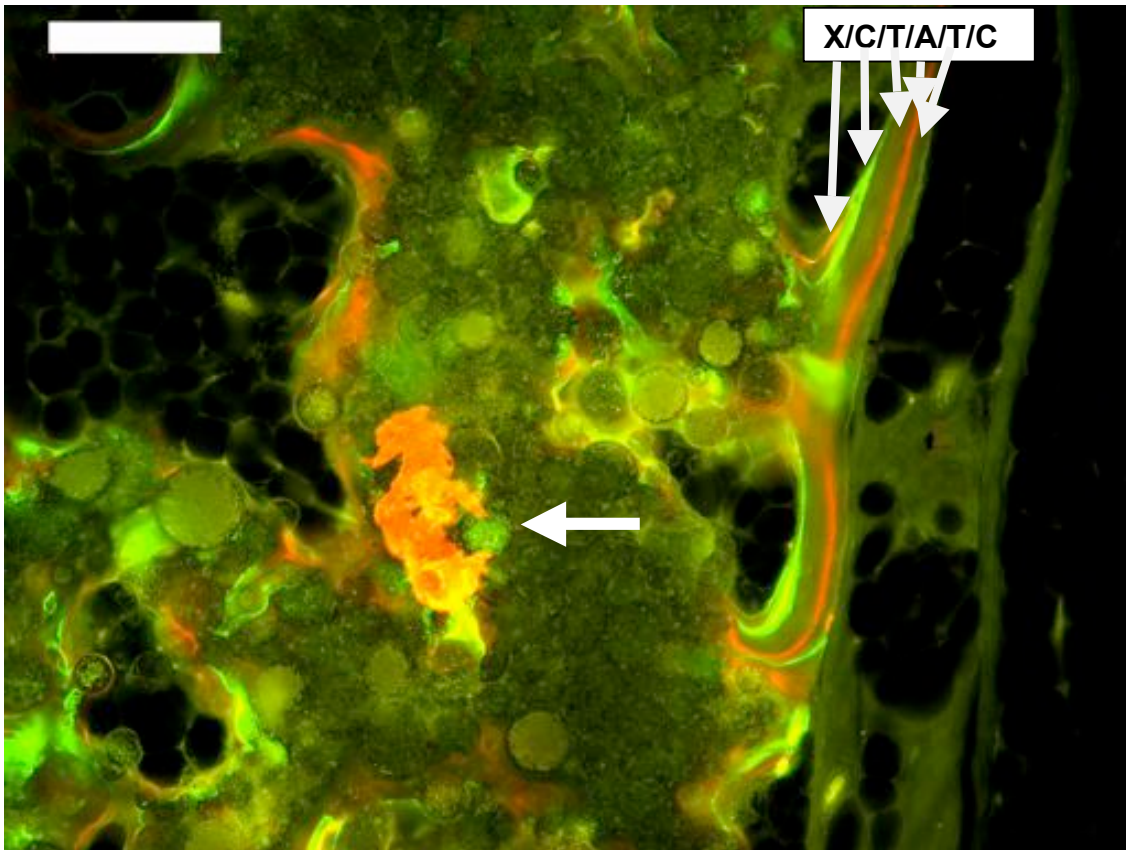


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie eines Hydroxylapatit-Blockes mit allen Fluorochromen. Oben: Abfolge der Marker: Beginn in Woche 4 mit Alizarin (A), Woche 5 beidseits Tetracyclin (T), Woche 6 Calceingrün (C), Woche 7 Xylenolorange (X) unterer Pfeil: Alizarin und Calceingrün haben sich tief in den Block eingelagert (Balken: 100 µm).

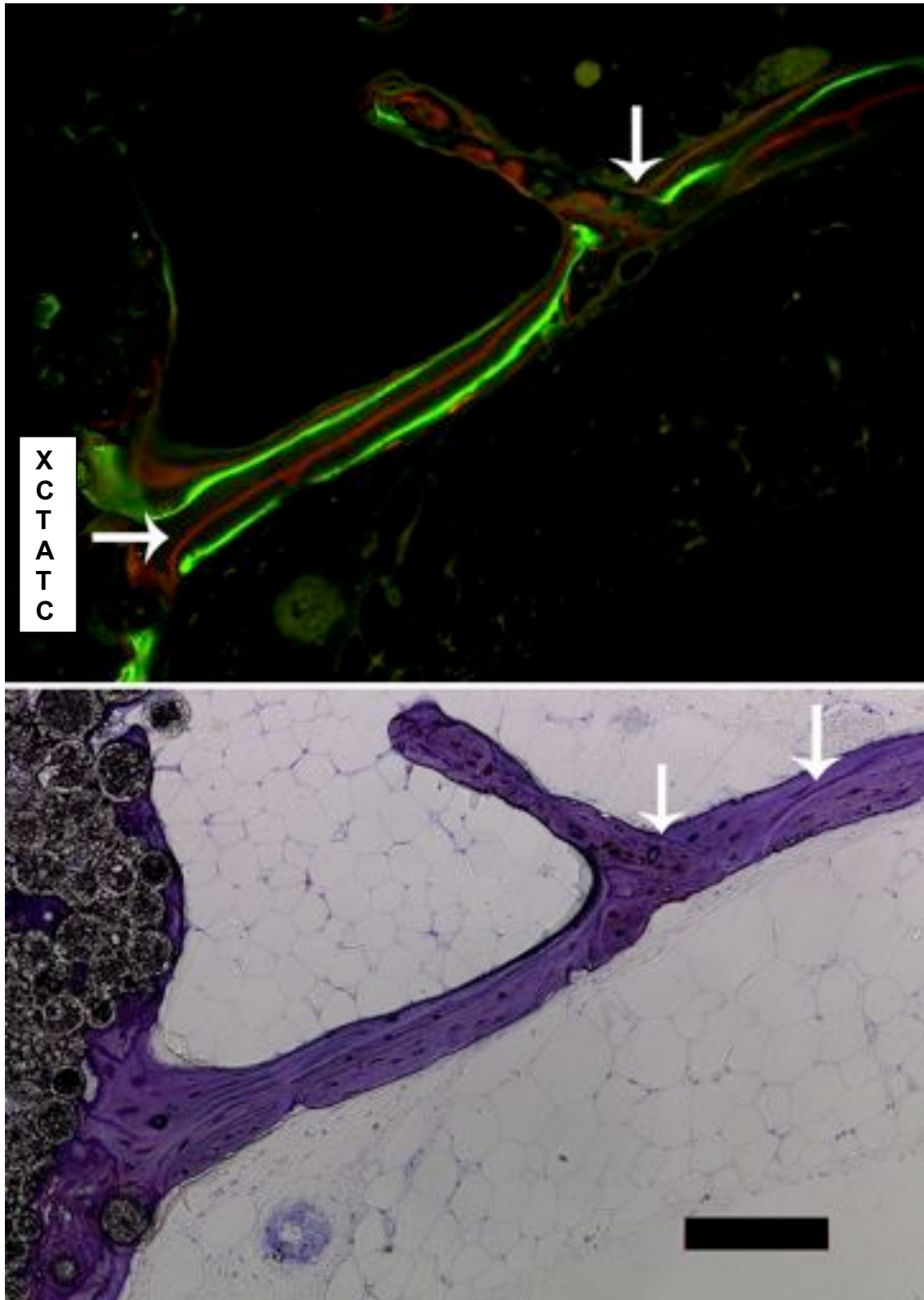


Abbildung 10: Korrespondierendes Areal eines HA-Blockes mit der typischen Abfolge der Fluoreszenzbanden (oben) und dem zugehörigen Toluidinblau-Ausschnitt. Abfolge der Banden: Mitte Alizarin (A), daran jeweils Tetracyclin (T), dann Calceingrün (C) und Xylenolorange (X). Die Pfeile der rechten Bildseite markieren scharfe Abbrüche in der Bandenstruktur als Anzeichen von Remodelingprozessen. (Balken: 100 μm)

