

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-,
Gesichtschirurgie der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.med. Dr.med. dent. J. Reuther

**Knochenregeneration mit rhBMP-2 und
unterschiedlichen Trägermaterialien -
Biomechanische, fluoreszenzmorphometrische und
radiomorphometrische Untersuchungen
im Rattenmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Oliver Liebl
aus Marktheidenfeld

Würzburg, Juli 2004

Referent : Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

Koreferent : Prof. Dr. med. dent. A. Renk

Dekan : Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2005

Der Promovend ist Zahnarzt

In Gedenken an meine Mutter

1	Einleitung	1
1.1	<i>Entwicklung und Historie der Knochenersatzmaterialien</i>	1
1.2	<i>Grundstruktur des Knochengewebes</i>	2
1.3	<i>Knochenbildung</i>	5
1.4	<i>Osteogene Reparatur</i>	7
	1.4.1 <i>Osteokonduktion – zellvermittelte Osteogenese</i>	7
	1.4.2 <i>Osteoinduktion</i>	7
1.5	<i>Wachstumsfaktoren und „Bone morphogenetic Proteins“</i>	9
1.6	<i>Knochenersatzmaterialien</i>	12
	1.6.1 <i>Einteilung der Knochenersatzmaterialien</i>	13
	1.6.2 <i>Übertragbarkeit von Infektionserregern</i>	16
2	Problemstellung	19
3	Material und Methode	20
3.1	<i>Rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2)</i>	20
3.2	<i>Defekte kritischer Größe („Critical sized defects“)</i>	20
3.3	<i>Defektmodelle</i>	21
3.4	<i>Trägermaterialien</i>	22
	3.4.1 <i>Insoluble Collagenous Bone Matrix: ICBM</i>	22
	3.4.2 <i>Hydroxylapatit: HA</i>	23
	3.4.3 <i>α-Tricalciumphosphat: α-TCP</i>	23
	3.4.4 <i>Algipore[®]</i>	23
	3.4.5 <i>BioOss[®]</i>	24

3.4.6	<i>Bioglas</i>	24
3.4.7	<i>Kollagen</i>	25
3.4.4	<i>Ethisorb[®]</i>	25
3.5	<i>Vitalfärbung mit Fluorochromen</i>	26
4	Untersuchungsmethoden	28
4.1	<i>Herstellung der Trenn-Dünnschliffpräparate</i>	28
4.2	<i>Mikroradiographie</i>	31
4.3	<i>Polychrome Sequenzmarkierung</i>	33
4.4	<i>Halbautomatische Auswertung mit ImageSXM[®] v1.62</i>	35
4.5	<i>Biomechanische Untersuchungen</i>	37
4.5.1	<i>Drei-Punkt-Biegeversuch Grundlagen</i>	37
4.5.2	<i>Drei-Punkt-Biegeversuch Durchführung</i>	41
4.6	<i>Statistische Auswertung</i>	44
5	Ergebnisse	45
5.1	<i>Mikroradiographie</i>	45
5.2	<i>Polychrome Sequenzmarkierung</i>	54
5.3	<i>Drei-Punkt-Biegeversuch</i>	57
6	Diskussion	60
7	Zusammenfassung	89
8	Übersicht der verwendeten Abkürzungen	91
9	Literaturverzeichnis	93

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Historie

Die Entwicklung der rekonstruktiven Knochenchirurgie reicht bis in das 17. Jahrhundert zurück. 1668 soll der Chirurg *Job van Meekeren* bei einem Russen die erste erfolgreiche Schädeldachplastik mit einem xenogenen Transplantat einer Hundekalotte durchgeführt haben [1]. *V. Walter* führte 1821 die erste, im Schrifttum belegte, autogene Knochentransplantation durch, er versorgte einen Schädeldefekt mit dem bei der Trepanation gewonnenen Knochenmaterial [2]. Seit 1859 untersuchte *Ollier*, in tierexperimentellen Studien, verschiedene Möglichkeiten schlecht heilende Frakturen und Knochendefekte mit Knochentransplantaten zu sanieren. Er prägte die Begriffe autogene, allogene, xenogene Knochentransplantate. *Ollier* vermutete Zellen mit osteogenetischer Potenz im Periost des Transplantates welche eine Knochenneubildung fördern. Aufgrund dieser Forschungsgrundlagen wird *Ollier* heute als Begründer der klassischen Osteoblastenlehre bezeichnet [3]. 1923 verwendete *Hegedus*, als vermutlich einer der Ersten, autogene Knochenspäne als Transplantate im Mund,- Kiefer, Gesichtsbereich [4]. Mit Einführung der modernen Tiefkühltechnik um 1950 durch *Inclan* [5], *Bush* und *Garber* [6] fand die allogene Knochentransplantation weite Verbreitung. Seither sind zahlreiche unterschiedliche Methoden und Knochenersatzmaterialien beschrieben worden. Heute sind Transplantate essentielle Bestandteile in der Behandlung von Frakturen und in der Wiederherstellungschirurgie. Bei ca. 15% der Operationen in der Wiederherstellungschirurgie des Bewegungsapparates und etwa 50% der rekonstruktiven Eingriffe am Ohr werden Knochentransplantate eingesetzt [7, 8]. Allein in den USA werden pro Jahr über 300000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt [9, 10]. In Deutschland werden ca. 25000 allogene Transplantate und ca. 71000 autologe Transplantate pro Jahr zur Defektauffüllung verwendet [11, 12]. Nach *Pfeiffer et al.* stieg die Zahl freier

Hartgewebstransplantate in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie in 28 Jahren um das 3,5fache an [13].

1965 konnte durch *Urist et al.* in Tierexperimenten nachgewiesen werden, dass demineralisierter Knochen (DBM) nach intramuskulärer Implantation eine Knochenbildung induziert [14, 15]. *Urist* stellte bei weiteren Untersuchungen im Jahr 1973 fest, dass sogenannte Knochenmatrixgelatine eine noch weit höhere induktive Kraft aufweist. Er erkannte, dass sich in der Matrix osteoinduktive Proteine befinden müssen, die er als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnete. BMPs induzieren die Proliferation und Differenzierung pluripotenter Mesenchymzellen in knochen- und knorpelbildende Zellen (vgl Kapitel 1.3) [16, 17].

Bislang konnten über 40 verschiedene BMPs isoliert, charakterisiert und gentechnisch hergestellt werden [18]. Einige der bisher bekannten BMPs liegen in geringer Konzentration im Knochengewebe vor. Die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit durch die gentechnische Herstellung der BMPs eröffnet neuen Therapiekonzepten Einzug in die plastische und rekonstruktive Knochenchirurgie.

1.2 Grundstruktur des Knochengewebes

Knochen besteht aus einem netzartigen Verband von spezialisierten Zellen. Im Interzellularraum findet sich das für Knochengewebe charakteristische Osteoid (Knochengrundsubstanz oder Matrix). 4 Zellgruppen sichern die physiologische Funktion des Knochengewebes. Der Osteoblast ist für die Bildung von Knochengewebe verantwortlich, der Osteoklast baut Knochensubstanz ab, Osteocyten und sogenannte Bone-Liningzellen sichern die Stabilität und Funktion des Knochens als Mineralspeicher und Strukturelement.

Der Osteoblast:

Die Osteoblasten entstammen mesenchymalen Vorläuferzellen. Aus dem Stromazellsystem des Knochenmarks entwickeln sich die so genannten Präosteoblasten als Präcursorzelle. Diese Zellen siedeln sich vermehrt an einer durch Osteoklasten umgebauten Endostoberfläche des Knochens an und werden zu Osteoblasten transformiert.

Hauptprodukt der Osteoblasten ist das Typ-I Kollagen. Weitere Syntheseprodukte sind Osteocalcin und Osteonectin, welches als Glykoprotein die Mineraldeposition an die Kollagenfibrille fördert und unterhält. Die vernetzten Typ-I-Kollagenstrukturen bilden ein ideales Gerüst zur Einlagerung von Mineralien. Makromoleküle wie Osteocalcin und Osteonectin begünstigen den Kristalleinbau und die Kristallfixation in die Kollagenmatrix und bestimmen die biochemischen und biomechanischen Eigenschaften des Knochens.

Zytokine üben auf die Osteoblasten und deren Wechselwirkung mit dem neu gebildeten Osteocytensystem agonistische und antagonistische Effekte aus, die sich direkt auf die Menge des gebildeten Hartgewebes auswirken. Makromoleküle, (z.B. Osteocalcin) bedingen die Kristallgröße und damit das Wachstum der Gewebestrukturen. Auch für alle osteoklastisch und antiosteoklastisch wirkenden Substanzen weisen die Osteoblasten Rezeptoren auf. Hier sind vor allem die antiosteoklastisch wirkenden systemische Hormone zu nennen.

Parathormone (PTH) bewirken eine Vergrößerung der Osteoblasten und steigern die Synthese von Peptidasen, Kollagenasen und Plasminogenaktivator-Inhibitoren, womit der Remodellingprozeß erhöht wird. D-Hormon kann antiproliferativ oder, in niedriger Dosis, proliferativ wirksam sein. Es regt die Differenzierung der Präcursorzellen zu reifen Osteoblasten an und erhöht die Produktion von Osteocalcin und dem Plasminogen-Aktivator. Retinoide (Vitamin A) bremsen das Wachstum begünstigen aber die Differenzierung des Osteoklasten und die Ausprägung des D-Hormonrezeptors. Gray konnte 1989 Östrogenrezeptoren an Osteoblasten nachweisen, durch deren Aktivierung sowohl die TGF- β -, als auch die IGF-II-Synthese nachweislich stimuliert

werden konnte. Glukokortikoide hemmen die Bildung von Kollagen, nichtkollagenen Proteinen (NCP), Osteocalcin und dem Plasminogen-Aktivator. Progesteron bindet an Teile des Glukokortikoidrezeptors an den Osteoblasten und es wird diskutiert ob es so in der Lage ist die Wirkung der Glukokortikoide kompetitiv zu hemmen. Das Plasminsystem steuert die Osteoblastenaktivität über eine Art Proteasen-Fließgleichgewicht zwischen Inhibition und Aktivierung.

Ein weiterer effektiver Regulationsmechanismus für die Osteoblastenfunktion besteht in den lokal wirkenden Wachstumsfaktoren und den so genannten BMPs [19].

Der Osteoklast:

Osteoklasten stammen aus Vorläuferzellen der Monocyten-Makrophagen-Linie. Sie besitzen mehrere Kerne und sind in der Lage Phosphatasen zu bilden und zu lagern. Mit Hilfe des Ektoenzym alkalische Phosphatase (AP) sind die Osteoklasten in der Lage Knochen enzymatisch abzubauen. Beim Abbau entstehen sogenannte How'shipsche Lakunen. Osteoklasten nehmen eine zentrale Rolle beim Knochenwachstum und dem Remodellingprozeß ein.

Die Bindung der Osteoklasten an die Knochenmatrix wird über phosphorylierte Proteine, wie z.B. Bone-Sialo-Protein (BSP), Osteopodin, Osteonectin oder Thrombospondin, vermittelt. Die Knochenmatrix besteht aus einem Netz von Typ-I-Kollagenfibrillen mit zwischengelagerten Hydroxylapatitkristallen aus unlöslichem tertiärem Calciumphosphat. Diese beiden Strukturen sind als „Verbundwerkstoff“, ähnlich dem Stahlbeton, verantwortlich für die Zugfestigkeit und die Kompressionskraft des Knochengewebes. Osteoklasten lösen sowohl die anorganische Komponente als auch die Kollagenfibrille und die nichtkollagenen Proteine (NCP) der Knochenmatrix auf. Im sauren Milieu der Resorptionslakunen findet die Degradation der Kollagenfibrillen und anderer Proteine statt. Dieser Abbau ist nicht auf die Anwesenheit einer Kollagenase gebunden sondern wird hauptsächlich durch den niedrigen pH-Wert und die hohe Calciumkonzentration in den How'shipschen Lakunen bedingt [20].

1.3 Knochenbildung

Die überwiegende Anzahl der Knochen des menschlichen Skelettes werden knorpelig vorgebildet (chondrale Ossifikation), während in den Belegknochen des Schädels und in der Clavicula eine desmale Ossifikation stattfindet.

