

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

---

**EXPERIMENTELLE ERMITTLUNG DES OPTIMALEN  
APPLIKATIONSZEITPUNKTES VON REKOMBINANTEM HUMANEM  
BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 IN DER INTRAMUSKULÄREN  
ENDOKULTIVIERUNG HETEROTOPEN KNOCHENGEWEBES MIT  
SYNTHETISCHEM HYDROXYLAPATIT UND BIO-OSS® ALS MATRIZEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**KRISTINA SCHÜNEMANN**

aus **Schönebeck/Elbe**

Kiel, **2010**

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. Dr. Warnke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Schünke

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.12.2010

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Klinische Rekonstruktion knöcherner Defekte .....	1
1.2 Tissue Engineering von Knochengewebe.....	2
1.3 Knochenersatzmaterialien.....	3
1.4 Bone Morphogenetic Proteins.....	4
1.5 Rekombinantes humanes BMP-2.....	5
1.6 Intramuskuläre Endokultivierung heterotopen Knochens .....	6
1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	7
2. Material und Methode.....	8
2.1. Versuchsaufbau im Vorversuch.....	8
2.2 Versuchsaufbau im Hauptversuch.....	8
2.3 Tierhaltung.....	9
2.4 Narkose.....	9
2. 5 Ablauf des Vorversuchs.....	10
2.5.1 Erster operativer Eingriff.....	10
2.5.2 Zweiter operativer Eingriff.....	10
2.5.3 Computertomographie.....	11
2.5.4 Polychrome Sequenzmarkierung.....	11
2.5.5 Tötung der Tiere und Entnahme der Proben.....	12
2.5.6 Komplikationen im Vorversuch.....	12
2.6 Ablauf des Hauptversuches.....	13
2.6.1 Material im Hauptversuch.....	14
2.6.2 Erster operativer Eingriff.....	15
2.6.3 Zweiter operativer Eingriff.....	15
2.6.4 Computertomographie.....	16
2.6.5 Polychrome Sequenzmarkierung .....	17
2.6.6 Tötung der Tiere und Entnahme der Proben.....	17
2.6.7 Komplikationen im Hauptversuch.....	18
2.7 Präparateherstellung.....	18
2.8 Herstellung der Hartschliff-Präparate.....	18
2.8.1 Mikroradiographie.....	19
2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	20
2.8.3 Toluidinblau-Färbung.....	20
2.9 Herstellung der Paraffin-Präparate.....	21
2.9.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....	22
2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	22
2.9.3 Immunhistochemie mit Antikörper gegen PECAM- 1.....	22
2.10 Statistische Auswertung der computertomographisch ermittelten Werte.....	23
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Ergebnisse des Vorversuchs.....	25
3.1.1 Resultate der computertomographischen Untersuchungen.....	25
3. 1.2 Auswertung der Mikroradiographien.....	29
3.1.3 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie.....	31
3.1.4 Ergebnisse der histologischen Auswertung des Vorversuchs.....	33

3.2 Ergebnisse der Hauptversuchsreihe.....	34
3.2.1 Auswertung der computertomographischen Untersuchungen.....	34
3.2.2 Auswertung der Mikroradiographie.....	38
3.2.3 Ergebnisse der histologischen Auswertung eines Areals in unterschiedlicher Färbung...	42
3.2.4. Resultate der histologischen Auswertung der Paraffinschnitte.....	45
3.2.5 Resultate der immunhistologischen Auswertung.....	46
4. Diskussion.....	47
4.1 Vorversuch.....	47
4.2 Komplikationen und methodische Schwächen des Vorversuches.....	51
4.3 Hauptversuch.....	53
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literaturverzeichnis.....	61
7. Bildanhang.....	68
Danksagung.....	82
Lebenslauf.....	83

## **1. Einleitung**

Die Versorgung und Rekonstruktion knöcherner Defekte als Folge von Traumata, destruierenden Erkrankungen und kongenitalen Fehlbildungen stellt in der operativen Medizin einen Schwerpunkt dar. Insbesondere bei der Behandlung von Defekten des kraniofazialen Skeletts gilt es, neben der anatomischen Wiederherstellung auch den Ansprüchen bezüglich Funktion und Ästhetik Genüge zu tun. Es existiert eine Vielzahl von therapeutischen Strategien, um eine adäquate Knochenrekonstruktion zu erreichen. Diese entspricht jedoch häufig nicht einer vollständigen biologischen Geweberegeneration im Sinne einer restitutio ad integrum, sondern meist nur einer Reparatation. Die derzeit angewandten Methoden zur Restauration größerer Defekte beinhalten die Implantation eines Ersatzmaterials zur Rekonstruktion des fehlenden Knochengewebes.

### **1. 1 Klinische Rekonstruktion knöcherner Defekte**

Als Ersatzmaterial kann ein Eigentransplantat des Patienten aus einer anderen Skelettregion herangezogen werden, ein sogenannter „autologer“ Knochenersatz. Nach wie vor wird dieses Vorgehen aufgrund der hohen mechanischen und immunologischen Kapazität des patienteneigenen Knochens, gepaart mit einer guten psychosozialen Akzeptanz favorisiert (Artico et al. 2003). Um Knochendefekte nach Unfällen, Tumoroperationen oder infolge von kongenitalen Fehlbildungen zu decken, gelten Transplantate von körpereigenem Knochen aktuell weiterhin als Goldstandard (Seitz 2008). Allerdings zieht die Verwendung eigenen Knochengewebes, die immer mit dem Schaffen eines zweiten Knochendefektes in der Spenderregion verbunden ist, die Risiken einer weiteren Operation nach sich und ist mit einer erhöhten postoperativen Morbidität behaftet (Warnke et al. 2004). Eine weitere Schwierigkeit dieses Verfahrens besteht in der limitierten Verfügbarkeit an eigenem Knochen, der als Spenderknochen geeignet ist. In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie kommen ab einer Defektgröße von etwa 5 cm neben Transplantaten aus dem Beckenkamm auch Fibulatransplantate, Scapula- oder Rippentransplantate zum Einsatz (Springer et al. 2004).

Als weiteres Material zur Rekonstruktion von kleineren Knochengewebdefekten steht vorbehandelter humaner Spenderknochen, der in der Literatur meist als „Allograft“ oder „alloplastisches Material“ geführt wird, zur Verfügung. Dieses Material wird ebenfalls schon

seit vielen Jahren insbesondere in der orthopädischen Chirurgie klinisch verwendet, stellt aber ein potenzielles immunologisches Risiko dar und eine Krankheitsübertragung in Form von Viren kann nicht völlig ausgeschlossen werden (Giannoudis et al. 2005). Neben der fraglichen psychischen Akzeptanz des einzelnen Patienten hat sich allogenes Knochenmaterial im Vergleich zu autologem Knochen als weniger effektiv erwiesen (Finkemeier 2002).

## **1.2 Tissue Engineering von Knochengewebe**

Infolge des hohen Bedarfs an geeignetem Material zur Knochenrekonstruktion begann die Suche nach anderen, nicht mit den dargestellten Nachteilen behafteten Knochenersatzmaterialien. Die wissenschaftliche Erforschung einer biologischen Gewebsregeneration wird unter dem interdisziplinären Begriff des „Tissue Engineering“ vereint, bei dem Aspekte aus Biologie, Medizin und Materialforschung zusammenfließen. Ein Spezialgebiet stellt darunter das „Bone Engineering“, die Züchtung neuen Knochengewebes, dar. Im Fokus des Interesses steht hierbei die Interaktion von Zellen, Wachstumsfaktoren und einer Matrix, die im Sinne einer Extrazellulärmatrix ein geeignetes Mikroklima erzeugt. Für die Synthese eines optimalen Gewebeersatzes besteht daher die Zielsetzung, die Nachteile einer Transplantatentnahme und einer potenziellen Immunreaktion oder Infektionsübertragung zu umgehen.

Die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche klinische Anwendung eines jeden Ersatzmaterials zur Defektrekonstruktion im Knochengewebe ist dessen Osseointegration, im Sinne einer echten knöchernen Verbindung zwischen Wirtsknochen und Transplantatmaterial (Constantino und Freidman 1994). Die Knochenbildung ist ein Resultat einer komplexen Kaskade von Ereignissen, bei der aus unreifen Vorläuferzellen schließlich Osteoblasten entstehen, die Extrazellulärmatrix bilden, welche durch Mineralisation zu Knochengewebe umgeformt wird. Für ein erfolgreiches Bone Engineering sind daher mehrere Faktoren entscheidend: eine Zelldifferenzierung hin zu Osteoblasten beziehungsweise die Verwendung geeigneter differenzierter Zellen, eine biologische Kontrolle des Knochenwachstums und der Differenzierung sowie adäquate Matrizen, die eine Zellmigration, Zelladhäsion und -proliferation unterstützen (Service 2000 und Reddi 2000).

### 1.3 Knochenersatzmaterialien

Die wissenschaftliche Arbeit der letzten Jahre hat zusätzlich zu autologen und allogenen Transplantaten eine Vielzahl von synthetischen Knochenersatzmaterialien hervorgebracht, dies sind hauptsächlich Hydroxylapatite, Calciumphosphate, Polymere, Komposite, bioaktive Gläser und Kollagene. Alle diese Biomaterialien, gleichgültig ob sie permanent oder biodegradierbar sind, sollen eine Knochenneubildung hervorrufen. Eine grundsätzliche Unterscheidung wird bezüglich des Ursprungs des neugebildeten Knochengewebes auf den Matrizen getroffen: Ein Material wird als „osteinduktiv“ bezeichnet, wenn es eine Stimulation mesenchymaler Stammzellen des Wirtsorganismus bewirkt und sich diese Zellen zu knochenproduzierenden Osteoblasten entwickeln. Dahingegen hat ein Material definitionsgemäß eine „osteokonduktiven Wirkung“, wenn es lediglich die Orientierung von Blutgefäßen hin zum Defektgebiet sowie eine Bildung von Havers-Systemen im Knochen erleichtert (Cypher et al. 1996) oder als Folge seiner Form und Oberflächenstruktur die Knochenformierung auf seiner Oberfläche begünstigt (Giannoudis et al. 2005). Ein Biomaterial, das nachgewiesenermaßen sowohl osteokonduktiv als auch osteinduktiv ist, ist autologer Knochen, wohingegen alle synthetischen Knochenersatzmaterialien lediglich osteokonduktive Kapazitäten aufweisen (Bishop und Einhorn 2007).

Bereits vielfach untersuchte Matrizen zur Kultivierung neuen Knochengewebes sind xenogenes bovines Hydroxylapatit (Bio-Oss®), synthetisch hergestelltes Hydroxylapatit und  $\beta$ -Tricalciumphosphat. Hydroxylapatit wird klinisch bereits in der orthopädischen Chirurgie und in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet. Es ist eines der vielversprechendsten Materialien für die Implantation im humanen Gewebe aufgrund seiner exzellenten Biokompatibilität und seiner Bioaktivität (Turhani et al. 2007). Allerdings hat sowohl synthetisches Hydroxylapatit als auch bovines Hydroxylapatit lediglich eine osteokonduktive Wirkung und keine osteoinduktive (Janssen et al. 2006).

Synthetisches Hydroxylapatit konnte zusammen mit rhBMP-2, im Rattenmodell subkutan implantiert, eine bessere Osteoinduktion hervorrufen als  $\beta$ -Tricalciumphosphat (Alam et al. 2001). Der bovine Hydroxylapatit-Träger Bio-Oss® wurde in vielen randomisierten Studien getestet und ist eines der am besten dokumentierten Biomaterialien. Bio-Oss® kann als ein etabliertes Knochenersatzmaterial angesehen werden, das auch klinisch bereits mit Erfolg zur Rekonstruktion großer Defekte eingesetzt wurde. Vorteilhaft ist an synthetischem



Hydroxylapatit und bovinem Hydroxylapatit, dass beide Materialien in Form von porösen Blöcken die Durchbauung mit neuem Knochengewebe erlauben und gleichzeitig eine stabile Leitschiene für die Knochenneubildung darstellen.

#### **1.4 Bone Morphogenetic Proteins**

Die eingangs beschriebenen Knochenersatzmaterialien besitzen keine osteoinduktive Potenz. Die Differenzierung von Stammzellen zu knochenbildenden Zellen muss durch andere Zusätze stimuliert werden. Bereits in den 1960er Jahren wurde im Zusammenhang mit der Implantation von demineralisierter Knochenmatrix in Nagern eine ektope, also eine Knochenbildung in nicht skelettalem Gewebe beobachtet (Urist 1965). Im Jahre 1988 wurden erstmals die verantwortlichen Proteine isoliert und als Bone morphogenetic proteins bezeichnet (Wozney et al. 1988 und Wang et al. 1988). Seitdem sind die Bone morphogenetic proteins, auch kurz „BMP“, und der Prozess der Osteoinduktion Gegenstand intensiver Forschung.

Die Bone morphogenetic proteins sind Teil der Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )-Superfamilie, zu der noch andere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zählen (Wozney 1989, Massague 1990). Derzeit sind fünfzehn Untertypen der BMPs identifiziert und charakterisiert worden. Gemeinsam ist allen BMPs der molekulare Aufbau des reifen Proteins aus Polypeptid-Dimeren, wobei das Molekül sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer aktiv ist (Wozney et al. 1988 und Celeste et al. 1990). Die Signaltransduktion erfolgt bei allen BMPs über zwei membranständige Serin/Threonin-Rezeptorkinasen, den Typ I- (mit A- und B-Untertypen) und den Typ II-Rezeptor. Beide Rezeptoren interagieren miteinander und über die anschließende Aktivierung intrazellulärer Proteine der Smad-Familie werden molekulare Transkriptionsfaktoren direkt reguliert (Graff et al. 1996 und Padgett et al. 1998). Bone morphogenetic proteins haben in *in vitro*-Studien eine Wirkung auf multipotente Zellen gezeigt, wobei insbesondere dem Differenzierungsgrad der Zellen eine entscheidende Bedeutung beigemessen wurde (Yamaguchi et al. 1996). Reife, von der Maus stammende Osteoblasten und Fibroblasten konnten im Zellkulturversuch durch eine Behandlung mit BMP-2 nicht angeregt werden, osteogene Parameter zu exprimieren (Katagiri et al. 1994), hingegen sprachen Myoblasten auf eine BMP-Gabe an, da diese Zellen noch in der Lage sind, den Entwicklungsweg hin zu osteogenen Zellen einzuschlagen (Bosch

et al. 2000 und Levy et al. 2001). Daher ist das Muskelgewebe für das Bone Engineering von besonderer Bedeutung. Bei intramuskulärer Anwendung wurde eine höhere Osteoinduktivität unter Einsatz geringerer BMP-Konzentrationen im Vergleich zur subkutanen BMP-Gabe beobachtet (Katagiri et al. 1997 und Yoshida et al. 1998). Auch hämatopoetischen Zellen wurden durch Bone morphogenetic proteins zur osteogenen Differenzierung stimuliert (Doherty et al. 1998). In *in vitro*-Experimenten mit murinen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass ein für das Blutgefäßwachstum verantwortlicher Faktor (Vascular endothelial growth factor- $\alpha$ ) die BMP-Wirkung verstärkt und gleichzeitig BMPs auch die Angiogenese fördern (Deckers et al. 2002 und Street et al. 2002). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben ergeben, dass BMPs keineswegs nur die Entwicklung des Knochengewebes beeinflussen, sondern als multipotente Differenzierungsfaktoren auch bei der Entstehung einer Vielzahl anderer Gewebe beteiligt sind (Groeneveld und Burger 2000).

Die Isolation von BMPs aus tierischem und humanem Knochen ist mit einem hohen Materialeinsatz für die Gewinnung einer ausreichenden BMP-Menge verbunden. Dies hat zur Entwicklung von Techniken geführt, mithilfe derer diese Proteine gentechnisch im Laborverfahren hergestellt werden können. Die Isolation von humaner DNA, die für BMPs codiert, hat es ermöglicht, diese Proteine in entsprechenden Vektoren zu klonen und in heterologen Systemen zu exprimieren, beispielsweise in Bakterien oder Viren. Auf diese Weise konnte rekombinantes humanes BMP in größeren Mengen produziert werden (Granjeiro et al. 2005), welches von einigen Autoren als wirksamer beschrieben wurde als das aus Knochenmaterial isolierte BMP.

### **1.5 Rekombinantes humanes BMP-2**

Rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2) ist ein besonders gut erforschtes, gentechnisch hergestelltes BMP. BMP-2 wurde 1988 erstmalig geklont (Wang et al. 1988) und BMP-2, insbesondere rhBMP-2 weist eine hohe osteoinduktive Wirkung auf (Wang et al. 1990 und Giannoudis et al. 2005). In einer vergleichenden Untersuchung der bekannten BMPs ordneten Cheng und Mitarbeiter 2004 in der Hierarchie der osteogenen Aktivität BMP-2 an höchster Stelle ein. Im Tiermodell fand rhBMP-2 vielfach erfolgreiche Anwendung

(Groeneveld und Burger 2000) und auch über den Einsatz am Menschen wurde positiv berichtet. Im Jahre 2002 wurde BMP-2 zur Applikation in der humanen Spinalchirurgie durch die FDA (Food and drug administration, USA) zugelassen. Seitdem wurden in mehreren Studien eine bessere Frakturheilung und eine reduzierte Infektionsrate bei Verwendung von rhBMP-2 in der orthopädischen Chirurgie von Tibiafrakturen und Wirbelsäulendeformationen erreicht (Axelrad und Einhorn 2009). Der Haupteffekt des rhBMP-2 besteht in der Osteoinduktion in vivo (Vehof et al. 2002), nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation entsteht aus Knorpelgewebe durch Mineralisations- und Umbauprozesse vitales Knochengewebe (Wang et al. 2000, Nakagawa et al. 2001). Eine heterotopische Knochenneubildung konnte im Rattenmodell auch im Weichgewebe induziert werden (Inoda et al. 2007). In klinischen Studien wurde eine Verbesserung des Reifungs- und Mineralisationsprozesses des neu gebildeten Knochens durch den Einsatz von rhBMP-2 gezeigt (Jung et al. 2003).

### **1.6 Intramuskuläre Endokultivierung heterotopen Knochens**

Ein weiterer Meilenstein des Bone Engineering stellt die Nutzung des Patientenorganismus als Bioreaktor für die Generierung eines Knochenersatzes dar. Diese Methode wurde zuerst im Tiermodell angewandt: 1997 wurde von Levine und Mitarbeitern im Kaninchenmodell nach Applikation von Hydroxylapatit und BMP in subperiostaler Lage eine Knochenneubildung beobachtet. Terheyden, Warnke und Mitarbeiter führten 2001 eine Mandibularekonstruktion bei Mischweinen mit zuvor in deren Musculus latissimus dorsi unter Einsatz von Bio-Oss®-Matrizen und BMP-7 herangezüchtetem vaskularisiertem Knochenersatz durch und etablierten so die Technik der intramuskulären Endokultivierung. Im Jahre 2004 gelang es Warnke und Mitarbeitern, bei einem Patienten einen Unterkieferdefekt nach Tumorchirurgie mit einem im Musculus latissimus dorsi des Patienten herangezüchteten dreidimensional individuell geformten vaskularisierten Defektersatz zu rekonstruieren. Dennoch stellt eine homogene Vaskularisierung des endokultivierten Knochens nach wie vor eine Herausforderung dar. Zudem ist der herangezüchtete Knochen hauptsächlich spongios und die dreidimensionale Form des verwendeten Bio-Oss®-Materials musste mittels eines Titangitters stabilisiert werden. Da

speziell bei Schädel-Rekonstruktionen komplexe Formen vorliegen, können keine vordefinierten Standardgeometrien verwendet werden.

Es stellt eine besondere Herausforderung dar, ein synthetisches Knochenersatzmaterial computergestützt individuell zu gestalten, das eine ausreichende Stabilität für die Rekonstruktion großer Knochendefekte aufweist. Untersuchungen von Seitz et al. beschäftigen sich momentan mit der auf Patientendaten basierenden Entwicklung von computerdesigntem Knochenersatzmaterial. Eine weitere Unwegbarkeit stellt die überschießende Knochenbildung außerhalb der Matrizen dar, eine ektopische Knochenformation, die häufig zu beobachten war (Linde & Hedner 1995).

### **1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

In den meisten publizierten Studien wurde BMP-2 während der Implantation der Matrizen simultan verabreicht. Jedoch befinden sich in der Matrize zu diesem Zeitpunkt keinerlei Weichgewebe und Blutgefäße und somit auch keine residenten mesenchymalen Stammzellen. Es wird postuliert, dass Knochenersatzmaterialien am Spenderort zusammen mit einer adäquaten Quelle von Osteoblastenvorläuferzellen inseriert werden müssen, um das volle osteogene Potenzial des BMPs auszuschöpfen (Bauer 2007). In einigen Untersuchungen wurde BMP, das bereits in resorbierbares Trägermaterial integriert war, implantiert (Ruhe et al. 2003; Saito et al. 2003 und Karageorgiou et al. 2006) und dadurch wurde eine konstante Abgabe des BMPs über einen längeren Zeitraum erreicht (Hollinger et al. 1998 und Issa et al. 2008). Bei Vorimplantation des Knochenersatzmaterials ist das Einwachsen von Weichgewebe und die Ausbildung einer Blutgefäßversorgung möglich, bevor in einem zweiten Eingriff BMP dazugegeben würde, so dass eine derart verzögerte BMP-Applikation auf ein günstigeres Mikroklima in der Matrize treffen könnte. Durch das Einwachsen von Weichgewebe könnten bereits mesenchymale Stammzellen vorhanden sein, die die BMP-Wirkung verstärken und die Osteoinduktion steigern und verbessern.

Das Ziel dieser Arbeit war es, im Rattenmodell die Knochenneubildung mittels intramuskulärer Endokultivierung bei simultaner rhBMP-2-Gabe mit derjenigen Knochenneubildung nach einer verzögerten rhBMP-2 Injektion zu vergleichen und durch Alteration der Verzögerungsintervalle den besten Zeitpunkt für eine Applikation von rhBMP-2 zu finden.

## **2. Material und Methode**

Die Versuche dieser Studie sind vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein gemäß § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.04.2006 genehmigt worden (Tierversuchserlaubnis V-742-72241.121-14 39-5/04).

Die vorliegende experimentelle Versuchsreihe beinhaltet einen Vorversuchsteil in Form einer Pilotstudie und einen Hauptversuchsteil.

### **2.1. Versuchsaufbau im Vorversuch**

Für den Vorversuch wurden 6 speziell gezüchtete Albinoratten des Lewis-Stammes verwendet. Alle Tiere waren weiblichen Geschlechts und zu Beginn des Versuchs ca. 3 Monate alt. Mithilfe von rekombinantem humanem bone morphogenetic Protein-2 (Produkt InductOs® der Firma Wyeth Europa Ltd., Maidenhead Berkshire, UK, enthält Diboterin  $\alpha$  in wässriger Lösung) und dem Hydroxylapatit-Träger Bio-Oss® (demineralisierte Rinderspongiosa, Fa. Geistlich Pharma AG, Wolhusen, CH) sollte die Osteoinduktion bei gleichzeitiger Implantation beider Materialien und bei verzögerter BMP-Gabe 4 Wochen nach der Implantation des Trägers verglichen werden. Auf diese Weise wurde in jedem Tier ein Modell geschaffen, in dem sowohl die simultane Applikation des BMP-2 als auch die um 4 Wochen verzögerte Zugabe des BMP-2 in einem Tier untersucht werden konnte und so unabhängig von interindividuellen Unterschieden in einem Organismus miteinander verglichen werden konnte.

In einem ersten Eingriff wurde den Tieren auf der linken Seite in einer Tasche oberhalb des Musculus latissimus dorsi ein Bio-Oss®-Block implantiert. Nach einer Einheilphase von 4 Wochen wurde in einer zweiten Operation ebenfalls auf der rechten Seite supramuskulär ein Bio-Oss®-Block eingesetzt und auf die Blöcke beider Seiten intraoperativ rhBMP-2 aufgebracht.

### **2.2 Versuchsaufbau im Hauptversuch**

Der Hauptversuch lief grundsätzlich wie der Vorversuch ab, allerdings kamen anstelle der Bio-Oss®-Blöcke jetzt speziell hergestellte synthetische Hydroxylapatit-Blöcke zusammen mit rhBMP-2 der Firma Wyeth Europa Ltd. (Münster, D) für die Endokultivierung neuen

Knochengewebes zum Einsatz. Insgesamt 24 weibliche Albinoratten des Lewis-Stammes wurden in drei Versuchsgruppen zu je 8 Tieren eingeteilt. Zunächst wurde in einem operativen Eingriff allen Tieren auf der linken Seite auf dem Musculus latissimus dorsi ein Hydroxylapatit-Block eingepflanzt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde nach 4 Wochen Verzögerung im Anschluss an die erste Operation auf der Gegenseite der Block implantiert und beidseits rhBMP-2 verabreicht. Bei Gruppe 2 wurde ein Zeitintervall von zwei Wochen gewählt, nach dem der zweite Block implantiert und rhBMP-2 gegeben wurde, für Gruppe 3 wurde das Zeitintervall auf eine Woche Verzögerung festgelegt.

### **2.3 Tierhaltung**

Nach dem ersten chirurgischen Eingriff wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen mit durchsichtiger Unterschale vom Typ PC 3108 der Größe 40 x 23 x 22 cm in einem getrennten Raum bei 24°C und künstlicher Beleuchtung untergebracht. Sie erhielten über den gesamten Versuchszeitraum täglich frisches Streu und Frischwasser sowie Standardtiernahrung ad libitum (ssniff®-Trockenfutter, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D).

### **2.4 Narkose**

Alle chirurgischen Eingriffe und die computertomographischen Untersuchungen fanden in Narkose statt. Dazu wurde gewichtsadaptiert 1 µl Ketamin pro Gramm Körpergewicht und 0,6 µl Xylazin pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Durch diese kombinierte Injektion wurde eine etwa 45 minütige Analgesie und Sedierung der Tiere erreicht. Die verwendeten Präparate waren Ketanest® S (10 %), Pfizer Pharma GmbH Berlin, D, mit dem Wirkstoff Ketaminhydrochlorid und Rompun® (2 %), Bayer Vital GmbH Leverkusen, D, das den Wirkstoff Xylazinhydrochlorid enthält. Die Versuchstiere wurden vor jeder Narkose gewogen und die nötige Dosis an Ketamin und Xylazin wurde individuell gewichtsabhängig bestimmt. Ob eine ausreichende Narkosetiefe bestand, wurde anhand des Verschwindens von Abwehrreflexen und des Lidschlußreflexes überprüft. Unter der Narkose wurden die Augen der Tiere fortwährend mit NaCl-Lösung oder Bepanthen®-Augensalbe (Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D) benetzt und die Körpertemperatur mit Wärmflaschen stabilisiert. Eine Überwachung der Tiere bis zum Ende der Narkose war stets gewährleistet.

## **2. 5 Ablauf des Vorversuchs**

6 weibliche Albinoratten des Lewis-Stammes wurden operiert, die Tiere waren zu Beginn des Versuchszeitraumes etwa 3 Monate alt und das Körpergewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 200 g. Alle Tiere befanden sich zu Beginn des Versuches in einem guten körperlichen Zustand.

### **2.5.1 Erster operativer Eingriff:**

#### **Einseitige Implantation eines Bio-Oss®-Blocks ohne Zugabe von rhBMP-2**

Der operative Zugang zum linken Musculus latissimus dorsi erfolgte über eine paramediane Inzision links der Brustwirbelsäule mit einem sterilen Einmalskalpell. Zur Aufnahme des Bio-Oss®-Blocks wurde mit Kontakt zum Musculus latissimus dorsi eine Tasche präpariert. Die 2 x 1 x 1 cm großen Blöcke waren zuvor mit steriler NaCl-Lösung gespült worden und wurden mit einer Pinzette in die präfabrizierten Muskeltaschen eingelegt. Anschließend wurden die Taschenränder spannungsfrei adaptiert und mit resorbierbarer Naht der Stärke 4-0 und 3-0 wurde die Inzisionswunde mittels einer Rückstichnaht und Einzelknopfnähten schichtweise verschlossen.

### **2.5.2 Zweiter operativer Eingriff:**

#### **Kontralaterale Implantation eines zweiten Bio-Oss®-Blocks und rhBMP-2-Applikation beidseits**

Das Operationsfeld wurde mittels Rasur freigelegt und desinfiziert. Über einen paramedianen Schnitt rechts der Brustwirbelsäule wurde der Zugang zum rechten Musculus latissimus dorsi gewählt und es wurde in gleicher Weise wie zuvor eine intramuskuläre Tasche präpariert. Bevor die Bio-Oss®-Blöcke implantiert wurden, wurden sie mit steriler NaCl-Lösung gespült. Auf der linken Seite wurde der bereits vier Wochen zuvor implantierte Block aufgesucht und ein Zugang zum Aufträufeln des rhBMP-2 präpariert. Das rhBMP-2-Präparat war bis zum Einsatz gekühlt gelagert worden und je Block wurden 100 µg rhBMP-2 (Produkt InductOs® der Firma Wyeth Europa Ltd., Maidenhead Berkshire, UK) verabreicht. Die Wundränder wurden mit resorbierbarer Naht der Stärke 4-0 und 3-0 wie im ersten Eingriff adaptiert und verschlossen.

### **2.5.3 Computertomographie**

Direkt im Anschluss an den zweiten operativen Eingriff erfolgte in Narkose (siehe Kapitel 2.3 Narkose) eine computertomographische Untersuchung der Implantatregion ohne Gabe von Kontrastmittel. Der Scan wurde mit einem Somatom®-Gerät der Siemens AG, Erlangen, D, durchgeführt unter Ausgabe von Einzelschichten der Schichtstärke 0,5 mm und einer dreidimensionalen Datenrekonstruktion. Die verwendeten Geräteeinstellungen waren: 210 mAs Stromstärke, 120 kV Spannung und 46,82 mGy applizierte Strahlendosis.

Weitere computertomographische Untersuchungen wurden immer mit den gleichen Einstellungen 2, 4 und 6 Wochen nach Implantation des rechten Bio-Oss®-Blocks vorgenommen. Eine letzte Untersuchung erfolgt direkt nach der Tötung der Tiere 8 Wochen nach Implantation des zweiten Blocks.

Die Bestimmung der Knochendichte im Bereich der Implantate wurde geblindet vorgenommen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die Dichtemessung wurde anhand einer Volumenmessung mit dem Software Syngo® der Firma Siemens AG, Erlangen, D, durchgeführt, wobei als Auswertgrenzen 150 Hounsfield Units und 3000 Hounsfield Units festgelegt worden waren. Durch diese Limitation wurde sichergestellt, dass kein Weichgewebe für die Auswertung herangezogen wurde. Die Detektion der zu messenden Areale wurde schichtweise manuell vorgenommen und graphisch dargestellt. Das Volumen der markierten Bereiche wurde berechnet und dessen Dichte in Hounsfield Units bestimmt. Als Ausgangswert für die Dichte diente das jeweilig erste CT eines Blockes, mit dem die Dichteveränderungen durch Osteoinduktionsprozesse in den folgenden CT-Untersuchungen verglichen werden konnten.