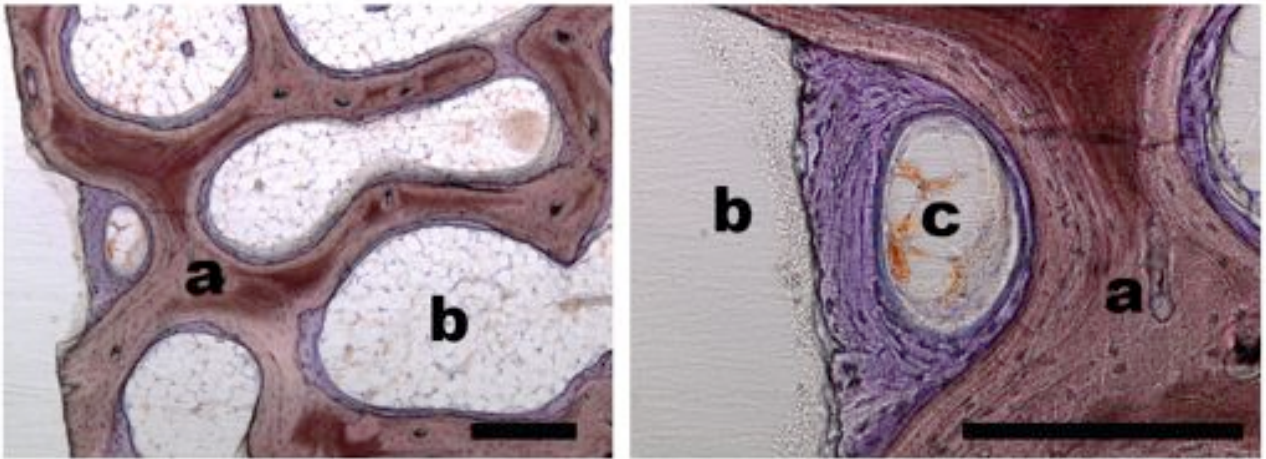


Abbildung 11: Bio-Oss®-Block, Toluidinblau.

Gleichmäßige Knochenbildung entlang der Trabekel (a), der intertrabekuläre Raum (b) ist mit Fettgewebe gefüllt. Formation eines frühen Havers-Systems (c) mit Osteoblasten, Osteoidsäumen und versorgendem Gefäß ist zu erkennen. (Balken: 200 µm)

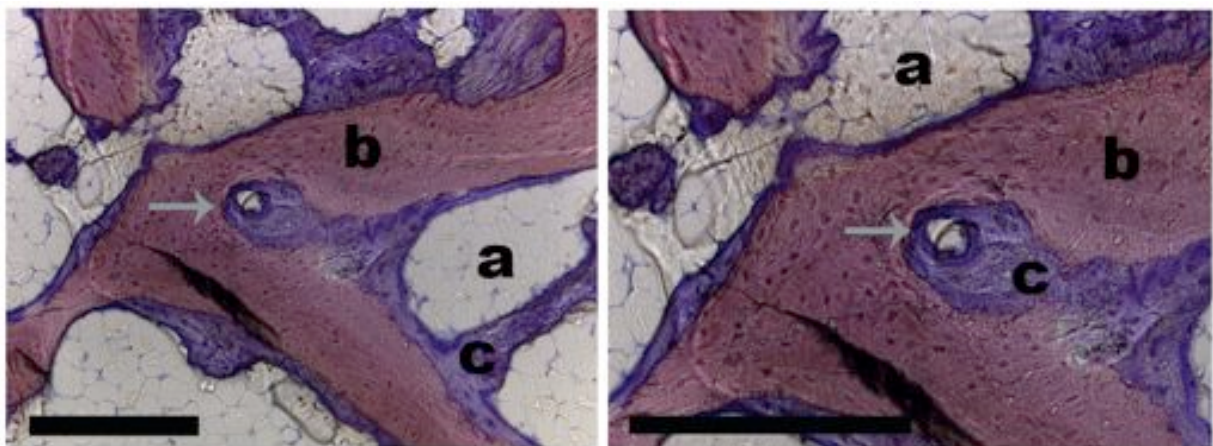


Abbildung 12: Bio-Oss®-Block mit Zentralkanal, Toluidinblau.

Knochen (c) hat sich gleichmäßig entlang der Trabekel (b) gebildet, der intertrabekuläre Raum (a) ist mit Fettgewebe gefüllt. Der Pfeil markiert ein Havers-System mit aktiven kubischen Osteoblasten und Osteozyten. (Balken: 200 µm)

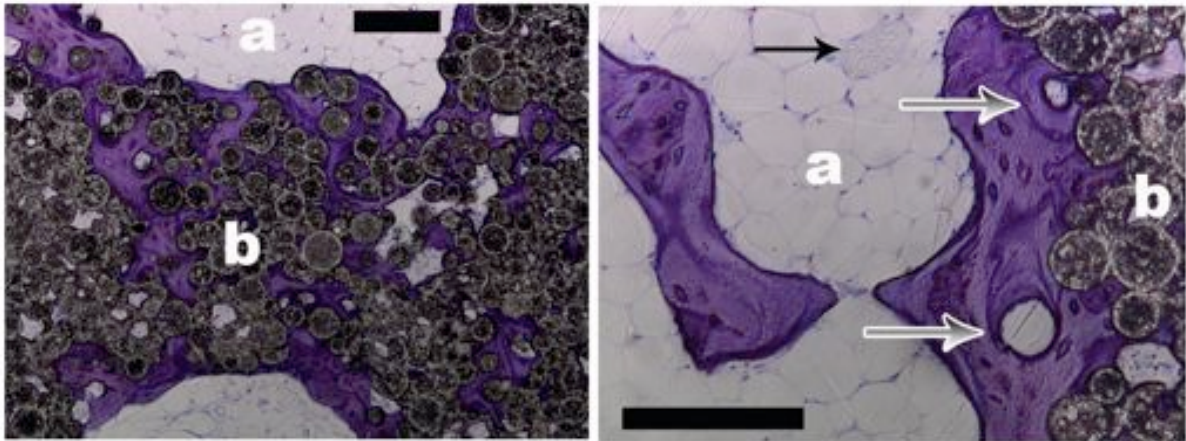


Abbildung 13: Gedrucktes Hydroxylapatit, Toluidinblau.