Chondrale Ossifikation:

Bei der indirekten, chondralen Ossifikation ist der spätere Knochen knorpelig präformiert und außer im Bereich der Gelenke und der Diaphyse von Perichondrium umgeben. Die Osteogenese geht von den Ossifikationszentren aus und setzt später als die desmale Ossifikation ein [21].

Die *perichondrale Knochenbildung* erfolgt von der Peripherie ausgehend im Bereich der Diaphyse der Röhrenknochen mit der desmalen Ausbildung einer perichondralen Knochenmanschette (vgl Kapitel 1.3.2). Osteoblasten mauern sich im Bereich der Manschette ein, und es beginnt das Längenwachstum. Dabei kommt es zu einer Längsspannung, die Zellhöhlen des umschlossenen Knorpels bilden sich blasenartig um und werden säulenartig angeordnet. Das Perichondrium wird anschließend zum Periost umgewandelt.

Die *enchondrale Ossifikation* der Diaphyse eines Röhrenknochens beginnt mit der charakteristischen Umwandlung der Knorpelzellen zum „Blasenknorpel“, es wird die so genannte Primärpongiosa gebildet [21]. Mit Hilfe von Chondroklasten, mesenchymaler Herkunft, wird der verkalkte Säulenknorpel abgebaut. Es entstehen so genannte primäre Markräume (Resorptionslakunen) in die Gefäße, Bindegewebe und Mesenchymzellen einwachsen und damit den Knorpel vaskularisieren. Die Mesenchymzellen differenzieren zu Osteoblasten, welche die Lakunen ausfüllen und Osteoid und Tropokollagen bilden. Dazwischen liegende Blutgefäße und Bindegewebe bilden das primäre Knochenmark. Die sich bildenden knöchernen Strukturen verwachsen mit der Knochenmanschette, die Mesenchymzellen des primären Knochenmarks differenzieren zu Vorstufen von Blutzellen und es entsteht das sekundäre Knochenmark. Der

Verknöcherungsvorgang wandert von der Diaphyse in Richtung knorpeliger Epiphyse. Die Ossifikation der Epiphyse erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt und gleicht dem Vorgang an der Diaphyse. Ein Blutgefäß aus dem Perichondrium sprießt in die Epiphyse ein und bildet das Ossifikationszentrum. Um den Verknöcherungskern wird der Knorpel knöchern ersetzt bis nur noch ein schmaler Saum Gelenkknorpel und die knorpelhafte Metaphyse (Epiphysenfuge) übrig bleibt. In der Epiphysenfuge findet bis zum Wachstumsende interstitielles Knorpel- und Knochenwachstum statt [21].

Desmale Ossifikation:

Die Verknöcherung auf bindegewebiger Grundlage, die desmale Ossifikation, geht von Verknöcherungsinseln (Ossifikationszentren) aus, die durch Zellvermehrung im Mesenchym entstehen. Osteoblasten differenzieren sich aus den pluripotenten Mesenchymzellen und produzieren Osteoid und Kollagen. Zwischen den Kollagenfibrillen reichern sich Kalzium- und Phosphationen an und bilden Hydroxylapatitkristalle (vgl. Kapitel 1.2.1). Dieser primär gebildete Bindegewebsknochen (Geflechtknochen, Faserknochen) ist weitgehend ungeordnet und zeigt einen netzförmigen Aufbau und nur eine geringe Verkalkungsdichte [21]. Mit der Zeit nimmt die Apatiteinlagerung zu, das Knochengewebe „reift“ und wird anschließend zu räumlich ausgerichteten und funktionstüchtigen Lamellenknochen umgebaut (vgl. Kapitel 1.2.2). Der Lamellenknochen weist eine geordnete Faseranordnung auf, die für die biomechanischen Eigenschaften verantwortlich ist, dabei entspricht die Apatitanordnung in den konzentrischen Fibrillenschichten der funktionellen Beanspruchung (vgl. Kapitel 4.3) [22].

Die desmale Ossifikation findet bei der knöchernen Defektheilung (periostale Ossifikation), der Bildung des Schädeldaches, der meisten Gesichtsknochen, der Clavicula und der perichondralen Knochenmanschette statt [23, 24].

1.4 Osteogene RepARATION

1.4.1 Osteokonduktion – zellvermittelte Osteogenese

Beim Vorgang der Osteokonduktion kann das, den Defekt umgebende, Knochengewebe in eine geeignete poröse Leitstruktur einwachsen (Leitschieneneffekt). Eine Gefäßeinsprossung, die Einwanderung perivaskulären Gewebes, von Osteoblasten und die damit verbundene Knochenneubildung kann ohne Resorption stattfinden. Die Knochengewebsbildung und -regeneration geht somit ausschließlich vom Lagergewebe und seinen determinierten Zellen (Osteoprogenitor-Zellen) aus [14]. Daher sollte eine möglichst große Kontaktfläche zum Implantatlager gegeben sein [17]. Das appositionelle Knochenwachstum kann nur bei geeigneter Oberflächengeometrie, Biokompatibilität, Porosität und geeigneter chemischer Zusammensetzung des Knochenersatzmaterials eintreten. In der Literatur wird ein Aufbau aus interkonnektierenden Poren mit einem Durchmesser zwischen 120 und 250 µm als ideal angegeben. Mit porösen Kalziumphosphatkeramiken (HA, TCP, etc.) wird versucht diesen Mechanismus klinisch bei der Regeneration von Knochengewebe nutzbar zu machen [25]. Ungünstige Defektformen, -größen, -lokalisationen, sowie mechanische Instabilität können die knöcherne Durchbauung des Biomaterials nachhaltig behindern und führen zu einer unvollständigen Verknöcherung [26].

1.4.2 Osteoinduktion

Bei der Osteoinduktion wird, vom Implantat ausgehend, die Differenzierung osteogener Zellen im Lagergewebe stimuliert (vgl. Tabelle 1). Pluripotente Zellen mesenchymaler Herkunft, so genannte Osteoprogenitor-Zellen, werden zu Osteoblasten differenziert und können sowohl orthotop, das heißt im Knochengewebe, als auch heterotop, also außerhalb des Knochengewebes, eine Knochenneubildung bewirken [17]. 1965 konnte

durch *Urist* nachgewiesen werden, dass beim Einsatz von demineralisierter Knochenmaterial eine echte Osteoinduktion statt findet (vgl Kapitel 1.1 und Kapitel 1.5) [27]. Kübler postulierte 1997, dass „lediglich durch den zunehmenden Einsatz demineralisierter, allogener Knochenimplantate (DBM, DFBA, DMFDB, AAA-Knochen, etc.) [...] die knochenregenerative Potenz der Osteoinduktion gegenwärtig Einsatz“ findet [17]. Durch Einsatz der BMPs wird es in Zukunft aber möglich sein das Wirkungsprinzip der Osteoinduktion klinisch in der rekonstruktiven Chirurgie anzuwenden.

Prozess der Knocheninduktion (nach Reddi):		
Zelluläre Ebene	Molekulare Ebene	Zeitablauf
<ul style="list-style-type: none"> • Blutgerinnung • Freisetzung von Thrombocyten 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrinvernetzung • Freisetzung von „Platelet-derived-Growth-Factor“ • Bindung von Plasmafibronektin an implantierter Matrix) 	1. Minute
<ul style="list-style-type: none"> • Eintreffen chemotaktisch angelockter polymorph-nukleärer Leukozyten (PMN) 	<ul style="list-style-type: none"> • Freisetzung proteolytischer Enzyme (Kollagenase, Elastase...) • Freisetzung kollagener Peptide 	1. Stunde
<ul style="list-style-type: none"> • Akkumulation von PMN • Zelladhäsion 	<ul style="list-style-type: none"> • limitierte Proteolyse und Freisetzung chemotaktischer Faktoren für Fibroblasten 	3.-18. Stunde
<ul style="list-style-type: none"> • Chemotaxis von Fibroblasten und Zellanlagerung an implantierte extrazelluläre Matrix 	<ul style="list-style-type: none"> • Freisetzung von Fibronektinpeptiden • Erhöhte Zellmotilität • Beteiligung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten 	1. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Chemotaxis von Fibroblasten • Signaltransduktion von der Matrix zur Zelloberfläche 	<ul style="list-style-type: none"> • Initiierung der Protein- und Nukleinsäuresynthese • <i>Freisetzung von Wachstumsfaktoren</i> 	2. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Zellproliferation 	<ul style="list-style-type: none"> • H-Thymidininkorporation in DNA • Anstieg der Ornithindekarboxylaseaktivität • Synthese von Typ III- Kollagen 	3. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Differenzierung der Chondroblasten 	<ul style="list-style-type: none"> • Glykosaminoglykane (GAGS) 	5. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Chondrocyten, Synthese und Sekretion von Matrix 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese von Typ-II-Kollagen • knorpelspezifische Proteoglykane 	7. Tag

<ul style="list-style-type: none"> • Hypertrophie der Chondrocyten • Kalzifikation der Knorpelmatrix • Gefäßeinsprossung 	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg der Aktivität der alkalischen Phosphatase • Synthese von Typ-IV-Kollagen Laminin und Faktor VIII in Gefäßen 	9. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Osteoblasten • Osteogenese und Mineralisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Synthese von Typ-I-Kollagen • Knochenspezifische Proteoglykansynthese • Einbau von Ca; maximale Aktivität der alkalischen Phosphatase 	10.-12. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Osteoklasten • Knochenumbau und Abbau der implantierten Matrix 	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg lysosomaler Enzyme (saure Phosphatase, Arylsulfatase, β-Glukuronidase) • Akkumulation von Osteocalcin • Freisetzung von Kollagenasen und Proteasen 	12.-18. Tag
<ul style="list-style-type: none"> • Knochenmarkdifferenzierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung des Fe-Einbaus in Häm • Akkumulation von Lysozym Synthese von Typ-III-Kollagen 	21. Tag

Tabelle 1: Prozess der Knocheninduktion nach *Reddi et al.* [28-30]

1.5 Wachstumsfaktoren und „Bone morphogenetic Proteins“

Aus dem Knochengewebe können verschiedene Wachstumsfaktoren isoliert werden. *Tabelle 2* gibt einen Überblick über die im Knochengewebe wirksamen Wachstumsfaktoren.

Wachstumsfaktoren im Knochen:	
• Bone-derived Growth Factor I (Mitglied der TGF- β -Familie)	• BDGF-I
• Bone-derived Growth Factor II (β 2-Mikroglobulin)	• BDGF-II; β ₂ -M
• Platelet-derived Growth Factor (osteosarcoma derived growth factor)	• PDGF
• Skeletal Growth Factor	• SGF
• Niedermolekularer Skeletal Growth Factor	• (IGF-II?)
• Insulin-like Growth Factor I (Somatomedin C)	• IGF-I
• Insulin-like Growth Factor II	• IGF-II
• Epidermic Growth Factor	• EGF
• Endothelial Cell Growth Factor	• ECGF
• Saurer Fibroblast Growth Factor	• aFGF
• Basischer Fibroblast Growth Factor (prostatic growth factor)	• bFGF
• Transforming Growth Factor- β 1 (Cartilage inducing factor A; CIF-A)	• TGF- β 1
• Transforming Growth Factor- β 2 (Cartilage inducing factor B; CIF-B)	• TGF- β 2
• Ostoinductive factor	• OIF
• Bone morphogenetic proteins	• BMP

Tabelle 2: Wachstumsfaktoren im Knochen (modifiziert nach Kuboschke [31] und Kübler [17])

Allerdings führt keiner dieser Wachstumsfaktoren, mit Ausnahme der BMPs, alleinig implantiert zu einer heterotopen Knocheninduktion [17].

TGF- β wird u. a. von Osteoblasten als inaktive Form gebildet und in der Knochenmatrix lokal gebunden. Aktiviert wird TGF- β über einen sauren pH-Wert oder durch Proteasen wie Plasmin oder Kathepsin und ist der entscheidende Stimulator für die Matrixbildung durch Osteoblasten. IGF-I wird im Knochen selbst gebildet und steuert hier, wie auch unter anderem EGF und PDGF, die DNA-Synthese in den Osteoblasten und somit die Proteinsynthese. PDGF wird von den Thrombocyten bei der Gerinnung freigesetzt und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung [19].

Es konnte nachgewiesen werden, dass demineralisierter Knochen in Kombination mit TGF- β -Wachstumsfaktoren zu einer beschleunigten Osteoinduktion führen kann [32]. Grund hierfür ist aber eher ein mitogener als ein morphogenetischer Effekt [17].