### **2.5.4 Polychrome Sequenzmarkierung**

Zwei Wochen nach der zweiten Operation wurde mit der intraperitonealen Injektion von Fluorochromen begonnen, um den Zeitraum, in dem eine Knochenneubildung stattgefunden hat, näher bestimmen zu können. Vor der Verwendung wurden die Fluorochrome auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und steril filtriert. Bis zur Tötung der Tiere erfolgte wöchentlich die gewichtsadaptierte Gabe eines Fluoreszenzfarbstoffes:



2. Woche nach BMP-Gabe	Xylenol Orange (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(6% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 1,5 ml / kg Körpergewicht)
3. Woche nach BMP-Gabe	Calcein Grün (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(1% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 5 ml / kg Körpergewicht).
4. Woche nach BMP-Gabe	Alizarin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(3% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 0,8 ml / kg Körpergewicht)
5. Woche nach BMP-Gabe	Doxycyclin Ratiopharm SF® (Ratiopharm, Ulm, D)	(1mg/kg Körpergewicht)
6. Woche nach BMP-Gabe	Xylenol Orange (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(6% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 1,5 ml / kg Körpergewicht)
7. Woche nach BMP-Gabe	Calcein Grün (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(1% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 5 ml / kg Körpergewicht).

**Tabelle 1:** Fluorochrominjektion nach rhBMP-2-Gabe mit den jeweiligen gewichtsabhängigen Dosierungen

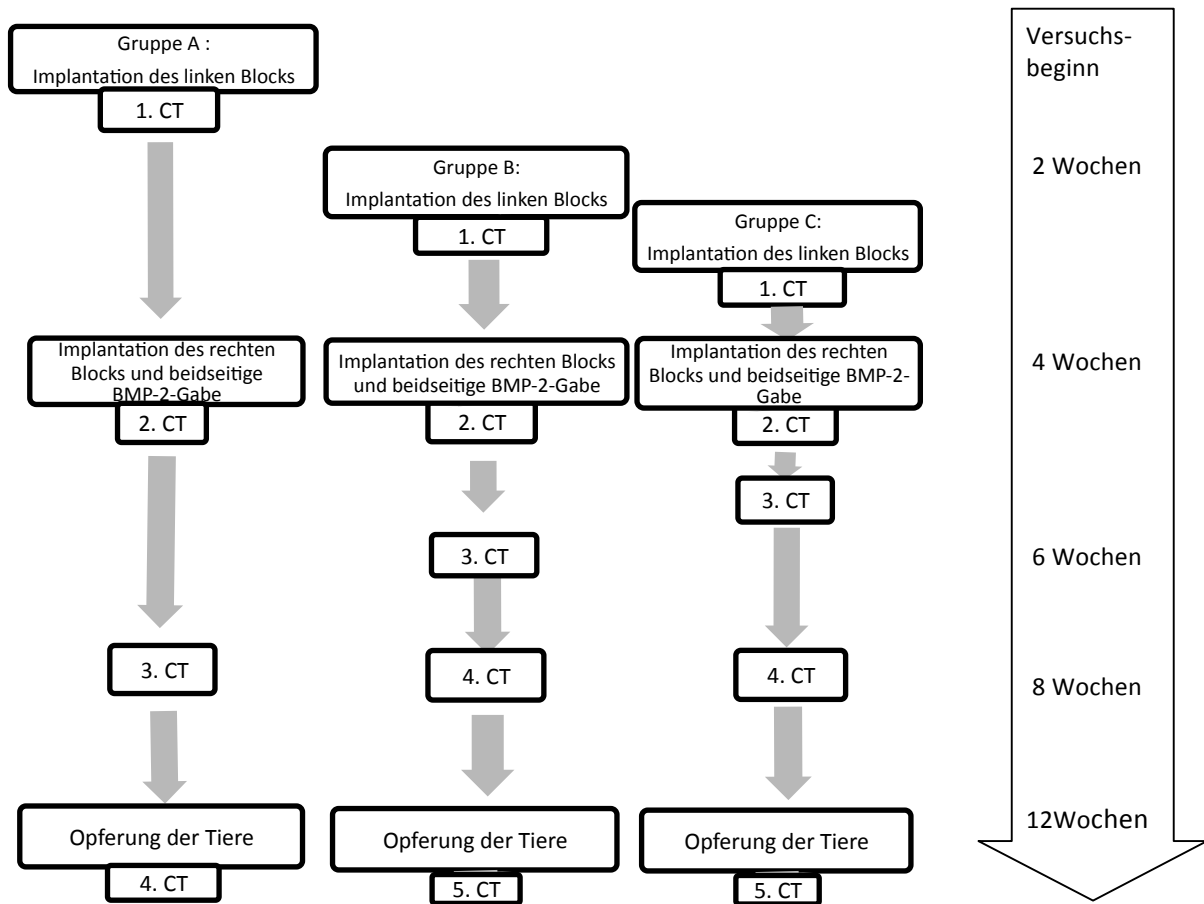
### 2.5.5 Tötung der Tiere und Entnahme der Proben

Nach einem Versuchszeitraum von insgesamt 12 Wochen wurden die Tiere 8 Wochen nach Implantation des zweiten Bio-Oss®-Blocks und Gabe von rhBMP-2 mit einer Überdosis Kohlendioxid-Gas getötet. Es erfolgte die computertomographische Untersuchung (siehe Kapitel 2.5.3 Computertomographie) der getöteten Tiere und im Anschluss daran die Entnahme der implantierten Blöcke mit ca. 0,5 cm umgebenden Gewebes. Die Proben wurden mit 4 %igem Formalin für 14 Tage fixiert. Die histologischen Präparate wurden in beiden Versuchsteilen auf die gleiche Weise hergestellt, das Verfahren wird im Folgenden genauer dargelegt.

### 2.5.6 Komplikationen im Vorversuch

Ein Tier verstarb unter der Narkose bei der zweiten Operation. Im Gebiet des rechten Implantats entwickelte sich bei zwei Ratten ein Serom, das sich jedoch bis zum Versuchsende weitestgehend zurückbildete. Bei zwei Tieren wurden Wundheilungsstörungen an den Inzisionswunden der rechten Implantate beobachtet, die in einer partiellen Implantatexposition resultierten (vergl. Abb.A ).

## 2.6 Ablauf des Hauptversuches



**Abbildung 1:** Schematischer Ablauf des Hauptversuchs in drei Gruppen

Mit dem Ziel, unterschiedliche Einheilungszeiträume bzw. Verzögerungsintervalle der BMP-Applikation miteinander zu vergleichen und einer simultanen Implantation der Matrize und des BMPs gegenüberzustellen, wurden im Hauptversuch mehrere Versuchsgruppen gebildet. Insgesamt 24 weibliche Albinoratten des Lewis-Stammes wurden mit einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von 200g und einem Alter von etwa 4 Monaten operiert. Die Versuchstiere wurden, wie in Abbildung 1 ersichtlich, in drei Gruppen von je 8 Tieren eingeteilt. Die Zeiträume, um die die BMP-Gabe nach der Implantation des Blockes verzögert wurde, wurden folgendermaßen gewählt:

Gruppe A: BMP-Gabe links 4 Wochen verzögert, rechts simultan

Gruppe B: BMP-Gabe links 2 Wochen verzögert, rechts simultan

Gruppe C: BMP-Gabe links 1 Woche verzögert, rechts simultan

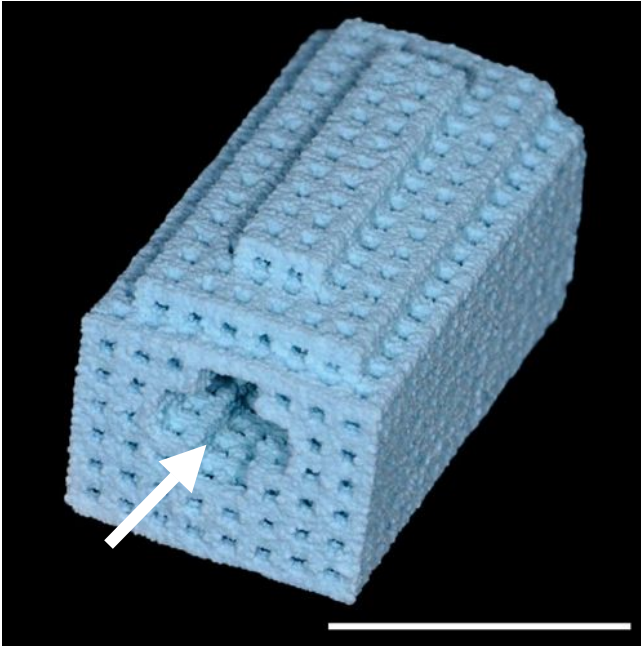
### 2.6.1 Material im Hauptversuch

Als Wachstums- und Differenzierungsfaktor kam wie bereits im Vorversuch rhBMP-2, Produkt InductOs® der Firma Wyeth Europa Ltd., Maidenhead Berkshire, UK, zum Einsatz.

Anders als im Vorversuch wurde in dieser Versuchsreihe jedoch ein synthetischer Hydroxylapatit-Träger implantiert, dessen Herstellungsverfahren kurz erläutert wird. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Fluidtechnik und Mikrofluidtechnik der Universität Rostock wurden in einem dreidimensionalen Druckverfahren aus synthetischem Hydroxylapatit-Granulat HA SP 19 (Friedrich-Baur-Institut, Bayreuth, D) als Basis und einer Polymerlösung als Bindemittel direkt aus Computerdaten maßgeschneiderte Modelle hergestellt. Dazu wurden dünne Schichten des Hydroxylapatit-Pulvers auf eine Grundplatte aufgebracht, die dann durch gezielte Binderzugabe entsprechend des gewünschten Bauteils verdichtet wurden. Die von uns verwendeten Blöcke bestanden aus gebundenem Hydroxylapatit-Pulver, das ungebundene Pulver übernahm eine Stützfunktion und wurde nach Ende des Herstellungsprozesses entfernt. Wie beim etablierten 3-D-Druckverfahren zur Herstellung keramischer Implantate resultierte aus dem Verfahren ein Grünkörper, der in einem weiteren Vorgang bei einer Temperatur von 1250°C gesintert wurde. Dadurch wurde eine hohe Endfestigkeit erreicht und die eingesetzten organischen Bestandteile des Bindemittels wurden vollständig ausgebrannt. Das Verfahren des dreidimensionalen Druckens von individuellem Knochenersatzmaterial wurde von Seitz im Jahre 2008 erprobt und beschrieben.

Die geometrischen Besonderheiten des auf diese Weise hergestellten Hydroxylapatit-Körpers waren der gestufte Aufbau einer Längsfläche und ein Kanal im Zentrum, der längs den gesamten Block durchzog und einen Querschnitt in Form eines Kreuzes mit vier Ausläufern im Verlauf der Ebenen des Blocks besaß. Neben diesem Zentralkanal besaßen die Matrizen im gesamten Volumen interkonnektierende Porositäten mit einem Durchmesser von 500 µm (vergleiche Abb.2) Die Außenabmessungen des Blocks betragen an den größten Stellen 2 x 1 x 1 cm.

Die zur Hauptinzision hin orientierte Seite des Blockes wurde soweit möglich abgerundet hergestellt, um mögliche Spannungen der Haut über den Blockkanten zu minimieren.



**Abbildung 2:** Im 3-D-Druckverfahren hergestellter Hydroxylapatit-Block. Der weiße Balken markiert eine Strecke von 1 cm. Mittig ist der Zentralkanal zu erkennen (Pfeil).

### **2.6.2 Erster operativer Eingriff: Implantation eines Hydroxylapatit-Blocks zur Weichgewebsintegration ohne rhBMP-2**

Es wurden jeweils 8 Tiere an einem Tag operiert. Begonnen wurde mit den Tieren der Gruppe A, zwei Wochen später wurden die Tiere der Gruppe B operiert und drei Wochen nach dem ersten Eingriff wurde die Implantation des ersten Blockes bei den Tieren der Gruppe C vorgenommen (vergl. Abb. 1). Die Vorbereitung der Tiere erfolgte bereits unter Narkose (siehe Kapitel 2.3 Narkose) durch Rasur des Operationsfeldes und Hautdesinfektion. Der operative Zugang zum linken Musculus latissimus dorsi wurde über eine mediane Inzision auf Höhe der Brustwirbelsäule gewählt. Zur Aufnahme des Hydroxylapatit-Blocks wurde in Kontakt zur Muskulatur eine Tasche präpariert. Die Blöcke waren zuvor sterilisiert worden und wurden mit einer Pinzette auf der linken Seite in die Muskeltasche eingebracht. Anschließend wurden die Wundränder spannungsfrei adaptiert und die Inzisionswunde mit resorbierbarer Naht der Stärke 4-0 und 3-0 schichtweise verschlossen. Der Block wurde einer vierwöchigen Integrationszeit überlassen, um das Einwachsen von Weichgewebe und Gefäßen zu erlauben.

### **2.6.3 Zweiter operativer Eingriff vier Wochen später: Implantation des zweiten Hydroxylapatit-Blocks und Applikation von rhBMP-2 beidseits**

Das Operationsfeld wurde erneut mittels Rasur freigelegt und desinfiziert. Über den bereits vorhandenen Hautschnitt wurde der Zugang zum rechten Musculus latissimus dorsi gewählt und es wurde in gleicher Weise wie zuvor eine intramuskuläre Tasche präpariert und ein steriler Hydroxylapatit-Block eingelegt. In den Zentralkanal wurde 200 µg rhBMP-2 (Produkt InductOs®) gelöst in 1 ml NaCl-Lösung langsam eingespritzt. Der präimplantierte linke Block wurde schonend aufgesucht, ohne dessen bindegewebige Ummantelung zu zerstören. Das rhBMP-2-Präparat wurde mit einer spitzen Kanüle und durch das Bindegewebe hindurch direkt in den Zentralkanal des Hydroxylapatit-Blocks injiziert. Je Implantat wurden 200 µg rhBMP-2 (Produkt InductOs®) gelöst in 1 ml NaCl-Lösung aufgebracht, pro Tier wurden daher 400 µg rhBMP-2 verabreicht. Die Wundränder wurden mit resorbierbarer Naht der Stärke 4-0 und 3-0 wie im ersten Eingriff adaptiert und verschlossen.

#### **2.6.4 Computertomographie**

Direkt im Anschluss an den ersten operativen Eingriff erfolgte unter Fortbestehen der Narkose (siehe Kapitel 2.4 Narkose) die erste computertomographische Untersuchung der Tiere ohne Gabe von Kontrastmittel. Der Scan wurde mit einem Somatom®-Gerät der Siemens AG Erlangen, D, durchgeführt unter Ausgabe von 0,5 mm dicken Einzelschichten und einer dreidimensionalen Datenrekonstruktion. Die verwendeten Geräteeinstellungen waren: 210 mAs Stromstärke bei 120 kV Spannung und 46,82 mGy applizierter Strahlungsmenge. Die weiteren computertomographische Untersuchungen wurden jeweils mit den gleichen Einstellungen vorgenommen. Zum Zeitpunkt der BMP-Injektion wurde noch unter Narkose die zweite Untersuchung durchgeführt. Dann wurden für die Folgeuntersuchungen in jeder Tiergruppe unterschiedliche Zeitpunkte gewählt, so dass beide Blöcke rechts und links nach dem gleichen Zeitintervall untersucht wurden und zusätzlich in allen Tiergruppen für den rechten Block der Untersuchungszeitraum von 4 Wochen eingehalten wurde. Die Einteilung in Versuchsgruppen war folgendermaßen:

**Gruppe A:** vier Wochen nach der zweiten Operation und zur Tötung der Tiere

**Gruppe B:** zwei Wochen nach der zweiten Operation, vier Wochen nach der zweiten Operation und zur Tötung der Tiere

**Gruppe C:** eine Woche nach der zweiten Operation, vier Wochen nach der zweiten Operation und zur Tötung

Die Knochendichtemessung im Bereich der Implantate wurde anhand einer Volumenmessung mit dem Software Syngo® der Siemens AG Erlangen, D, durchgeführt. Als untere Auswertgrenze wurde eine Dichte von 150 Hounsfield Units und als obere Grenze wurden 3000 Hounsfield Units festgelegt, um zu gewährleisten, dass nur Knochen und kein Weichgewebe für die Auswertung herangezogen wurden. Die auszumessenden Areale wurden schichtweise manuell graphisch detektiert und das Volumen der markierten Bereiche wurde berechnet und dessen Dichte in Hounsfield Units bestimmt. Als Ausgangswert für die Dichte diente das jeweilig erste CT eines Implantates, mit dem die durch Osteoinduktionsprozesse verursachten Dichteveränderungen in den folgenden CT-Untersuchungen verglichen werden konnten.

### 2.6.5 Polychrome Sequenzmarkierung

Eine Woche nach dem zweiten operativen Eingriff wurde mit der intraperitonealen Injektion von 4 verschiedenen Fluorochromen begonnen. Die Methode der polychromen Sequenzmarkierung von Knochengewebe wurde bereits beschrieben, siehe hierzu Kapitel 2.5.4. Bis zwei Wochen vor Opferung der Tiere erfolgte wöchentlich die gewichtsadaptierte Gabe eines Fluoreszenzfarbstoffes:

1 Woche nach BMP-Gabe	Xylenol Orange (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(6% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 1,5ml / kg Körpergewicht)
2 Wochen nach BMP-Gabe	Calcein Grün (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(1% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 5ml / kg Körpergewicht).
3 Wochen nach BMP-Gabe	Alizarin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(3% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 0,8ml / kg Körpergewicht)
4 Wochen nach BMP-Gabe	Doxycyclin Ratiopharm SF® (Ratiopharm, Ulm, D)	(1mg/kg Körpergewicht)
5 Wochen nach BMP-Gabe	Xylenol Orange (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(6% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 1,5ml / kg Körpergewicht)
6 Wochen nach BMP-Gabe	Calcein Grün (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)	(1% in 2% NaHCO <sub>3</sub> , 5ml / kg Körpergewicht).

**Tabelle 2** : Fluorochrominjektion nach rhBMP-2-Gabe im Hauptversuch

### 2.6.6 Tötung der Tiere und Entnahme der Proben

8 Wochen nach Implantation des zweiten Hydroxylapatit-Blocks und Gabe von rhBMP-2 wurden die Tiere nach der Euthanasie-Methode mit einer Überdosis Kohlendioxid-Gas in

einem abgeschlossenen Behälter getötet. Anschließend wurde die letzte computertomographische Untersuchung (siehe Kapitel 2.5.3 Computertomographie) der getöteten Tiere durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die implantierten Blöcke mit ringsum ca. 0,5cm des umgebenden Gewebes entnommen und mit 4%igem Formalin für 14 Tage fixiert. Da die Gruppen in unterschiedliche Zeitintervalle eingeteilt worden waren, erstreckte sich für die Tiere der Gruppe A der Versuchszeitraum auf 12 Wochen, für die Gruppe B auf 10 Wochen und für die Gruppe C auf 9 Wochen.

### **2.6.7 Komplikationen im Hauptversuch**

In jeder der Versuchsgruppen verstarben intraoperativ 2 Versuchstiere, so dass sich die Gesamtzahl der Tiere auf 18 reduzierte und die Gruppen zum Ende des Versuchszeitraums aus je 6 Tieren bestanden. Bei allen anderen Tieren verlief die Wundheilung komplikationslos und die Tiere waren in einem guten Allgemeinzustand.

## **2.7 Präparateherstellung**

Sowohl die Präparate der Proben aus dem Vorversuch als auch diejenigen aus dem Hauptversuch wurden auf gleiche Weise hergestellt. Als erstes wurden die Präparate mittels einer Tischbandsäge (Fa. Metabo, Bochum, D) quer geteilt, um sowohl unentkalkte Hartschliff-Präparate als auch entkalkte Paraffinpräparate herzustellen.

## **2.8 Herstellung der Hartschliff-Präparate:**

### **Histologische Präparate für Mikroradiographie, Fluoreszenzmikroskopie und Toluidinblau-Färbung**

Die Präparate wurden nach der Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe im PSI®-Einbettautomaten dehydriert (Fa. Pool of Science Instruments, Ltd. Basel, CH) und für eine Woche in Methylmethacrylat-Monomer eingebettet und schrittweise aufgefüllt. Die Polymerisation erfolgte bei 38°C im Wasserbad innerhalb von ca. 10 Tagen. Das Einbettmediums Metha-Mix setzt sich wie folgt zusammen: 2,5 ml Methacrylsäuremethylester, 500 ml Nonylphenol polyethylenglycolacetat, 25 ml Dibutylphtalat, 15 g  $\alpha,\alpha$ -Azisobutyronitril.

Die Proben wurden anschließend zugesägt (Metallsäge, Fa. Metabo, Bochum, D) und auf mit Folie beschichtete Plastikobjektträger aufgeklebt (Loctite 493, Fa. Loctite UK Ltd., UK). Mit der Exact-Säge (Fa. Exakt-Apparatebau, Norderstedt, D) wurden ca. 150 µm-200 µm dicke Schnitte hergestellt, die mit dem Mikroschleifsystem der Firma Exakt auf eine Dicke von 90 µm gebracht wurden. Die Hochglanzpolitur erfolgte mit Silikonkarbidpapier verschieden feiner Körnung auf dem Poliergerät Saphir 360E (Fa. ATA GmbH, D). Anschließend wurden von diesen Schnitten Mikroradiographien hergestellt (siehe Kapitel 2.8.1 Mikroradiographie). Die Präparate wurden samt Folienbeschichtung von den Plastikobjektträgern entfernt und mit der Folie auf die Mikroradiographie-Platten aufgeklebt, wobei das Präparat die Platte berührte. Nach der Mikroradiographie wurden die Folienträger erneut auf Plastikobjektträger aufgeklebt, dazu wurde transparenter lichthärtender Kleber verwendet (Technovit, Fa. Heraeus Kulzer, Hanau, D). Für die Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie) wurden die Präparate auf eine Stärke von 40 µm gebracht und hochglanzpoliert, dazu wurden ebenfalls das Mikroschleifsystem Exakt und das Poliergerät Saphir benutzt. Nach Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Toluidinblau-Färbung der Präparate (siehe Kapitel 2.8.3 Toluidinblau-Färbung).

### **2.8.1 Mikroradiographie**

Die auf Folienträgern befindlichen 90 µm dicken Schiffe wurden auf High Resolution HD-Platten (HTA Enterprises, San José, USA) mit einem Auflösungsvermögen von 2000 Linien pro mm spaltfrei adaptiert. Mit dem Mikroröntgengerät Cabinet-X-Ray-System der Faxitron Serie (Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, D) wurden die Präparate bei 3 mAs und 25 kV und einem Fokus-Film-Abstand von 16 cm 10 Minuten lang belichtet (1 min. für 10 µm Präparatestärke und 1 min. für den Folienträger). Die Fotoplatten wurden anschließend für 5 min. bei 20°C mit Periomat intra- Entwicklerflüssigkeit (Fa. Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, D) in einer Verdünnung von 1:4 entwickelt und 10 min mit dem Fixierer RA-3000 (Kodak Polychrom Graphics, USA) fixiert.

Um die Knochenneubildung anhand der Mikroradiographien quantifizieren zu können, wurden zunächst mithilfe des Mikrophot-FXA-Fotomikroskops (Fa. Nikon, Tokyo, J) bei zweifacher Vergrößerung (entspricht einer realen 6,25 fachen Vergrößerung) digitale Übersichtsaufnahmen angefertigt. Mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop® CS3



(Fa. Adobe, San Jose, USA) wurden die Einzelaufnahmen zu Bildkollagen zusammengefügt, so dass das gesamte Präparat in einer Übersicht dargestellt war. Um eine Aussage über die Menge an neugebildetem Knochen treffen zu können, wurden die Kollagen mit dem Bildanalyse-Programm Leica Q Win® (Leica Microsystems, Wetzlar, D) graphisch analysiert. Der Größenmaßstab der Kollagen wurde durch Formatieren übernommen und diente als Berechnungsgrundlage für die gesamte Fläche, die das knochendichte Material einnahm. Anschließend konnten unterschiedliche Graustufen detektiert werden und durch die Selektion dunklerer Areale wurde der neugebildete Knochen im Präparat markiert. So konnte die Fläche, die der neue Knochen einnahm, absolut und prozentual als Anteil am Gesamtknochen berechnet werden. Zusätzlich wurde der Messrahmen so gesetzt, dass es möglich war, eine gegebenenfalls vorhandene ektope Knochenneubildung gesondert zu vermessen. Die Resultate der Flächenanalyse wurden auf statistische Signifikanz mit einer ANOVA-Analyse geprüft.

### **2.8.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Nach der Mikroradiographie wurden die Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie neu aufgeklebt und auf 40 µm Dicke geschliffen (siehe Kapitel 2.8 Herstellung der Hartschliff-Präparate). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde unter dem Licht einer Quecksilberdampfampe mit dem Mikrophot FXA-Mikroskop vorgenommen. Es wurden sowohl Detailaufnahmen in verschiedenen Vergrößerungsstufen (4-fach, 10-fach, 20-fach), als auch Einzelaufnahmen zur Erstellung einer Bildkollage in 2-facher Vergrößerung angefertigt. Analog zur Herstellung der Mikroradiografie-Kollagen wurden die Einzelbilder mit der Software Adobe Photoshop® zu Kollagen zusammengefügt.

### **2.8.3 Toluidinblau-Färbung**

Die Präparate wurden nach der Fluoreszenzmikroskopie mit Toluidinblau histologisch gefärbt. Die oberflächliche Schicht der Hartschliff-Präparate wurde dazu mit 0,1 %iger Ameisensäure für 4 min entkalkt, wodurch die Anfärbbarkeit der Knochenmatrix verbessert wurde. Die folgende einstündige Behandlung mit 20 %igem Methanol diente dazu, die Zell- und Weichgewebsanfärbung zu optimieren. Dann erfolgte die eigentliche Färbung mit filtrierter Toluidinblau-Lösung (enthält 1 mg Toluidinblau O und 1 mg Natriumtetraborat, gelöst in 100ml destilliertem Wasser) für 5 Minuten. Die gefärbten Schiffe wurden mit HCL-

Alkohol unter lichtmikroskopischer Kontrolle differenziert und mit Eukitt® (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und einem Deckgläschen eingedeckelt. Unter Zuhilfenahme des Mikrophot FXA®- Mikroskops wurden digitale Fotografien der histologischen Präparate in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt, wobei darauf geachtet wurde, dass im Präparat die gleichen Ausschnitte wie bereits für die Fluoreszenz und die Mikroradiographie fotografiert wurden.

## **2.9 Herstellung der Paraffin-Präparate:**

### **Schnittserien für die Goldner-Masson-Färbung, die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Immunhistochemie**

Mit dem Ziel, dünnere entkalkte Schnitte der Proben für eine weiterführende histologische Untersuchung anzufertigen, wurde die zweite Hälfte der entnommenen Probe in Paraffin eingebettet (vergl. Abb. 3). Die Proben wurden als erstes für 6 Wochen im Ultraschall-Schnell-Entkalkungsautomat USE 33 (Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) mit 12,5 %iger Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA, pH 7,4) entkalkt, um sie für die Semidünnschnitt-Herstellung zu konditionieren. Im Einbettautomat (Tissue Processor TPC 15, Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) erfolgt die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe, das darauffolgende Ausgießen mit Paraffin wurde mithilfe der Ausgießstation TES 99 (Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) durchgeführt. Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Präparate am Microtom (Microm International GmbH, D) in 5-8 µm dicke Schnitte zerteilt und im Wasserbad gestreckt. Die fertigen Schnitte wurden auf Glasobjektträgern fixiert und im Brutschrank bei 50°C getrocknet. Von den Schnittserien wurden in der Folge Goldner-Masson-Färbungen, Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und ein Antikörpernachweis auf CD-31-Oberflächenmoleküle hergestellt.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der gefärbten Präparate wurde mit dem Mikrophot FXA®-Mikroskop durchgeführt, wobei sowohl stark vergrößerte Einzelausschnitte repräsentativer Bereiche als auch Einzelbilder einzelner aussagekräftiger Präparate für Kollagen digital fotografiert wurden. Zur Bildbearbeitung und Erstellung der Kollagen wurde das Adobe Photoshop®CS3- Programm verwendet.

### **2.9.1 Trichromfärbung nach Masson-Goldner**

Nach Lagerung der Paraffinschnitte in 70%igem Ethanol wurden sie 5 min lang mit Weigert´s Eisenhämatoxylin behandelt und danach kurz mit HCL-Alkohol differenziert. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Zellkerne angefärbt und im Anschluss wurden die Präparate für 7 min Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin ausgesetzt. Als nächstes wurden die Präparate in Phosphormolybdänsäure-Orange G (7 min) und Lichtgrün (6 min) inkubiert, wobei die Paraffinschnitte zwischen allen Farbbädern mit essigsaurem destilliertem Wasser gespült wurden. Die fertigen Präparate wurden mit 100 %igem Ethanol entwässert und mit Mountex® (Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) und einem Deckgläschen luftdicht eingeschlossen.

### **2.9.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Eine Serie der Paraffinschnitte wurde mit Xylol für dreimal 10 min. entparaffiniert und 5 min in 100%igem Ethanol eingelegt. Die Präparate wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (von 100 %igem Ethanol bis 50 %igem Ethanol) rehydriert. Für 3 min wurden die vorbehandelten Präparate mit Hämalan nach Mayer (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, D) gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser 10 min gespült. Als zweite Farbkomponente wurde Eosin G (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, D) in 1 %iger Lösung für 30 sec zur Plasmafärbung verwendet. Die Paraffinschnitte wurden nach Beendigung des Färbvorgangs kurz in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Mountex® (Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) und einem Deckgläschen eingedeckelt.

### **2.9.3 Immunhistochemie mit Antikörper gegen PECAM- 1**

Für die immunhistochemische Nachweisreaktion wurde eine Serie an Paraffinschnitten in Xylol entparaffiniert (dreimal 10 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Vorbehandlung wurden die Präparate in TEC-Puffer im Dampfdrucktopf erhitzt und nach dem Abkühlen mit Ethanol in aufsteigender Konzentration dehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte für 15 min in 2 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung eingelegt und wieder in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Die rehydrierten Präparate wurden nun für 20 min mit dem Waschpuffer PBS mit darin enthaltenem Donkey-Normal-Serum (4%) behandelt und im Anschluss eine Stunde in Primär-Antikörper (PECAM-1 [m-20], Ziegen-IgG, 20 µl/ml, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) inkubiert. Nachdem die Präparate in PBS-Puffer gewaschen

worden waren, wurden sie dem Sekundärantikörper ausgesetzt (Affen-IgG-B maus-/menschens-adsorbiert, Biotin konjugiert 5 µl/ml, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Es folgte eine weitere Waschung der Präparate und eine halbstündige Behandlung der Präparate mit ABC-Elite-Lösung und daraufhin wurde eine erneute Waschung durchgeführt. Abschließend wurde DAB-Substrat (Diaminobenzidinetetrahydrochlorid) mit 12 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min zugesetzt und die Zellkerne ebenfalls 5 min mit Hämalaun nach Mayer (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, D; Verdünnung 1:4) angefärbt. Die Präparate wurden 10 min in Leitungswasser gespült, um die Zellkerne zu bläuen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe kurz dehydriert, bevor sie mit Mountex® (Fa. medite Medizintechnik, Burgdorf, D) und Deckgläschen dicht versiegelt wurden. Zusätzlich zu den beschriebenen in Antikörper inkubierten Präparaten wurden auch Negativkontrollen hergestellt. Von der lichtmikroskopischen Ansicht beider Präparateserien wurden Detailvergrößerungen und Einzelbilder für Kollagen nach dem zuvor erläuterten Verfahren fotografiert und miteinander verglichen.