Neu gebildeter Knochen hat sich im Knochenersatzmaterial (*b*) eingelagert, Fettgewebe und faserreiches Bindegewebe mit einem Gefäß (*schwarzer Pfeil*) haben die freien Areale aufgefüllt. Die grauen Pfeile markieren neu gebildeten Knochen mit kleinen Havers-Systemen. Es sind Osteozyten und kubische Osteoblasten mit Osteoidsäumen zu erkennen. (Balken: 100 μm)

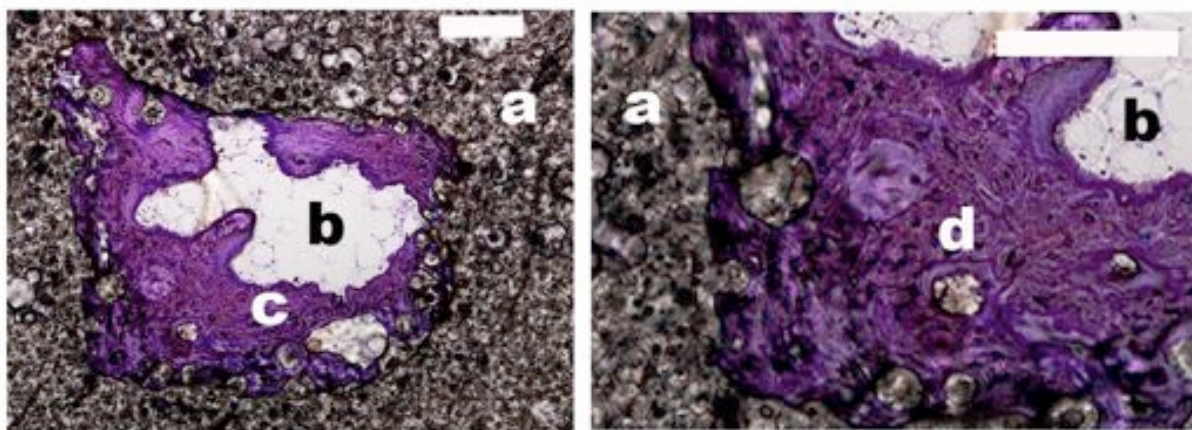


Abbildung 14: β -Tricalciumphosphat, Toluidinblau.

In den Poren des Knochenersatzmaterialies (*a*) hat sich Fettgewebe mit Gefäßen (*b*) gebildet. Dem β -TCP hat sich neuer Knochen aufgelagert und ist in die Poren eingewachsen. Havers-Systeme (*d*) mit Osteoblasten und Osteozyten sind zu erkennen. (Balken: 100 μm)

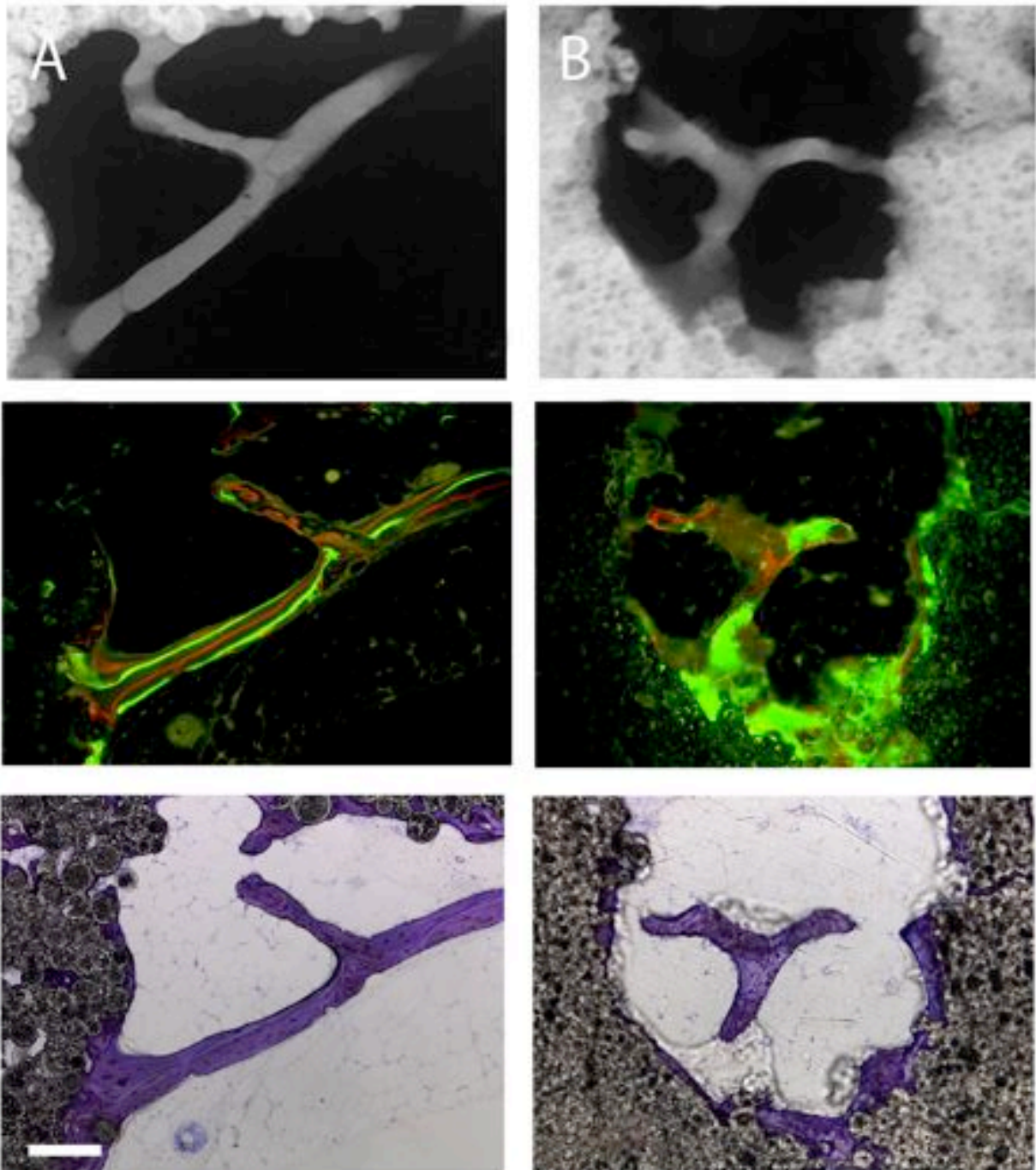


Abbildung 15: Vergleich der angewandten Hartschliff-Verfahren. Oben Mikroradiographie, in der Mitte Fluoreszenzmikroskopie, unten Toluidinblau.