Auch der Einsatz von alkalischen Fibroblast Growth Factor (aFGF), basischen Fibroblast Growth Factor (bFGF), Epidermic Growth Factor (EGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Skeletal Growth Factor oder Insulin-like Growth Factor (IGF) konnte eine Stimulation der Osteoblastenaktivität bewirken. Jedoch immer nur in Kombination mit demineralisierten Knochenimplantaten oder im orthotopen Gewebe.

Ende der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde bei Versuchen mit Knochenimplantaten postuliert, dass der osteoinduktive Effekt von Bestandteilen der Knochenmatrixgelatine ausgehen muss. *Urist* nannte diesen hypothetischen Induktor zunächst „Bone induction principle (BIP)“ [16], später dann „Bone Morphogenetic Protein (BMP)“ [33]. Weitere Forschungen mit den implantierten Knochenpräparaten führten zur Entwicklung von autolysiertem, Antigen extrahiertem, allogenen humanem Knochen, dem so genannten AAA-Knochen [34]. In den 80er Jahren konnten durch die Gruppe um *Wozney* diese Proteine das Erste Mal isoliert und charakterisiert werden [35]. In den folgenden Jahren wurden weitere osteoinduktive Proteine sowohl aus humanem und bovinem Knochen als auch aus Knochen von Schafen, Schweinen, Affen, Kaninchen und Ratten isoliert. Es wurden in der Folge, von verschiedenen Autoren, Knochenmatrices unterschiedlicher Spezies sowohl im orthotopen als auch heterotopen Implantationsmodell untersucht, mit dem Ergebnis, dass durch Demineralisierung, Gelatinierung und weiterer Extraktion des Knochens, die osteogenetische Potenz der Knochenmatrix bzw. der Matrixextrakte deutlich gesteigert werden konnten [36]. In vivo Experimente konnten zeigen, dass der Ablauf der Knochenneubildung bei der Implantation von BMP identisch ist mit der Kaskade der Osteoneogenese (*vgl. Tabelle 1*), wobei die Menge an neu gebildeten Knochengewebe proportional zur Menge an implantierten BMP ist [17]. Diese Proteine führen nicht nur im orthotopen sondern auch im heterotopen Implantatlager zu einer de novo Knochenbildung [37, 38]. Die natürliche Gewebekonzentration der BMPs ist gering (ca.

1µg BMP-1-4 pro kg Knochengewebe, erst die gentechnische Herstellung erlaubte umfangreiche Untersuchungen [39, 40]). Dem *Institut Physiologische Chemie II der Universität Würzburg* (Leiter Prof. Sebald) gelang es BMP-2 und BMP-4 in Bakterienzellen (*E. coli*) zu exprimieren und nach Aufreinigung zu renaturieren. „Dabei besteht der Vorteil des etablierten bakteriellen Expressionssystems und seiner großen Proteinausbeute“ [17].

1.6 Knochenersatzmaterialien

Bei den zur Auffüllung ossärer Defekte in Frage kommenden Materialien ist zwischen Knochenimplantaten und Knochentransplantaten zu unterscheiden.

Transplantate bestehen aus vitalen, knochenbildenden Zellen, aufgrund immunologischer Aspekte dürfen hier nur autologe Knochen verwendet werden.

„Da beim autogenem Knochentransplantat die Antigenstruktur identisch mit dem Gewebe am Einsatzort ist und dabei vitales Material verwendet wird, darf die Qualität des autologen Knochens [...] als das beste Material für den Aufbau von ossären Defekten angesehen werden“ [41]. Von vielen Autoren wird autogener Knochen aufgrund seiner herausragenden biologischen Wirkung auch als der „*goldene Standard*“ für die Behandlung von skelettalen Substanzverlusten bezeichnet und autogene Spongiosa stellt „von den körpereigenen Strukturen [...] den besten Induktor für eine Knochenneubildung dar“ [42-44] Aber trotz ihrer überragenden biologischen Merkmale weisen autogene Transplantate zahlreiche Nachteile auf (vgl. *Tabelle 3*).

Implantate können aus devialem autogenem, allogenen oder xenogenem Gewebe bestehen. Allogene Stoffe werden vor ihrer Anwendung einer physikalischen (Kältekonserverung, Lyophilisation, Autoklavierung, etc.) und, oder einer chemischen Behandlung unterzogen, um antigenetisch wirkende Zellen zu devitalisieren. Mit

Ausnahme von Kollagen Typ-I und ICBM haben tierische, also xenogene Implantate im klinischen Einsatz heutzutage keine bedeutende Rolle [17].

1.6.1 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Die Knochenersatzmittel werden aufgrund ihrer Herkunft in autogene, allogene und xenogene Materialien unterteilt. Daneben werden alloplastische Knochenersatzmaterialien aus voll- oder halbsynthetischer Fertigung als Implantate verwendet. Die Tabellen 3 bis 5 (modifiziert nach Foitzik) geben einen Überblick über die Vor- und Nachteile und die Wirkungsweisen der einzelnen Typen [41].

Autogene Knochentransplantate: (Verpflanzung innerhalb des selben Individuums)	
Vorteile:	Nachteile:
• Optimale Antigenstruktur (keine immunologische Abwehrreaktion)	• Begrenzte Verfügbarkeit
• Transplantation vitaler Zellen (<i>Osteoinduktion und Osteogenese</i>)	• Begrenzte Lagerfähigkeit
• Leitschienenfunktion (<i>Osteokonduktion</i>)	• Hohe Kosten (z.B.: durch Zweiteingriff, Lagerhaltung, etc.)
• Maximale Biokompatibilität (atoxisch, nicht antigen, nicht mutagen, akanzerogen)	• Zusätzliche operative Maßnahme erforderlich
• bekannte biologische und biomechanische Eigenschaften	• Verlängerte Operationsdauer
	• Komplikationen am 2. Operationssitus [45] (z.B.: Infektionen, Nervenläsionen, Hämatome, etc.); Komplikationsrate 10% [46]

Tabelle 3: klinische Bewertung autogener Knochentransplantate

<i>Allogene und xenogene Knochentransplantate: (Verpflanzung innerhalb Individuen der selben und verschiedener Spezies)</i>	
Vorteile:	Nachteile:
• Lagerung in Knochenbanken	• Möglichkeit der Antigenität
• Nahezu unbegrenzt verfügbar	• Unsichere Wirkung wegen inhomogener Zusammensetzung
• Leitschienenfunktion (<i>Osteokonduktion</i>)	• Infektionsübertragung möglich (z.B.: bovine spongiforme Enzephalopathie, HIV, Hepatitis; bakterielle Kontamination bei 3-4% der Implantaten) [47, 48]
• Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen	• Implantation devitaler Zellen
	• Verringerte biologische und biochemische Eigenschaften (aufgrund der physikalischen und chemischen Aufbereitung)
	• Aufklärungs- und Haftungsproblematik
	• Hohe Kosten (z.B.: Lagerhaltung, etc.)

Tabelle 4: klinische Bewertung allogener und xenogener Knochentransplantate

<i>Alloplastische Knochenersatzmaterialien: (Vollsynthetische Herstellung eines Biomaterials; bzw. ausgiebige physikalische oder chemische Bearbeitung xenogener Gewebearten)</i>	
Vorteile:	Nachteile:
• Gute lagerfähigkeit	• Bindegewebige Einscheidung nicht resorbierbarer Ersatzmaterialien (z.B.: Hydroxylapatit)
• Nahezu unbegrenzt verfügbar	• Entzündliche Gewebereaktionen
• Meist resorbierbare Stoffe	• Gemisch von unterschiedlichen chemischen Phasen (z.B.: Tri-Calcium-Phosphat)
• Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen	• Nicht alle Ersatzstoffe sind sterilisierbar
• Keine Kontaminationsgefahr	• Persistenz durch mangelnden/fehlenden Abbau

Tabelle 5: klinische Bewertung alloplastischer Knochenersatzmaterialien (KEM)

1992 unternahm *Rüger* eine Unterscheidung, nach Ausgangsverbindungen bzw. dem Herstellungsverfahren, in folgende vier Klassen [44]:

• **Klasse I Verbindungen:** (*biologisch, organische Substanzen*)

Knochenmatrixextrakte, Knochenmatrixfraktionen und einzelne Wachstumsfaktoren (z.B.: ICBM, BMPs und ähnliches). (siehe auch Kapitel 1.5)

• **Klasse II Verbindungen:** (*synthetische, anorganische Materialien*)

Kalziumphosphatkeramiken unterschiedlicher Stöchiometrie. (z.B.: HA, TCP, Algipore[®], BioOss[®], Biogläser, Kollagen und ähnliche)

• **Klasse III Verbindungen:** (*synthetische, organische Materialien*)

Organische Polymere und deren Kombinationen. (Polyester, Polyaminosäuren, Polyanhydride, Polyorthoester, Polyphosphazene; z.B.: Ethisorb[®] und ähnliche)

• **Klasse IV Verbindungen:** (*Komposite*)

Alle Komposite und Kombinationen aus Substanzen der Klassen I, II und III Verbindungen. (z.B. Kombinationen aus Metallen und Wachstumsfaktoren [44])

Unabhängig vom Knochenersatzmaterial kommt beim Einheilungsprozess der Art des Transplantatlagers größte Bedeutung zu. *Lexer* unterschied 1924 drei Qualitäten des Transplantatlagers [49]:

- ***Ersatzstarkes Lager***, mit guter Gewebevaskularisation,
- ***Ersatzschwaches Lager***,
- ***Ersatzunfähiges Lager***, mit verminderter Durchblutung des Gewebes bzw. mit avitalem Gewebe.

Bei der Auswahl des Knochenersatzmaterials ist die Lagerqualität zu berücksichtigen. Je niedriger die Qualität des Transplantatlagers ist, desto höher sind die Anforderungen an die biologische Wertigkeit des Ersatzmaterials [50]. Häufig sind bei ungünstigen Verhältnissen vorbereitende chirurgische Maßnahmen wie mikrochirurgischer Transfer von Knochen, Weichteil- und Knochendebridement, Osteosynthese und Weichteilrekonstruktionen erforderlich um die Lagerqualität zu erhöhen.

1.6.2 Übertragbarkeit von Infektionserregern

Allogene Knochen stehen in Knochenbanken in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung. Aufgrund ihrer Herkunft kann aber nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sie mit Infektionserregern oder Fremdeiweißen kontaminiert sind. Seit den 50er Jahren sind TBC- bzw. Hepatitisinfektionen durch allogene Knochentransplantate bekannt [51]. Selbst bei steriler Entnahme von Knochentransplantaten schwanken die Kontaminationsraten zwischen 5% und 80% [52, 53]. Grundsätzlich können über Knochen alle Infektionserreger übertragen werden, die auch im Blut vorhanden sein können und über Bluttransfusionen übertragbar sind.

Tabelle 6 (modifiziert nach *Knaepler et al.* [48]) stellt eine Übersicht der Infektionskrankheiten dar, welche über allogene Transplantate übertragbar sind.

Mit allogenen Knochentransplantaten übertragbare Infektionskrankheiten:	
Viral:	Bakteriell:
• Hepatitis A,B,C	• Alle bakteriellen Erreger sind übertragbar
• Deltahepatitis	Andere:
• Zytomegalie	• Malaria Plasmodien
• Epstein-Barr	• Mikrofilaria
• HIV-1, HIV-2, HIV-0	• Trypanosomen
• Parvoviren	• Babesia microti
• HTLV (humanes T-Zell-Leukämie Virus) I/II usw.	• Leishmamen
Prionen:	
• Creutzfeldt-Jakob-Agens	

Tabelle 6: Mit allogenen Knochentransplantaten übertragbare Infektionskrankheiten

Um Infektionen zu vermeiden sollen die Spender so ausgewählt und selektiert werden, dass eine Übertragung bekannter Erreger unwahrscheinlich ist (Multiorganspender). Zusätzlich unterlaufen die biologischen Materialien so genannte Inaktivierungsverfahren. Bei festen Stoffen, wie Knochen muss sichergestellt sein, dass dieses Verfahren alle Bereiche des Transplantates erreichen kann und nicht etwa im Inneren nicht inaktivierte Bereiche übrig bleiben [48].