## **2.10 Statistische Auswertung der computertomographisch ermittelten Werte**

Die Knochendichte im Bereich der Hydroxylapatit-Matrizen wurde mit der Software JMP® (Fa. SAS, USA) unter Verwendung der ANOVA-Methode statistisch analysiert. Folgende Parameter wurden berücksichtigt:

- seit Implantation vergangene Zeit (in Wochen)
- seit BMP-Gabe vergangene Zeit (in Wochen)
- Tiergruppe (simultane BMP-Gabe oder verzögerte BMP-Gabe)
- die Kombination beider Parameter.

Ein Zufallseffekt wurde sowohl für jedes Tier als auch für die Kombination aus Tier und Zeit nach Implantation berücksichtigt. Als Referenzgröße wurde der Mittelwert aller 84 Messungen bestimmt. Um eine Abhängigkeit der einzelnen Variablen voneinander zu untersuchen, wurde in einer Regressionsanalyse mithilfe der Least Squared Means-Methode die wahrscheinliche Funktion, die diese Abhängigkeit beschreibt, berechnet. Dazu wurden die Mittelwerte durch Errechnen der kleinsten Abstandsquadrate ermittelt. Die geringsten Standardabweichungen wurden kalkuliert und für die zu erwartenden Schätzwerte wurde die korrespondierende Standardabweichung berechnet. Da man von einem normalverteilten Standardfehler in der Berechnung der Mittelwerte ausgeht, wurde das 95 %-

Konfidenzintervall für diese Schätzwerte berechnet. Dies ist dasjenige durch Stichproben-Berechnungen kalkulierte Intervall, in dem mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit der erwartete Mittelwert zu finden ist. Zusätzlich wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  bestimmt, das eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit gibt, mit der der ermittelte Zusammenhang mit dem tatsächlichen Zusammenhang übereinstimmt. Je näher der  $R^2$ - Wert an 1.0 herankommt, umso höher ist die Qualität der statistischen Analyse. Um eine Aussage über die statistische Signifikanz zu treffen, wurde der P-Wert errechnet, der die Fehlerwahrscheinlichkeit einer statistischen Analyse angibt.

### **3. Ergebnisse**

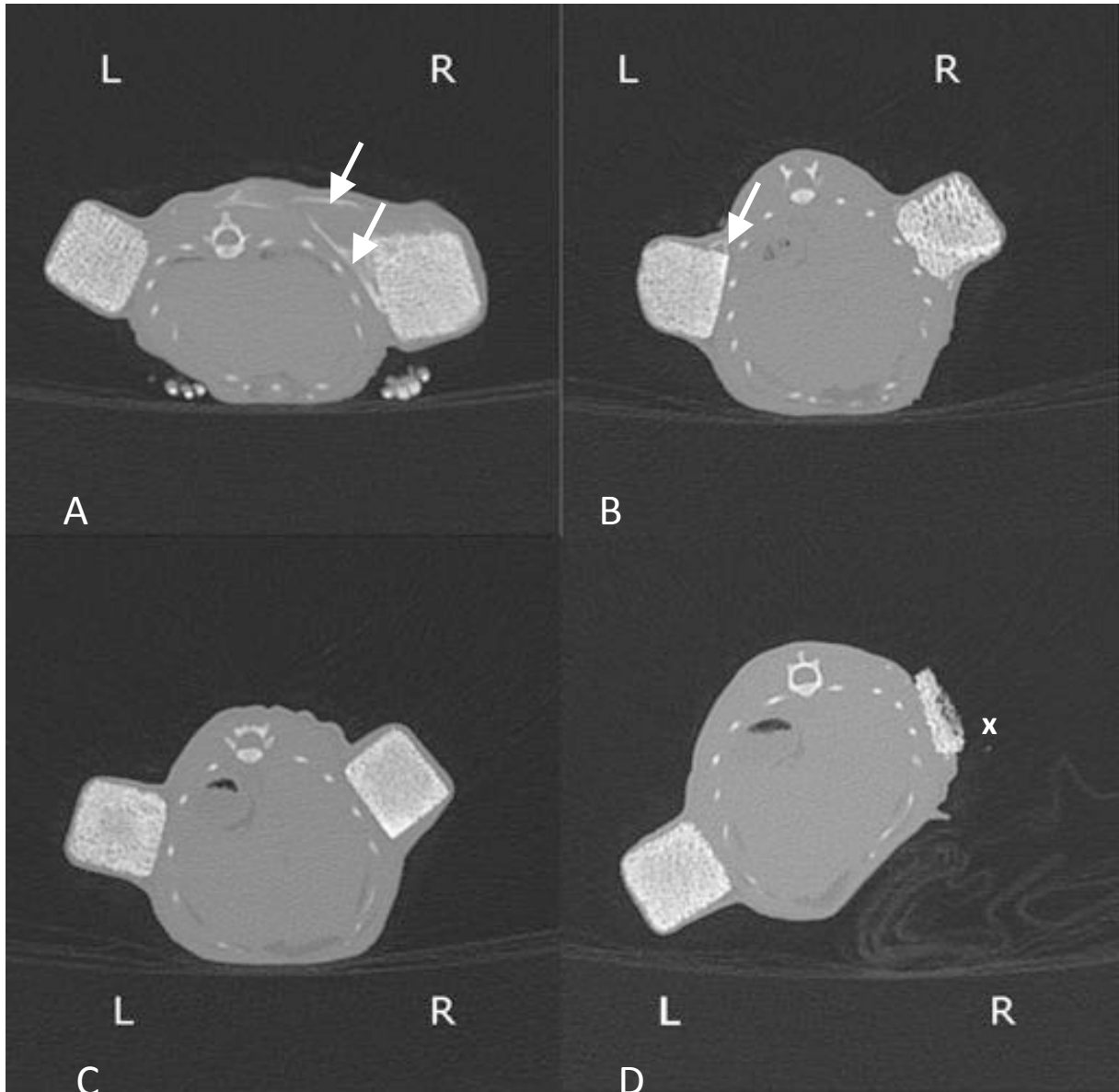
#### **3.1 Ergebnisse des Vorversuchs**

Die erste Versuchsreihe diente dazu, die Osteoinduktion bei einer verzögerte Gabe von BMP-2 unter Verwendung eines bewährten Knochenersatzmaterials wie Bio-Oss® als Matrize gegenüber der Osteoinduktion bei simultaner Applikation beider Materialien zu evaluieren. Als wichtigster Parameter wurde die Knochendichte mittels Computertomographie untersucht. Weitere Daten über den zeitlichen Ablauf des Osteoinduktionsprozesses ließen sich aus der polychromen Sequenzmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen gewinnen, die sich bei der Osteogenese in den Knochen einlagern. Die quantitative Auswertung der Knochenneubildung erfolgte mittels graphischer Analyse der Mikroradiographien. Zusätzlich angefertigte histologische Präparate verschiedener Färbungen ließen eine detaillierte lichtmikroskopische Untersuchung der Implantate zu und konnten über die Struktur des neugebildeten Knochens in den Präparaten Auskunft geben. Die Paraffinpräparate lieferten Anhaltspunkte für die Angiogenese und Weichgewebisdurchbauung in den Bio-Oss®-Matrizen. Im Folgenden werden die Resultate der jeweiligen Untersuchungsmethode genauer dargelegt.

##### **3.1.1 Resultate der computertomographischen Untersuchungen**

Exemplarisch sind Bilder der computertomographischen Untersuchung in Abbildung 3 dargestellt. Alle Implantate lagen innerhalb ihrer Tasche dem Musculus latissimus dorsi auf und hatten somit radiographisch keinen Kontakt zum Skelett der Ratte. Bei zwei Tieren war es im Versuchszeitraum zu einer teilweisen perkutanen Freilegung der Bio-Oss®-Blöcke gekommen, begleitet von einem auch klinisch sichtbaren Materialverlust, der im Verlauf zunahm. Aufgrund des Volumenverlustes war es in einem Fall nicht möglich, von diesem Implantat eine ausreichend große Probe zu gewinnen, um zusätzlich zur PMMA-Einbettung eine Paraffin-Einbettung durchzuführen. Eine ektope Knochenneubildung war in der Region der präparierten Muskeltasche bei zwei Tieren anhand der CT-Bilder erkennbar. Im ersten Fall zeigte sich eine überschießende ektope Knochenneubildung ausgehend vom rechten Implantat (simultane Bio-Oss®-Implantation und rhBMP-2-Gabe) und im zweiten Fall war eine deutlich schwächere ektope Knochenneubildung im Bereich des linken Implantats (um

vier Wochen verzögerte rhBMP-2-Gabe) erkennbar (siehe hierzu auch Abb. 3). Es zeigte sich bei zwei Tieren in den ersten 4 Wochen ein flüssigkeitsgefüllter Raum um die Implantate herum, auch klinisch war eine Schwellung zu beobachten. Zum Zeitpunkt der vierten Untersuchung war klinisch und radiologisch keine Schwellung mehr aufgefallen.



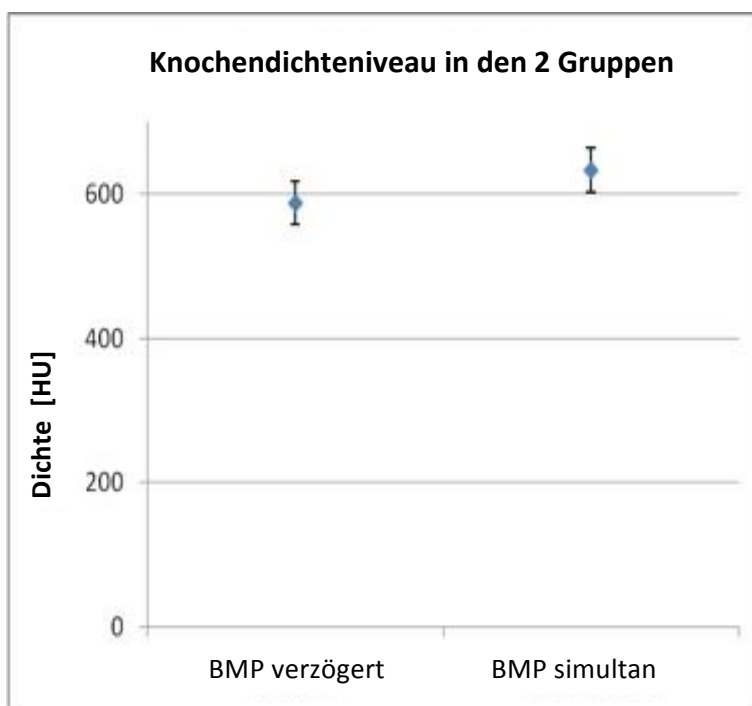
**Abbildung 3:** CT, coronare Schnittbilder der Abschlussuntersuchung der Tiere 8 Wochen nach BMP-Gabe. Ektope Knochenneubildungen sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet, der Materialverlust durch Implantatfreilegung ist mit X markiert. Bemerkenswert ist die starke ektope Verknöcherung im Bereich der intramuskulären Tasche im Bildausschnitt A. Das Knochenersatzmaterial ist oberhalb des Musculus latissimus dorsi platziert und hat keinen Kontakt zum Skelett des Tieres. Somit handelt es sich um eine heterotope Knocheninduktion. L= linke Seite mit verzögerter rhBMP-2-Gabe, R= rechte Seite mit simultaner rhBMP-2-Gabe.

## Resultate der statistischen Auswertung

Der Mittelwert der Knochendichte aller 54 Messungen betrug 609 Hounsfield Units (HU). Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  betrug 0.69, so dass von einer relativ hohen Güte der durchgeführten linearen Regressionsanalyse auszugehen ist (siehe hierzu Kapitel 2.6.5 Statistische Analyse der Daten).

Um eine Aussage über die statistische Signifikanz zu treffen, wurde der P-Wert errechnet, der die Fehlerwahrscheinlichkeit der Analyse angibt. Der ermittelte P-Wert lag bei 0.01 und somit  $< 0.05$ , damit lag eine statistische Signifikanz der Ergebnisse vor.

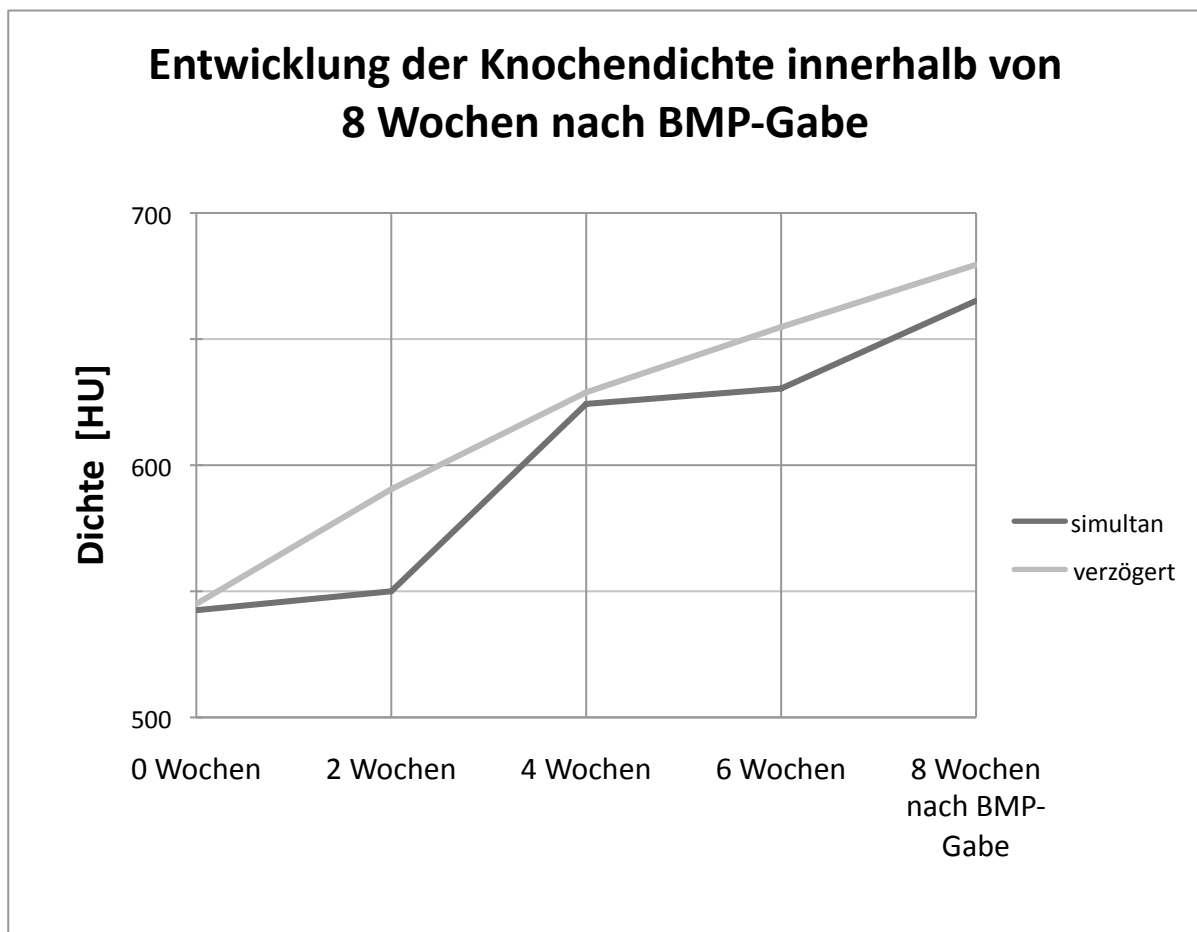
Die Unterschiede im Knochendichteniveau für die verzögerte und die simultane BMP-Applikation sind in Abbildung 5 dargestellt. Es wurden bei der verzögerten Gabe von BMP-2 signifikant geringere Knochendichten beobachtet. Die größten Unterschiede wurden jedoch für die Zeit nach BMP-2-Gabe beobachtet ( $p < 0.0001$ ), wohingegen die Kombination der Parameter Tiergruppe und Zeit nach BMP-Gabe keine signifikanten Differenzen hervorbrachte ( $p = 0.9$ ). Nach der BMP-Applikation war der mittlere Anstieg des Knochendichteniveaus in beiden Gruppen gleich groß. Für die simultane BMP-Applikation betrug der mittlere Dichtezuwachs in den 8 Wochen nach BMP-Gabe 122 HU und der mittlere Dichtezuwachs für die um 4 Wochen verzögerte BMP-Gabe lag bei 134 HU. Eine graphische Darstellung der Veränderungen der Knochendichte über den Untersuchungszeitraum ist in Abbildung 4 gezeigt.



**Abbildung 4** : Darstellung der unterschiedlichen Knochendichteniveaus in der verzögerten Applikation von BMP-2 und bei simultaner BMP-2-Gabe mit den korrespondierenden Standardabweichungen. Die verzögerte Applikation ergab statistisch signifikant geringere Werte ( $p < 0.0001$ ).



Die Kurven für die Knochendichteentwicklung über den Beobachtungszeitraum von 8 Wochen ab BMP-Gabe sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Bio-Oss®-Blöcke, die zum Zeitpunkt 0 der CT-Untersuchung bereits 4 Wochen in situ waren und die gerade erst implantierten Blöcke wiesen nahezu gleiche Ausgangswerte in ihrer Dichte auf. Die mittlere Knochendichte aller 5 linken Blöcke zum Zeitpunkt 0 betrug 545,5 HU und die aller rechten Blöcke 542,5 HU. Insgesamt verlief der Anstieg der Knochendichte bei verzögerter BMP-Gabe gleichmäßiger. Die Kurve für die simultane BMP-Gabe wies anfänglich eine größere Steigung auf, nach 4 Wochen stagnierte die Knochenneubildung und erst 6 Wochen nach BMP-Gabe erfolgte ein erneuter Dichtezuwachs. Nach 8 Wochen war der Gesamtwuchs in beiden Gruppen jedoch vergleichbar und die mittleren Dichtewerte lagen sowohl in der Kontrollgruppe (665,2 HU) als auch in der Testgruppe (679,5 HU) auf einem ähnlichen Niveau.



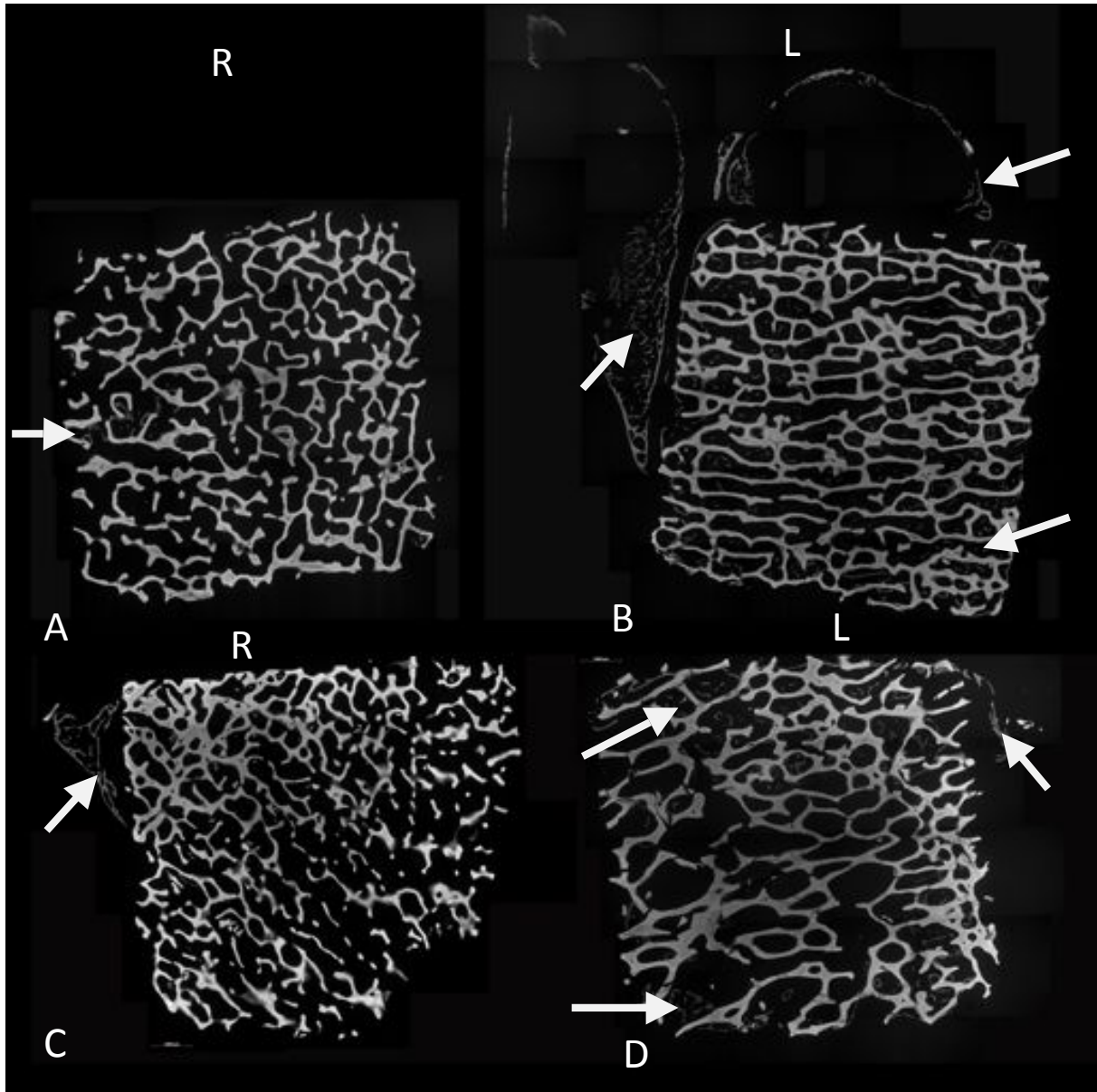
**Abbildung 5:** Graphische Darstellung der mittleren Knochendichteentwicklung über den Versuchszeitraum von 8 Wochen für die simultane BMP-Gabe und die um 4 Wochen verzögerte BMP-Gabe. Nach verzögerter rhBMP-2-Applikation steigt die Knochendichte insgesamt gleichmäßiger an als nach simultaner Applikation.

### 3. 1.2 Auswertung der Mikroradiographien:

In den Übersichtskollagen in Abbildung 6 ist zu erkennen, an welchen Stellen im Bio-Oss®-Block neuer Knochen gebildet worden ist, der sich hier aufgrund noch geringerer Mineralisation und dadurch geringerer Strahlenabsorption dunkler als das Hydroxylapatit darstellt. Zunächst soll die Auswertung der linken Präparate mit um vier Wochen verzögerter BMP-Gabe vorgestellt werden. In zwei Implantaten gab es keinen Hinweis auf eine Knochenneubildung, in den restlichen Präparaten wurde eine geringe Knochenbildung im Inneren des Knochenersatzmaterials vorgefunden. Ektope Knochenneubildung fand sich in zwei Fällen bei gleichzeitig kaum vorhandener Knochenneubildung innerhalb des Bio-Oss®-Blocks. Drei Präparate wiesen zahlreiche Bruchlinien im Knochenersatzmaterial sowie kleinere Bruchstücke auf.

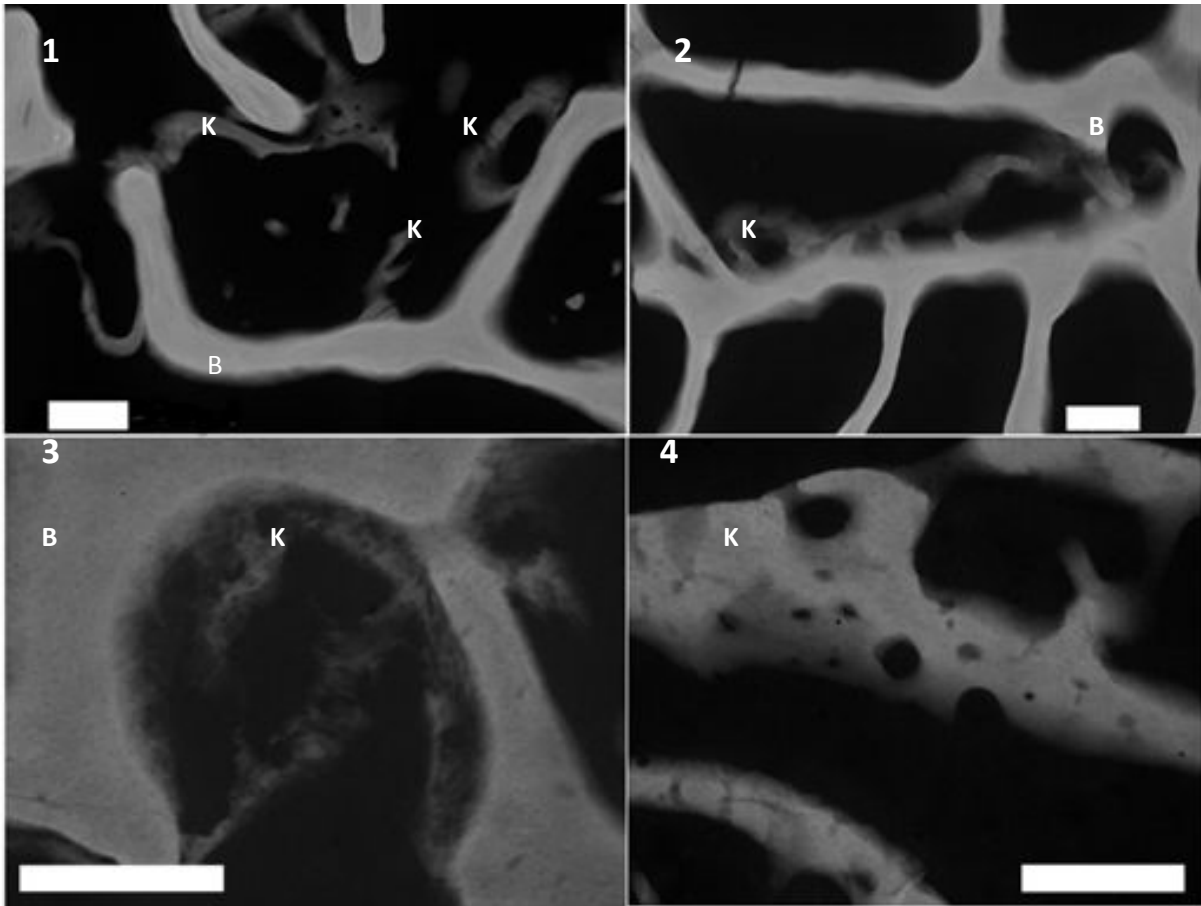
Auf der rechten Seite (simultane rhBMP-2-Gabe) war zweimal eine komplette, gleichmäßige Durchbauung des Knochenersatzmaterials mit neuem Knochengewebe zu beobachten. Bei einem dieser Präparate war es auch außerhalb des Knochenersatzmaterials zu einer erheblichen Osteoinduktion gekommen, deren radiologisch erkennbare Form an die präparierte Weichgewebstasche erinnerte. Keine mikroradiographisch nachweisbare Knochenneubildung gab es auf der rechten Seite ebenfalls in zwei Fällen bei den Tieren, die klinisch bereits eine teilweise Implantatfreilegung gezeigt hatten.

In den Ausschnittsvergrößerungen in Abbildung 7 lassen sich strukturelle Details des Knochengewebes erkennen. Bezüglich des mikroskopischen Aufbaus gab es keine Unterschiede zwischen einer simultanen und einer verzögerten BMP-Gabe. Das neue mineralisierte Gewebe bestand durchweg aus unreifem Knochen, der sich zu trabekelähnlichen Strängen formiert hatte. Im Zentrum dieses Knochengewebes konnten einige Haverssche Kanalsysteme identifiziert werden. Die Knochenneubildung war in den meisten Fällen mit dem Bio-Oss®-Material assoziiert, teilweise hatte sich neuer Knochen dem Knochenersatzmaterial direkt aufgelagert. Auch im Falle einer ektopen Knochenneubildung bestand stets eine Verbindung zum Knochenersatzmaterial. In einigen Fällen waren intertrabekuläre Knochenformationen aufzufinden, jedoch kann auch hier aufgrund der zweidimensionalen Darstellung der jeweiligen Schnittebene eine Verbindung zum Knochenersatzmaterial nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 6** : Mikroradiographiekollagen zweier Tiere. Oben sind Implantate der linken und rechten Seite eines Tieres nebeneinander abgebildet, in der unteren Reihe sind die Implantate eines anderen Tieres von der linken und rechten Seite dargestellt, dabei sind die Seiten korrekt wiedergegeben. Die Knochenneubildung ist jeweils durch Pfeile markiert.

Die Präparate auf der linken Seite (L, verzögerte BMP-Applikation) weisen eine geringere Knochenneubildung auf als die rechten Präparate (R, simultane Applikation). Beachte die starke ektope Knochenbildung im Präparat oben rechts.



**Abbildung 7** : Ausgewählte Ausschnitte aus den Mikroradiographien. Der weiße Balken entspricht stets einem Abschnitt von 200 $\mu$ m. Neugebildeter Knochen ist in den Abbildungen mit (K), Bio-Oss<sup>®</sup>-Material mit (B) gekennzeichnet. In den Ausschnitten 1 und 2 ist erkennbar, dass der neugebildete Knochen dem Bio-Oss<sup>®</sup>-Trabekel aufgelagert ist. In einer höheren Vergrößerung (Ausschnitt 3 ) ist die Auflagerung neuen Knochens direkt auf das Bio-Oss<sup>®</sup>-Gerüst zu beobachten. Ausschnitt 4 zeigt einen Bereich neuen Knochengewebes, in dem Poren in verschiedenen Größen angeschnitten sind.

### 3.1.3 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie liefert lediglich qualitative Aussagen über den zeitlichen Ablauf des Osteoinduktionsprozesses. Die Fluorochrome waren eine Woche nach BMP-Gabe bis 7 Wochen nach BMP-Gabe verabreicht worden (vergleiche Kapitel 2.8.2 Polychrome Sequenzmarkierung). Dabei war folgende Reihenfolge eingehalten worden:

- 1. und 5. Woche Xylenol Orange → fluoresziert orange
- 2. und 6. Woche Calcein Grün → fluoresziert grün
- 3. Woche Alizarin → fluoresziert rot
- 4. Woche Doxycyclin → fluoresziert braun

In Abbildung 19 sind exemplarisch zwei repräsentative Ausschnittskollagen eines rechten und eines linken Implantats dargestellt. In allen Präparaten zeigte das Bio-Oss®-Material eine starke Affinität zu Calcein Grün. Außen auf dem Knochenersatzmaterial waren typischerweise Banden der Abfolge rot, braun und orange aufgelagert, teilweise war auch eine äußere grüne Bande vorhanden. Dies bedeutet, dass der Großteil des Mineralisationsprozesses 2 Wochen nach BMP-Gabe (zur Calcein-Grün-Injektion) begann und bis zum Ende des Versuchszeitraums andauerte. Vereinzelt waren in den Verzögerungspräparaten auch innere Xylenol Orange-Einlagerungen festzustellen, die Hinweis auf eine sehr frühe Knochenneubildung geben.