A = Hydroxylapatit, B = β -Tricalciumphosphat. Die HA-Fluoreszenz zeigt die bereits in Abbildung 10 beschriebene Abfolge der Fluoreszenzbanden. (Balken: 100 μm)

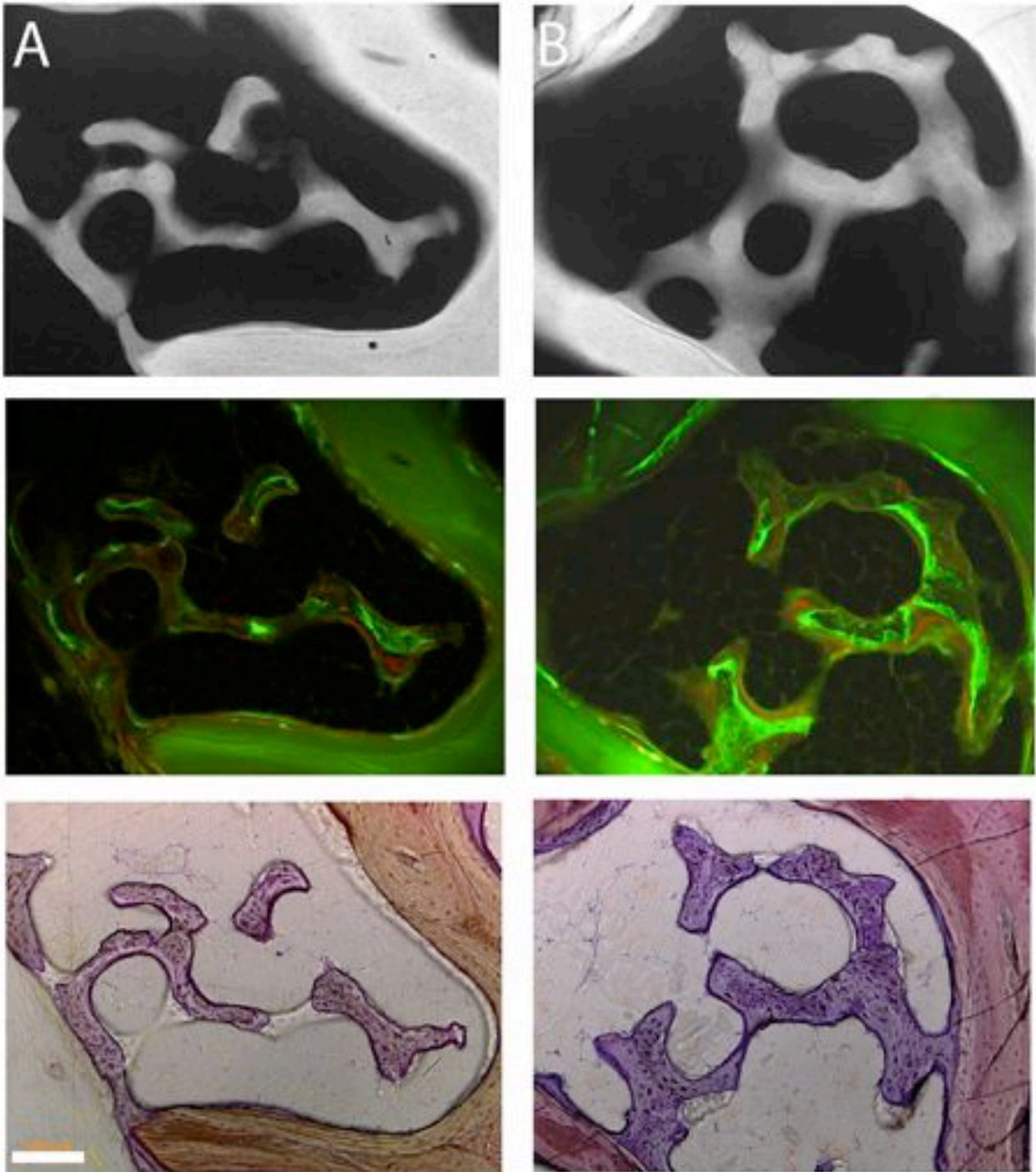


Abbildung 16: Vergleich der angewandten Hartschliff-Verfahren. Oben Mikroradiographie, in der Mitte Fluoreszenzmikroskopie, unten Toluidinblau. A = Bio-Oss® mit Zentralkanal, B = Bio-Oss®. (Balken: 100 μm)