Trotz Inaktivierungsverfahren und genauen Kontrollen bleibt das Restrisiko einer Infektionsübertragung bei allogener Knochentransplantation bestehen. So wurde 1992 von *Simmonds und Mitarbeitern* der Fall einer HIV-Übertragung über Knochentransplantation beschrieben. Der Spender befand sich im „diagnostischen Fenster“ und hatte noch keine Antikörper gebildet, somit war HIV bei der Kontrolluntersuchung nicht nachweisbar [52].

Von der *Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- & Kieferheilkunde* wird das Risiko einer HIV-Übertragung bei allogener Knochentransplantation mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:8 \times 10^6$ angegeben [54].

Eine andere Gefahrquelle stellen sogenannte Prionen dar, z.B. die für das Creutzfeldt-Jacob-Syndrom verantwortlichen Eiweißkörperchen. Infektiös ist hier ein falsch strukturiertes Protein. Aufgrund der außergewöhnlichen Stabilität der Prionen ist es kaum möglich biologisches Material sicher zu inaktivieren ohne die Leitfunktion des Transplantates zu zerstören [48]. Auch fehlen bislang geeignete Diagnosemethoden um das Creutzfeldt-Jakob-Agens sicher nachzuweisen [47].

Hepatitisviren reagieren aufgrund ihrer verschiedenen RNA- bzw. DNA-Strukturen ganz unterschiedlich auf Inaktivierungsverfahren. Weswegen auch hier eine mögliche Infektionsübertragung nicht ausgeschlossen werden kann. Das Übertragungsrisiko für Hepatitis C wird in der Literatur mit $1:1-5 \times 10^4$ angegeben, für Hepatitis B mit $1:1 \times 10^5$ [55].

Für xenogene Transplantate gilt im Wesentlichen das gesagte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Infektionskrankheiten von Tieren auf den Menschen durch Transplantationen biologischen Gewebes übertragbar sind. Weiterhin bleibt ungeklärt inwieweit die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) oder „scrapy“ auf den Menschen übertragbar sind.

2 Problemstellung

Bislang stellt der Einsatz von autogenem Knochen den so genannten „*goldenen Standard*“ dar (vgl Kapitel 1.6) [43, 44, 46]. Jedoch sind bei diesem Verfahren die begrenzte Verfügbarkeit, die schlechte Lagerfähigkeit und die Risiken eines damit verbundenen Zweiteingriffes als Nachteile zu werten.

Allogene Knochentransplantate bergen die Gefahr der Antigenität und der möglichen Übertragung von Krankheitserregern.

Idealerweise sollte ein Knochenersatzmaterial resorbierbar, knöchern ersetzbar sein und biologisch, biomechanisch und strukturell am Knochenumbau teilhaben.

Die rekombinante Herstellung von „Bone morphogenetic Proteins“ eröffnet viel versprechende Möglichkeiten in der rekonstruktiven Knochenchirurgie. Neuere Forschungen haben gezeigt, dass die Kombination herkömmlicher Knochenersatzmaterialien mit induktiven Wachstumsfaktoren viel versprechende Ergebnisse liefern.

In dieser Studie sollte ermittelt werden, welche Kombination von Trägermaterial und rhBMP-2 im Vergleich zum reinen Knochenersatzmaterial die Knochenneubildung am günstigsten vermitteln kann. Diese Problemstellung sollte in Knochendefekten kritischer Größe in der Kalotte, dem Unterkiefer und dem Femur von Ratten untersucht werden.

Es sollte analysiert werden inwieweit die verwendeten Trägermaterialien und rhBMP-2 in der Lage sind eine Knochenneubildung zu induzieren, die Ossifikationszeit positiv zu beeinflussen und welche biologische und biomechanische Wertung dieser neu gebildete Knochen in Vergleich zu Knochen aus unbehandelten Ersatzmaterialien aufweist.

3. Material und Methode

3.1 Rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2)

Das in dieser Studie verwendete rhBMP-2 wurde in einem bakteriellen Expressionssystem in *E. coli* am *Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg* generiert [43]. *E. coli* expremiert inaktives BMP-2-Monomer welches in einem zweiten Schritt in die dimere Form überführt wird, diese Überführung beruht auf einer patentierten Anleitung zur Faltung von TGF- β [56]. RhBMP-2 steht in ausreichender Menge zur Verfügung und hat einen Reinheitsgrad von über 98 % [57].

3.2 Defekte kritischer Größe („Critical sized defects“)

Der Begriff „critical size defect“ beschreibt Knochendefekte, der kleinst möglichen Größe bei denen eine spontane knöcherne Regeneration nicht erfolgt sondern eine bindegewebige Narbe entsteht [58, 59].

Die Größe des „critical size defect“ ist sowohl abhängig von dem Gewicht und dem metabolischen Index (MI) der untersuchten Spezies als auch der Lokalisation des Defektes. Durch frühere Untersuchungen ist die kritische Defektgröße bei Ratten für Trepanations- und Kontinuitätsdefekte bekannt [60].

Das Ausmaß der knöchernen Defektregeneration kann daher als Parameter der osteoinduktiven Eigenschaften des eingebrachten Implantates dienen.

3.3 Defektmodelle:

Die Präparation der Defektmodelle und die Implantation der Versuchsträger erfolgten an männlichen Spargue-Dawley-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 353g.

Ratten weisen mit **5.15** einen weitaus höheren metabolischen Aktivitätsindex (MAI) auf als Menschen mit **1.0**. Das heißt, hinsichtlich des Osteogenese tritt ein „Zeitraffereffekt“ auf, was den Versuchszeitraum verkürzt und bei der Übertragung auf den humanen Knochenmetabolismus bedacht werden muss [61].

Kieferwinkeldefekt:

Die Defekte der kritischen Größe von 5 mm wurden bei den Ratten beidseits im Ramus mandibulae nach Ablösen des m. masseter im Kieferwinkelbereich unter Schonung der Masseter-Pterygoid-Schlinge gesetzt. Um die regenerative Potenz des Periosts auszuschließen, wurde es jeweils medial und lateral des Unterkieferastes entfernt. Eine Unterkieferhälfte wurde mit einer BMP-Trägermaterial-Probe versorgt, die kontralaterale Seite mit reinem Knochenersatzmaterial ohne Zugabe von rhBMP-2. Die Verweildauer der Proben belief sich im Tier auf 28 Tage.

Kalottentrepanation:

Nach Darstellung des Schädeldaches und sorgfältiger Entfernung des Kopfhaut-Periostlappens wurden mittig auf der Sutura sagittalis Defekte mit der Größe 7 mm gesetzt.

Der Knochendeckel wurde vorsichtig von der Dura abgehoben ohne Dura mater und sinus zu verletzen und das Trägermaterial in den Defekt eingebracht. Die Proben blieben 28 Tage in situ.

Femurkontinuitätsresektion:

Nach Darstellung des Femurs und sorgfältiger Entfernung des Periosts wurde ein Kontinuitätsdefekt von 8 mm gesetzt. Um die osteoinduktive Potenz freiliegenden Knochenmarks im proximalen und distalen Femurstumpf auszuschließen wurde dieses, mit einer feinen Nadel mobilisiert und mit 0,9% igen NaCl herausgespült. Die belastungsstabile Osteosynthese erfolgte mit 8-Loch Titanplatten (Würzburger Miniplatte, Howmedica Leibinger GmbH, Tuttlingen). Die Verweildauer der Implantate betrug 63 Tage.

3.4 Trägermaterialien

Die Suspensionen von ICBM, HA, α -TCP, Algipore[®], BioOss[®] und Bioglas, jeweils mit aqua dest., wurde mit 10 μ g rhBMP-2 -beziehungsweise beim Femurdefekt mit 25 μ g rhBMP-2- versetzt, zentrifugiert, auf -80° C gekühlt, lyophilisiert und über Nacht in gesättigter Chloroformatmosphäre sterilisiert.

Dosierungen der Trägermaterialien, Menge an rhBMP-2 und Verweildauer in den Versuchstieren, *siehe Tabelle 8.*

3.4.1 Insoluble Collagenous Bone Matrix: ICBM (Klasse-I-Verbindung)

In dieser Studie wurde ICBM, welches in Anlehnung an die Patentschrift von *Kuber-Sampath und Ridge* (US-Patent-Nummer: 5171574) hergestellt wurde, verwendet [62]. Die Kortikalis langer Rinderknochen wurde unter stetiger Kühlung auf eine Größe von 500 μ m gemahlen und gesiebt. Anschließend wurde der Knochen chemisch entfettet, demineralisiert und -extrahiert.

3.4.2 Hydroxylapatit: HA (Klasse-II-Verbindung)

Die synthetische, anorganische Hydroxylapatitkeramik (Firma Biovision, Ilmenau) wird aus Kalziumphosphatverbindungen bei einer Temperatur von 1200° C gesintert und in polykristallines, phasenreines Kalziumhydroxylapatit umgewandelt. Hydroxylapatit ist nicht resorbierbar und weist eine hohe Langzeitstabilität auf. Durch einen Porenanteil von 30-80 % kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung auf ca. 1-10 m²/g. HA weist eine ähnliche Druckfestigkeit wie Spongiosa auf.

3.4.3 α -TriCalciumPhosphat: α -TCP (Klasse-II-Verbindung)

Das synthetische, anorganische und resorbierbare α -TCP (Firma Biovision, Ilmenau) wird aus amorphen Tricalciumphosphat durch Sinterung gewonnen. Durch Zermahlen entstehen Korngrößen zwischen 500 und 1000 μ m. α -TCP ist phasenrein, frei von nichtresorbierbaren HA und hat eine Dichte von 2,86 g/cm³. Neben dem α -TCP das nur bei Temperaturen über 1100° C auftritt, gibt es noch die β -Modifikation.

3.4.4 Algipore[®] (Klasse-II-Verbindung)

Algipore[®] (Firma Friadent GmbH) ist eine halbsynthetische phasenreine Kalziumphosphatkeramik mit der kristallinen Struktur des HA. Es wird aus Rotalgen durch hydrothermale Umwandlung (Mazeration) und Entfernung der organischen Bestandteile durch Hitzebehandlung hergestellt. Es zeichnet sich vor allem durch seine interkonnektierenden Mikroporositäten (10 μ m) und der großen Oberfläche (30-50 m²/g) aus.

3.4.5 BioOss® (Klasse-II-Verbindung)

Das halbsynthetische und nicht resorbierbare BioOss® (Firma Geistlich Pharma AG) wird über ein Inaktivierungsverfahren (Hitze und chemische Inaktivierung) aus Rinderknochen gewonnen. Mit dem Ca-P Verhältnis von 2:1 und der Oberfläche von 97 m²/g gleicht es annähernd humanem Knochen. Die Porengröße kann bis zu mehreren 100 µm betragen.

3.4.6 Bioglas (Klasse-II-Verbindung)

Das synthetische, anorganische Bioglas (Firma Biovision, Ilmenau) ist eine Glaskeramik, biodegradierbar und weist eine Partikelgröße zwischen 200 und 500 µm auf.

Bestandteile Bioglas:	
SiO ₂	45 Gew.%
CaO	24,5 Gew.%
Na ₂ O	24,5 Gew.%
P ₂ O ₅	6 Gew.%

Tabelle 7: Zusammensetzung Bioglas

Nach Schmelzen der Bestandteile bei 1350° C, Mahlen und Sieben auf eine Korngröße von 200-500µm wird das Granulat im Ultraschallbad gereinigt und mit Gamma-Strahlung sterilisiert. Die Oberfläche wird durch Mikro- und Makroporositäten vergrößert.

3.4.7 Kollagen Typ-I (Klasse-II-Verbindung)

Das aus bovinen Achilles-Sehnen gewonnene Kollagen Typ-I (Firma Innocell, Saal a. d. Donau) besteht zu 95% aus Typ-I Kollagen mit einem Rest Typ-III Kollagen und wird als 0,6%ige Dispersion in 2mmol/l Essigsäure, pH 4,5 geliefert. Aufgrund der ausgeprägten Fibrillenstruktur und dem hohen Quervernetzungsgrades ist das Kollagen Typ-I unlöslich in Wasser.

Das bovine Kollagen Typ-I wurde mit bzw. ohne rhBMP-2 lyophilisiert und über Nacht in gesättigter Chloroformatmosphäre sterilisiert. Durch die Lyophilisation entsteht ein watteähnliches Substrat. Der Abbau erfolgt enzymatisch. Die Resorption findet in ca. 6 Wochen statt.