Im ektopen Knochengewebe wies der zeitliche Ablauf der Knochenentstehung Alterationen auf, meist ließ sich hier eine Einlagerung von Alizarin oder Doxycyclin in zentralen Arealen beobachten, gefolgt von einer deutlichen äußeren Calcein-Grün-Bande (2. Gabe von Calcein Grün nach 6 Wochen, vergl. Abb. 19). Die ektote Knochenbildung ist daher in der 4. und 7. Woche nach BMP-Gabe besonders stark abgelaufen und begann später als die Knochenneubildung im Inneren des Knochenersatzmaterials.

Einige scharf begrenzte Einlagerungen in halbrunden Lakunen lieferten Hinweise auf einen Umbauprozess im neugebildeten Knochen, bei dem Osteoklasten zunächst eine Resorptionslakune gebildet hatten, die anschließend teilweise remineralisiert wurde. Die Formierung von Osteonen in kompakteren neuen Knochenstrukturen konnte mithilfe der verschiedenen Fluoreszenzbanden ebenfalls gut identifiziert werden. Als Zeitpunkt für den Beginn dieser Bildung lässt sich die 5. Woche nach BMP-Gabe festhalten, wie Doxycyclin-Einlagerungen an diesen Stellen belegen. Ein besonders intensives Remodeling mit vielen abrupt aneinanderstoßenden Mineralisationsfronten konnte im ektopen Knochen aufgefunden werden. Xylenol Orange-Einlagerungen in unscharf begrenzte Randbereiche des Bio-Oss®-Materials in vielen Präparaten mit verzögerter BMP-Applikation indizieren, dass hier Resorptionsprozesse stattgefunden haben.

### **3.1.4 Ergebnisse der histologischen Auswertung des Vorversuchs**

#### **Toluidinblau-Färbung der Hartschliff-Präparate**

Strukturelle Unterschiede im neugebildeten Knochen ließen sich im Vergleich der beiden Applikationszeitpunkten für rhBMP-2 in den histologischen Hartschliff-Präparaten nicht feststellen. Insgesamt jedoch war eine quantitativ stärkere Knochenneubildung in den Präparaten der Kontrollgruppe zu erkennen, die in den Mikroradiographien ebenfalls beobachtet wurde. Repräsentative Detailansichten beider Seiten sind in Abbildung 20 zusammengestellt. Mikroskopisch fand sich im neugebildeten Knochengewebe eine äußere Schicht unvollständig mineralisierten Osteoids und Osteoblasten sowie bereits mit mineralisierter Matrix umbaute Osteozyten im Zentrum. Teilweise ließen sich Osteone und Haverssche Kanäle ausmachen, auf die in Abbildung 21 hingewiesen wird. Als Resultat des Osteoinduktionsprozesses war Knochen entstanden, in dem Umbauprozesse stattfanden. Indizien dafür sind ausgefrante Säume von Resorptionslakunen und scharf begrenzte Schichten im Knochen, die Ausdruck von Resorptionsvorgängen sind. In den Implantaten konnten zwei Arten von Knochenneubildung ausfindig gemacht werden: Entweder war direkt auf die Bio-Oss®-Trabekel neuer Knochen aufgelagert worden, der in diesem Falle wenige Zelllagen dick war, oder es war innerhalb der Poren der Matrize eine Bildung trabekelähnlicher, teilweise auch komplexer knöcherner Strukturen abgelaufen. Durch direkte Auflagerung war in kleinen Poren im Bio-Oss®-Gerüst mineralisiertes Gewebe entstanden. Der ektop entstandene Knochen wies eine Struktur aus interkonnektierenden Strängen auf, die in ihrer Struktur der des Bio-Oss®-assoziierten Knochens glichen, und ebenfalls eine Schichtung und Osteone besaßen.

#### **Paraffinschnitte, Masson-Goldner- und Hämytoxylin-Eosin-gefärbt**

Aufgrund der geringen Schichtdicke der Schnitte von wenigen  $\mu$ -Metern ließen sich mikroskopische Details des neugebildeten Knochengewebes sowie die bindegewebige Durchbauung der Blöcke gut sichtbar machen, es war jedoch durch die vorangegangene Entkalkung nicht möglich, die Bio-Oss®-Struktur vollständig zu erhalten. In Abbildung 21 sind Einzelbilder mit höherer Vergrößerung aus Präparaten mit simultaner Gabe von BMP wiedergegeben, die Ansichten der Gegenseite mit verzögerter BMP-Gabe sind in Abbildung 22 aufgeführt. Auf beiden Seiten war Weichgewebe in die Matrize eingewachsen und

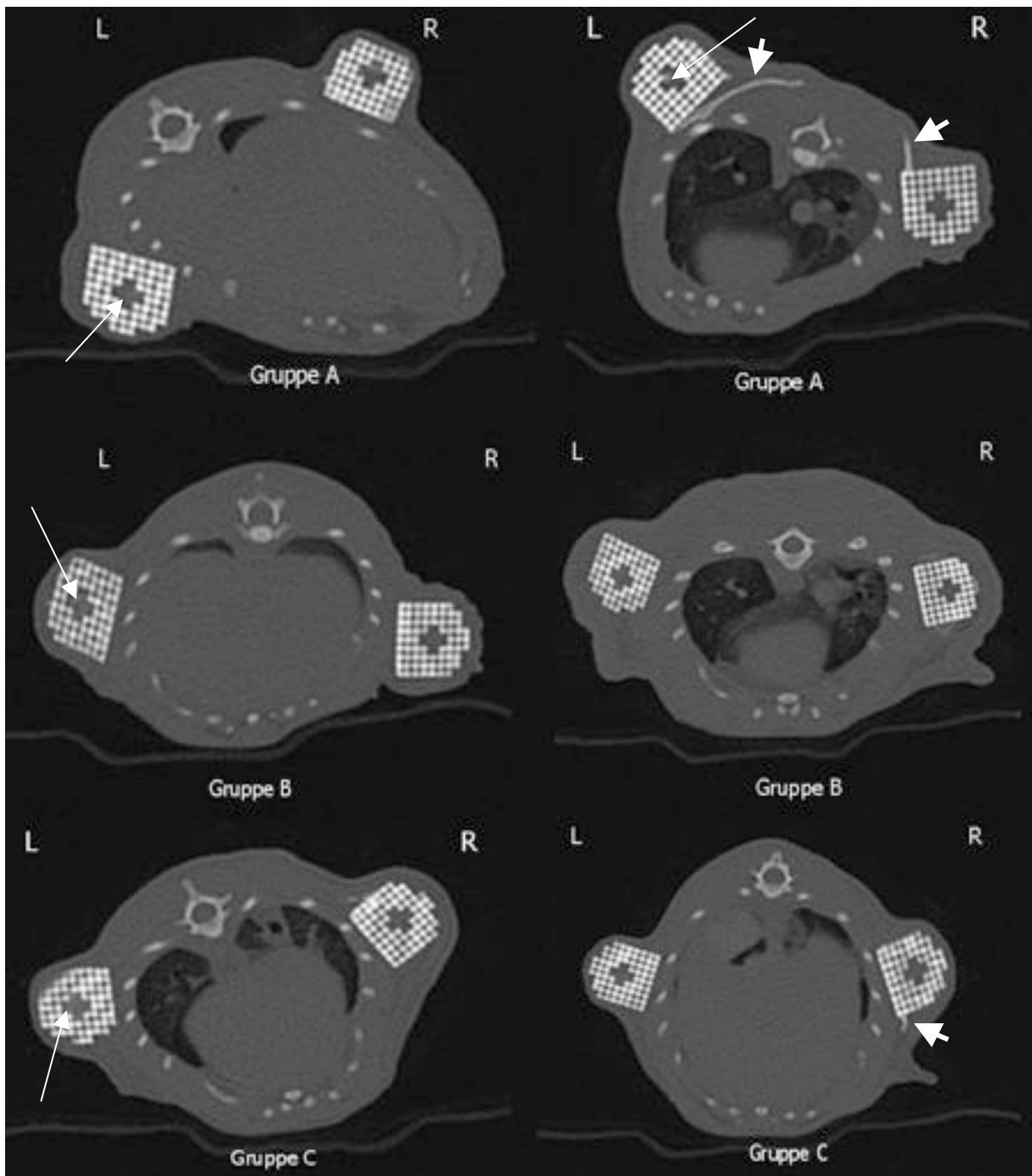
Anschnitte von Blutgefäßen waren ebenfalls vorhanden. Die Gegenüberstellung der Präparate beider Seiten zeigte etwas mehr Weichgewebisdurchbauung auf der Seite mit verzögerter BMP-Gabe. Neben kollagenem Bindegewebe, das Fibroblasten und zahlreiche andere Zellen mit runden Zellkernen enthielt, war auch Fettgewebe zu finden. Blutgefäßanschnitte konnten in Präparaten beider Gruppen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich beider Präparategruppen waren keine Unterschiede bezüglich der Weichgewebsstruktur zu finden. Die bereits anhand der Betrachtung der Toluidinblau-Präparate dargestellten Einzelheiten im Aufbau des Knochengewebes konnten mithilfe der Paraffin-Schnitte bestätigt werden.

### **3.2 Ergebnisse der Hauptversuchsreihe**

Mit dem Ziel, die Osteoinduktion in speziell geformten Hydroxylapatit-Implantaten zu vier verschiedenen Applikationszeitpunkten von rhBMP-2 miteinander zu vergleichen, wurden die Daten der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen ausgewertet. Dabei diente jeweils der rechts implantierte Block mit simultan verabreichtem BMP als Referenz. Insgesamt wurden die Daten von 18 Versuchstieren ausgewertet.

#### **3.2.1 Auswertung der computertomographischen Untersuchungen**

In Abbildung 8 sind exemplarische CT-Bilder der Abschlussuntersuchung eines Tieres jeder Gruppe zusammengestellt. Weder klinisch noch röntgenologisch gab es in dieser Versuchsreihe Anzeichen für Serome oder Wundheilungsstörungen, eine Implantatfreilegung hat nicht stattgefunden. Die Hydroxylapatit-Blöcke waren in ihrer Struktur mit dem Zentralkanal und den treppenförmig gestuften Längsseite gut zu erkennen, in einigen Anschnitten konnte eine Hartgewebsneubildung im Inneren des Kanals identifiziert werden. In 10 Fällen hatte sich nach simultaner BMP-Gabe eine ektopische Knochenformation gebildet, dies konnte auf der linken Seite bei verzögerter BMP-Gabe nur einmal beobachtet werden. Es bestand zu keinem Zeitpunkt ein Kontakt des Blockes oder des neuen Knochengewebes zum Skelett der Tiere.



**Abbildung 8:** Zusammenstellung typischer CT-Abschlussbilder von je 2 Tieren aus jeder Gruppe. Die Seiten sind mit L (links, verzögerte Gabe von BMP) und R (rechts, simultane BMP-Gabe) gekennzeichnet, die kurzen Pfeile weisen auf ektope Knochenneubildung hin. Im Zentralkanal röntgenologisch erkennbare Gewebsneubildung (lange Pfeile). Aufgrund der Positionierung der Tiere zur Schnittebene ist im Ausschnitt unten links der linke Block nicht vollständig angeschnitten.

### Auswertung der Knochendichte

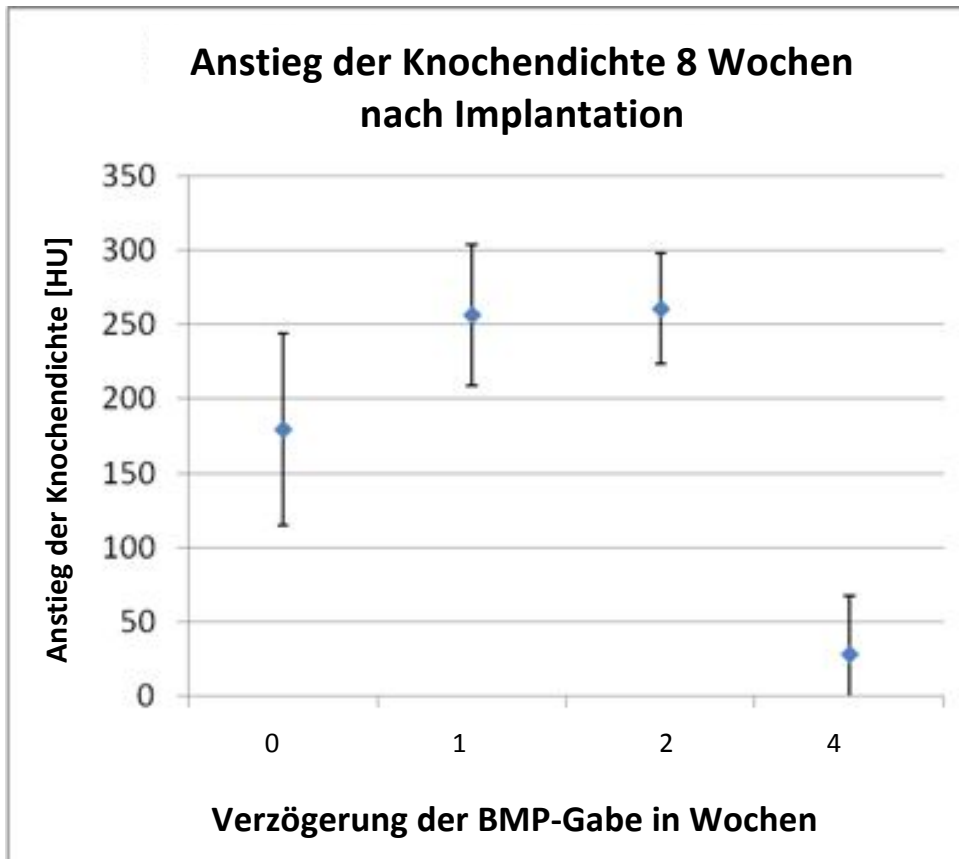
Der Mittelwert aller 84 Messungen wurde bestimmt, dieser betrug 1215 Hounsfield Units (HU). Die Anstiege im Knochendichteniveau innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 8



Wochen nach Implantation der Matrizen wurden mit den Anfangswerten für die Dichte des Implantats verglichen, wobei deutliche Differenzen zwischen den 4 Gruppen festzustellen waren. Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  betrug 0.97, was für eine hohe Güte der Analyse spricht. Der P-Wert war  $< 0.0001$  und somit lag eine statistische Signifikanz für diese Unterschiede vor. Wie in Abbildung 9 dargestellt, waren in der 2-Wochen-Verzögerungsgruppe (Gruppe B) die größten Anstiege (261 HU; 95%- Konfidenzintervall: 223 bis 298 HU) und in der 1-Wochen-Verzögerungsgruppe (Gruppe C) waren ähnlich hohe Werte (257 HU; 95%-Konfidenzintervall: 209 bis 304 HU) zu finden. Signifikant geringere Werte wurden bei simultaner Gabe festgestellt (179 HU; 95%- Konfidenzintervall: 115 bis 244 HU). In der 4-Wochen-Verzögerungsgruppe (Gruppe A) fand sich die geringste Knochendichtesteigerung (28 HU; 95%- Konfidenzintervall: -10 bis 67 HU).

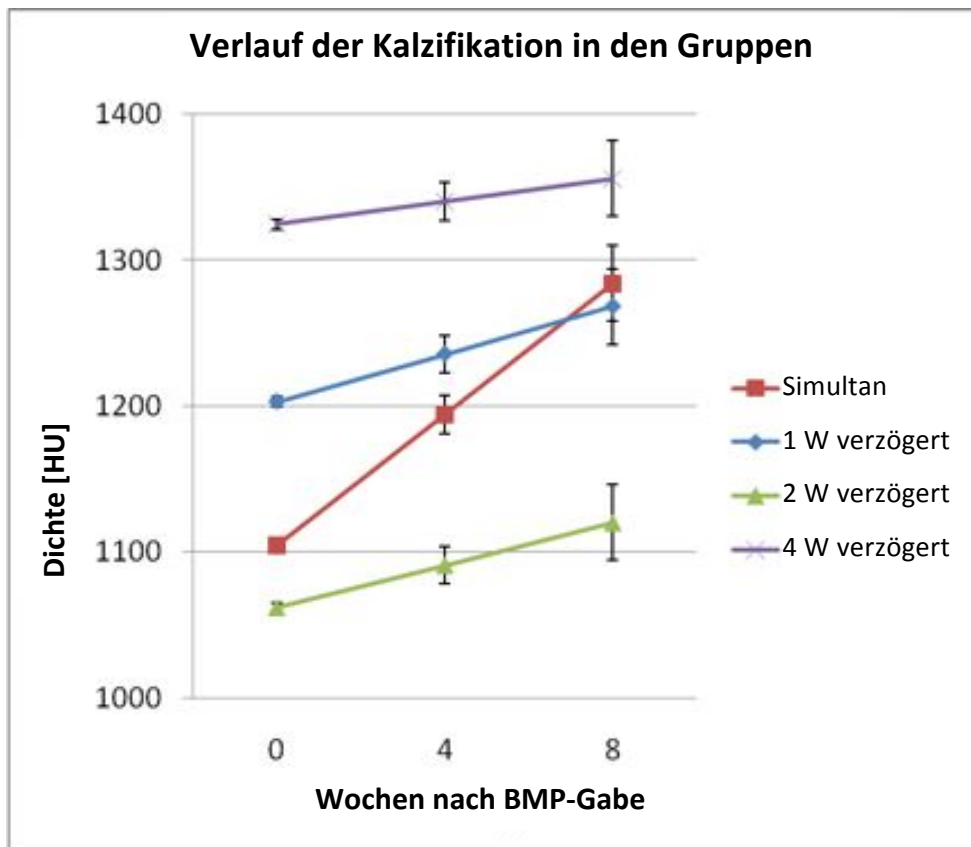
Bei Betrachtung der Entwicklung der Knochendichte auf die seit BMP-Gabe vergangene Zeit und nicht des Zeitintervalls, sondern bezogen auf die seit Implantation vergangene Zeit, ergeben sich die in Abbildung 9 dargestellten Kurven für die Tiergruppen. Ausgehend von unterschiedlichen Anfangswerten sind die Steigerungsraten in der Kontrollgruppe mit simultaner BMP-Gabe bei Implantation der Matrize besonders hoch (179 HU; 95%-Konfidenzintervall: 154 - 205 HU). Geringere Anstiege wurden nach um eine Woche verzögerter BMP-Gabe (65 HU; 95%- Konfidenzintervall: 39 - 91 HU) und in der 2-Wochen-Verzögerungsgruppe (58 HU; 95%- Konfidenzintervall: 32 - 84 HU) beobachtet. Der geringste Anstieg in der Knochendichte nach BMP-Injektion wurde nach vierwöchiger Verzögerung gefunden (31 HU; 95%-Konfidenzintervall: 5 - 57 HU). In dieser Analyse waren der Einfluss des Gruppeneffekts (unterschiedliche Verzögerung), als auch der Einfluss der Zeit seit BMP-Applikation, und derjenige einer Kombination beider Parameter sowie ein individueller Effekt des Tieres statistisch signifikant ( $p < 0.0001$ ).

Die Auswertung bezüglich einer potenziellen Korrelation der einzelnen Parameter miteinander erbrachte keine tierspezifische Auswirkung auf den Anstieg der Knochendichte, lediglich gruppenabhängige Auswirkungen waren vorhanden. Lineare Funktionsanalysen ließen auf keine systematischen Kurven in allen Gruppen schließen unter der Voraussetzung, dass eine lineare Interpretation der Knochendichte ausreichend ist.



**Abbildung 9:** Anstieg der Knochendichten in den einzelnen Tiergruppen innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 8 Wochen seit Implantation. Die Mittelwerte sind jeweils blau markiert, das korrespondierende 95%- Konfidenzintervall ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Auffällig ist die negative untere Grenze des 95%- Konfidenzintervalls in der 4-Wochen-Verzögerungsgruppe. Die höchsten Anstiege sind bei zweiwöchiger Verzögerung der BMP-Gabe zu finden, ähnliche Werte werden in der Gruppe C mit einwöchiger Verzögerung beobachtet.

Gegenüber der Dichte der eine Woche zuvor inserierten Blöcke zeigte sich ein höheres Anfangsniveau für die Knochendichte zum Zeitpunkt der BMP-Gabe in den bereits 4 Wochen zuvor implantierten Hydroxylapatit-Blöcken (vergl. Abb. 10). Die mittlere Dichte war in den zwei Wochen vorher implantierten Blöcken zum Zeitpunkt der BMP-Applikation am geringsten nachweisbar, leicht über diesem Niveau lag im Mittel die Dichte der am Untersuchungstag implantierten Kontrollblöcke mit simultaner BMP-Injektion.



**Abbildung 10:** Darstellung der Entwicklung der Knochendichte nach BMP-Gabe in den einzelnen Gruppen. Die Mittelwerte sind mit farbigen Symbolen gekennzeichnet, der Bereich des 95%-Konfidenzintervalls ist mit einem schwarzen Balken markiert. Die Kurve weist für die Implantate mit simultan zur Matrizeninsertion verabreichtem BMP die größte Steigung auf, gefolgt von einer annähernd gleich großen Steigung für die zweiwöchige und einwöchige Verzögerung. Die geringste Steigung ist für die 4-Wochen-Verzögerungsgruppe zu finden.

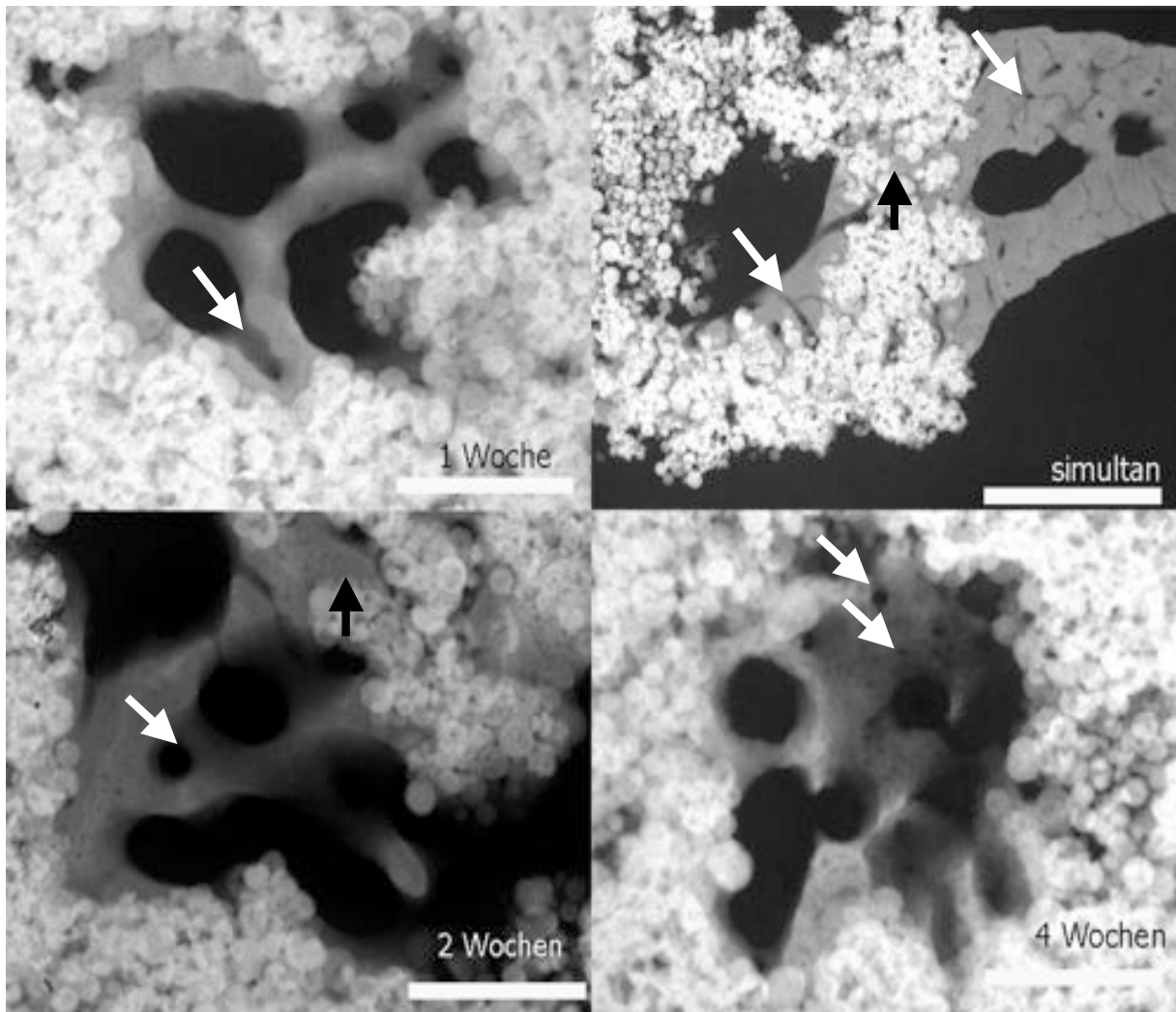
### 3.2.2 Auswertung der Mikroradiographie

Die Implantate waren in den Testgruppen zum Zeitpunkt der BMP-Gabe bereits 4, 2 oder 1 Woche in situ und somit über einen unterschiedlich langen Versuchszeitraum implantiert.

Aus jeder Präparategruppe ist in Abbildung 23 eine repräsentative Mikroradiographie-Kollage als Übersichtsdarstellung aufgeführt, auf die Einzelheiten wird im Folgenden genauer eingegangen. Qualitative Unterschiede zwischen den vier Applikationszeitpunkten ließen sich mikroradiographisch nicht feststellen, bezüglich der Knochenneubildungsrate an sich konnten Differenzen gefunden werden. Zudem gab es in allen Präparategruppen jeweils ein Implantat mit mikroskopisch sehr geringer sichtbarer Knochenneubildung. Beispielhaft für jeden BMP-Applikationszeitpunkt ist in Abbildung 11 je ein hochvergrößerter Ausschnitt

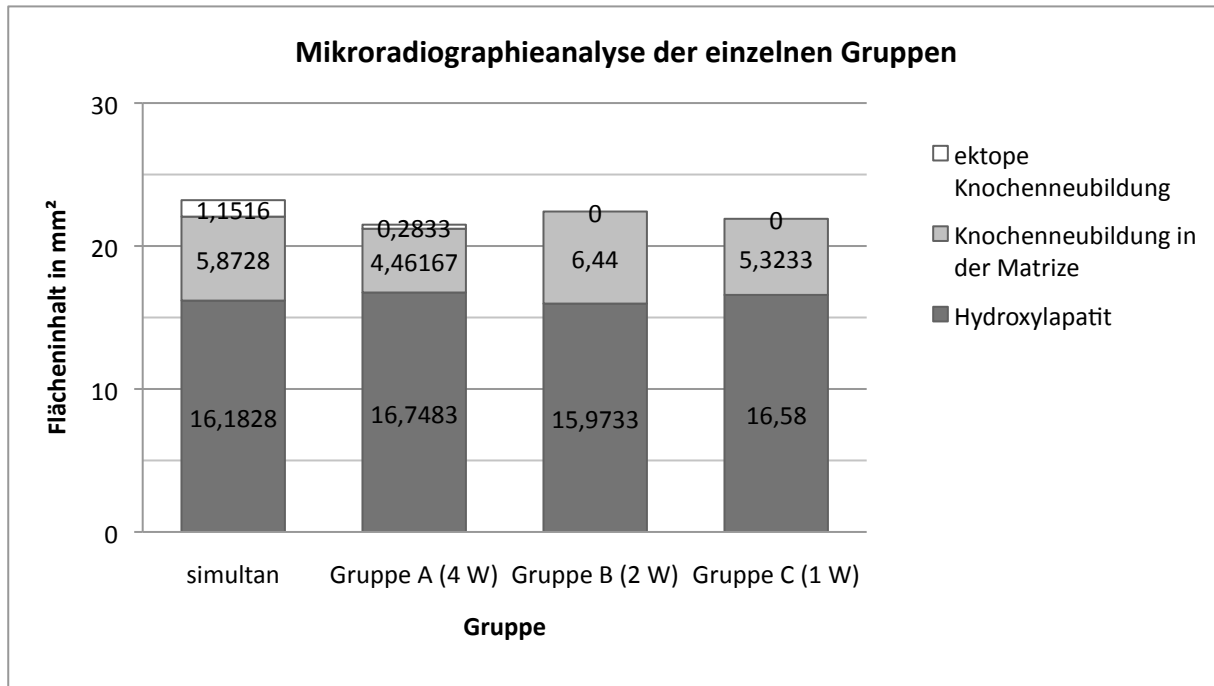
aus den entsprechenden Mikroradiographien gezeigt. Dabei glichen sich die neugebildeten Knochenformationen unabhängig vom Zeitpunkt der BMP-Injektion. Teils waren Kanalsysteme in komplexeren randständigen Knochenformationen oder im ektopen Knochen zu identifizieren, die Haversschen Systemen im kompakten Knochen glichen. In Poren mit Durchmessern unter 100  $\mu\text{m}$  konnte in der Hydroxylapatit-Matrix neugebildeter Knochen nachgewiesen werden. In Fällen von sehr geringer Knochenneubildung im Präparat war eine knöcherne Gewebsneubildung isoliert im Zentralkanal anzutreffen, meist als konzentrisch begrenzte komplexe Struktur. Höhere Vergrößerungen zeigten eine den Trabekeln aufgelagerte Knochenformation entlang des Hydroxylapatits und innerhalb der Poren des Gerüsts (siehe auch Abbildung 24). Zum Zentrum des Zentralkanals hatte sich teilweise eine der Kortikalis ähnliche Formation an Knochengewebe gebildet. Eine deutliche Wachstumsrichtung des Knochens vom Gerüstmaterial ausgehend in den Zentralkanal hinein war erkennbar. In Detailansichten bei sehr hoher Vergrößerung wurde deutlich, dass die Poren im Gerüst oberflächlich mit mineralisiertem Gewebe überzogen wurden, von dem aus einzelne Knochen trabekel das Porenvolumen durchspannten und die Seitenflächen miteinander verbanden.

Eine über das gesamte Hydroxylapatitgerüst gleichmäßig verteilte Knochenneubildung in den porösen Strukturen war nur in den Kontrollpräparaten mit simultaner BMP-Gabe anzutreffen. Neues Knochengewebe war mit einer Ausnahme im Bereich des Zentralkanals zu beobachten, wobei sich keine vom Zentrum des Hohlraums ausgehende Verknöcherung zeigte, sondern stets das Gerüst als Leitschiene diente. 11 der 18 Implantate mit simultaner BMP-Gabe wiesen eine überschießende ektople Knochenformation auf. Lediglich in einem Präparat mit 4-wöchiger BMP-Verzögerung wurde eine ektople Knochenneubildung beobachtet.