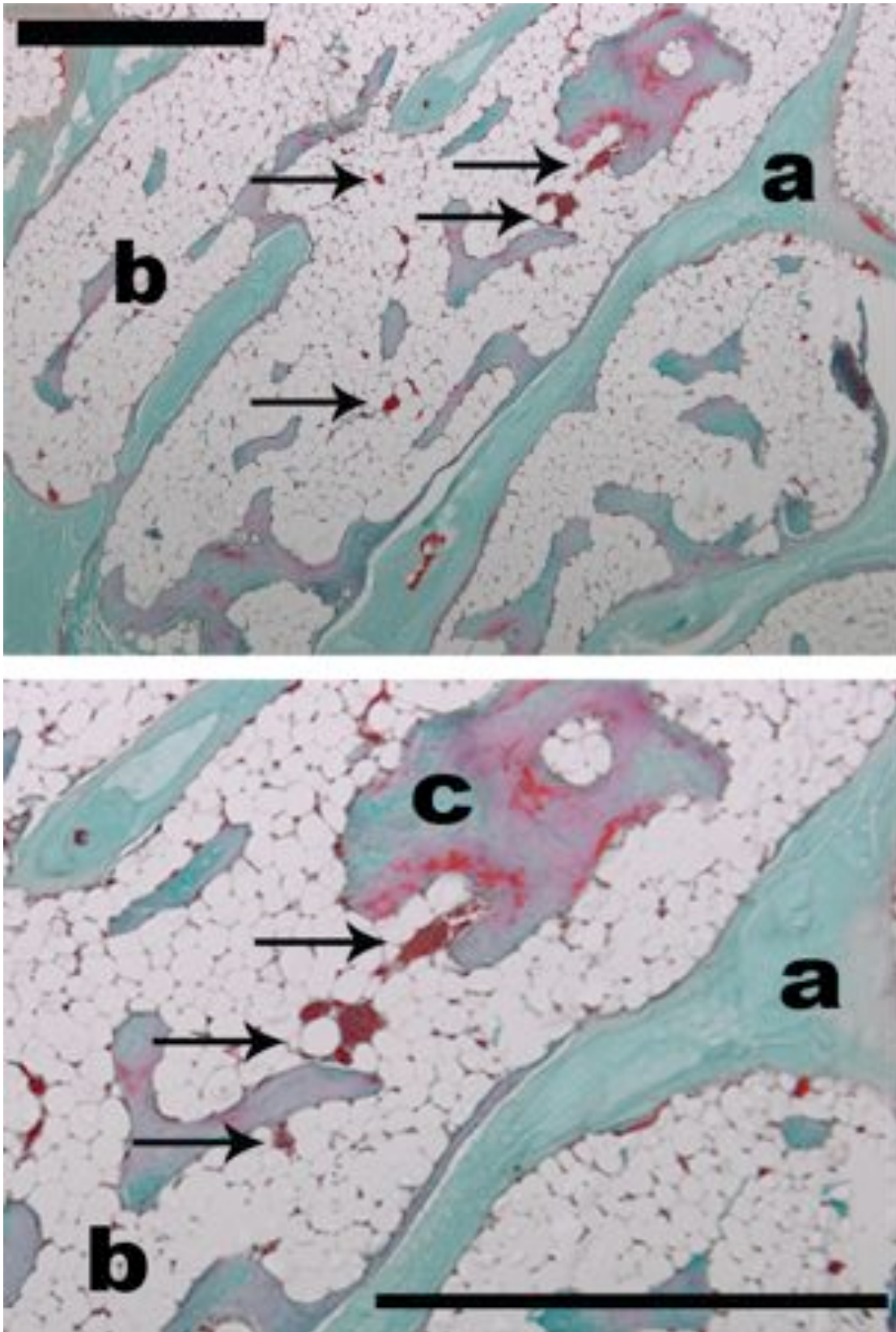


Abbildung 17: Bio-Oss®, Goldner, Paraffin. Trabekel des Bio-Oss® (a), Fettgewebe (b), neuer Knochen (c). Die Pfeile markieren angeschnittene Blutgefäße. (Balken: 500 µm)

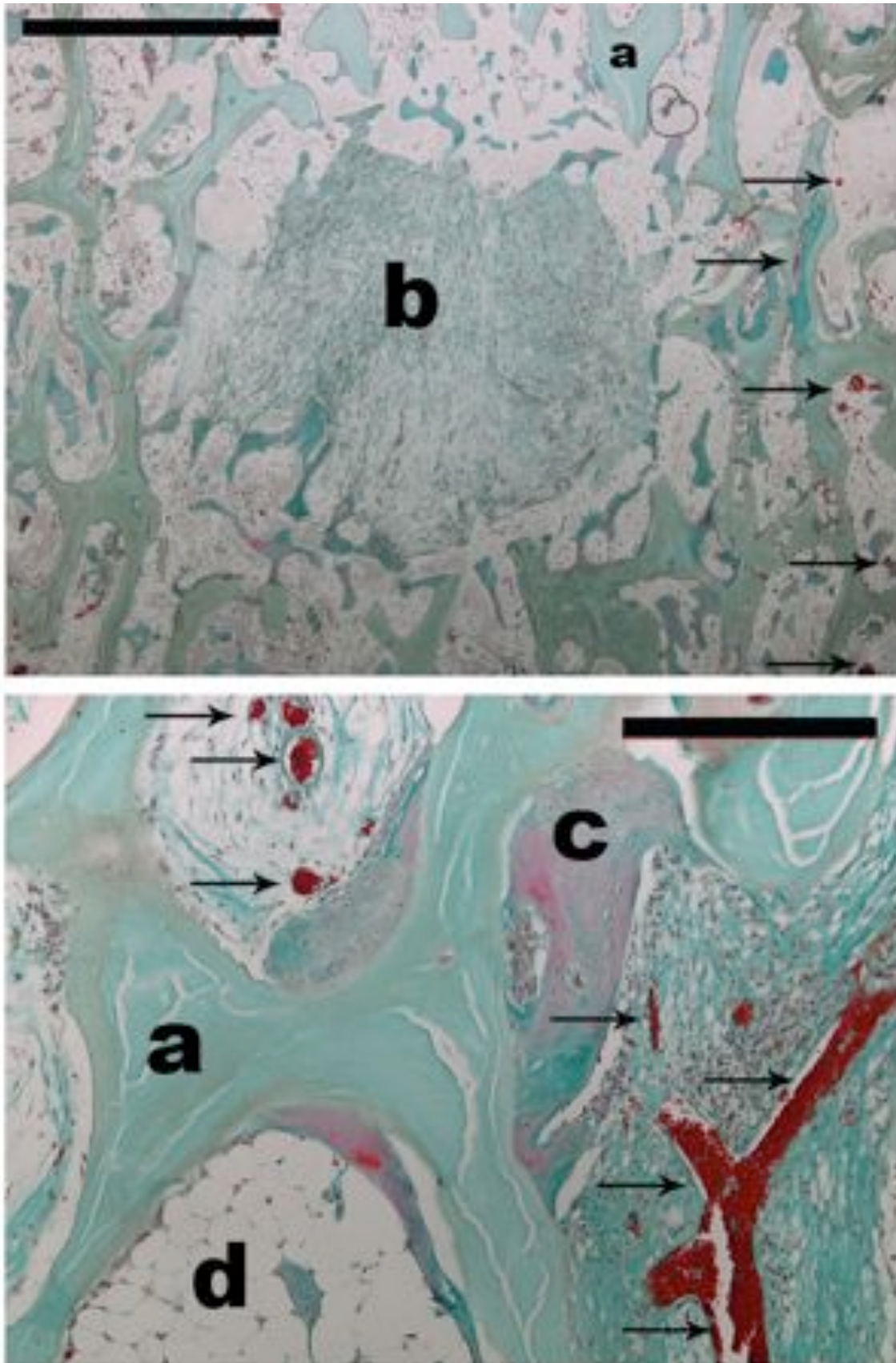


Abbildung 18: Bio-Oss® mit Zentralkanal, Goldner, Paraffin.
 Bio-Oss® (a), Zentralkanal mit faserreichem Bindegewebe (b), frisch gebildeter Knochen (c), Fettgewebe (d). Die Pfeile markieren diverse angeschnittene Blutgefäße (Balken oben links: 500 µm, unten rechts: 200 µm)