3.4.8 Ethisorb[®] (Klasse-III-Verbindung)

Ethisorb H510 rapid[®] (Firma Ethicon, Norderstedt) ist ein synthetisches und resorbierbares Copolymer aus Polyglactin und Polydioxazon. Die Polymere sind zu einem 2mm dicken Vlies zusammenschweißt. Für die Kieferwinkeldefekte wurde das Vlies in Scheiben von 5 mm Durchmesser gestanzt, für die Kalottendefekte in Scheiben von 7 mm Durchmesser. Für die Femurdefekte wurden 8 mm lange Streifen gestanzt. Die Proben wurden bei -80° C gekühlt, lyophilisiert und über Nacht in gesättigter Chloroformatmosphäre sterilisiert.

	Kieferwinkel	Kalotte	Femur
rhBMP-2	10 µg rhBMP-2	10 µg rhBMP-2	25 µg rhBMP-2
Verweildauer	28 Tage	28 Tage	56 Tage
Defektgröße	5 mm	7 mm	8 mm
ICBM:	30 mg	35 mg	35 mg
synthetisches HA:	55 mg	70 mg	132 mg
α - TCP:	50 mg	65 mg	110 mg
Algipore®:	45 mg	55 mg	70 mg
BioOss®:	35 mg	42 mg	Block
Bioglas:	50 mg	65 mg	115 mg
Kollagen Typ-I:	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
Ethisorb®:	5 mm	7 mm	Streifen

Tabelle 8: Übersicht über die Mengen an Trägmaterialien und Dosierung von rhBMP-2

3.5 Vitalfärbung mit Fluorochromen

Der zeitliche Ablauf der Kalzifizierung von Knochengewebe lässt sich mit Hilfe von Fluorochromen quantitativ nachweisen [63]. Fluochrome bilden mit Kalzium einen Chelatkomplex, der sich im mineralisierenden Knochen einlagert. Dabei kommt es zu einer Konzentration des Farbstoffes in den Appositionszonen [64]. Mittels UV-Strahlung wird die Fluoreszenz der Farbstoffe angeregt.

Zur Fluoreszenzmarkierung des neu synthetisierten Knochens wurden den Ratten, im Abstand von jeweils 7 Tagen, über einen Zeitraum von 4 Wochen, Fluochrome subkutan injiziert. Folgende Farbstoffe kamen dabei zur Anwendung:

Farbstoffe (In Reihenfolge der Injektion)	3%iges Xylenol- orange	3%iges Calcein- grün	3%iges Alizarin- Komplexon	Oxitetracyclin: Reverin® (Firma Höchst, Frankfurt)
Dosis	90 mg pro kg Körpergewicht	15 mg pro kg Körpergewicht	30 mg pro kg Körpergewicht	20 mg pro kg Körpergewicht
Farbe unter UV-Licht	Orange	Grün	Rot	Gelb

Tabelle 9: verwendete Fluorchrome

Zur Fluoreszenzanregung kam in dieser Studie Blaulicht ohne Einschränkung der Bandbreite zur Anwendung (HBO-50 Quecksilber-Hochdrucklampe). Das Erregerlicht fiel im Winkel von 45° auf das Präparat. Als Interferenzfilter wurde Filter BT490/500 und als Sperrfilter Filter-Nr. 3 verwendet.

4. Untersuchungsmethoden

4.1. Herstellung der Trenn-Dünnschliffpräparate

Für die mikroradiographischen und fluoreszenzmorphometrischen Untersuchungen wurden Präparate mit Hilfe der Trenn-Dünnschliff-Technik hergestellt. Nach Fixierung und Einbettung in dem Kunstharz Technovit 7200[®] VLC (Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim) wurden Schnitte in einer Stärke von ca. 100µm für die mikroradiographische Untersuchung und von unter 20 µm für die Untersuchung der polychromen Sequenzmarkierung dargestellt.

Vorbereitung der Knochenproben (Fixation, Dehydration, Infiltration):

Die Lagerung und Fixierung, der aus dem Tierexperiment stammenden Femur-, Kalotten- und Unterkieferproben, erfolgte in Formalin bei 4° C in einer Kühlkammer unter Lichtausschluss.

Nach dem Auswaschen der Fixierflüssigkeit im kalten Leitungswasser wurden die Proben stufenweise mit Glykolphosphorsäuremethacrylat (GMA) dehydriert.

Anschließend wurden die Knochenexplantate für weitere 6 Tage in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit dem Kunststoff Technovit 7200[®] VLC (Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim) infiltriert (vgl. Tabelle 10). In den Produktinformationen zu Technovit[®] 7200 VLC wird ein dreistündiger Zyklus der aufsteigenden GMA-Reihe angegeben [65]. Nach eigenen Erfahrungen hat sich jedoch für die zu untersuchende Objektgröße, wie auch von *Donath* angegeben, ein mindestens 24 stündiger Zyklus zur vollständigen Entwässerung bzw. Infiltration von Knochengeweben bewährt [66].

<i>Entwässerung und Kunststoffinfiltration:</i>		
Tag:	Gemisch	Verhältnis:
1. Tag	GMA / aqua dest.	50 / 50
2. Tag	GMA / aqua dest.	70 / 30
3. Tag	GMA / aqua dest.	90 / 10
4. Tag	GMA.	100 %
5. Tag	GMA / 7200 VLC.	50 / 50
6. Tag	7200 VLC.	100 %
7.-8. Tag	7200 VLC.	100 %
9.-10. Tag	7200 VLC.	100 %

Tabelle 10: aufsteigende Konzentrationsreihe zur Entwässerung und Kunststoffinfiltration

Einbettung und Polymerisation der Knochenproben:

Die Einbettung und Polymerisation der kunstharzinfiltrierten Probekörper erfolgte in lichtdurchlässigen Exakt-Einbettformen, Art. No. 4145, bzw. Art. No. 4144 (Firma Exakt-Apparatebau, Norderstedt). Um ein „Aufschwimmen“ der Explantate zu verhindern wurden die Knochenproben mit Hilfe des Fixationsklebers Technovit® 7230 VLC am Boden der Einbettformen befestigt und für 10 Minuten polymerisiert. Anschließend wurde mit reinem Technovit® 7200 VLC blasenfrei überschichtet und eine 2 stufige Polymerisation bei einer Wellenlänge von 400-500 nm und einer Temperatur von unter 40° C im Kulzer-Exakt Lichtpolymerisationsgerät Histolux (Firma Exakt-Apparatebau, Norderstedt) durchgeführt. Nach der Polymerisation wurde die oberflächliche Sauerstoffinhibitionsschicht mit einem Skalpell und an der Naßschleifmaschine Pressair TF250 (Firma Jean Wirtz) mit Silizium-Karbid-Schleifpapieren der Körnungen 320, 800 und 1000 entfernt.

Trenn-Dünnschliff-Technik:

Die eingebetteten Präparate wurden in der Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung (Exakt-Apparatebau, Norderstedt) mit der nicht zu untersuchenden Seite auf Plexiglasobjektträger mit dem Sekundenkleber Renfert No.1733 (Firma Renfert, Hilzingen) aufgeklebt. Die Unterseite des Montageobjektträgers und die Oberseite des Kunststoffblocks wurden anschließend mit dem Exakt-Mikroschleifsystem und Silizium-Karbid-Schleifpapier (Körnung 800, 1000) planparallel beschliffen und an vier Punkten mit einer digitalen Bügelmikrometerschraube vermessen (*1. Messung*).

Auf diese Präparatblöcke wurden planparallele, mit der Mikrometerschraube vermessene (*2. Messung*), Objektträger geklebt.

Die Klebeflächen wurden mit Ethanol gereinigt, der Präzisionskleber Technovit® 7210 VLC (Firma Heraeus Kulzer, Wehrheim) aufgebracht und mit Hilfe der Exakt-Vakuum-Klebepresse unter Photopolymerisation verklebt, anschließend wurde die Gesamtstärke des „Sandwich“ erfasst (*3. Messung*).

Aus der Differenz zwischen *3. Messung* (Gesamtstärke) und der Summe aus *1.* und *2. Messung* ergibt sich die Dicke der Klebeschicht. Nach *Donath* [66] sollte so eine Klebestärke von $5\mu\text{m}$ erreicht werden, in dieser Studie waren die Klebefugen im Schnitt $23\pm 9\mu\text{m}$ dick.

Die Trennschnitte wurden mit der Exakt-Trennband-Säge hergestellt. Der gesägte Schnitt wurde mit Silizium-Karbid-Schleifpapier entgratet.

Die Schnittdicke errechnete sich aus der Gesamtdicke des Schleifpräparates abzüglich der Objektträger- und Klebestärke. Vor dem Schleifen wurde der Nullpunkt am Gerät eingestellt. An der Mikrometerschraube konnte nun die gewünschte Größe eingestellt werden, nach Erreichen der Schichtdicke schaltete sich das Gerät automatisch ab [66]. Die Präparate wurden anschließend poliert (Körnung 2000). Einstellungen des Exakt-Mikroschleifsystems siehe *Tabelle 11*.

Exakt-Mikroschleifsystem:	Exakt-Trennschleifsystem
Schleiftellergeschwindigkeit (Grinding speed control): 60-70	Diamantsäge
Oszillationsgeschwindigkeit (Oscillating speed control): 50-70	
Tarier-Gewicht: 400g	Tarier-Gewicht: 68,92g

Tabelle 11: Einstellungen des Exakt-Mikroschleifsystems und -Trennschleifsystems

4.2. Mikroradiographie

Um den Ossifikationsgrad der verschiedenen Kombinationen aus Trägermaterialien und rhBMP-2 zu untersuchen wurden die Proben mittels der Röntgenmikroskopie ausgewertet.

Die Mikroradiographie nutzt die unterschiedliche Schwächung der Röntgenstrahlen durch verschiedene Gewebe beim Durchstrahlen aus. Um einen guten Kontrast zwischen den Gewebebestandteilen zu erhalten, wird mit weichen Röntgenstrahlen der Wellenlänge zwischen 0,01 und 1 nm gearbeitet. Bei der Kontaktmikroradiographie befinden sich die Probenoberflächen und die Fotoschicht des Röntgenfilms in engen Kontakt.

Die Kalotten-, Femur- und Unterkieferpräparate wurden mit Hilfe der Trenn-Dünnschliff-Methode auf eine Schichtdicke von ca. 100µm reduziert. Mit dem Cabinet X-Ray System, Faxitron Series (Firma Hewlett Packard GmbH, Böblingen) wurden die Proben bei einem Film-Fokus Abstand von ca. 15 cm und bei direktem Kontakt zwischen Probenkörper und Filmoberfläche auf „X-omat Ma“- Filmen, 13x18cm (Firma Kodak, Stuttgart) belichtet (16kV; 2 Minuten). Die Entwicklung erfolgte in der

hauseigenen Röntgenabteilung mit dem Entwicklungsautomaten Curix 242 S (Firma Agfa, München).



Abbildung 1: Röntgenautomat, Faxitron Series

Die entwickelten Röntgenbilder wurden eingescannt (Nikon LS1000, Auflösung 2700 dpi, 12 bit grau). Mit dem Programm Adobe Photoshop® 5.5d wurden die verknöcherten Areale über das „Zauberstab“-tool ausgewählt und mit grüner Farbe eingefärbt. (Abbildung 2) Die Röntgenbilder wurden anschließend auf die Größe des Knochendefektes beschnitten, freigestellt und als Tiff Grafik gespeichert.