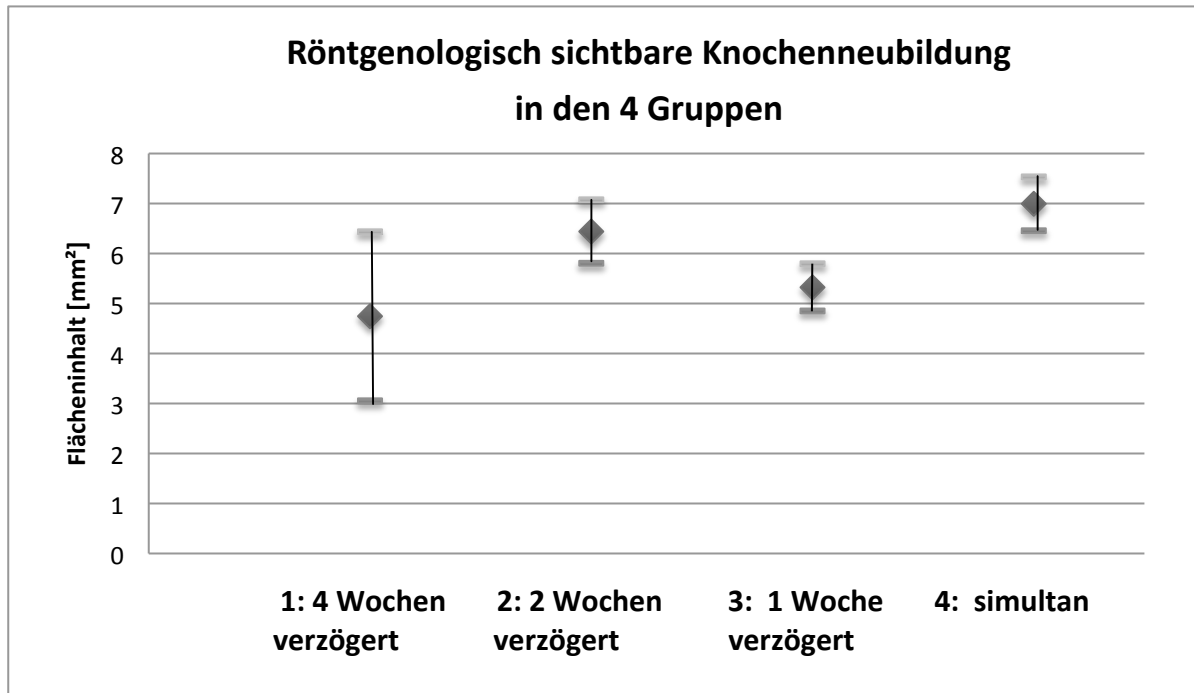
**Abbildung 11:** Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts für jeden der vier Applikationszeitpunkte für rhBMP-2. Die weißen Balken entsprechen 200  $\mu\text{m}$  im Präparat. Kanalsysteme im Knochen, die in unterschiedlicher Größe in jedem der vier Anschnitte erkennbar sind, sind mit weißen Pfeilen markiert. Im Beispiel für die simultane BMP-Gabe sind besonders viele Kanäle angeschnitten. Knochenneubildung hat auch in zentralen Poren des Hydroxylapatits stattgefunden (schwarze Pfeile).

Eine quantitative Auswertung der Kollagen lieferte genauere Resultate über die Menge der Knochenneubildung in den vier Testgruppen. Eine Bildanalyse der Graustufen im Präparat wurde vorgenommen und die dunkleren Bereiche wurden selektiv markiert. Die ektope Knochenbildung in einigen Präparaten wurde gesondert ausgemessen. Die mittleren Flächenanteile der folgenden detektierten Areale in den einzelnen Gruppen sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt: die Fläche des Knochenersatzmaterials, die Fläche der Knochenneubildung innerhalb der Matrize und die Fläche des ektop entstandenen Knochens.



**Abbildung 12:** Mittlere Flächeninhalte der Präparate jeder Gruppe. Die komplette Säule umfasst das gesamte röntgendichte Material, das detektiert werden konnte. Das Knochenersatzmaterial ist als dunkler Anteil dargestellt, darüber folgt die Knochenneubildung, unterteilt in Neubildung innerhalb der Matrizе (hellgrau) und außerhalb der Matrizе (weiß).

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der Daten sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt und in Tabelle 3 sind die Einzelwerte aufgelistet. Die flächenmäßig stärkste Knochenneubildung in den Matrizеn ist bei simultaner rhBMP-2-Applikation erfolgt (7,00 mm<sup>2</sup>, 95%- Konfidenzintervall: 6,45 - 7,53 mm<sup>2</sup>). Gleichzeitig war in dieser Gruppe die stärkste ektope Knochenbildung zu beobachten (vergl. Abb. 12). Eine geringere Knochenneubildung hatte in der Gruppe B mit um zwei Wochen verzögerter BMP-Gabe stattgefunden (6,44 mm<sup>2</sup>, 95%- Konfidenzintervall: 5,81- 7,07 mm<sup>2</sup>). Eine einwöchige Verzögerung der BMP-Applikation resultierte in einer geringeren Knochenneubildung (5,32 mm<sup>2</sup>, 95%- Konfidenzintervall: 4,85 -5,79 mm<sup>2</sup>). Die niedrigsten Werte wurden bei um vier Wochen verzögerter BMP-Gabe vorgefunden (4,74 mm<sup>2</sup>, 95%- Konfidenzintervall: 3,05-6,45 mm<sup>2</sup>). Zwischen den drei Verzögerungszeitpunkten und der simultanen Applikation fanden sich keine signifikanten Unterschiede (p= 0,33). Bei den Werten einer Gruppe lagen hohe Standardabweichungen vor, da die Einzelwerte eine sehr hohe Streuung aufweisen, welches sich ebenfalls in den hohen Varianzwerten widerspiegelt (vergl. Tab. 3).



**Abbildung 13:** Gesamte röntgenologisch sichtbare Knochenneubildung in den verschiedenen Gruppen. Die Mittelwerte sind jeweils schwarz markiert. Das korrespondierende 95%-Konfidenzintervall ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Infolge der unterschiedlichen Versuchsdauer in den einzelnen Testgruppen wurde in der Testgruppe 1 die Analyse nach 12 Wochen Verweildauer, in der Testgruppe 2 nach 10 Wochen, in der Testgruppe 3 nach 9 Wochen und in der Testgruppe 4 nach 8 Wochen in situ – Beobachtungszeit für das Knochenersatzmaterial durchgeführt. In allen vier Gruppen wurde 8 Wochen vor Versuchsende rhBMP-2 verabreicht.

	Simultane BMP-Gabe	1 Woche verzögert	2 Wochen verzögert	4 Wochen verzögert
Mittelwert	7,44	5,32	6,44	4,74
Standardabweichung	1,64	1,29	1,74	4,63
SE (Standardfehler)	0,67	0,53	0,71	1,89
95%- Konfidenzintervall	1,07	0,94	1,27	3,38

**Tabelle 3:** Aus den Daten der Mikroradiographie-Analyse berechnete statistische Werte

### 3.2.3 Ergebnisse der histologischen Auswertung eines Areals in unterschiedlicher Färbung

Im Folgenden werden korrespondierende Ausschnitte aus jeder der vier Präparategruppen vergleichend beurteilt. In Abbildung 14 ist ein ausgewählter Bereich eines Präparates der Gruppe mit vierwöchiger Verzögerung der BMP-Gabe in der Fluoreszenzmikroskopie und in der Toluidinblaufärbung gezeigt. Der Ausschnitt entstammt einem Bereich am Rande des

Zentralkanal und zeigt eine Knochenformation, bestehend aus Trabekeln, die eine Verbindung zum Knochenersatzmaterial aufweisen und durch einen fortlaufenden Strang zum Zentralkanal hin abgegrenzt sind. Ähnliche Knochenformationen waren häufig in den Präparaten der 4-Wochen-Verzögerungsgruppe auszumachen. Bei Betrachtung der korrespondierenden Fluoreszenzmikroskopie fiel auf, dass sich in die inneren Schichten stets Calcein Grün eingelagert hatte, das 2 Wochen nach der BMP-Gabe verabreicht worden war. Darauf aufgelagert war eine Alizarin-Bande und Doxycyclin-Banden, an einigen Stellen waren diesen Banden noch Calcein-Grün-Banden angelagert. Xylenol-Orange-Banden fanden sich kaum, sie waren dann auf Doxycyclin aufgelagert oder traten im Hydroxylapatit-Gerüst in Erscheinung. Eine Mineralisation hatte demzufolge zwei Wochen nach der BMP-Gabe eingesetzt und war in den darauffolgenden 21 Tagen gesteigert abgelaufen. Sechs Wochen nach BMP-Gabe kam es zu einer erneuten Verstärkung der Osteogenese. Da sich außen auf den Calcein-Grün-Banden noch unmarkierte Strukturen identifizieren ließen, die in der Toluidinblau-Färbung nachweislich mineralisiert waren, ist von einer über die ersten 6 Wochen hinaus andauernden Knochenneubildung auszugehen. Resorptionslakunen mit Kittlinien infolge eines Knochen- Remodelling (vergleiche Abb. 14) gaben Aufschluss über die Physiologie des neugebildeten Knochengewebes. Neben Auflagerungen von Osteoid auf das Hydroxylapatitgerüst und auf trabekelähnlichen Strukturen war auch eine knöcherne Durchbauung im Knochenersatzmaterial selbst festzustellen.

Beispielhaft für die Testgruppe mit zweiwöchiger BMP-Verzögerung zeigt Abbildung 15 einen mit neuem Knochengewebe komplett durchbauten Hydroxylapatit-Balken in 3 verschiedenen Darstellungsweisen. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass der größte Teil des mineralisierten Gewebes 2 Wochen nach BMP-Gabe entstanden ist, geringe Einlagerungen von Doxycyclin und Xylenol Orange, gefolgt von einer äußeren Calcein-Grün-Bande, weisen auf eine weitere Knochenneubildung ab der 5. Woche nach BMP-Gabe hin. In zwei anderen Präparaten dieser Gruppe waren auch Alizarineinlagerungen festzustellen. Vorherrschend war jedoch in allen Präparaten der zwei-Wochen-Gruppe eine Calcein-Grün-Einlagerung, auf die peripher weitere fluoreszierende Banden folgten. Die Toluidinblau-Färbungen zeigten keine qualitativen Unterschiede zu der um 4 Wochen verzögerten BMP-Gabe. Hinweise auf einen Aufbau des neugebildeten Knochens aus übereinander gelagerten Lamellen mit einer äußeren Schicht unvollständig mineralisierter Matrix fanden sich in den



Präparaten ebenso wie Anzeichen von Knochenumbauprozessen. Anschnitte eines Kanalsystems im Knochengewebe konnten in zwei Präparaten identifiziert werden.

Ein exemplarischer Detailausschnitt für die Testgruppe mit einwöchiger Verzögerung der BMP-Applikation ist in Abbildung 16 in Fluoreszenzmikroskopie, Toluidinblaufärbung und Mikroradiographie angeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierung ergab, dass die Knochenneubildung ihren Ausgang vom Knochenersatzmaterial aus nahm. In allen Präparaten dieser Gruppe war die Calcein-Grün-Einlagerung überwiegend, begleitet von einigen Alizarin-Banden. Auf der Grundlage dieser Beobachtung konnte auch in dieser Präparategruppe der Beginn einer Mineralisation ab der 3. Woche nach BMP-Gabe registriert werden. In kompakteren Strukturen ließen sich auch Alizarin-Banden in den ersten mineralisierten Schichten der Trabekel nachweisen. Insgesamt war die Verteilung der Fluorochrome eher inhomogen in dieser Gruppe, geordnete Banden waren kaum anzutreffen, sondern die flächigen Einlagerungen des Calcein Grün überwogen. In dem repräsentativen Beispielpräparat in Abbildung 16 sind Remodelling-Vorgänge mit dem Aufeinandertreffen zweier Mineralisationsfronten gut zu beobachten. Die Grenzen der kongruierenden Mineralisationsschichten entsprechen sich in Toluidinblaufärbung und Fluoreszenz.

Die Details eines Präparates der Kontrollgruppe mit simultaner BMP-Applikation sind in Abbildung 17 dargestellt. Als Beispiel für alle Präparate mit gleichzeitiger Implantation der Hydroxylapatit-Matrize und rhBMP-2-Injektion in den Zentralkanal ist ein Ausschnitt aus dem Inneren des Hydroxylapatit-Blocks gewählt worden, in dem eine Durchbauung der Hydroxylapatitbälkchen mit neuem Knochengewebe gut zu erkennen ist. Zudem beinhaltet dieser Abschnitt des Präparates- wie häufig in dieser Testgruppe- zahlreiche Anschnitte von Knochenkanälen, die hier sowohl quer als auch längs getroffen sind. In der Fluoreszenzaufnahme läßt sich der zeitliche Ablauf des Mineralisationsprozesses in dieser Knochenformation gut erschließen. Angefangen mit Calcein-Grün- Ablagerungen in zentralen Bereichen des Hydroxylapatit-Gerüsts sind alle Fluorochrome in ihrer chronologischen Abfolge zu identifizieren. Diese Reihenfolge ist auch in vielen anderen Präparaten bei simultaner BMP-Gabe zu beobachten und deckt sich mit der zeitlichen Abfolge des Osteoinduktionsprozesses in den Präparaten der drei Testgruppen. In den neugebildeten Knochen trabekeln im Bereich der Poren des Hydroxylapatit-Gerüsts und im Zentralkanal

war die erste mineralisierte Schicht eine Woche später entstanden, wie die Alizarineinlagerungen im Zentrum zeigen. Darauf folgende Schichten waren meist im Wochenrhythmus entstanden, dieser Prozess dauerte noch bis zum Ende des Versuchszeitraums an. Die Toluidinblau-Färbung stützt die aus der Analyse der fluoreszierenden Banden gewonnenen Erkenntnisse und läßt alle strukturellen Details erkennen, die auch in den anderen Gruppen zu beobachten waren. Wie bereits anhand der Präparate der anderen Testgruppen dargelegt worden ist, sind den Toluidinblau-Färbungen zahlreiche Hinweise auf Remodelling des neugebildeten Knochens zu entnehmen. Anhaltspunkte dafür sind mikroskopisch sichtbare Kittlinien zwischen verschiedenen Mineralisationsfronten, Resorptionslakunen, die teilweise remineralisiert worden sind, und Haverssche Knochenkanälchen mit Osteonen.

#### **3.2.4. Resultate der histologischen Auswertung der Paraffinschnitte**

Von den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten sind exemplarische Übersichtskollagen jeder Testgruppe und der Kontrollgruppe in Abbildung 25 dargestellt. Alle Präparate wiesen sowohl im Zentrum als auch im Randbereich des Implantats eine Durchdringung mit kollagenem Bindegewebe und Fettgewebe auf. Dabei war in einigen Präparaten jeder Gruppe der Zentralkanal nicht vollständig mit kollagenem Bindegewebe ausgefüllt. In der Peripherie des Implantats war eine bindegewebige Umscheidung der Matrize zu erkennen und in einigen Präparaten jeder Gruppe war der *Musculus latissimus dorsi* in der Umgebung der Hydroxylapatit-Blöcke anzutreffen. Eine erhöhte Knochenneubildung bei direktem Kontakt des Hydroxylapatit-Gerüsts mit dem Muskelgewebe ließ sich in den Schnitten nicht belegen. In allen Präparaten hat eine Gefäßneubildung stattgefunden, wie zahlreiche Gefäßanschnitte belegen. Zur Verdeutlichung wurden höher vergrößerte Detailansichten ausgewählter Präparate in Abbildung 26 zusammengestellt. Das Hydroxylapatit-Gerüst war in den meisten Präparaten durch den Entkalkungsprozess bedingt nur unvollständig erhalten und eine Beurteilung daher erschwert. Dennoch ließ sich besonders in der Kontrollgruppe eine Durchdringung des Knochenersatzmaterials mit neuem Knochengewebe, das in kleinen Poren zwischen einzelnen Hydroxylapatit-Granula entstanden ist, feststellen. Die Präparate mit um vier Wochen verzögerter BMP-Gabe wiesen generell eine geringere Knochenneubildung auf, ein Eindringen des Knochengewebes in poröse Bereiche innerhalb des Gerüsts war nur in einem

Präparat zu beobachten. Zwischen der einwöchigen und der zweiwöchigen BMP-Verzögerung gab es keine quantifizierbaren Differenzen hinsichtlich der Weichgewebisdurchbauung und der Knochenneubildung.

### **3.2.5 Resultate der immunhistologischen Auswertung**

In allen Paraffinpräparaten der Testgruppen ließen sich mithilfe der immunhistologischen Markierung unter Verwendung von PECAM-1 Endothelzellen nachweisen. In Abbildung 27 ist exemplarisch ein Bildausschnitt aus der Präparategruppe mit zweiwöchiger Verzögerung der BMP-Gabe in Färbung und Negativkontrolle dargestellt. Sowohl in den Hydroxylapatit-Balken als auch im intertrabekulären Weichgewebe waren mit diesem Verfahren Blutgefäße nachweisbar. Eine Auszählung der mikroskopisch sichtbaren markierten Gefäße in Präparaten aller vier Gruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, ebenso wenig konnte eine vorherrschende Lokalisation innerhalb des einzelnen Implantates festgestellt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Vorversuch

Das vorrangige Ziel des Tissue Engineerings von Knochengewebe besteht in der Erschaffung biologisch voll funktionsfähigen neuen Knochens, um zusätzliche Defekte und Komplikationen infolge einer chirurgischen Transplantathebung zur Rekonstruktion skelettaler Defekte zu vermeiden. Im Gesichtsbereich werden besonders hohe Anforderungen an Funktionalität und Ästhetik des Ersatzmaterials gestellt. Zusätzlich soll der Knochen möglichst einfach an verschiedene Regionen transferiert werden können. Es existieren diverse Methoden und Herangehensweisen, um neuen Knochen zu züchten. Die Methode der Endokultivierung ermöglicht es, neuen Knochen in einem heterotopen Gewebe im Patienten selbst heranzuzüchten (Warnke et al. 2004). Damit stellt diese Vorgehensweise ein zukunftsweisendes Verfahren dar, um die entscheidenden Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial zu erfüllen: immunologische Unbedenklichkeit, schnelle Osteoinduktion, Osteokonduktivität sowie stabile Osseointegration (Inoda et al. 2007). In der Fachliteratur besteht eine Präferenz für die intramuskuläre Kultivierung von Knochengewebe gegenüber der subkutanen Kultivierung (Okubo et al. 2000). Diese Forderung stützt sich auf die Erkenntnis, dass im Skelettmuskel vorhandene Myoblasten sich zu osteogenen Zellen differenzieren können (Levy et al. 2001). Doherty und Mitarbeiter fanden 1998 auch osteogenes Potenzial in hämatopoetische Zellen. Es hat sich herausgestellt, dass eine Vaskularisierung des Implantats für ein erfolgreiches Bone Engineering essenziell ist (Janssen et al. 2006). Desweiteren wird vermutet, dass die Mehrzahl der Knochenersatzmaterialien in den Spenderort zusammen mit einer adäquaten Quelle von Osteoblastenvorläuferzellen inseriert werden müssen (Bauer 2007).

In der Literatur wird der *Musculus latissimus dorsi* als geeignetes Implantatbett für das *in vivo* Tissue Engineering von Knochengewebe beschrieben, da eine Gefäßversorgung durch die *Arteria thoracodorsalis* möglich ist und für eine spätere Transplantation ein gefäßgestielter Muskellappen bereitsteht (Warnke et al. 2004). Daher sollte in der vorliegenden Studie die intramuskuläre Endokultivierung unter Ausnutzung dieser günstigen anatomischen Voraussetzungen durchgeführt werden. Aufgrund der Bedeutsamkeit von einem geeignetem Umfeld mit Blutversorgung und einem Reservoir an Stammzellen mit

osteogener Potenz leitet sich die Hypothese ab, dass die Wirksamkeit von Bone Morphogenetic Proteins gesteigert werden könne, wenn diese auf eine bereits vorhandene Vaskularisierung und Weichgewebstdurchdringung in der osteokonduktiven Matrize träfen. Die nötigen pluripotenten Stammzellen, die durch das BMP zur Knochenneubildung angeregt werden, wären bereits am gewünschten Ort im Weichgewebe, wodurch sich der Osteoinduktionsprozess beschleunigen ließe. Weiterhin könnte durch eine bereits bestehende Weichgewebsintegration eine sichere Fixierung des Implantats auf der Unterlage gelingen, so dass die Knochenneubildung in einer stabileren Umgebung stattfinden könnte. Einige Autoren postulieren auch eine *Up-Regulation* der BMP-Signaltransduktion durch im Bindegewebe vorhandene Faktoren (Hanada et al. 1997). In einer Studie zur Frakturheilung im Kaninchenmodell untersuchten Woo und Mitarbeiter im Jahre 2001 die BMP-Antwort nach einer kontrollierte Freisetzung über einen längeren Zeitraum aus speziellen Trägermaterialien. Eine kontinuierliche BMP-Freisetzung zeigte bessere Resultate als eine sofortige Abgabe einer Einzeldosis, da bereits nach 7 Tagen die BMP-Menge nicht mehr ausreichend für eine Osteoinduktion war. In einem Modell zur Defektheilung bei Primaten ließ sich durch die um eine oder zwei Wochen verzögerte BMP-Gabe im Vergleich zur sofortigen Verabreichung nach Osteotomie die Knochenheilung beschleunigen (Seeherman et al. 2006). In der studierten Literatur fand sich jedoch keine Studie, die eine simultane mit einer verzögerten BMP-2-Gabe in der heterotopen Knochenzüchtung unter Verwendung von Hydroxylapatit-Matrizen als osteokonduktive Gerüste vergleicht. Mit der Zielsetzung, diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurde in einer Pilotstudie an 6 Lewis-Ratten ein bilaterales Tiermodell entwickelt, das es ermöglichte, unabhängig von interindividuellen Unterschieden im Knochenstoffwechsel die simultane BMP-Gabe einer verzögerten BMP-Gabe in einem Organismus gegenüberzustellen.

Bio-Oss® erschien zunächst als zu bevorzugendes Knochenersatzmaterial aufgrund einer hohen Evidenz für hervorragende Biokompatibilität und Osteokonduktivität und nachgewiesenermaßen guter mechanischen Integrität (Janssen et al 2006). Jensen und Mitarbeiter (1996) verglichen im Rattenmodell Bio-Oss® mit drei anderen Knochenersatzmaterialien (ein Material war ebenfalls bovinen Ursprungs und zwei entstammten Korallen) und stellten für Bio-Oss® eine bessere Osseointegration im Vergleich zu den Testmaterialien fest. Acil und Mitarbeiter untersuchten 2000 die Biokompatibilität

von Bio-Oss® im Zellkulturversuch mit humanen osteoblastenähnlichen Zellen und bewerteten das Material als geeignet für ein Tissue Engineering von Knochen.

Als osteoinduktive Komponente wurde mit rhBMP-2 ein ebenfalls sehr gut untersuchtes Bone Morphogenetic Protein hinzugefügt, das sich in diversen Tiermodellen durch seine hohe Bioaktivität ausgezeichnet hat (Groeneveld & Burger 2000). Zur Initiation der Frakturheilung und Knochenzüchtung ist rhBMP-2 im Jahre 2002 zur Anwendung zugelassen worden und wurde auch seitdem klinisch erfolgreich in der orthopädischen Chirurgie eingesetzt (Axelrad & Einhorn 2009).

Im Rattenmodell konnte im Rahmen der enchondralen Knochenneubildung am Tag 21 und am Tag 28 eine endogene BMP-2-Ausschüttung durch Bindegewebszellen nachgewiesen werden (Nakagawa et al. 2001). Dieser Zeitpunkt versprach daher auch für die heterotope Knocheninduktion im Studienmodell optimal zu sein, obwohl die genannten Daten auf das Modell nur mit Einschränkungen übertragen werden können.

Die computertomographischen Untersuchungen im Vorversuch ergaben im Gegensatz zu den zitierten Resultaten anderer Studien eine signifikant höhere Knochendichte im Bio-Oss®-Implantat nach simultaner BMP-Gabe im Vergleich zur verzögerten Gabe. Da in osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien wie Bio-Oss® keine spontane Dichtezunahme durch Mineralisation stattfinden kann, kommt als Ursache für eine Dichtezunahme nur eine Knochenneubildung infolge einer durch BMP stimulierten Osteoinduktion infrage.

In der Mikroradiographie konnte die durch Dichteanalyse festgestellte Knochenneubildung bestätigt werden. Der neugebildete Knochen ist aufgrund seines geringeren Mineralisationsgrades weniger röntgendicht und erscheint dunkler. Im Gegensatz dazu stellt sich das Knochenersatzmaterial hell dar, da es die Röntgenstrahlung stärker absorbiert. Eine gleichmäßigere Knochenneubildung im gesamten Präparat wurde beobachtet, wenn rhBMP-2 simultan mit der Bio-Oss®-Matrize appliziert wurde. Die in früheren Studien häufig im Tiermodell zu beobachtende überschießende Knochenneubildung außerhalb der Matrizen (Ripamonti et al. 1996) trat allerdings ebenfalls besonders großflächig nach einer simultanen BMP-Gabe auf. Insbesondere im Rattenmodell ist schon bei geringer BMP-Konzentration eine ektope Knochenneubildung häufig (Linde & Hedner 1995), von daher muss eine Überdosierung des BMPs als mögliche Ursache nicht in Betracht gezogen werden, sondern

dass das BMP nicht selektiv allein auf das Implantat aufgebracht wurde. Chen und Mitarbeiter stellten außerdem fest, dass bei der rhBMP-2-Anwendung in der Spinalchirurgie eine ektope Knochenneubildung eine häufige Komplikation war und diese Eigenschaft daher als symptomatisch bei Anwendung von rhBMP-2 anzusehen sei.

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein etabliertes Verfahren zur in vivo- Analyse von Umbauprozessen in Knochen (Frost 1969). Das jeweilige Fluorochrom lagert sich durch Komplexierung mit Kalziumionen in der Schicht der Mineralisationsfront an, in der zum Zeitpunkt der Fluoreszenzmarkergabe ein aktiver Mineralisationsprozess im Gange war. Dies ist die jeweils jüngste Mineralisationsschicht, die außen auf bereits abgelagertes Osteoid aufgelagert wird (Pautke et al. 2005). Durch die mehrfarbige Markierung im Wochenrhythmus bilden sich nach Anregung mittels einer Quecksilberdampflampe mikroskopisch sichtbare fluoreszierende Banden aus, die mit dem Ablauf des Mineralisationsprozesses direkt korrelieren. Bis zu einer minimale Stärke von 5  $\mu\text{m}$  sind zeitliche Abfolgen so sicher nachzuweisen und zu dokumentieren (Pautke et al. 2005). Die auf diese Weise sichtbar gemachten Mineralisationsprozesse begannen in allen Präparaten 14 Tage nach BMP-Applikation. Die Einlagerung von Fluorochromen wurde in anderen Studien als Beweis für eine Perfusion des Knochenersatzmaterials akzeptiert (Shirota et al. 1995 und Terheyden et al. 2001 a), daher konnte eine Perfusion des Implantats zu diesem Zeitpunkt ebenfalls belegt werden. Die Knochenapposition auf dem Bio-Oss®-Material dauerte über den Versuchszeitraum von acht Wochen an. Die ektope Knochenbildung lief hauptsächlich in der 4. und 5. Woche nach BMP-Gabe ab. Einige Areale in Präparaten mit simultaner Gabe des BMPs wiesen Fluorochromeinlagerungen auf, ohne dass sich in diesem Gebiet in der korrespondierenden Toluidinblaufärbung eine Knochenneubildung nachweisen ließ. Dies gibt wiederum Anlass zu der Annahme, dass auch durch Resorptionsvorgänge freigewordene Bindungsstellen an Calcium-Ionen eine Fluorochromanreicherung erlauben. Ob Bio-Oss® resorbierbar ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Janssen et al. 2006). Methodenkritisch muss angemerkt werden, dass das dargestellte Verfahren eine zweifache Gabe von Xylenol Orange und Calcein Grün beinhaltet, so dass es teilweise nicht möglich war, die Knochenneubildung zeitlich sicher der ersten oder zweiten Calcein- Grün-Gabe zuzuordnen.

Insgesamt war eine gute Osseointegration des Knochenersatzmaterials zu beobachten, die bei simultaner BMP-Gabe regelmäßiger und lückenloser erschien. Weiterhin gab es histologische Anhaltspunkte für einen funktionierenden Knochenstoffwechsel mit Remodelingprozessen im neugebildeten Knochengewebe. Die Histologie ergab eine etwas bessere bindegewebige Durchdringung der Matrize nach verzögerter BMP-2-Gabe. Die beobachtete konzentrische Neovaskularisation war bereits von Terheyden et al. 2001 bei der intramuskulären Endokultivierung beschrieben worden und als vorteilhaft gegenüber der Blutversorgung durch ein zentrales Gefäß bewertet worden, da das Risiko einer thromboembolischen Komplikation geringer ist.

Der Ergebnisanalyse zufolge konnte- anders als in Modellen zur Frakturheilung- in diesem Modell zur intramuskulären Endokultivierung heterotopen Knochens keine Verbesserung der Osteoinduktionsprozesses bei einer um 4 Wochen verzögerten BMP-Applikation nach Abwarten einer Einheilphase festgestellt werden. Von einer Perfusion ist in allen Testgruppen erst ab der 3. Woche nach BMP-Gabe auszugehen. Auf eine bereits zum Zeitpunkt der BMP-Gabe vorhandene Vaskularisierung in den präimplantierten Blöcken gab es keinerlei Hinweis, so dass die dahingehend eingangs aufgestellte Hypothese nicht bestätigt werden konnte.

#### **4.2 Komplikationen und methodische Schwächen des Vorversuches**

An dieser Stelle soll kritisch zum Design und Ablauf der Pilotstudie Stellung genommen und auseinandergesetzt werden, welche Konsequenzen sich für das Studiendesign des Hauptversuches aufgrund der Bewertung ergaben. Da letztlich nur die Ergebnisse von 5 Tieren in die Auswertung einfließen, war der auswertbare Datenumfang begrenzt. Hinzu kamen Wundheilungsstörungen an zwei Implantaten auf der Kontrollseite, die zu einer teilweisen Implantatfreilegung mit Volumenverlust der Blöcke geführt hatten. Als mögliche Ursachen kamen scharfe Kanten des Knochenersatzmaterials und ein im Verhältnis zur gesamten Körpergröße recht voluminöses Ausmaß der Matrize in Betracht, eventuell war auch die Zugspannung auf den Wundrändern zu groß. Diese potenziellen Störfaktoren wurden im Hauptversuch ausgeschaltet, indem ein anderes Design für die Matrize mit abgerundeten Kanten gewählt wurde und die Operationstechnik dahingehend verändert wurde, dass fortan über einen medianen Schnitt Zugang zu beiden Seiten gefunden wurde



und die Weichgewebstasche größer präpariert wurde. Die in der Pilotstudie aufgetretenen Komplikationen wiederholten sich unter Anwendung der erörterten Modifikationen im Hauptversuch nicht.