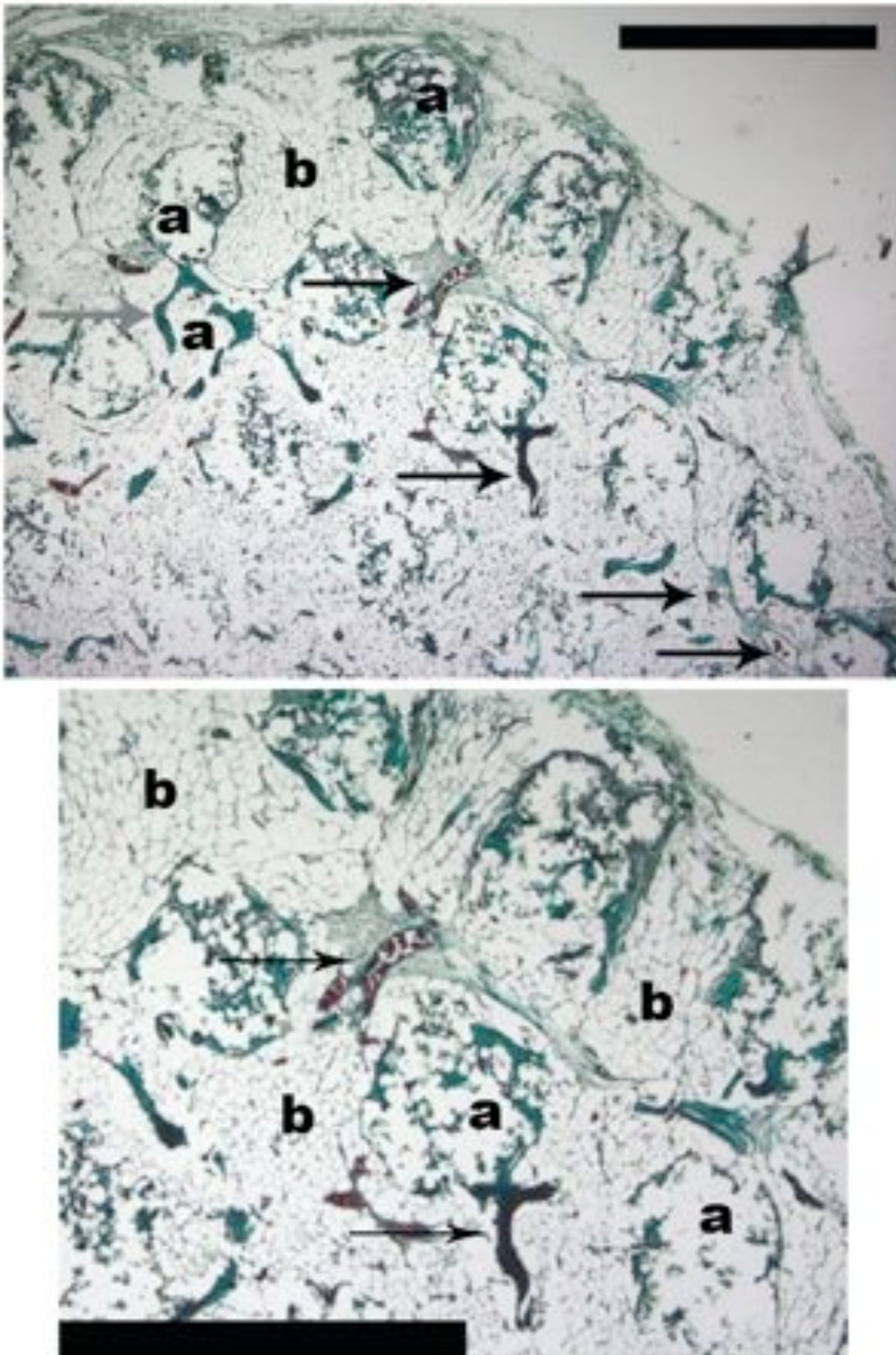


Abbildung 19: Hydroxylapatit, Goldner, Paraffin.
 Knochenersatzmaterial (a), wurde von neuem Knochen (*grauer Pfeil*) infiltriert.
 Fettgewebe (b). Die Pfeile deuten auf Blutgefäße. (Balken: 500 µm)

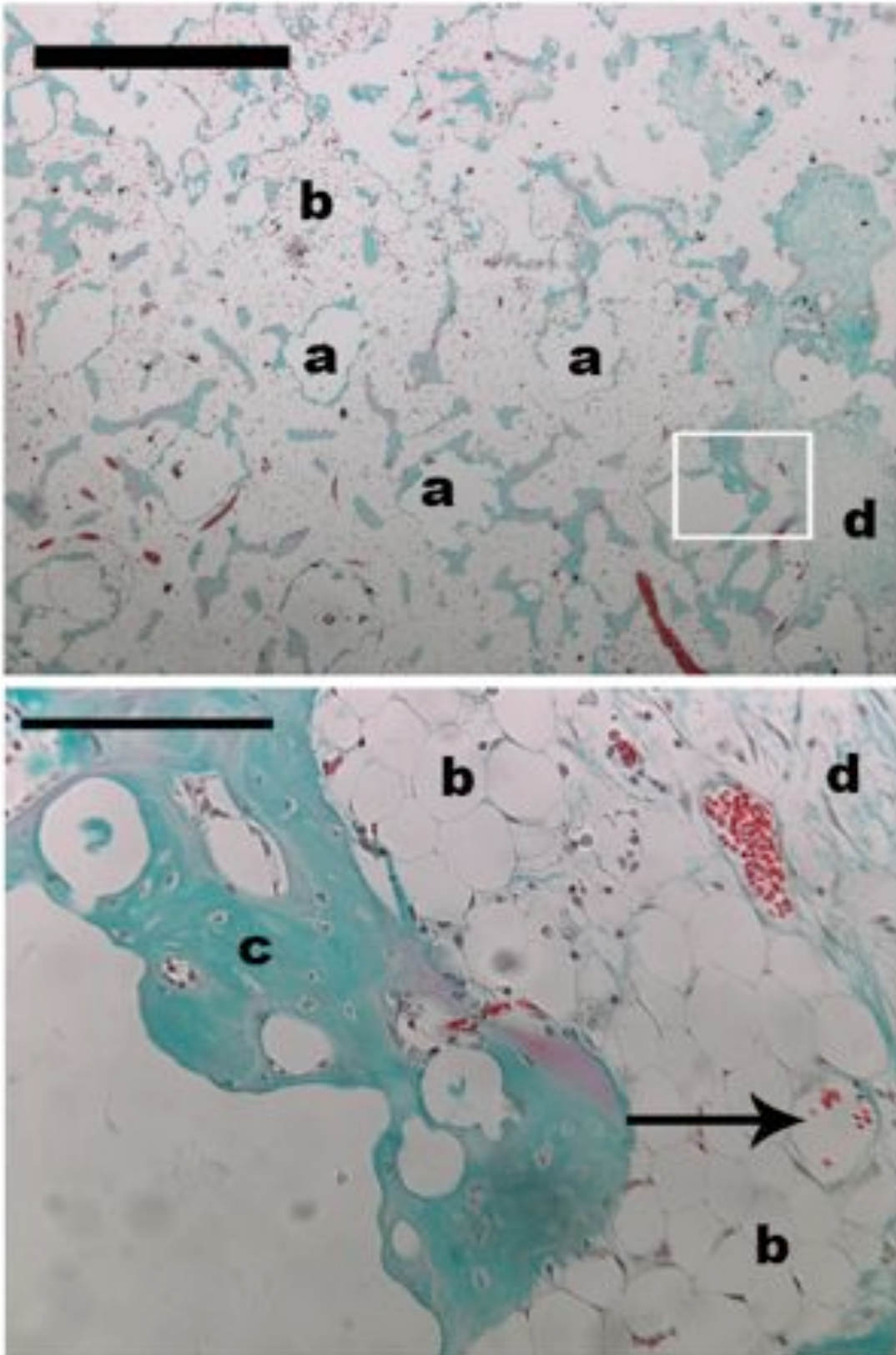


Abbildung 20: β -Tricalciumphosphat, Goldner, Paraffin. Knochenersatzmaterial (a), Fettgewebe (b), frischer Knochen (c) mit Osteoblasten und Osteozyten, faserreiches Bindegewebe (d) am Präparaterand. Pfeile markieren Blutgefäße. (Balken oben = 1000 μm , unten = 200 μm)