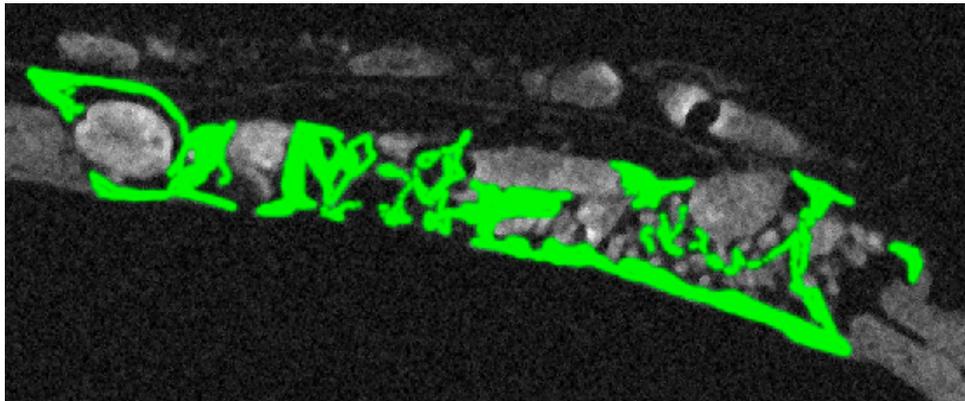


Abbildung 2: Mikroradiographie in Adobe Photoshop® 5.5d

4.3. Polychrome Sequenzmarkierung

Die Trenn-Dünnschliffpräparate wurden mit Hilfe des Photomikroskop mit Polymerisationseinheit Leitz DM-RBE (Firma Leica) bei 10-facher Vergrößerung, UV-Licht der Quecksilber Hochdrucklampe HBO 50 W (Firma Osram, München), Filter Nummer I-3/A und automatischer Belichtungssteuerung fotografiert (Film RSX 100, Firma Agfa, München).

Die Bilder wurden als Diapositive entwickelt, eingescannt (Nikon LS1000, Auflösung 800 dpi) und als Tiff-Grafik gespeichert. Anschließend wurden, mit dem Programm Adobe Photoshop® 5.5d für Apple® Macintosh, Kollagen aus den Einzelbildern erstellt.

Mit Hilfe des „Auswahl“-Werkzeuges wurde eine rechteckige Auswahl um den Knochendefekt erzeugt. Die Auswahlgröße ergab sich aus der Begrenzung des nativen Knochens zum Knochendefekt. Über den Befehl „freistellen“ unter dem Menüpunkt „Bild“ wurde der ausgewählte Bereich beschnitten und freigestellt.

Um das Bild im Programm ImageSXM® verwenden zu können und den Speicherbedarf zu senken wurde die Bildgröße reduziert.

Da bei der Auswertung der Fluoreszenzbilder der prozentuale Anteil der den Versuchstieren verabreichten Farbstoffes, und damit die Fläche des zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten Knochens, im Vordergrund stand, ergab sich die Notwendigkeit die einzelnen Farbräume; dass heißt das rote, grüne und gelbe Spektrum, vom Gesamtbild zu separieren.

Unter dem Menü „Auswahl“ befindet sich der Punkt „Farbbereich wählen“. In der dazugehörigen Dialogbox konnte der gesuchte Farbbereich gewählt werden. Die „Auswahl“ befand sich im Modus für „Aufgenommene Farbe“. Der Toleranzschwelle wurde auf 150 gesetzt um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten. (Abbildung 3)

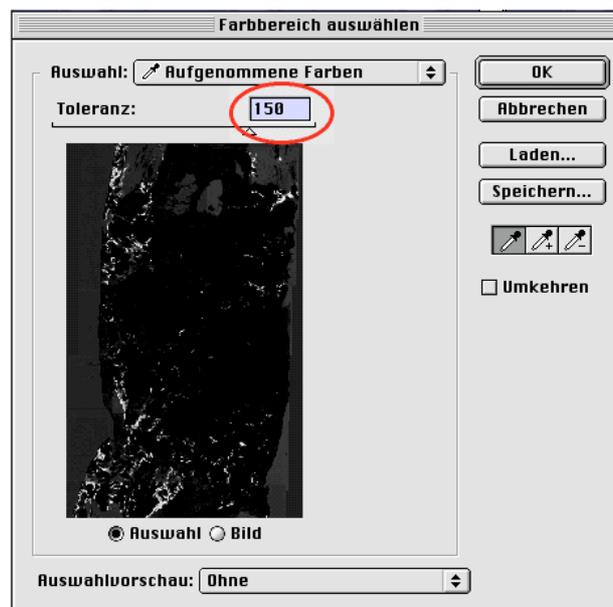


Abbildung 3: Auswahl des Farbbereiches

Der gewünschte Farbraum wurde mit Hilfe des „Pipetten“-tools im Hauptbild ausgewählt. Das Vorschaufenster zeigt den aktivierten Farbbereich als weiße Flächen. Die Bestätigung mit „OK“ erzeugte eine Auswahl begrenzt auf die Pixel mit der ausgesuchten Farbe. Die Auswahl wurde in eine neue Datei kopiert und als TIFF-Datei gespeichert.

Bei den anderen Farbräumen wurde analoger in Weise vorgegangen.

4.4. Halbautomatische Auswertung mit ImageSXM[®] v1.62

Die Auswertung der mikroradiographischen Präparate und der polychromen Sequenzmarkierung erfolgte mit dem Programm ImageSXM[®] v1.62 einer Weiterentwicklung des Bildbearbeitungsprogrammes NIH-Image[®] v1.62 des US National Institute of Mental Health (NIMH) für Apple[®] Macintosh [67].

Um die Bilder zu verarbeiten wurde in dem Menü „options“, Unterpunkt „colortables“, die Systempalette „system“, mit maximal 256 Farben, ausgewählt.

In der Werkzeugpalette befindet sich das „Lut-tool“ mit dem ein bestimmter Farbbereich im Bild markiert und ausgewertet werden kann. In der Farbpalette erscheint ein roter Balken der sich verschieben, vergrößern und verkleinern lässt. Im Bild verfärbt sich je nach Lage des „Lut-Bereiches“ ein Bereich rot und ist damit aktiviert und auswertbar (vergleiche Abbildungen 4 und 5).

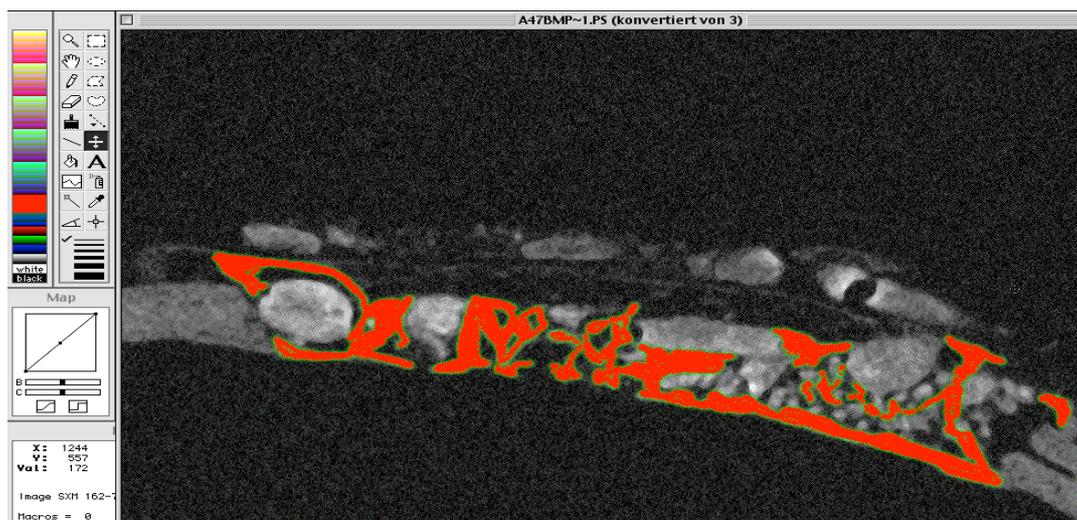


Abbildung 4: Mikroradiographie in ImageSXM[®]

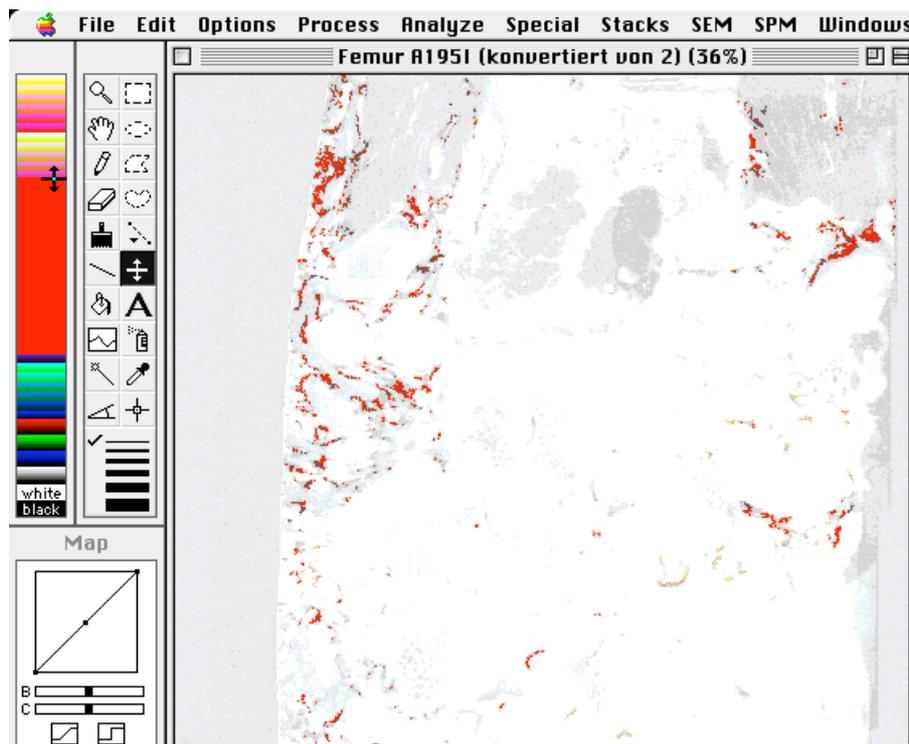


Abbildung 5: Fluoreszenzmarkierung Femur in ImageSXM®

Auswertung Mikroradiographie:

Für die mikroradiographischen Präparate wurde das Programm mit „*set scale*“ unter dem Menüpunkt „*Analyze*“ auf eine Auflösung von 104 pixel pro mm kalibriert, mit dem Befehl „*Measure*“ die Fläche des gebildeten Knochens berechnet und mit „*show results*“ in mm² angezeigt.

Auswertung polychrome Sequenzmarkierung:

Über den Menüpunkt „*Analyze*“ und den Befehl „*Measure*“ wurde die Anzahl der ausgewählten Pixel berechnet, und über den „*show results*“, im selben Menü, angezeigt.

Alle Farbbereiche wurden separat ausgewertet und die Flächen berechnet. In der unseparierte Gesamtansicht des Bildes wurde die Gesamtfläche des Defektes berechnet.

Aus dem Quotienten der Pixelanzahl des auszuwertenden Farbraumes und der Pixelanzahl des gesamten Bildes ergab sich die Fläche des sequenzmarkierten Bereiches in Prozent.

4.5 Biomechanische Untersuchungen

4.5.1 Drei-Punkt-Biegeversuch Grundlagen

Bei Biegebelastungen entstehen an der konvexen Seite eines Körpers Zugspannungen und an der konkaven Fläche Druckspannungen. Im Bereich der Druckspannung kommt es bei Belastung zur Volumenverkleinerung, im Bereich der Zugspannung zur Volumenvergrößerung. In der Mitte liegt die neutrale Faser, die weder durch Zug- noch durch Druckspannung belastet wird. Die Spannungen nehmen von der neutralen Faser ausgehend zu und erreichen in den Randfasern ihre höchsten Werte [68] (vgl. *Abbildungen 6 und 7*).