Weitere Schwächen des Modells bestanden in der alleinigen Untersuchung eines Zeitintervalls zur BMP-Verzögerung. Unter der Zielsetzung, den optimalen Applikationszeitpunkt zu finden, mussten weitere Verzögerungsintervalle untersucht werden, um Vergleichsdaten zu gewinnen. Bei einem größeren Probenumfang lässt sich auch ein Effekt der Zeit gegenüber einem tierspezifischen Effekt auf die Knochendichteentwicklung besser detektieren.

Das verwendete bovine Hydroxylapatit-Gerüst zeigte trotz guter Integration in den neugebildeten Knochen mechanische Schwächen unter physiologischen Belastungen. In mehreren Blöcken beider Testgruppen konnten mikroskopisch Risse im Material festgestellt werden. Hinzu kommt, dass bei der Rekonstruktion größerer Defekte bisher nicht auf ein formgebendes Titangitter um das Bio-Oss®-Material herum verzichtet werden konnte (Warnke et al. 2006). Auch die Beobachtungen des Vorversuchs lassen weiter fraglich erscheinen, ob insbesondere große Defekte hinreichend stabil mit reinen Bio-Oss®-Körpern rekonstruiert werden können. In Anbetracht der Zielsetzung, einen adäquaten Knochenersatz zukünftig mithilfe von Daten aus computertomographischen Untersuchungen in einem CAD/CAM-Verfahren passgenau für die individuelle Patientensituation herstellen zu können, müssen Materialien gefunden werden, die formstabil gefräst werden können (Sun et al. 2005). Bio-Oss® als biologisches Produkt mit einer spongiösen Struktur ohne definierte Porengröße kann diese Anforderungen bislang nicht erfüllen. Eine vielversprechende Alternative stellen die verwendeten, in einem dreidimensionalen Druckprozess gesinterten Hydroxylapatit-Matrizen dar, die auch zum Ersatz komplexer, größerer skelettaler Defektsituationen geeignet sind, wie sie nach einer Tumoroperation im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich häufig auftreten (Seitz 2008).

Es besteht ein wissenschaftlicher Konsens über die große Bedeutung, die dem Volumen, der Größe und der Interkonnektivität der porösen Hohlräume in Knochenersatzmaterialien beizumessen ist (Eppley et al. 2005). Als geeigneter Porendurchmesser für das Einwachsen von Knochengewebe wird eine Größe zwischen 100 µm und 500 µm in der Literatur genannt

(Skowronski et al. 2003). Diese Maße wurden bei dem Design der Matrizen berücksichtigt und eine mittlere Porenweite von 500 µm konnte erreicht werden.

Eingangs wurde erläutert, dass eine Verbesserung des Mikroklimas für den Osteoinduktionsprozesse durch eine bereits bestehende bindegewebige Durchdringung der Matrizen vorstellbar war. Die histologische Untersuchung ergab auch eine gleichmäßige Durchdringung selbst kleinster Poren der Bio-Oss®-Blöcke mit Bindegewebe. Jedoch konnte keine Verbesserung der Knochenneubildungsrate im Vergleich zu den Kontrollpräparaten festgestellt werden. In der Testgruppe war es zwar im Randbereich des Matrize und außerhalb davon zu einer Knochenneubildung gekommen, jedoch hatte sich zentral sehr wenig Knochengewebe gebildet. Ursächlich könnte ein Verschließen der interkonnektierenden Poren mit Bindegewebe sein, das auch ein Eindringen von BMP in zentrale Bereiche der Matrize verhindert. Demzufolge wurde der Anspruch formuliert, im Hauptversuch die BMP-Darreichung zu optimieren, um eine ausreichende Osteogenese auch in zentralen Bereichen des Knochenersatzmaterials sicherzustellen. Besonders angesichts der Zielsetzung, mit Tissue Engineering Knochenersatz zu Rekonstruktion großer Defekte zu züchten, bestand hier Nachbesserungsbedarf. Abhilfe sollte ein Zentralkanal in den Matrizen schaffen, der im computergestützten Herstellungsverfahren eingearbeitet wurde. Neben einer besseren Erreichbarkeit zentraler Bereiche wäre dadurch die Grundlage für eine kontrollierte Applikation des BMP in das Gerüst ohne große Überschüsse gegeben, die einer ektopen Knochenbildung in der intramuskulären Tasche Vorschub leisten. In der Hauptversuchsreihe wurde zusätzlich ein geringeres Flüssigkeitsvolumen mit höherer BMP-Konzentration verwendet.

### **4.3 Hauptversuch**

Im Hauptversuch wurde rhBMP-2 verzögert nach 1, 2 und 4 Wochen nach Implantation einer speziell designten Hydroxylapatitmatrize bei insgesamt 18 Lewis-Ratten appliziert, unter Beibehalt des bilateralen Vergleichsmodells aus dem Vorversuch mit verzögerter BMP-Gabe auf der Testseite (links) und simultaner BMP-Gabe auf der Kontrollseite (rechts). Eine einwöchige und zweiwöchige BMP-Verzögerung hatte sich bereits in einer 2007 durchgeführten Studie von Betz und Mitarbeitern als vorteilhaft für die Frakturheilung im

Rattenmodell erwiesen. Durch eine Verzögerung der Injektion von BMP-2- cDNA um 5 bzw. 10 Tage nach dem chirurgischen Eingriff konnten mehr Segmentdefekte von kritischer Größe eine radiologische Einheit erreichen, da ein Reparaturgewebe mit erhöhter Mineralisation und besserer mechanischer Festigkeit gebildet wurde.

Die Auswertung der computertomographisch ermittelten Dichtewerte ergab signifikante Unterschiede in der Dichteentwicklung der untersuchten Gruppen. Nach identischen Zeitspannen nach der Implantation konnte durch die verzögerte Gabe von BMP-2 um eine bis zwei Wochen eine heterotopische Knochenneubildung beschleunigt werden, wohingegen eine um vier Wochen verzögerte BMP-Gabe die Knochenneubildung gegenüber der Kontrollseite verlangsamt. Die größten Anstiege in der Knochendichte nach einem achtwöchigen Beobachtungszeitraum nach der Implantation der Matrize wurden in der Testgruppe mit zweiwöchiger BMP-Verzögerung gefunden. Betrachtet man jedoch den Dichteanstieg in den Implantaten ab der BMP-Applikation über einen Zeitraum von acht Wochen, ergab die simultane BMP-Injektion auf der Kontrollseite die höchste Steigerung bezüglich der Knochendichte. Die einwöchige und zweiwöchige Verzögerung resultierte in annähernd gleichen, etwas niedrigeren Anstiegen und die geringste Steigerung war erneut in der Testgruppe mit vierwöchiger BMP-Verzögerung zu beobachten.

Diese Resultate geben Aufschluss über die Kinetik, die dem BMP-induzierten Knochenneubildungsprozess zu Grunde liegt. Generell bestand eine längere Verweildauer der Hydroxylapatit-Matrizen in den Testgruppen mit verzögerter Gabe von BMP als in der Kontrollgruppe. Verglichen mit den ersten 8 Wochen konnte eine simultane BMP-Gabe keine stärkere Dichtezunahme als die einwöchige und zweiwöchige BMP-Verzögerung erreichen. Nur im Vergleich mit den letzten 8 Wochen in den zwei Testgruppen verlief die Kurve bei simultaner BMP-Gabe relativ steiler. Obwohl die Testpräparate gegenüber den Kontrollpräparaten zur BMP-Gabe im Vorsprung waren, hat in der Zeit, die die Matrizen auf der Testseite länger in situ verblieben, keine Beschleunigung des Knochenneubildungsprozesses mehr stattgefunden. Eine vierwöchige Verzögerung erwies sich zu keinem Zeitpunkt als vorteilhaft für die Knochendichteentwicklung. Aufgrund des Studiendesigns konnten keine Vergleichsdaten über die Dichte in den Kontrollpräparaten nach dem gleichen Beobachtungszeitraum wie in den Testgruppen gewonnen werden. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, wann nach simultaner Gabe von BMP

ein Plateau im Dichtezuwachs erreicht wird und ob ein Unterschied zur Kinetik einer verzögerten BMP-Gabe besteht.

Die Bildanalyse der Mikroradiographiekollagen konnte keine signifikanten Unterschiede in den Testgruppen untereinander und im Vergleich mit der Kontrollgruppe hervorbringen, die gewonnenen Ergebnisse unterstützen aber die Resultate der Computertomographie. Dieses Analyseverfahren kann generell als weniger valide gegenüber der Computertomographie eingestuft werden allein aufgrund der Tatsache, dass nie das gesamte Volumen der Implantate wie in der CT-Auswertung untersucht werden konnte, sondern nur zweidimensionale Ausschnitte aus den Matrizen. Zudem war das angewendete Verfahren der manuellen Graustufendetektion nur unzureichend selektiv und ließ einen untersucherabhängigen Fehler zu. Dahingegen wurden die computertomographischen Daten ohne Kenntnis der zugehörigen Verzögerungsintervalle und Untersuchungszeitpunkte mithilfe eines klinisch bewährten Systems ausgewertet, um eine Verfälschung der Ergebnisse möglichst auszuschließen.

Die Analyse der Fluoreszenzmarkierung ergab keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Eine appositionelle Knochenneubildung hatte, wie bereits in der Pilotstudie, in allen Gruppen zwei Wochen nach der BMP-Gabe eingesetzt und war besonders stark in den darauffolgenden 21 Tagen abgelaufen, danach setzte eine weitere Knochenneubildung 6 Wochen nach BMP-Gabe ein. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Hydroxylapatit-Blöcke gute osteokonduktive Eigenschaften besitzen und der Knochenneubildung als Leitschiene dienen. Im Vergleich zum Bio-Oss®- Implantat aus dem Vorversuch konnte keine früher beginnende Knochenneubildung nachgewiesen werden, der zeitliche Ablauf war ebenfalls ähnlich.

Mit einer verzögerten BMP- Applikation konnte die überschießende ektope Knochenneubildung deutlich reduziert werden, wohingegen auf der Kontrollseite in 60 % der Fälle eine ektope Knochenneubildung stattgefunden hatte. Insbesondere der Zentralkanal schien hierbei bedeutsam. Möglicherweise verhinderte der Zentralkanal in Kombination mit einer Ummantelung der Blöcke mit kollagenem Bindegewebe, wie sie besonders in den histologischen Präparaten der Testgruppen vorgefunden wurde, ein Eindringen von BMP in das umgebende Gewebe und damit auch eine ektope Knochenneubildung.

Wie bereits in der Vorversuchsreihe konnten histologisch vitales Knochengewebe und Knochenumbauprozesse in allen Testgruppen nachgewiesen werden. Bemerkenswert war eine Neubildung von Knochengewebe auch in Poren, die einen Durchmesser deutlich unter 100 µm aufwiesen. Besonders eindrucksvoll hatte die Durchdringung des Hydroxylapatit-Gerüsts nach einer zweiwöchigen BMP-Verzögerung und nach einer simultanen Applikation stattgefunden. Stellenweise schien eine Biodegradation mit Substitution des Knochenersatzmaterials durch neugebildetes Knochengewebe begonnen zu haben. Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu der in der Literatur vertretenen Ansicht, dass in Poren mit einem Durchmesser kleiner als 100 µm kein Einwachsen von Knochengewebe möglich wäre (Eppley et al. 2005) und unterstreichen die Eignung eines im 3-D-Druckverfahren hergestellten Hydroxylapatit-Scaffolds zur Knochenzüchtung in vivo. Dem Material kann in der vorliegenden Studie eine gute Biokompatibilität und Osseointegration bescheinigt werden, wie auch kürzlich in einer Materialuntersuchung mit Bio-Oss® und TCP als Vergleichsmaterial von Warnke und Mitarbeitern 2010 festgestellt wurde. Desweiteren konnte auch unter physiologischen Belastungen kein Verlust der mechanischen Integrität wie bei der Verwendung von Bio-Oss® im Vorversuch festgestellt werden. Die mittlere Dichte des gesinterten Hydroxylapatits lag bereits anfangs deutlich über den Werten der Bio-Oss®-Blöcke. Studien attestieren gesinterten Keramiken eine höhere Osteokonduktivität, da osteogene Zellen diese mit einer höheren Proliferations-, Differenzierungs- und Wachstumsrate besiedeln (Villareal et al. 1998).

Untersuchungen zum Weichgewebsaufkommen in den Testgruppen belegten im Gerüst stets eine gute bindegewebige Auffüllung der interkonnektierenden Poren unabhängig vom Zeitpunkt der BMP-Gabe. Auch der Zentralkanal war zumeist bindegewebig aufgefüllt, wies aber selten eine vollständige Durchbauung des Lumens mit neuem Knochenmaterial auf. Die Fluoreszenzmikroskopie belegt ebenfalls, dass die Knochenneubildung immer ihren Ausgang vom Hydroxylapatitgerüst nahm.

Die Einsprossung von Gefäßen hatte wie im Vorversuch von der Peripherie her stattgefunden, im Zentralkanal konnten mithilfe der Immunhistochemie kaum Blutgefäße nachgewiesen werden. Dennoch stellt der Zentralkanal für zukünftige Studien eine Möglichkeit dar, ein zentrales Gefäß zur Anastomosierung an das Gefäßsystem des Transplantatlagers zu beherbergen.

Sowohl im Vorversuch als auch im Hauptversuch konnte durch eine Applikation von rhBMP-2 vier Wochen nach der Gerüstimplantation keine Verbesserung der heterotopen Knochenzüchtung erreicht werden. Die Analyse der Mikroradiographie-Präparate ergab, dass eine Knochenneubildung in den meisten Fällen nur in den Randbereichen des Zentralkanals stattgefunden hatte. Ein Fall von ektope Knochenneubildung kann möglicherweise auf eine versehentliche BMP-Injektion außerhalb der Zentralkanals zurückgeführt werden. Da die Osteoinduktion nur in unmittelbarer Nähe der BMP-Injektionsstelle auftrat, ist davon auszugehen, dass kein BMP in ausreichender Konzentration in die Poren der Blöcke gelangen konnte, vermutlich durch eine komplette Auffüllung dieser Poren mit Weichgewebe. Diese Beobachtung zeigt zudem, dass sich in der osteokonduktiven Matrize nur nach Zusatz eines osteoinduktiven Materials wie Bone morphogenetic proteins neuer Knochen gebildet hatte.

Wenn es gilt, nach Implantation einer Hydroxylapatit-Matrize innerhalb einer Zeit von 8 Wochen eine größtmögliche Knocheninduktion zu erzielen, hat sich eine um zwei Wochen verzögerte BMP-Injektion als bester der getesteten vier Applikationszeitpunkte erwiesen. Auch eine einwöchige Verzögerung der BMP-Gabe resultierte über diesen Zeitraum in einer stärkeren Beschleunigung des Osteoinduktionsprozesses als in der Kontrollgruppe mit simultaner BMP-Gabe bei Implantation der Hydroxylapatit-Blöcke. Diese Ergebnisse sind erstaunlich angesichts der geringeren Kontaktzeit mit Bone Morphogenetic Protein in den Testgruppen. Im Gegensatz zu den Kontrollproben konnte keine ektope Knochenneubildung in diesen Testgruppen nachgewiesen werden, was auf eine alleinige BMP-Akkumulation in der Matrize bei den zwei Testgruppen schließen ließ. Da es unter dieser Annahme nicht zu einem Konzentrationsverlust des BMPs kam, konnte das osteoinduktive Potenzial der verabreichten BMP-Lösung in diesen Testgruppen effektiver genutzt werden als in der Kontrollgruppe, in der 11 von 18 Proben eine ektope Knochenformation aufwiesen. Eine Abgrenzung des Knochenersatzmaterials zum Milieu der Weichgewebetasche durch eine in vielen histologischen Präparaten vorgefundene bindegewebige Ummantelung hat vermutlich maßgeblich dazu beigetragen, dass das injizierte BMP hauptsächlich im Implantat verblieb.

Betrachtet man jedoch eine Zeitspanne von 8 Wochen mit der BMP-Applikation als Ausgangspunkt, konnte in der Kontrollgruppe die höchste Knochenneubildungsrate nachgewiesen werden. Sowohl eine einwöchige als auch eine zweiwöchige BMP-

Verzögerung konnte keine vergleichbar starke Beschleunigung des Osteoinduktionsprozesses bewirken. Als Ursache wurde eine Sättigungscharakteristik in der Kinetik der BMP-induzierten Osteoinduktion bei verzögerter BMP-Gabe angenommen. Eine zweiwöchige und eine einwöchige BMP-Verzögerung konnte somit zwar in den ersten Wochen eine bessere Beschleunigung der heterotopen Knochenbildung bewirken, auf längere Sicht hin folgte aus einer simultanen BMP-Gabe aber eine höhere Knochenneubildungsrate. Eine Ursache für diese abflauende Osteoinduktion in den Testgruppen kann die „Abschottung“ des Implantats gegenüber der umgebenden Muskulatur durch die bindegewebige Ummantelung darstellen, obgleich diese zur Verringerung einer ektopen Knochenbildung potenziell vorteilhaft war. In der Literatur wurde die osteogene Potenz von Zellen, die aus dem Muskelgewebe stammen, vielfach betont und eine intramuskuläre Endokultivierung daher favorisiert (Okubo et al. 2000). Eine bindegewebige Trennung der Kompartimente würde die Rekrutierung pluripotenter Stammzellen erschweren, wodurch die Stagnation der Osteoinduktion in den Testgruppen auch zu erklären wäre.

Die Hypothese, die der vorliegenden Studie zugrunde liegt, berücksichtigt nicht die Bedeutung modulierender Faktoren der Bone Morphogenetic Proteins für die Signaltransduktion. Die Beeinflussung der BMP-Wirkung durch Mediatoren ist noch unzureichend erforscht. Bekannt ist jedoch, dass Faktoren wie Entzündungsmediatoren und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in der Lage sind, die BMP-Antwort zu verstärken (Deckers et al. und Street et al. 2002). Neben einer Positivregulation der BMP-Wirkung wird auch eine negative Beeinflussung durch noch unbekannte Mediatoren postuliert (Groeneveld & Burger 2000). Wodurch die BMP-Signaltransduktion in dieser Studie beeinflusst wurde, ist mit dem momentanen Kenntnisstand nicht abzusehen.

Aufgrund des bilateralen Versuchsmodells liegen keine Daten für die Kontrollgruppe über den gleichen Zeitraum wie in der Testgruppe vor. Zusätzlich kann methodenkritisch eine negative Beeinflussung der Kapazität des Modells durch den deutlich geringeren Probenumfang in den Testgruppen (je 6 Proben gegenüber 18 Kontrollproben) eingewendet werden. Durch den größeren Datenumfang in der Kontrollgruppe konnten sich die einzelnen Werte im Mittel weniger auswirken als in den Testgruppen.

Generell darf das Resultat eines Tierversuchs nie uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Auch wenn die Ratte als Versuchstier durchaus ein geeignetes Modell darstellt, um die intramuskuläre Endokultivierung von Knochenersatz zu untersuchen, bestehen erhebliche Abweichungen gegenüber dem menschlichen Knochenstoffwechsel. Der Knochenmetabolismus ist zwar bei Ratten ebenfalls durch Wachstum und Umbauprozesse gekennzeichnet, wobei die Knochenresorption und das Remodeling mit dem des Menschen vergleichbar sind (Cesnjaj et al. 1991), jedoch findet die Knochenneubildung erheblich stärker statt als im menschlichen Organismus. Dadurch ist es in Studienmodellen wie diesem möglich, innerhalb eines verhältnismäßig kurzen Versuchszeitraums eine quantifizierbare Knochenneubildung zu beobachten, allerdings muss im Menschen mit einer deutlich langsameren Wachstumsgeschwindigkeit gerechnet werden.

Bezüglich der klinischen Anwendbarkeit einer heterotopen Knochenzüchtung mit verzögerter BMP-Gabe muss auch auf eine grundsätzliche Schwäche dieser Methode hingewiesen werden: der Notwendigkeit eines zweiten Eingriffs zur BMP-Applikation mit damit verbundener Morbidität. Mithilfe eines Zentralkanals kann die BMP-Injektion jedoch minimalinvasiv durchgeführt werden.

Die aus dieser Studie gezogenen Schlüsse legen nahe, dass in zukünftigen Studien auch über eine Modifikation des Porenvolumens im Hydroxylapatit-Körper nachgedacht werden sollte. Neben Makroporositäten, die ein Einwachsen von Weichgewebe erlauben, könnten zur besseren BMP-Verteilung auch Mikroporositäten angelegt werden, in die Weichgewebe nicht eindringen kann.

Das Modell des Zentralkanals hat sich insgesamt zur Reduktion der überschießenden Knochenneubildung außerhalb der Matrizen als vorteilhaft herausgestellt. Um die Diffusionsstrecke für die BMP-Lösung zu verringern, kann insbesondere in größeren Matrizen ein System aus mehreren miteinander verbundenen Kanälen erfolgversprechender als ein einziger Kanal im Zentrum sein. Unter Berücksichtigung von Remodeling-Vorgängen und einer bis zum Versuchsende andauernden Knochenneubildung muss auch über eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums in zukünftigen Studien nachgedacht werden, um Aussagen zur Kinetik des Osteoinduktionsprozesses für die verschiedenen Applikationszeitpunkte treffen zu können.



## 5. Zusammenfassung

Aufgrund der Bedeutsamkeit der osteogenen Potenz von hämatopoetischen Zellen für das Bone Engineering in vivo wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine BMP-Gabe in vorimplantierte Matrizen mit Weichgewebs- und Gefäßeinsprossung die Knochenneubildung verbessern könne. Im Rahmen einer Pilotstudie an 6 Lewis-Ratten konnte die Endokultivierung heterotopen Knochens auf dem Musculus latissimus dorsi unter Verwendung von Bio-Oss-Matrizen durch eine Verzögerung der rhBMP-2-Applikation jedoch nicht verbessert werden. Daraufhin kam im Hauptversuch ein im dreidimensionalen Druckverfahren industriell gefertigtes Hydroxylapatit-Implantat zum Einsatz, das neben einer besseren Stabilität eine Eignung zum computergestützte Design eines individuellen Knochenersatzes für komplexe skelettale Defekte besitzt. Ein genormter Porendurchmesser versprach eine gleichmäßigere Knochenneubildung und ein Zentralkanal sollte das Einbringen des BMPs im Rahmen einer verzögerten Gabe erleichtern.

Im Hauptversuch wurde in 18 Lewis-Ratten die intramuskuläre Endokultivierung heterotopen Knochens nach sofortiger BMP-Applikation und um eine, zwei und vier Wochen verzögerter BMP- Gabe evaluiert. Über einen kürzeren Zeitraum führten die ein- und zweiwöchige Verzögerung der BMP-Gabe zu besseren Resultaten, doch auf längere Sicht war die Knochenneubildung nach simultaner BMP-Gabe überlegen. Einschränkend ist zu sagen, dass auch eine vermehrte ektope Knochenneubildung nach simultaner BMP-Applikation stattgefunden hatte. Die BMP-Injektion nach vier Wochen Einheilzeit hat sich in dieser Studie nicht vorteilhaft ausgewirkt. Das eingewachsene Weichgewebe schien eine Verteilung der nachträglich injizierten BMP-Lösung zu verhindern. Während der Einheilphase hatte sich in den Testgruppen zudem eine bindegewebige Ummantelung des Implantats ausgebildet. Die osteogene Potenz der Muskulatur, die man sich bei der Knochenkultivierung zu Nutze machen wollte, wurde so möglicherweise beschränkt. Ein Zentralkanal zur kontrollierten Injektion einer BMP-Lösung konnte sich jedoch in der Studie bewähren und zeigte histologisch auch in Mikroporen eine hervorragende Durchdringung mit neuem Knochengewebe. Insgesamt kam ein Vorimplantieren des Knochenersatzmaterials zu einem ähnlichen Resultat wie die simultane Implantation von BMP und Matrize, wobei durch Modifikationen des Matrizendesigns in zukünftigen Studien auch möglicherweise bessere Ergebnisse durch eine verzögerte BMP-Gabe zu erreichen sind.

## 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(4), 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
- Artico, M., Ferrante, L., Pastore, FS., Ramundo, EO., Cantarelli, D., Scopelliti, D., et al.** (2003): Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature. *Surg Neurol.* 60, 71-79.
- Axelrad T.W., Einhorn, T. A.** (2009): Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine & growth factor rev.* 20, 481- 488.
- Bauer, T.W.** (2007): Bone graft substitutes. *Skeletal. Radiol.* 36, 1105-1107
- Betz, O.B., Betz, V.M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., Vrahas, M.S., Bouxsein, M.L., and Evans, C.H.** ( 2007): Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.* 14, 1039
- Bishop, G. B. , Einhorn T. A.** (2007): Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma. *Int Orthop.* 31(6): 721– 727.
- Bosch, P., Musgrave, D.S., Lee, J.Y., Cummins, J., Shuler, T., Ghivizzani, T.C., Evans, T., Robbins, T.D., Huard, J.** (2000): Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res.* 18, 933-44
- Cao, G., O'Brien, C.D., Zhou, Z., Sanders, S.M., Greenbaum, J.N., Makrigiannakis, A., DeLisser, H.M.** (2002): Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol* 282, C1181- C1190
- Celeste, A.J., Iannazzi, J.A., Taylor, R.C., Hewick, R.M., Rosen, V., Wang, E.A. & Wozney, J.M.** (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9843-9847
- Cesnjaj ,M., Stavljenić, A., Vukicević, S.** (1991): In vivo models in the study of osteopenias. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* Apr. 29(4), 211- 219
- Chen, N.F., Smith, Z.A., Stiner, E., Armin, S., Sheikh, H., Khoo, L.T.** (2010): Symptomatic ectopic bone formation after off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in transforaminal lumbar interbody fusion. *J Neurosurg Spine.* 12 (1): 40- 6.

**Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y., He, T.C.** (2004): Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 85-A(8), 1544-1552 (2003) Erratum in: *J Bone Joint Surg Am.* 86-A(1), 141

**Constantino, P.D., Freidman, C.D.** (1994): Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am* 27: 1037—73.

**Cypher, T.J., Grossman, J.P.** (1996): Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35, 413- 7

**Deckers, M.M., van Bezooijen, R.L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W.** (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545-1353

**Doherty, M.J., Ashton, B.A., Walsh, S., Beresford, J.N., Grant, M.E., Canfield, A.E.** (1998): Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 13, 828- 38

**Eppley, B. L., Pietrzak, W. S., Blanton, M. W.** (2005): Allograft and Alloplastic Bone Substitutes: A Review of Science and Technology For the Craniomaxillofacial Surgeon. *J Craniofac Surg* 16 (6), 981- 989

**Finkemeier, C.G.** (2002): Bone-grafting and bone graft substitute. *J Bone Joint Surg -Am* 84-A: 454– 464

**Frost, H.M.** (1969): Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3, 211 – 237

**Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E.** (2005): Bone substitutes: An update. *Injury* 36, Suppl. 3, 20- 7

**Graff, J.M., Bansal, A. & Melton, D.A.** (1996): Xenopus Mad proteins transducer distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* 85, 479– 487

**Granjeiro, J.M., Oliveira, R.C., Bustos-Valenzuela, J.C., Sogayar, M.C., Taga, R.** (2005): Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res* 38 (10), 1463-1473

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

**Hanada, K., Dennis, J.E. & Caplan, A.I.** (1997): Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 12, 1606– 1614

**Hollinger, J.O., Uludag, H., and Winn, S.R.** (1998): Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev.* 31, 303

**Inoda, H., Yamamoto, G., and 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

**Issa, J.P., Bentley, M.V., Iyomasa, M.M., Sebald, W., and De Albuquerque, R.F.** (2008): Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat Histol Embryol.* 37, 181

**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(3),315- 23

**Jensen, S.S., Aaboe, M., Pinholt, E.M., Hjørting-Hansen, E., Melsen, F., Ruyter, I.E.** (1996): Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 11(1), 55- 66

**Jung, R.E., Glauser, R., Schärer, P., Hämmerle, C.H.F., Sailer, H.F., Weber, F.E.** (2003): Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized, controlled clinical and histomorphometric study. *Clin Oral Impl Res.* 14, 556- 568

**Karageorgiou, V., Tomkins, M., Fajardo, R., Meinel, L., Snyder, B., Wade, K., Chen, J., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D.L.** (2006): Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res. A* 78, 324

**Katagiri, T., Akiyama, S., Namiki, M., Komaki, M., Yamaguchi, A., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T.** (1997): Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and Myogenin. *Exp Cell Res* 230, 342– 351

**Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yoshiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S. & Suda, T.** (1990): The non osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 295– 299

**Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T.** (1994): Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *Pathobiology* 127, 1755– 1766

**Levine, J.P., Bradley, J., Turk, A.E., Ricci, J.L., Benedict, J.J., Steiner, G., Longaker, M.T., McCarthy, J.G.** (1997): Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit. *Ann Plast Surg.* 39(2), 158- 168.