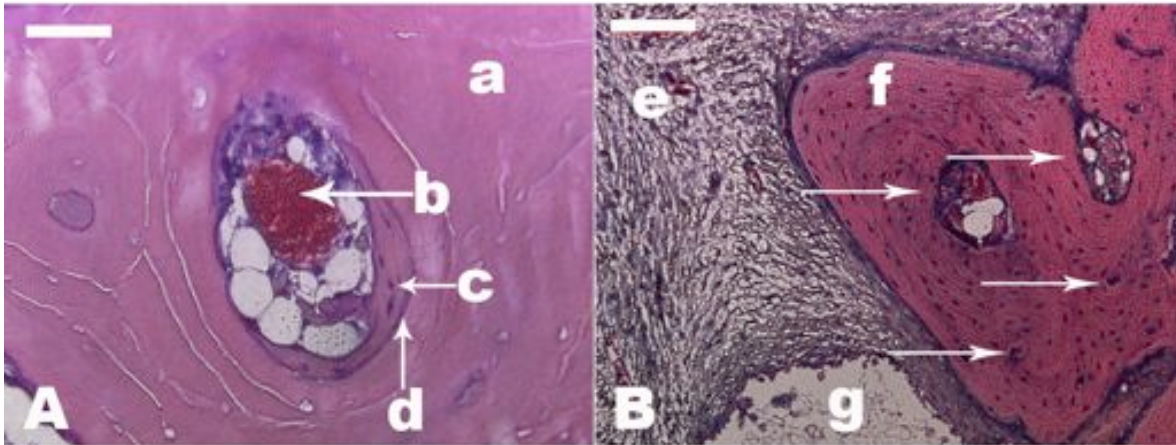


Abbildung 21: A: Bio-Oss®, B: β -Tricalciumphosphat, HE, Paraffin.

A: In einem Bio-Oss®-Trabekel *a* bildet sich ein frühes Havers-System mit Zentralarterie (*b*), sich konzentrisch anlagerndem Knochen (*c*) mit Osteozyten und Osteoblasten. (*d*) zeigt die Kittlinie zum Knochenersatzmaterial hin.

B: Formation mehrerer Havers-Systeme (*f*) unterschiedlicher Größen (*Pfeile*) mit Zentralgefäßen und vitalen Osteoblasten und Osteozyten. im β -TCP-Block (*g*). In den Poren Bildung faserreichen Bindegewebes (*e*). (Balken: 100 μ m)

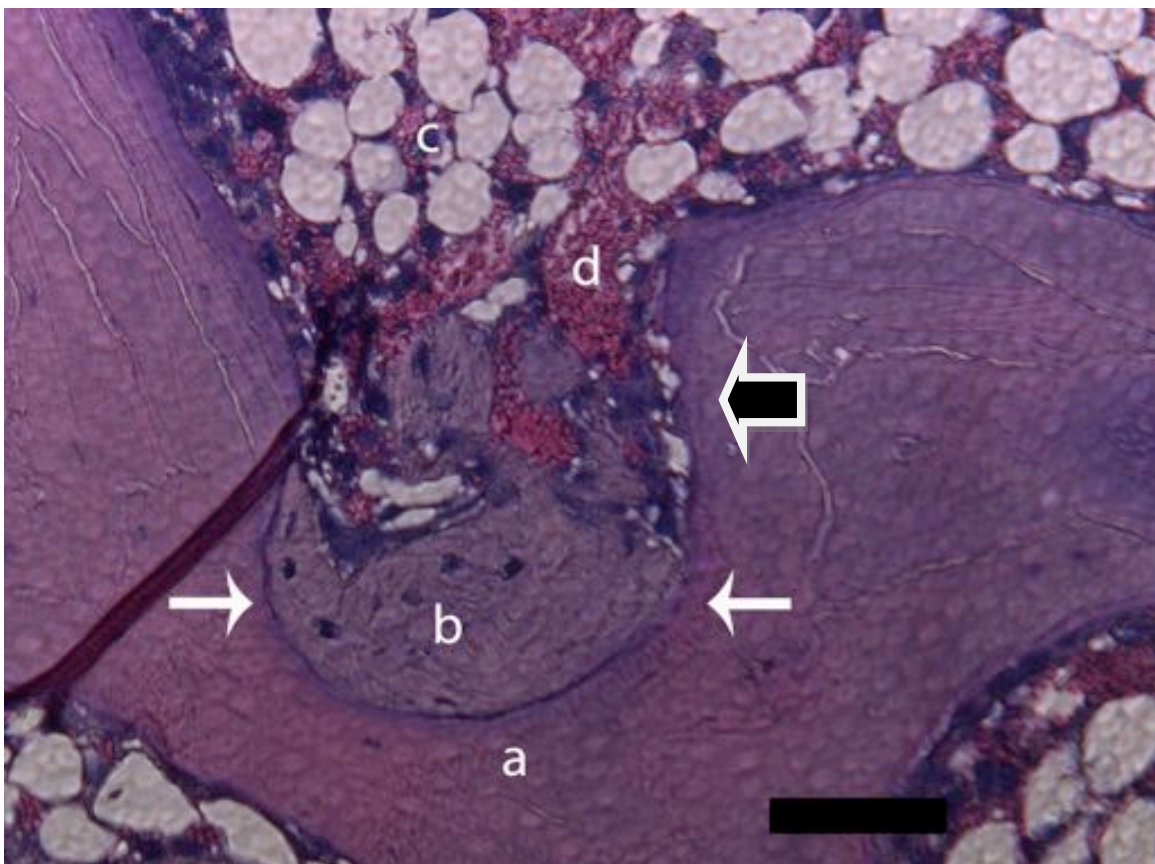


Abbildung 22: Bio-Oss®, HE, Paraffin.