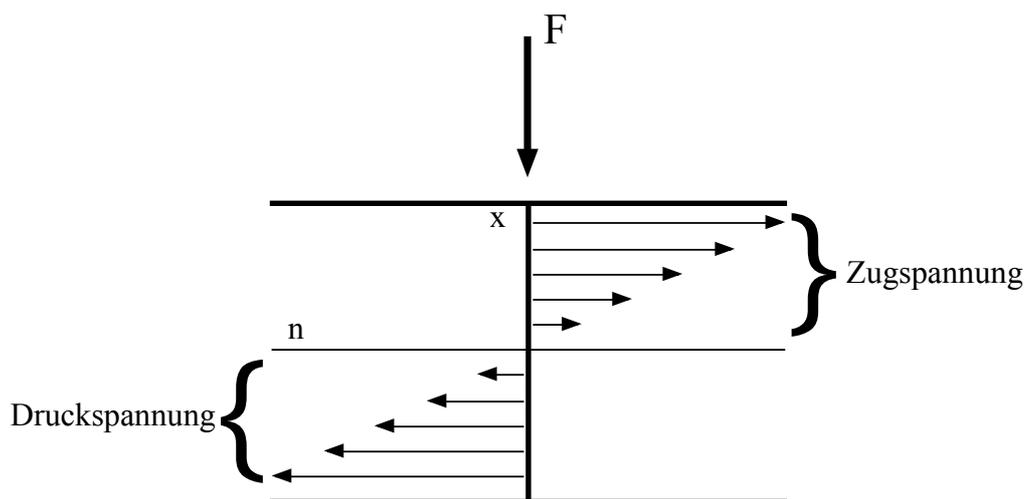


Abbildung 6: „Vektordiagramm“ zum Spannungsgradienten bei Biegebelastungen (modifiziert nach *Blumenauer, Cochran, Skedros et al.* [68-70])

mit:	F	:=	auftreffende Kraft
	n	:=	neutrale Faser
	x	:=	größte Zugbelastung

Im Knochen führt die Kombination aus kollagenen Fasern und Hydroxylapatit zu einem anisotropen Verbundmaterial, das sowohl Zugspannung, Druckspannung und Scherbelastung widerstehen kann. Vor allem in funktionell belasteten Bereichen des Skelettsystems tritt die Zweiphasennatur des Knochens in Vordergrund und erhöht seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Frakturen. Mikrofrakturen und -Spalten werden von den kollagenen Fasern und ihrem niedrigen Elastizitätsmodul abgefangen. Osteone und die laminären Strukturen bilden einen weiteren Mechanismus der für die Duktilität und Zähigkeit des Materials verantwortlich ist -woraus sich auch das plastische und viskoelastische Verhalten von Knochen erklären lässt [69]. Bei Auftreten von Zug- und Druckspannungen kommt es zur elastischen Verformung des Knochens.

Knochen als biologisches Gewebe ist charakterisiert durch sein elastisches Verhalten bis zur Proportionalitätsgrenze. In diesem linearen Bereich gilt das Hook'sche Gesetz:

$$Y = \sigma / \varepsilon \quad \text{mit: } Y := \text{Elastizitätsmodul, Young'scher Modul}$$

„Das Elastizitätsmodul bringt die Biegefestigkeit bei einer Normalspannung zum Ausdruck“ [69].

Im Bereich zwischen Proportionalitätsgrenze und Elastizitätsgrenze findet eine nichtlineare, jedoch vollständig reversible Verformung statt. Wird die Quetsch- bzw. Streckgrenze des Materials überschritten, kommt es zum plastischen Fließen mit viskoelastischem Verhalten, bei anhaltender Belastung über die plastische Fließgrenze

hinaus kommt es zur Fraktur, bzw. Ruptur, des Knochens. Knochen wird schon kurz nach Erreichen der Elastizitätsgrenze zerstört [69].

Die Kenntnisse des viskoelastischen Verhaltens von Knochen sind beim Einsatz von Knochenersatzmaterialien besonderer Interesse. Materialien die zur Defektauffüllung und zum Ersatz verwendet werden sollen müssen ähnliche viskoelastische Eigenschaften aufweisen wie Knochen. Knochenproben sind aufgrund ihrer Herkunft und Anatomie heterogene und anisotrope Materialien. Für anisotrope Körper gilt generell, das Elastizitätsmodul ist in Längsrichtung größer als in Querrichtung.

Bei der Durchführung des Dreipunktbiegeversuches mit Knochenproben kann es an lokal stärker mineralisierten Stellen zu erhöhten Elastizitätsmodulen kommen; ist die Prüfzelle weniger stark mineralisiert wird ein niedrigeres Elastizitätsmodul vorgetäuscht. Der Grund hierfür liegt in der Prüfungsanordnung des Drei-Punkt-Biegeversuches. Allerdings können bei ausreichend „kleinen“ Proben homogene und isotrope Verhältnisse für die Versuchsdurchführung angenommen werden. Das größte Biegemoment tritt unmittelbar unter dem Kraftangriffspunkt auf. Nach *Blumenauer* gilt folgende Beziehung [68]:

$$M_{\text{bmax}} = \frac{F_{\text{max}} \times L_v}{4}$$

mit: F_{max} := vom Prüfstempel einwirkende maximale Kraft
 L_v := Abstand der Auflagerrollen (Stützweite)

Im elastischen Gebiet ist die Verteilung der Beanspruchung über den Querschnitt linear. Die maximale Spannung berechnet sich aus folgenden Gleichungen [68]:

aus:
$$\sigma_{b \max} = \frac{F_{\max} \times L_v}{4 \times W} \quad \text{mit: } W = \frac{b \times h^2}{b}$$

ergibt sich:
$$\sigma_{b \max} = \frac{3 F_{\max} \times L_v}{2 b \times h^2}$$

- mit: F_{\max} := vom Prüfstempel einwirkende maximale Kraft
 L_v := Abstand der Auflagerrollen (Stützweite)
 W := Widerstandsmoment
 b := Probenbreite
 h := Probendicke

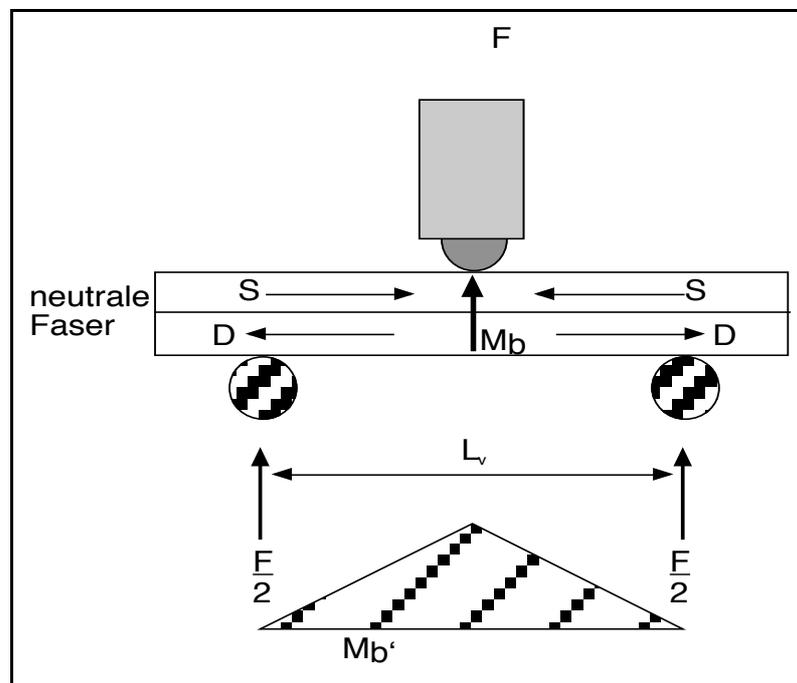


Abbildung 7: Biegeversuch mit Dreipunkt-Belastung und Biege-Momentverlauf (M_b) (modifiziert nach *Blumenauer, Cochran, Austermann* [68-70])

mit:	F	:=	Kraft des Prüfstempels
	F/2	:=	Lagerkräfte
	Mb	:=	Biegemoment
	Mb'	:=	Biegemomentverlauf
	Lv	:=	Abstand der Auflagerollen
	S	:=	Stauchung
	D	:=	Dehnung

4.5.2 Drei-Punkt-Biegeversuch: Durchführung

Die praktische Materialprüfung der zu untersuchenden Knochen erfolgte im Drei-Punkt-Biegeversuch mit der Universalprüfmaschine Typ 1445 (Firma Zwick, Ulm) bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Der Abstand der Auflager für die Proben betrug 30 mm. Die Proben wurden mit der Heißklebepistole „Pattex-Supermatic“ (Firma Henkel, Düsseldorf) und „Pattex hot stix“ an den Auflagern befestigt um sie zu stabilisieren und ein verrutschen zu verhindern. (Abbildung 8)

Anschließend erfolgte die Materialprüfung. Es wurde eine Vorkraft von 1 N aufgebracht. Die Prüfgeschwindigkeit betrug 0,5 mm pro Minute und erfolgte kontinuierlich bis zur Zerstörung der Knochenprobe oder einer Längenänderung von 4 mm. Die Bruchabschaltswelle betrug 40% der maximalen Kraft.

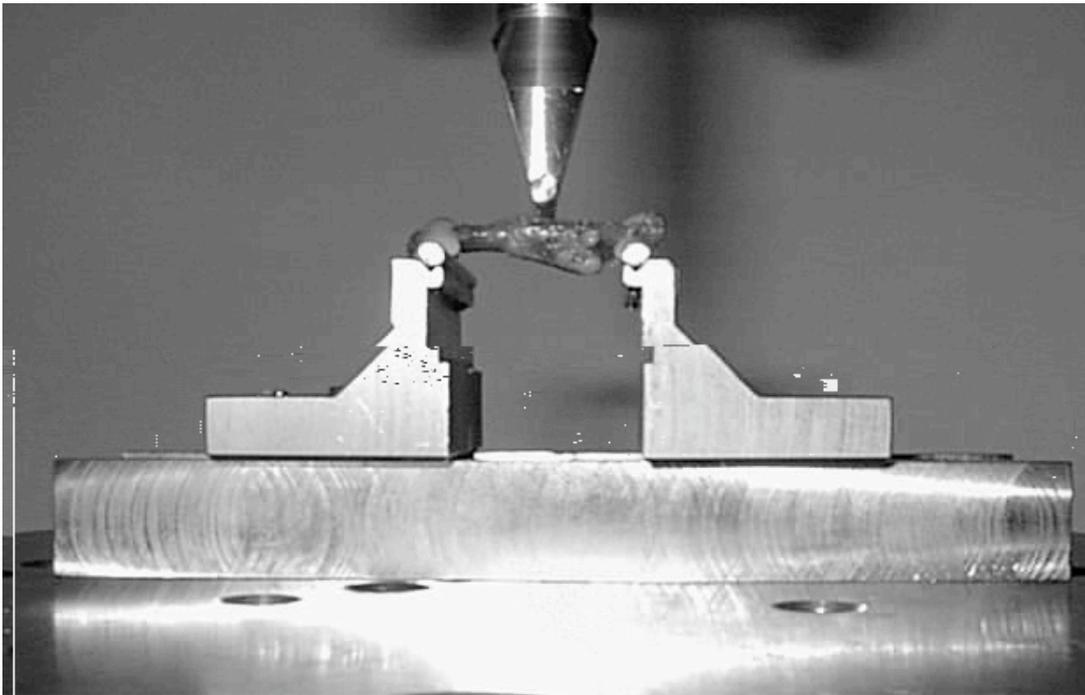


Abbildung 8: Femurprobe beim Drei-Punkt-Biegeversuch in der Universalprüfmaschine

Aus den Werten des Drei-Punkt-Biegeversuches wurden mit der Statistiksoftware SAS Statview[®] 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, USA) für Apple[®] Macintosh Regressionsdiagramme der einzelnen Träger erstellt. Die unterschiedlichen Elastizitätsmodule der Proben errechneten sich über die Steigungsformeln der einzelnen Regressionskurven (α). *Abbildung 9* zeigt ein exemplarisches Regressionsdiagramm mit eingezeichnetem Steigungsdreieck für α -TCP mit und ohne Zusatz von rhBMP-2 im Drei-Punkt-Biegeversuch

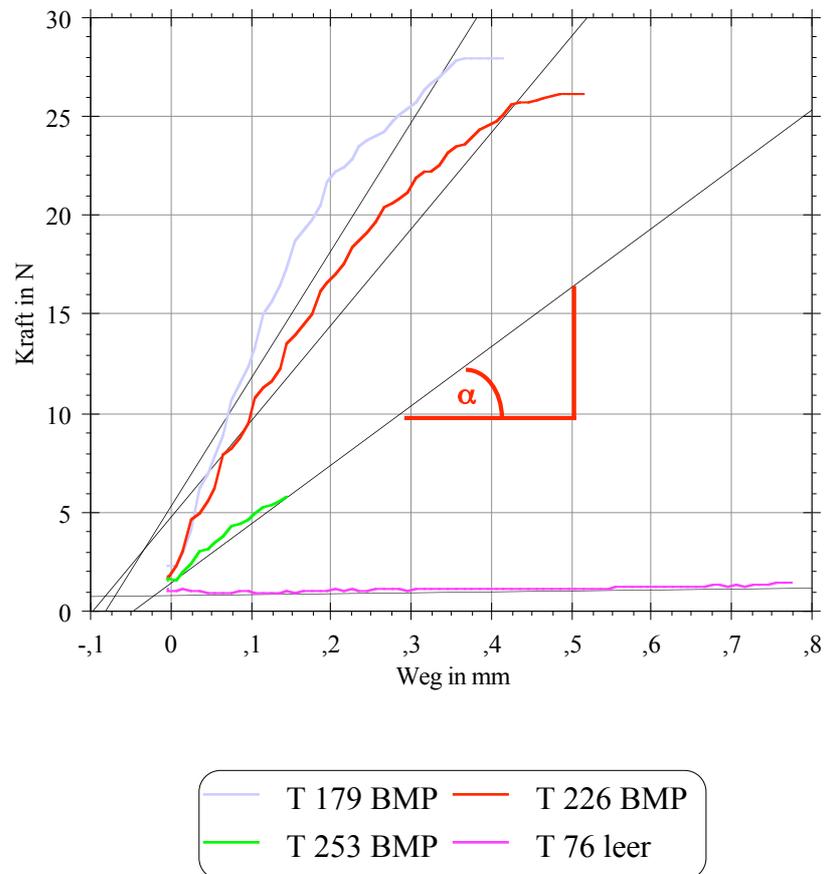


Abbildung 9: Exemplarisches Regressionsdiagramm mit Steigungsdreieck und Winkel α (α -TCP)

Die ermittelten E-Module wurden in einem „Boxplot-Diagramm zusammengefasst und miteinander auf signifikante Unterschiede verglichen.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit der Tabellenkalkulation Microsoft Excel[®] X und der Statistiksoftware SAS Statview[®] 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, USA) für Apple[®] Macintosh.