**Levy, M.M., Joyner, C.J., Viridi, A.S., Reed, A., Triffitt, J.T., Simpson, A.H., Kenwright, J., Stein, H., Francis, M.J.** (2001): Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone* 29, 317- 22

**Linde, A. & Hedner, E.** (1995): Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int* 56, 549– 553

**Massague, J.** (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597– 641

**Nakagawa, T., Sugiyama, T., Kamei, T., Murata, T., Tagawa, T.** (2001): An immuno-light- and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Arch Oral Biol* 46, 403– 411

**Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, I.I., Lymanm S., Paddock, C., Muller, W.A.** (1990): PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219- 1222

**Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Iizuka, 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

**Padgett, R.W., Cho, S.H. & Evangelista, C.** (1998): Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling. *Pharmacol Ther* 78, 47– 52

**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

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

**Ripamonti, U., Van Den Heever, B., Sampath, T.K., Tucker, M.M., Rueger, D.C. & Reddi, A.H.** (1996): Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13, 273- 289

**Ruhe, P.Q., Hedberg, E.L., Padron, N.T., Spauwen, P.H., Jansen, J.A., and Mikos, A.G.** (2003): RhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J.Bone Joint Surg.Am.* 85-A, Suppl 3, 75

**Saito, N., Okada, T., Horiuchi, H., Ota, H., Takahashi, J., Murakami, N., Nawata, M., Kojima, S., Nozaki, K., and Takaoka, K.** (2003): Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* 32, 381

**Seeherman, H., Li, R., Boussein, M., Kim, H., Li, X.J., Smith-Adaline, E.A., Aiolova, M., and Wozney, J.M.** (2006): RhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site

healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J. Bone Joint Surg. Am.* 88, 144

**Seitz, Hermann** (2008): Dreidimensionales Drucken von patientenindividuellem Knochenersatz. *Forum für Rapid Technologie*, 5. Ausgabe, 5

**Service, R.F.**(2000): Tissue engineers build new bone (news). *Science* 289, 1; 498- 500.

**Shirota, T., Schmelzeisen R., Orno, K., Michi, K. I.** (1995): Experimental reconstruction of mandibular defects with vascularized iliac bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg.* 53, 566– 571

**Skowronski, P.P., An, Y.H.** (2003): Bone graft materials in orthopaedics. *MUSC Orthopaed J* 6, 58–66

**Springer, I.N., Terheyden, H., Geiss, S., Härle, F., Hedderich, J., Acil, Y.** (2004): Particulated bone grafts-effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 15(2),205- 212

**Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V. Jr., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A., Filvaroff, E.H.** (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9656- 966

**Sun, W., Starly, B., Nam, J., Darling, A.** (2005): Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering. *Comput Aided Des* 37 (11), 1097- 1114

**Terheyden, H., Jepsen, S., Vogler, S., Tucker, M.M., Rueger, D.C.** (1997): Recombinant human osteogenic protein-1 (rhBMP-7) in the rat mandibular augmentation model; differences in bone morphology are dependent on the type of carrier. *Mund Kiefer Ges Chir* 1, 272- 277

**Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., Rueger, D.R.** (2001)a: 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(5), 373- 379

**Terheyden, H., Warnke, P.H., Dunsche, A. et al.** (2001)b: Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: Transplantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30, 469– 478

**Turhani, D., Weissenbock, M., Stein, E., Wanschitz, F., and 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

**Urist, M. R.** (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893- 899.

**Vehof, J.W., de Ruijter, A.E., Spauwen, P.H., and Jansen, J.A.** (2001): Influence of rhBMP-2 on rat bone marrow stromal cells cultured on titanium fiber mesh. *Tissue Eng* 7, 373

**Vehof, J.W., Takita, H., Kuboki, Y., Spauwen, P.H. und Jansen, J.A.** (2002): Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 61, 440

**Villareal, D.R., Sogal, A., Ong, J.L.** (1998): Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. *J Oral Implantol* 21(2), 67– 73

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

**Wang, E.A., Rosen, V., D’Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I.** (1990): Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2220–2224

**Warnke, P.H., Seitz, H., Warnke, F., Becker, S.T., Sivananthan, S., Sherry, E., Liu, Q., Wiltfang, J., Douglas, T.** (2010): Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: Characterization and biocompatibility investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* Epub Jan 2010

**Warnke, P.H., Springer, I. N. G., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P. A. J., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., Terheyden, H.** (2004): Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364, 766– 770

**Warnke, P.H., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M. et al.** (2006): Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27(17), 3163- 3167

**Warnke, P.H., Springer, I.N., Acil, Y., Julga, G., Wiltfang, J., Ludwig, K., Russo, P.A., Sherry, E., Sivananthan, S., Hedderich, J., Terheyden, H.** (2006): The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials* 27, 1081– 1087

**Woo, B. H., Fink, B. F. et al.** (2001): Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 18, No. 12

**Wozney, J.M.** (1989): Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1, 267– 280

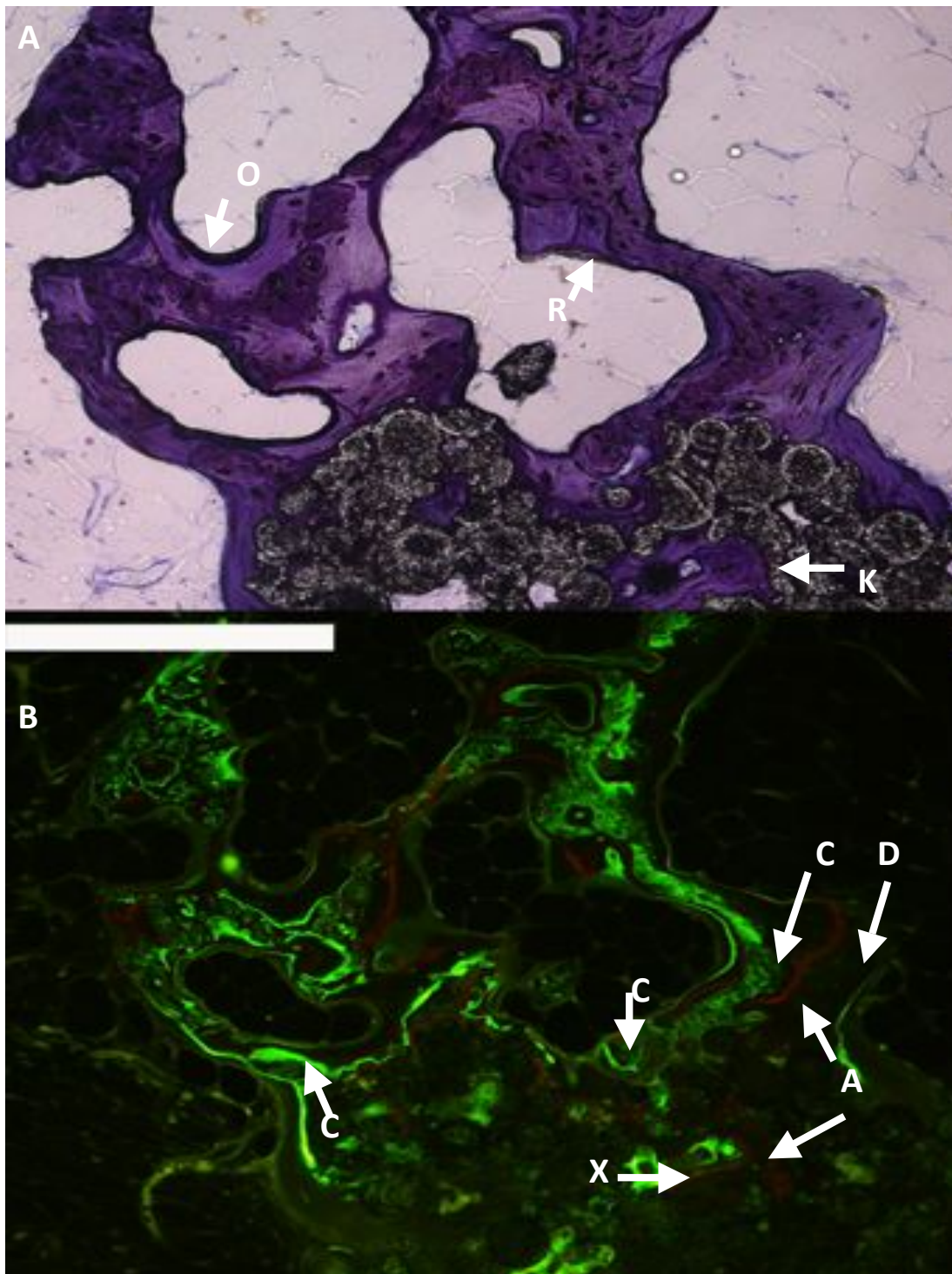
**Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A.** (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528– 1534.

**Yamaguchi, .A, Ishizuya, T., Kintou, N., Wada, Y., Katagiri, T., Wozney, J.M., Rosen, V. & Yoshiki, S. (1996):** Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 366– 371

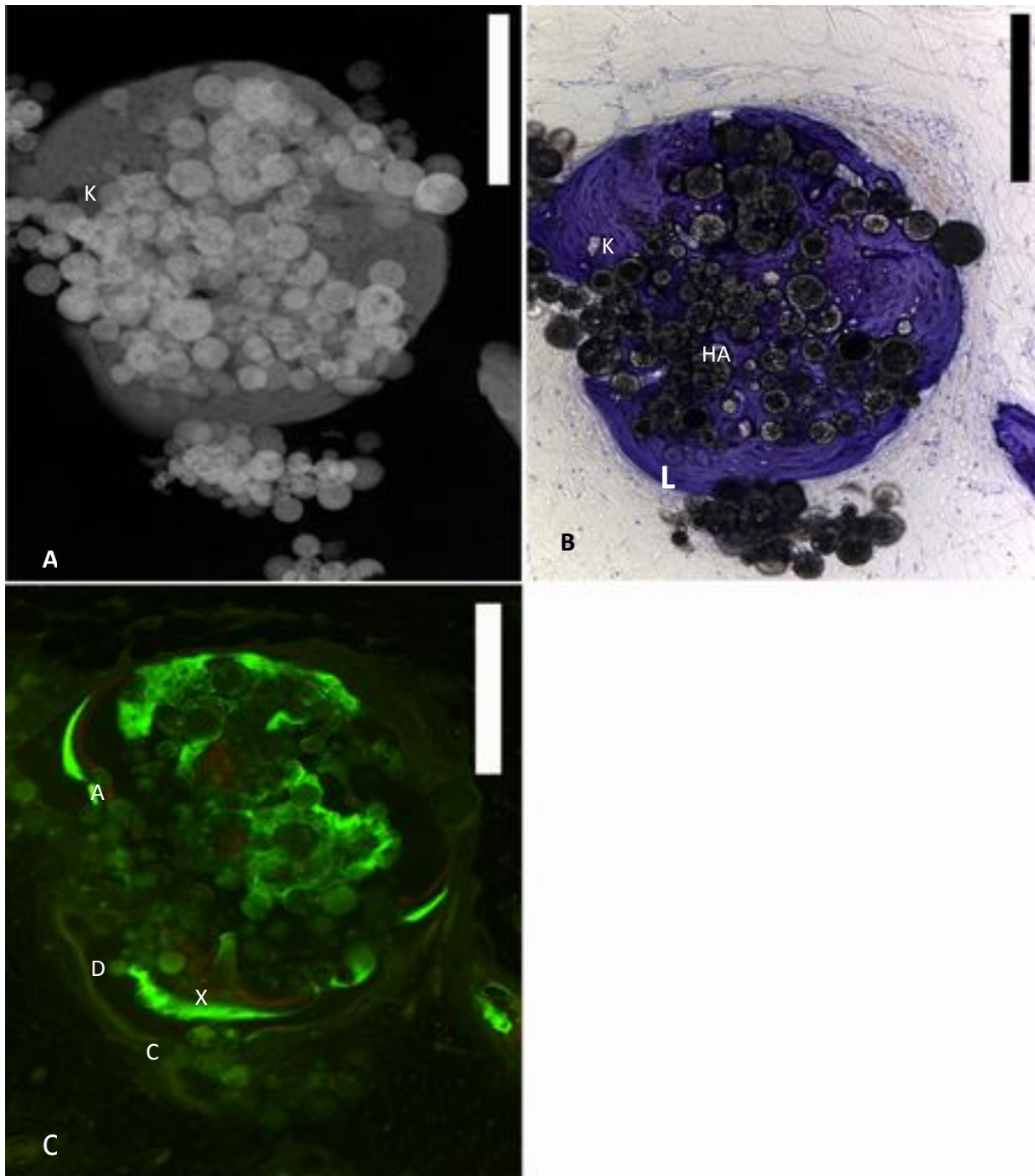
**Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y.& Iizuka, T. (1998):** Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 26, 112– 115



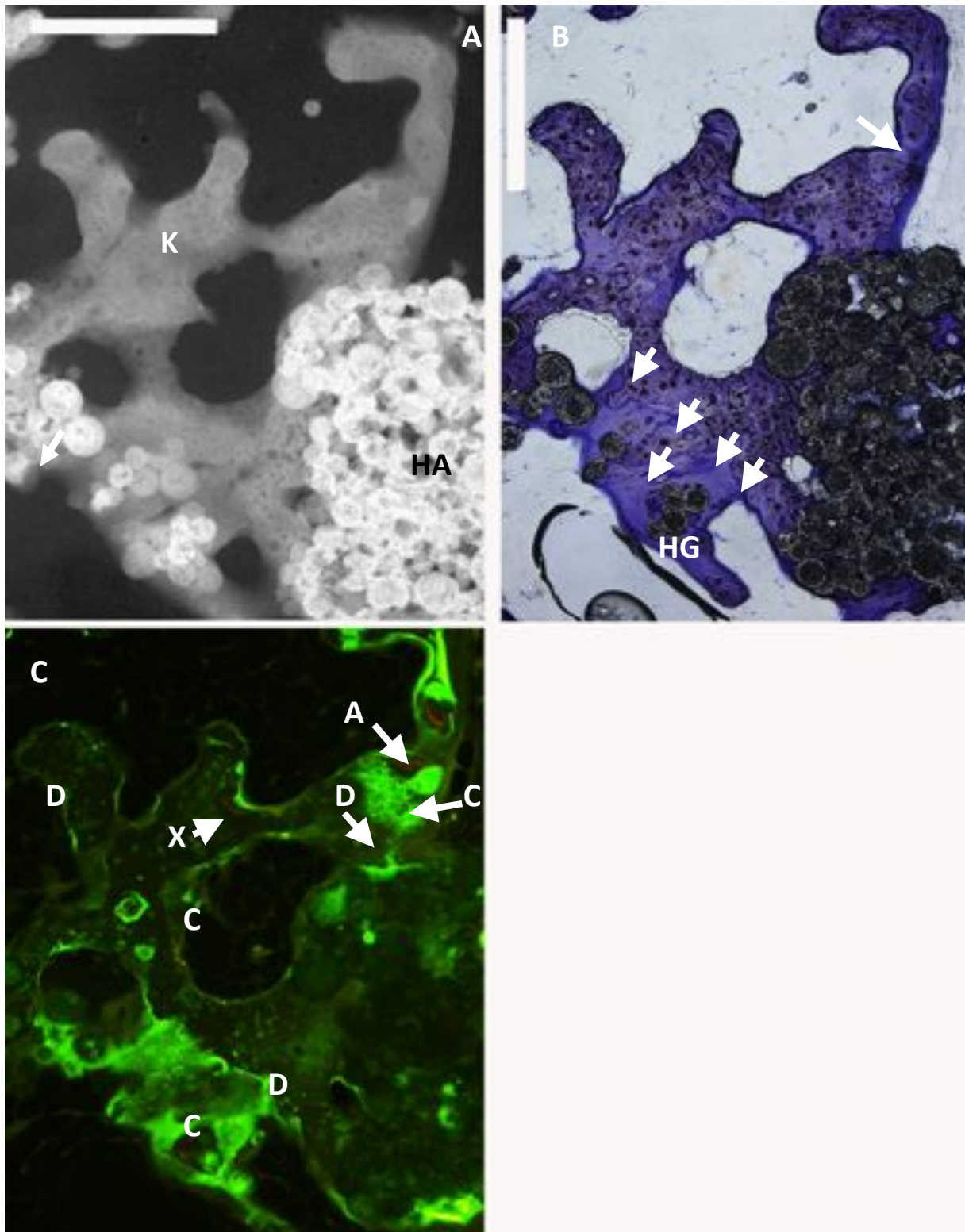
## 7. Bildanhang



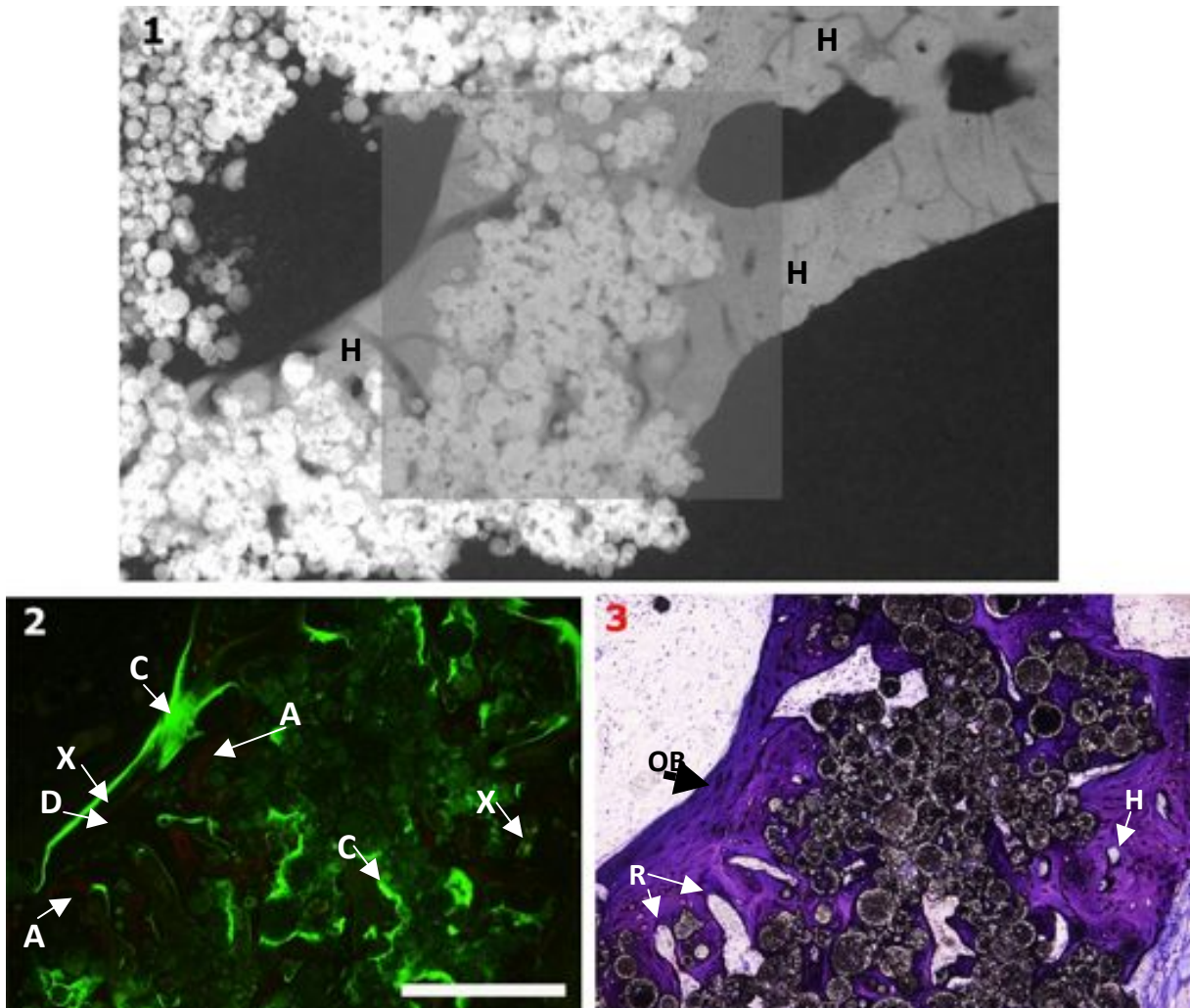
**Abbildung 14:** 4-Wochen-Verzögerungsgruppe. A: Toluidinblaufärbung. Neuer Knochen ist violett angefärbt, Hydroxylapatit-Material schwarz. Osteoidablagerung (O), eine bereits remineralisierte Resorptionslakune (R) sowie die Durchbauung des Hydroxylapatits mit neuem Knochen (K) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. B : Fluoreszenzmikroskopie. Einlagerungen von Xylenol Orange (X), Calcein Grün (C), Alizarin (A) und Doxycyclin (D) sind mit beschrifteten Pfeilen markiert. Balkenlänge: 200µm.



**Abbildung 15:** Im Bild A (Mikroradiographie) stellt sich der neugebildete Knochen (K) dunkler dar als Hydroxylapatit (HA). Im Bild B (Toluidinblau- Färbung) Aufbau des neugebildeten Knochens in konzentrischen Lamellen (L). Die in Bild C (Fluoreszenzmikroskopie) zu erkennenden Fluorochrom-Einlagerungen sind mit Pfeilen markiert (X = Xylenol Orange, C= Calcein Grün, A= Alizarin, D= Doxycyclin). Balken= 200 $\mu$ m.



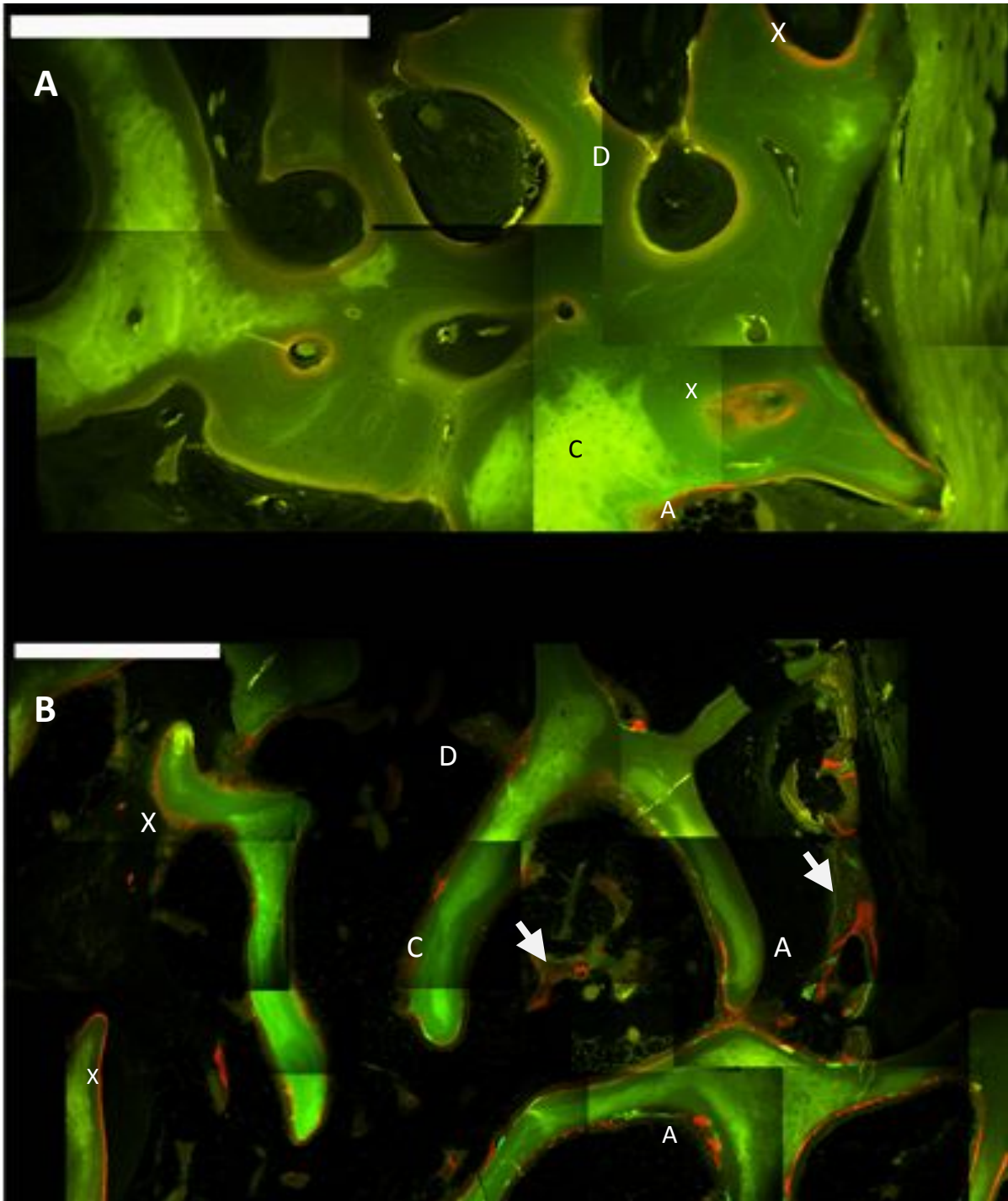
**Abbildung 16:** Korrespondierende Areale eines Präparates mit einwöchiger BMP-Verzögerung. Der Maßstab umfasst 200µm. **Bild 1:** Mikroradiographie. Neugebildeter Knochen (K) Hydroxylapatit (HA). **Bild 2:** Toluidinblau-Färbung. Mit Pfeilen markiert: Grenzen der Mineralisationsschichten, komplett von Knochen umgebene Hydroxylapatit-Granula (HG). **Bild 3:** Fluoreszenzmikroskopie. Einlagerungen von Calcein-Grün (C) in der 7. Wochen nach BMP-Gabe auf mit Doxycyclin (D) markierte Bereiche. Im Bereich des Zusammentreffens der Mineralisationsfronten ist eine Alizarin-Einlagerung (A) zu erkennen. Xylenol Orange(X) ist nur in geringem Umfang eingelagert worden.



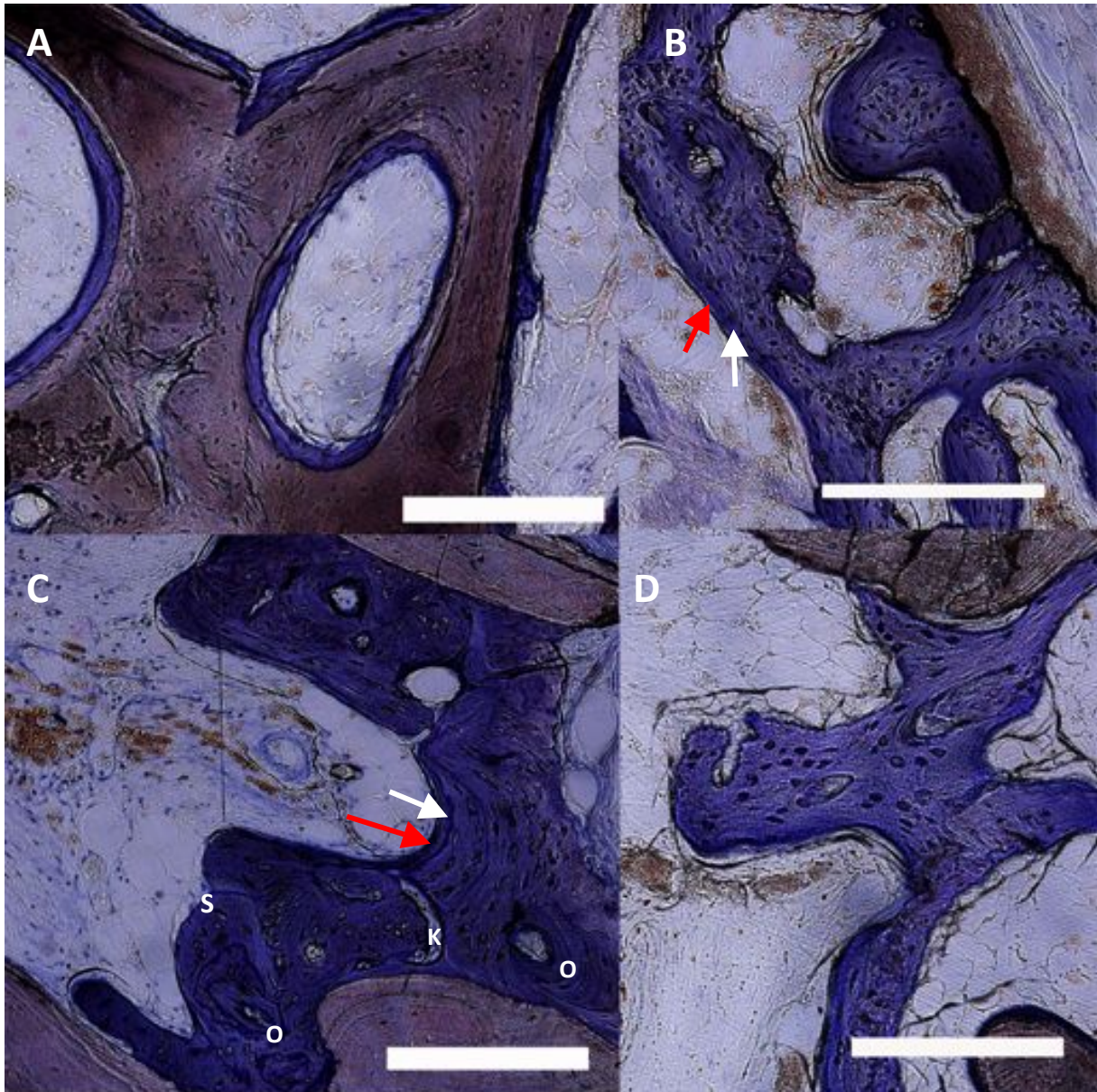
**Abbildung 17:** Ein beispielhafter Ausschnitt aus einem Präparat der Kontrollgruppe mit simultaner BMP-Gabe. Bild 1: Die Mikroradiographie dient der Übersicht über das Areal, dem die Detailansichten entstammen (grau unterlegter Bereich). Bild 2: Fluoreszenzmikroskopie. Die verschiedenen Fluorochrom-Einlagerungen sind mit Pfeilen markiert (X = Xylenol Orange, C= Calcein Grün, A= Alizarin, D= Doxycyclin). Im Bild 3 (Toluidinblaufärbung) sind besonders hervorzuheben: Haverssche Systeme (H), Resorptionslakunen (R) und eine osteoblastenreiche jüngere mineralisierte Schicht (OB). Der Maßstab entspricht einem Abschnitt von 200 $\mu$ m.



**Abbildung 18:** Wundheilungsstörungen über den rechten Implantaten 4 Wochen nach Implantation mit teilweiser Implantatfreilegung.



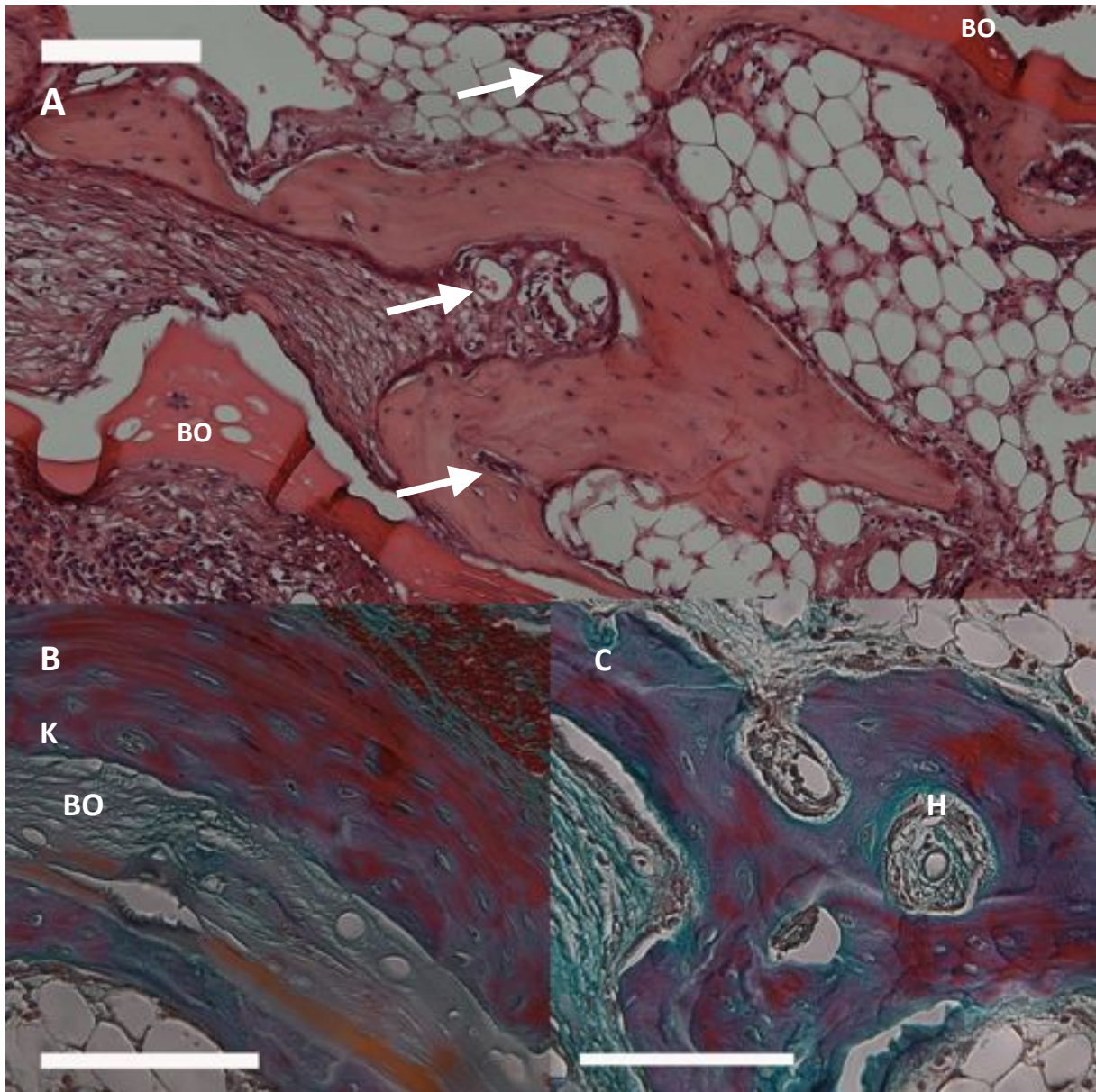
**Abbildung 19:** Fluoreszenzmikroskopie der Präparate eines Tieres, im oberen Ausschnitt ist BMP verzögert gegeben worden (linke Tierseite), im unteren wurde mit der Implantation des Bio-Oss-Blocks BMP verabreicht. Der weiße Balken entspricht einem Abschnitt von 500 $\mu$ m im Präparat, die Vergrößerung ist im Bild A größer als im Bild B. Die Fluorochrome sind folgendermaßen gekennzeichnet: (X) Xylenol Orange, (C) Calcein Grün, (A) Alizarin, (D) Doxycyclin. Die Affinität des Bio-Oss $\text{®}$  zu Calcein Grün ist deutlich sichtbar, im Vergleich beider Präparate zeigt sich eine geringe Einlagerung von Doxycyclin und Xylenol Orange bei verzögerter BMP-Gabe und eine gute Ausbildung von Banden aller 4 Fluorochrome im auf das Bio-Oss $\text{®}$ -Material aufgelagerten Knochengewebe. Die Pfeile weisen auf eine intertrabekuläre Knochenneubildung hin.