Beginnende Resorption des Bio-Oss®-Trabekels (*a*) bei einem Präparat mit Zentralkanal. Die Resorptionslakune (*Pfeile*) weist im rechten oberen Rand eine gezackte Oberfläche als Folge von Osteoklastenaktivität auf (*schwarzer Pfeil*). Sie ist aufgefüllt mit Knochen, Osteoblasten und Osteozyten (*b*). Fettgewebe (*c*) mit versorgenden Blutgefäßen (*d*). (Balken: 50 μ m)

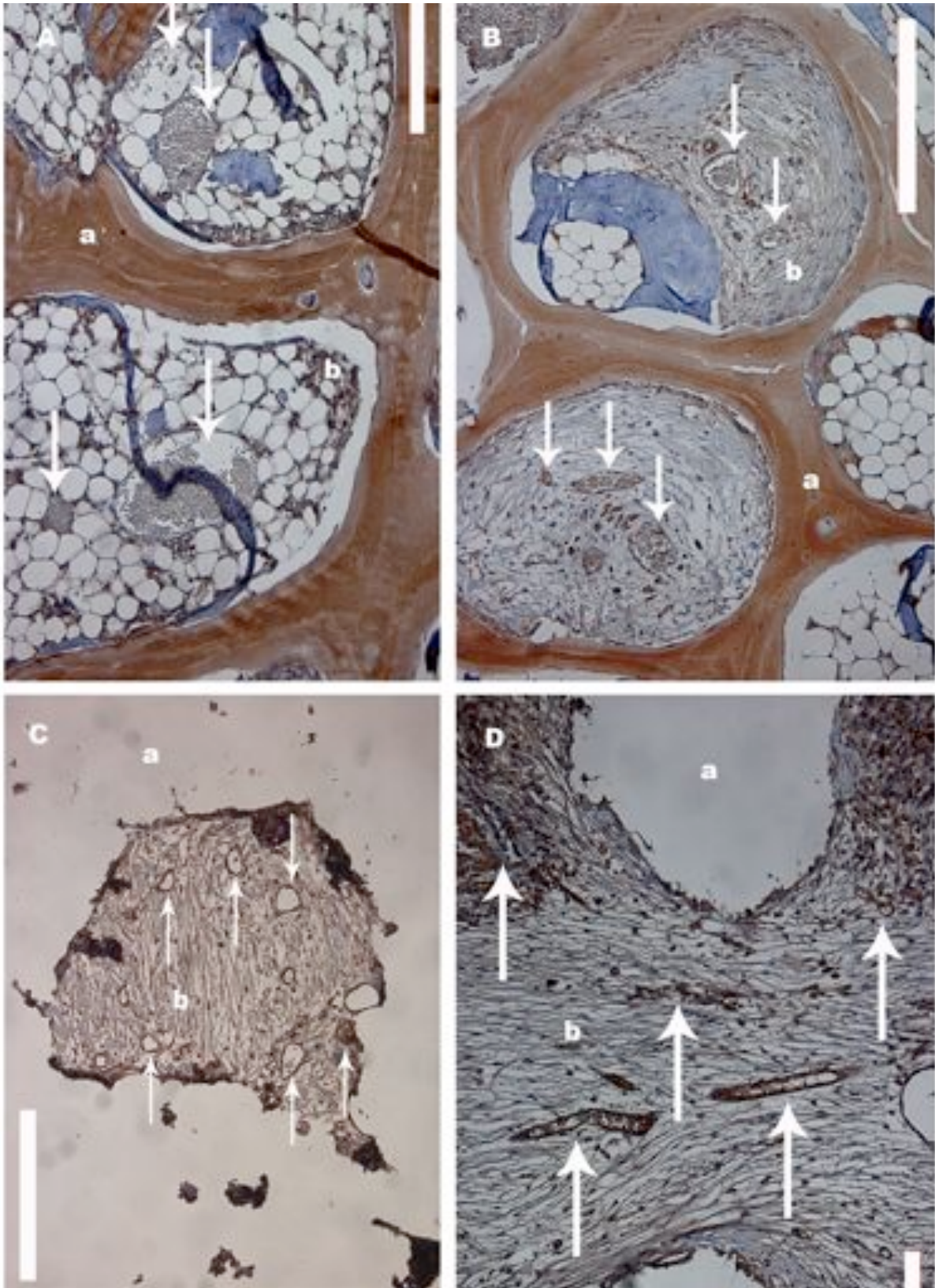


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von Pecam-1, Paraffin.

A = Bio-Oss®, B = Bio-Oss® mit Zentralkanal, C = Hydroxylapatit, D = β -Tricalciumphosphat.

Die Pfeile markieren immunhistochemisch nachgewiesene Endothelzellen von Blutgefäßen im Bindegewebe bzw. Fettgewebe (b) der jeweiligen Knochenersatzmaterialien (a). (Balken: 200 μ m)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. P.H. Warnke danke ich sehr herzlich für die freundliche Vergabe des interessanten Themas sowie für die umfassende Betreuung, Anregung und Unterstützung bei der Erhebung der Befunde und Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. Dr. S. Becker gilt mein besonderer Dank für sein großes Engagement und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche dieser Arbeit sowie für die vielen hilfreichen Anmerkungen und Korrekturen.

Herrn Prof. Dr. Y. Acil danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die freundliche Betreuung.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Bolte möchte ich mich für die Anleitung bei der Durchführung und Auswertung der Computertomographien bedanken.

Herrn Dr. T. Nitsche danke ich für die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau G. Neßenius, MTA, danke ich für die freundliche Anleitung und Mithilfe bei der Durchführung histologischer Arbeiten und für Ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. R. Vontheim bedanke ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herr Prof. Dr. G. Schultheiß hat mit seinen Mitarbeitern für die fachgerechte Betreuung der Tiere während des Versuches gesorgt, hierfür spreche ich ihm meinen Dank aus.

Meinen Kommilitoninnen Frau Kristina Schünemann, Frau N. Käser und Frau B. Weigel möchte ich für die angenehme, freundschaftliche und effektive Zusammenarbeit danken.

Bedanken möchte ich mich bei der Europäischen Union für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des MyJoint-Projektes (FP-6 NEST 028861).

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines Studiums und meiner Dissertation unaufhörlich unterstützt hat und die mir den nötigen Freiraum zur Durchführung dieser Arbeit gab.

Lebenslauf

Name: Oliver Krapf

Geburtsdatum: 15. Juli 1984

Geburtsort: Rüsselsheim

Familie: Vater: Dr. med. Lothar Krapf, Chefarzt
Mutter: Renate Krapf, geb. Müller, Gymnasiallehrerin

Schulbildung: Aug. 1991 – Grundschule in Schafflund
Dez. 1994

Jan. 1995 – Grundschule Garding
Aug. 1995
Aug. 1995 – Nordseegymnasium St. Peter (Europaschule)
Jun. 2004 in St. Peter-Ording
Jun. 2004 Abitur, Note: 1,5
Auszeichnung durch die Deutsche
Physikalische Gesellschaft für hervorragende
Leistungen im Fach Physik

Studium: Okt. 2004 – Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-
Dez. 2009 Universität zu Kiel
Vorphysikum: sehr gut
Physikum: sehr gut
Staatsexamen: sehr gut

Anstellung: Dez. 2006 – Anstellung als studentische Hilfskraft für den
Feb. 2007 Präparierkurs an dem Anatomischen Institut
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
seit Jan. 2010 Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis
Farkas-Schünemann, Garding

Wissenschaft: seit Dez. 2007 Promotionsarbeit an der Klinik für Mund-,
Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen: Nov. 2009 Endocultivation: 3D printed customized
porous scaffolds for heterotopic bone
induction. Oral Oncology, e181-8