**Abbildung 20:** Detailansichten der Toluidinblau-Färbungen. Der weiße Balken entspricht einem Ausschnitt von 200 µm im Präparat. Die Bilder A und B sind exemplarische Einzelausschnitte für die simultane Gabe von BMP, die Bilder C und D stammen aus Präparaten mit verzögerter BMP-Gabe. Das Bio-Oss®-Gerüst stellt sich braun dar, das mineralisierte Gewebe ist blau angefärbt. In allen Bildausschnitten können Osteozyten im Knochengewebe identifiziert werden.

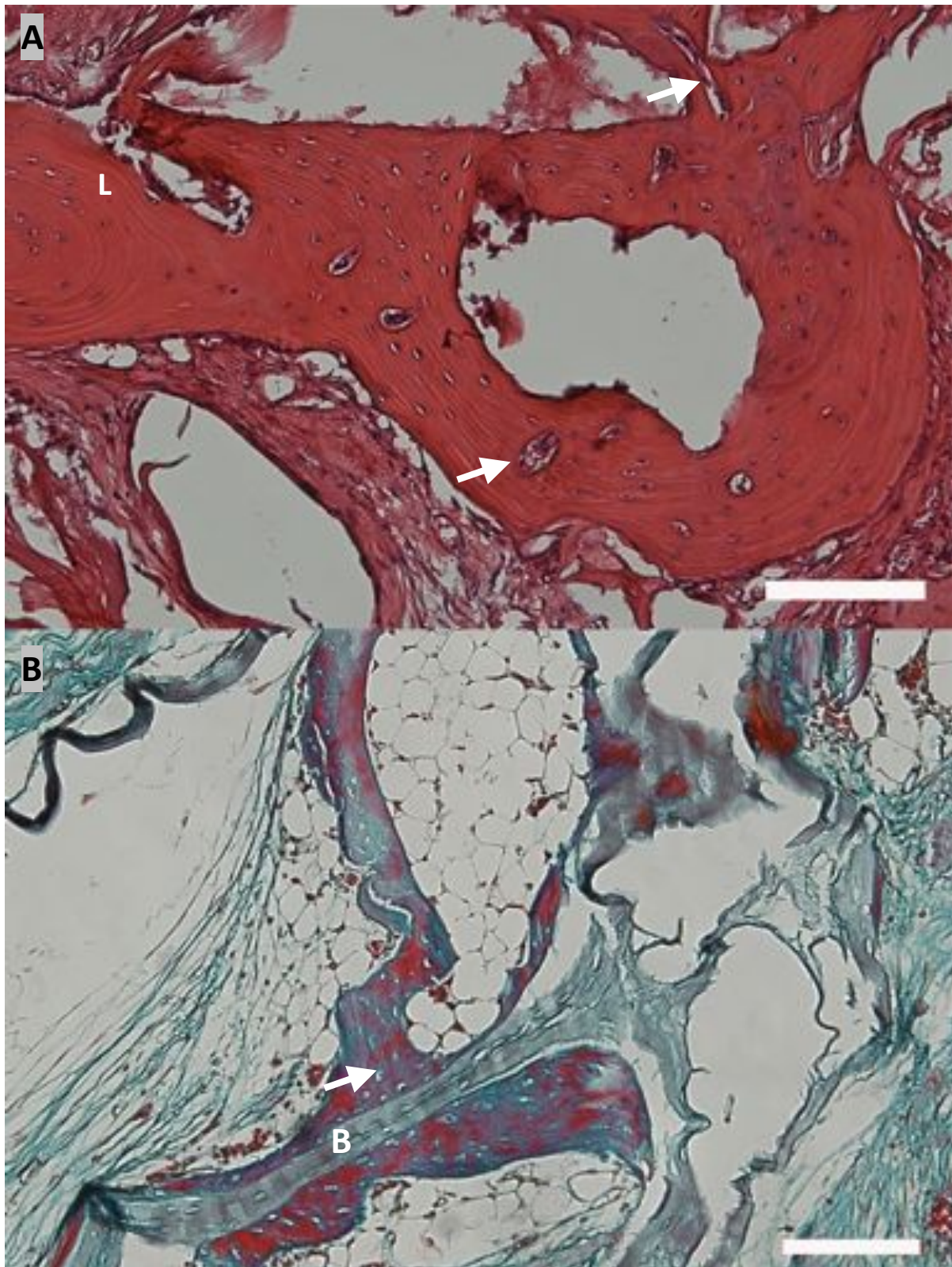
Im Bild A ist ein Areal angeschnitten, in dem die Osteogenese direkt auf dem Knochenersatzmaterial stattgefunden hat, Bild B zeigt einen Bereich von Knochengewebe, das sich im Randbereich des Blockes gebildet hat. Ein Aufbau aus einer äußeren Lage aus noch unvollständig mineralisiertem Material (roter Pfeil) und gefolgt von einer Zellschicht flacher Osteoblasten sowie einer inneren mineralisierten Matrix mit Osteozyten ist hier erkennbar. Auch im Ausschnitt C wird auf diesen strukturellen Aufbau mit Pfeilen hingewiesen.

Der Osteoinduktionsprozess hat, wie im Ausschnitt C, in einigen Bereichen der Präparate kompakte Strukturen mit bereits ausgebildeten Osteonen (O) und einem Kanalsystem (K) hervorgebracht. Zusätzlich sind auf diesem Bild scharf begrenzte Schichten (S) im mineralisierten Gewebe zu finden. Im Bild D sind ebenfalls Zeichen eines Knochenumbaus zu sehen.

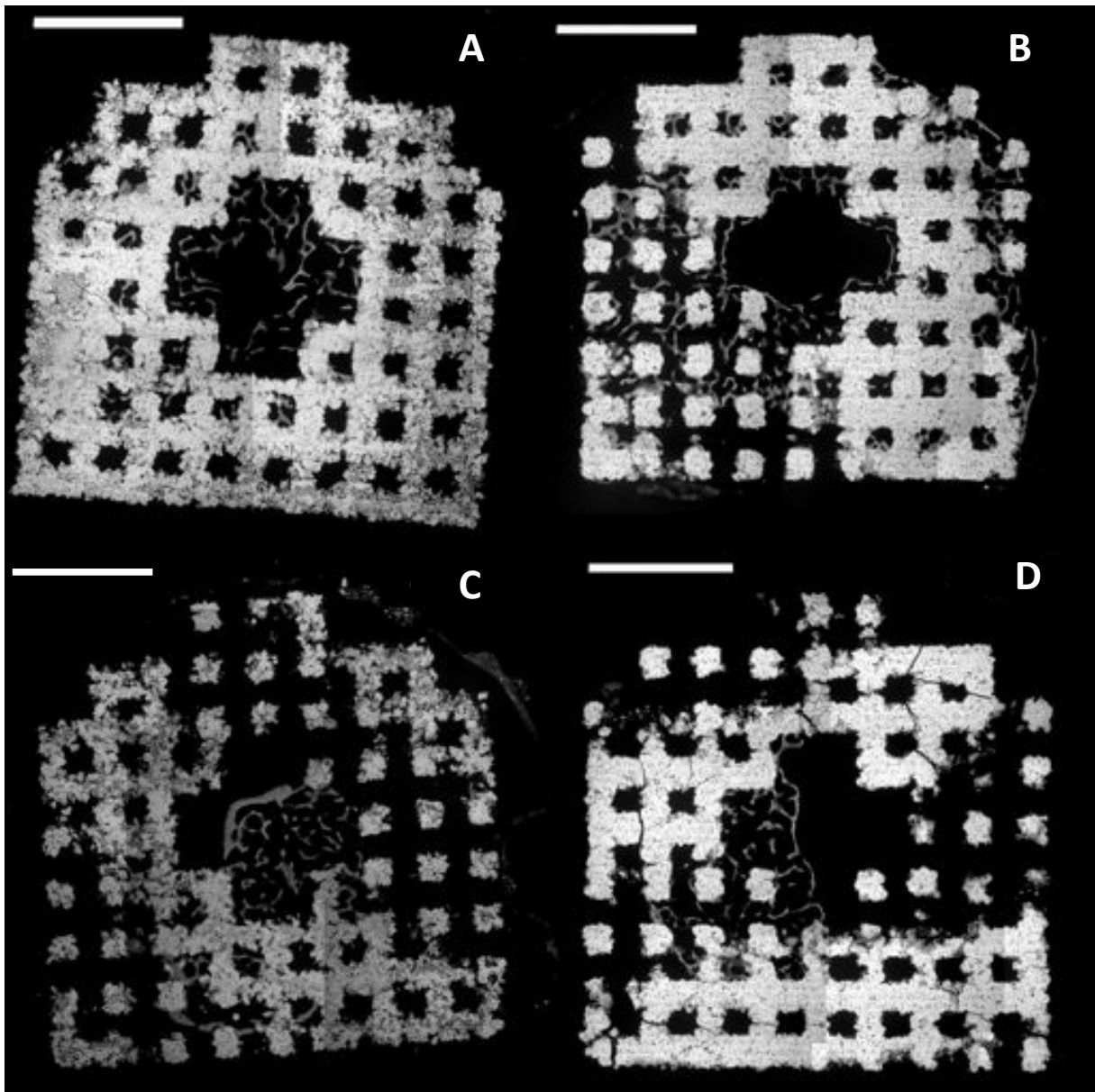


**Abbildung 21:** Zusammenstellung einiger Paraffinschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Masson-Goldner-Färbung bei simultaner BMP-Gabe. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$  im Präparat. Bild A: In der HE-Färbung ist das Knochengewebe (K) heller rot gefärbt als das Bio-Oss®-Material (BO). Das Implantat weist eine Durchbauung mit kollagenem Bindegewebe und Fettgewebe auf und einige kleine Blutgefäße sind angeschnitten (Pfeile). Bild B: Der Knochen ist violett gefärbt, das Bio-Oss®-Material grün. Die Osteozyten im Knochengewebe sind gut zu erkennen. Bild C: Im Knochengewebe ist ein Haversscher Kanal (H) mit zentralem Blutgefäß vorhanden. Bild B und C Masson-Goldner-Färbung.

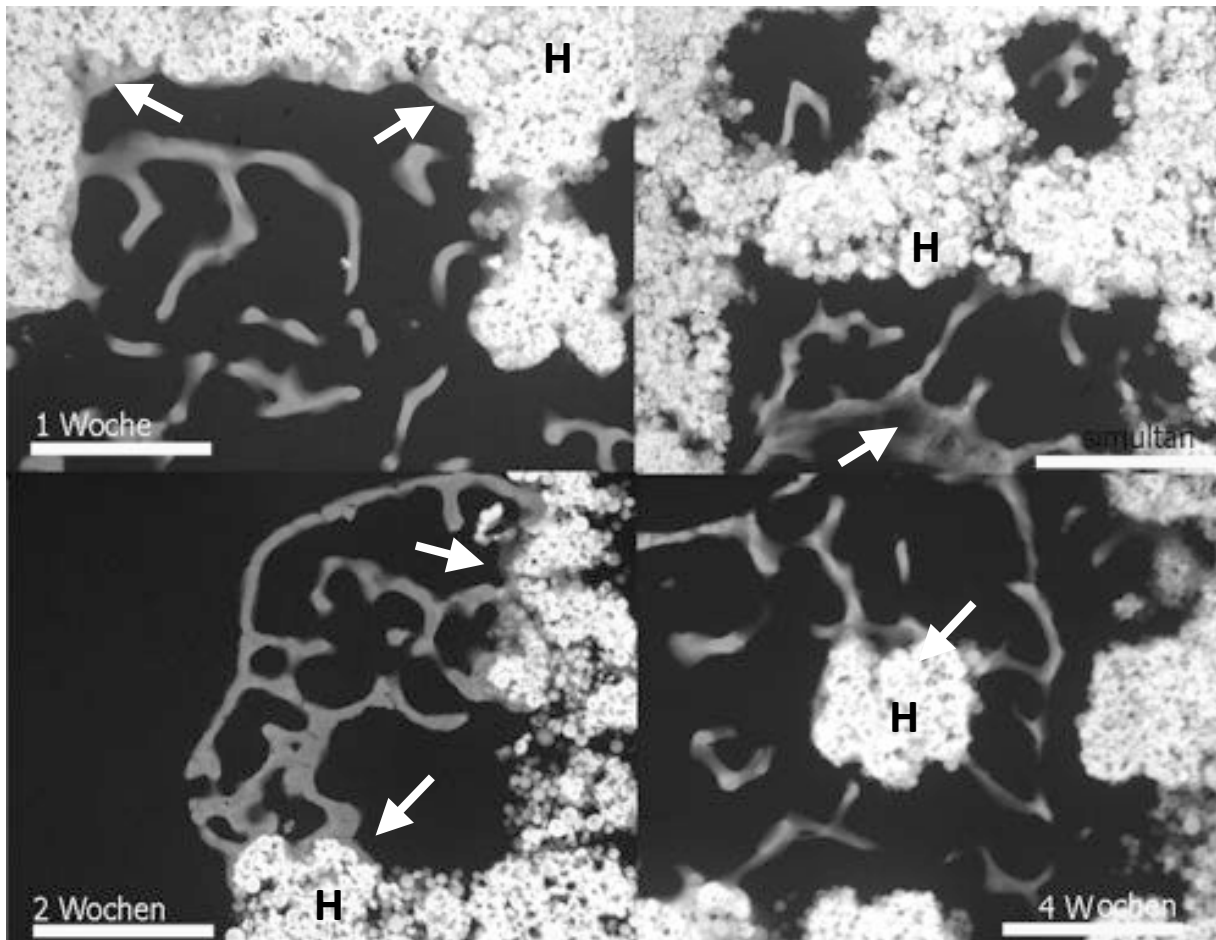




**Abbildung 22:** Zusammenstellung zweier Paraffinschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Masson-Goldner-Färbung bei verzögerter BMP-Gabe. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$  im Präparat. Bild A: Intertrabekuläre Knochenneubildung mit lamellärer Struktur (L), umgeben von Bindegewebe. Die Pfeile weisen auf Gefäßanschnitte hin. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Bild B: Bio-Oss-assoziierte (B) Knochenneubildung mit umgebender Gefäßversorgung (Pfeil). Masson-Goldner-Färbung.



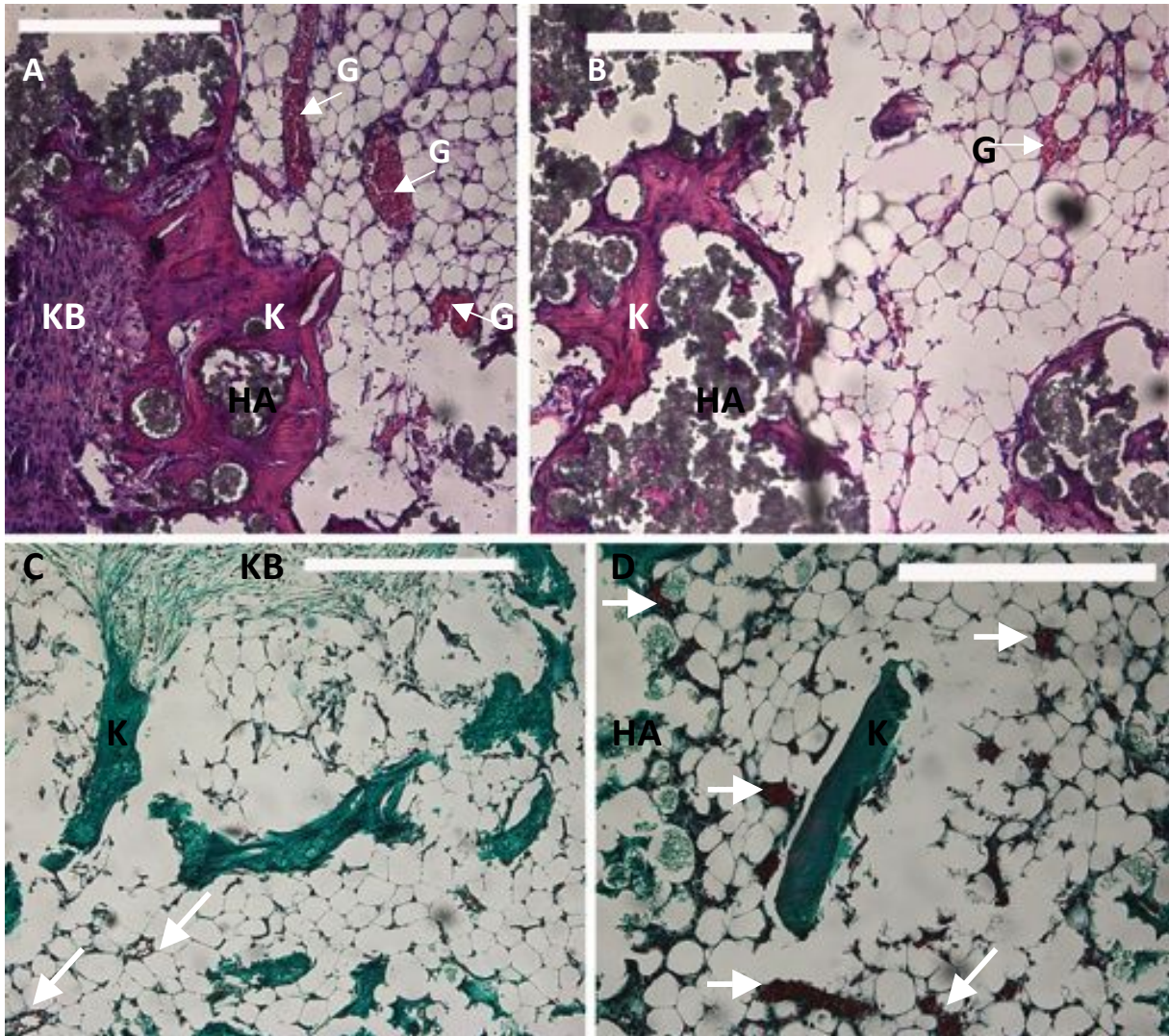
**Abbildung 23:** Darstellung einer repräsentativen Mikroradiographiekollage aus jeder Gruppe. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 2 mm im Präparat. A: Präparat der Gruppe mit einwöchiger Verzögerung. B: Präparat der Kontrollgruppe als Referenz. C: Präparat aus Testgruppe mit Gabe von BMP um 2 Wochen verzögert. D: Testgruppe mit BMP-Applikation 4 Wochen verzögert.



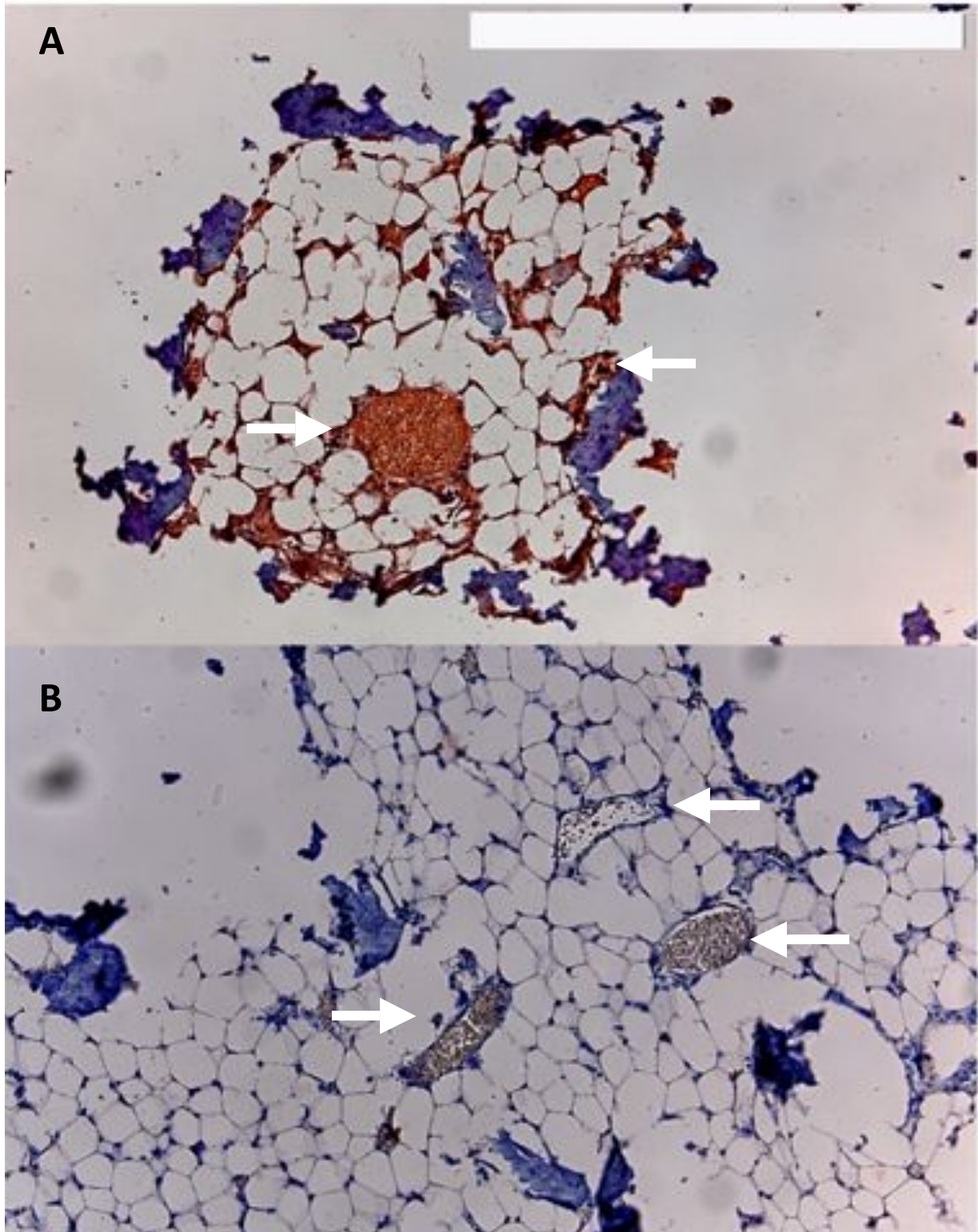
**Abbildung 24:** Ausschnitte aus den Mikroradiographien jeder Gruppe. Der weiße Balken entspricht einem Abschnitt mit der Länge von 500 µm im Präparat. Der neu gebildete Knochen stellt sich dunkel dar, das Hydroxylapatit-Gerüst erscheint als helle, aus vielen runden Makroteilchen bestehende Struktur (gekennzeichnet mit H). Die Pfeile weisen auf eine direkte Auflagerung des mineralisierten Gewebes auf des Hydroxylapatit hin.



**Abbildung 25:** Paraffinschnitte der 4 verschiedenen Präparategruppen, dargestellt als Übersichtskollagen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die weißen Balken entsprechen 2mm-Abschnitten im Präparat. Neugebildeter Knochen ist violett gefärbt, Bindegewebe blau, Muskelgewebe rot und Hydroxylapatit schwarz. Bild A: Präparat aus der einwöchigen Verzögerungsgruppe, im Randbereich sind Anteile des Musculus latissimus dorsi zu erkennen (Pfeile). Eine Knochenneubildung ist sowohl in den Poren des Gerüsts als auch im Zentralkanal (ZK) nachzuweisen. Bild B: Präparat aus der Kontrollgruppe, gut zu erkennen ist die Ausfüllung des Zentralkanals (ZK) mit Bindegewebe sowie die Ummantelung des Implantats mit kollagenem Bindegewebe (Pfeile). Am unteren linken Bildrand ist ein Anteil des Muskelgewebes angeschnitten (M). Im gesamten Präparat ist neugebildeter Knochen zu erkennen. Bild C: Präparat aus der Zwei-Wochen-Verzögerungsgruppe. Im Zentralkanal (ZK) hat sich trabekuläres Knochengewebe gebildet, der Großteil der Poren im Gerüst weist jedoch keine Knochenneubildung auf. Auch dieses Präparat ist vollständig von Bindegewebe durchzogen und umkleidet. Bild D: BMP wurde 4 Wochen nach Implantation der Matrice verabreicht. Eine Knochenneubildung hat nur ganz vereinzelt stattgefunden, das Präparat ist bis auf das Innere des Zentralkanals gut von Bindegewebe durchdrungen.



**Abbildung 26:** Ausgewählte Paraffinschnitte in Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Masson-Goldner-Färbung der 4 Versuchsgruppen. Ein Abschnitt von 200 µm ist jeweils durch einen weißen Balken ausgewiesen. Bild A: Einwöchige BMP-Verzögerung. Neugebildetes Knochengewebe erscheint dunkelrot, Bindegewebe blau-violett. Neugebildetes Knochengewebe (K) ist umgeben von zellreichem kollagenem Bindegewebe (KB) und Fettgewebe (F). Blutgefäße sind mehrfach angeschnitten (G). Einige Hydroxylapatit-Granula sind in das Knochengewebe integriert worden (HA). Bild B: simultane BMP-Gabe in der Kontrollgruppe. Das Hydroxylapatit ist mit neuem Knochengewebe durchbaut, in der Umgebung sind Blutgefäße und Fettgewebe zu erkennen. Bild 1 und 2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Bild C: BMP wurde zwei Wochen nach Implantation der Matrize gegeben. Das mineralisierte Gewebe stellt sich grün dar, Kollagen erscheint ebenfalls grün. Auch hier sind Anschnitte von Blutgefäßen im Weichgewebe zu erkennen (Pfeile). Bild D: Ansicht einer Pore im Hydroxylapatit (HA) mit einem Strang neugebildeten Knochengewebes im Zentrum, der von versorgenden Gefäßen umgeben ist (Pfeile). Bild 3 und 4 Masson-Goldner-Färbung.



**Abbildung 27:** Ausgewählte Paraffinschnitte in immunhistologischem Antikörpernachweis mit PECAM-1-Färbung. Ein Abschnitt von 200  $\mu\text{m}$  ist durch einen weißen Balken ausgewiesen. Blutgefäße sind mit Pfeil gekennzeichnet. Bild A: zweiwöchige BMP-Verzögerung mit Antikörpernachweis gegen Oberflächenstruktur CD-31 auf Endothelzellen. Neugebildetes Knochengewebe erscheint blau, Endothelien stellen sich braun dar. Bild B: Zweiwöchige BMP-Verzögerung, Färbung ohne Zusatz von PECAM-1 als Negativkontrolle.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. P. Warnke möchte ich für die freundliche Vergabe dieses interessanten Themas und für die intensive persönliche Betreuung und Beratung bei der Abfassung dieser Dissertation, die sogar über die halbe Weltkugel funktionierte, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dr. S. Becker für das große Engagement und die großartige Unterstützung hinsichtlich der Planung und Versuchsdurchführung sowie für die vielen nützlichen Anmerkungen und Korrekturen beim Verfassen dieser Arbeit.

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

Herrn Prof. Dr. Y. Acil danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die freundliche Betreuung in allen Fragen, die die Präparateherstellung und die Histologie betrafen.

Herrn Dr. T. Nitzsche danke ich für die kompetente und engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau G. Neßenius, MTA, danke ich für die freundliche Anleitung zur Anfertigung histologischer Präparate und stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. J. Hedderich möchte ich meinen Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung ausdrücken.

Herr Prof. Dr. G. Schultheiß und seinen Mitarbeitern danke ich für die fachliche Beratung bezüglich des Umgangs mit den Versuchstieren und die Sicherstellung einer qualifizierten Betreuung der Tiere während der Versuchsphase.

Meinem Lebenspartner und Mitdoktoranden, Herrn Oliver Krapf, habe ich ganz besonders zu danken für all die Hilfe und die produktive Zusammenarbeit in vielen gemeinsamen Stunden. Du warst mir auch in dieser beruflichen Angelegenheit immer eine wunderbare Stütze und stets die letzte Instanz!

Frau Babett Weigel und Frau Nathalie Käser möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und das immer sehr nette Miteinander danken.

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

Bei der Europäischen Union möchte ich mich für die Finanzierung dieser Studie im Rahmen des MyJoint-Projektes (FP-6 NEST 028861) bedanken.

**Lebenslauf**

Name:	Kristina Schünemann	
Geburtsdatum:	28. Juni 1985	
Geburtsort:	Schönebeck/Elbe	
Schulausbildung:	August 1991 - Juni 1995	Grundschule in Tetenbüll
	August 1995 - Juni 2004	Nordseegymnasium St. Peter in St. Peter-Ording
	September 2000 - Dezember 2000	Auslandsaufenthalt mit Schulbesuch in London
	Juni 2004	Abitur mit Auszeichnung für hervorragende Leistungen im Fach Physik durch die Deutsche Physikalische Gesellschaft. Note: 1,3.
Studium:	Oktober 2004 - Dezember 2009	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  Vorphysikum: sehr gut,  Physikum: sehr gut,  Staatsexamen: sehr gut
Anstellung:	Dezember 2006 - Februar 2007	Anstellung als studentische Hilfskraft für den Präparierkurs am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
	seit Januar 2010	Assistenz Zahnärztin in der Praxis Dr. Hautz, Husum
Wissenschaft:	seit November 2007	Promotionsarbeit an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Publikationen:	Januar 2010	Endocultivation: Does delayed application of BMP improve intramuscular heterotopic bone formation? Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery (2010) 38, 54- 59