Experimenten mit biologischen Materialien, insbesondere Knochen als inhomogene und anisotrope Materialien weisen eine relativ große Streubreite auf.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchungen und des Drei-Punkt-Biegeversuches sollten die verschiedenen Träger-rhBMP-2 Kombinationen miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit fand dazu der t-Test (nach Student) für unabhängige Stichproben Anwendung.

Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ wurden mit *, hochsignifikante Unterschiede von $p < 0,01$ mit **, und höchstsignifikante Unterschiede von $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet

5. Ergebnisse

5.1 Mikroradiographie

Nach Opferung der Versuchstiere und Herstellung der Trenn-Dünnschliffproben wurden die Proben röntgenologisch untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei allen rhBMP-2-haltigen Proben im Unterkiefer, in der Kalotte und im Femur zur Ausbildung deutlicher Verknöcherungszonen kam.

Die Bewertung der röntgendichten Materialien ist kritisch zu diskutieren. Vor allem das nicht biodegradierbare Bioglas wies im Schnittpräparat nahezu die gleiche Dichte wie Knochen auf, wodurch eine deutliche Unterscheidung nicht möglich war.

Als Vergleichskriterium zwischen den einzelnen Trägern wurde die durch das knöcherne Regenerat eingeschlossene Fläche einschließlich eingeschlossener Markräume gewählt. Exostosenbildungen wurden daher entsprechend berücksichtigt.

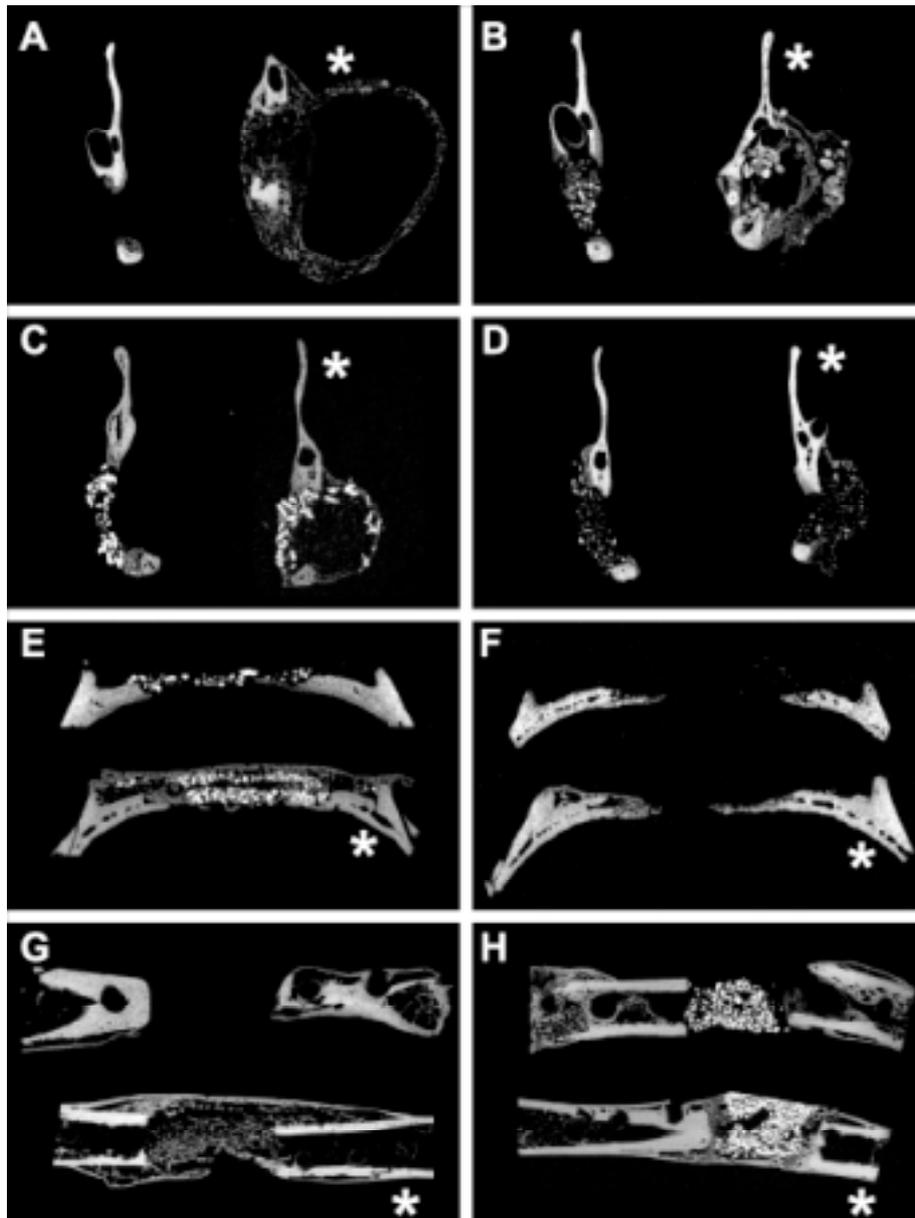


Abbildung 10: Mikroradiographische Darstellung der Knochenregeneration in Defekten kritischer Größe: ohne bzw. mit (*) Zusatz von rhBMP-2

A <i>CSD Kieferwinkel ICBM</i>	stärkste Knochenneubildung mit zentraler Markhöhle	E <i>CSD Kalotte Algipore</i>	
B <i>CSD Kieferwinkel Algipore</i>	massive Dislokation der Träger	F <i>CSD Kalotte Ethisorb</i>	Unzureichende Defektüberbrückung
C <i>CSD Kieferwinkel BioOss</i>	massive Dislokation der Träger mit zentraler Knochenmarkbildung	G <i>CSD Femur Kollagen Typ I</i>	Ausbildung einer Neokortikalis
D <i>CSD Kieferwinkel Synthetisches HA</i>	stärkste Knochenneubildung mit zentraler Markhöhle	H <i>CSD Femur α-TCP</i>	Ausbildung einer Neokortikalis

Tabelle 12: Wertung der Mikroradiographien aus Abbildung 10

Kieferwinkeldefekt:

Bei den Unterkieferproben zeigte sich, nach Ablauf des Untersuchungszeitraumes von 28 Tagen, die größte Knochenneubildung bei ICBM mit rhBMP-2 im Mittel $20,4 \pm 9,2$ mm², gefolgt von α -TCP, Algipore[®], BioOss[®], HA, Bioglas, Kollagen Typ-I und Ethisorb[®] jeweils in Kombination mit rhBMP-2 (vgl. *Abbildung 11*).

Bei allen Materialien, vor allem aber bei ICBM, kam es zur Ausbildung von Exostosen. Diese Exostosen wurden bei der Flächenberechnung berücksichtigt.

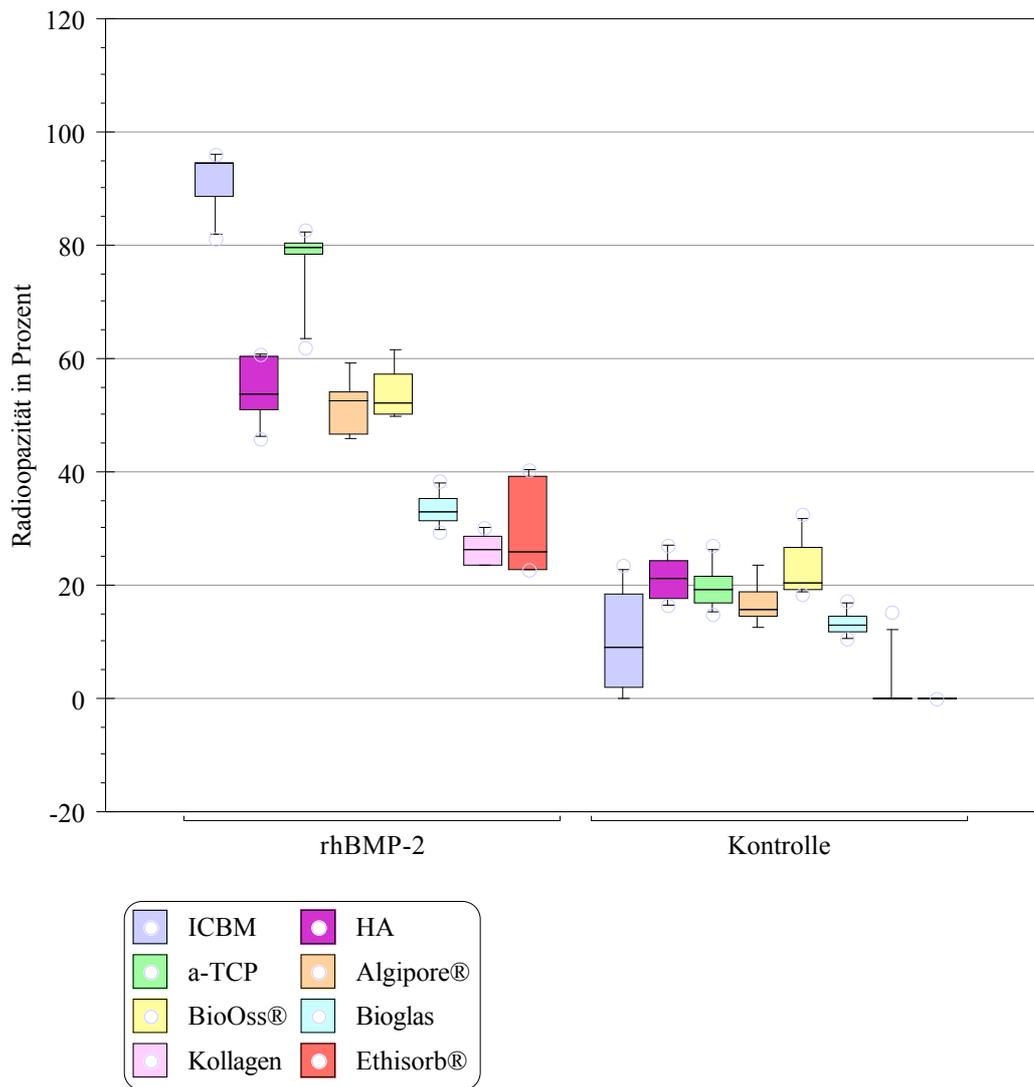


Abbildung 11: Kieferwinkeldefekt; Ossifikationsgrad in % der Defektfüllung (n=6)

Tabelle 13 zeigt die signifikanten Unterschiede zwischen den Trägersystemen mit rhBMP-2 zueinander. Als Signifikanzgrenzen wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) angenommen.

10 µg rhBMP-2	HA	α -TCP	Algipore®	BioOss®	Bioglas	Kollagen Typ-I	Ethisorb®
ICBM	<0,0001***	0,015*	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***
HA	.	0,0021**	0,7757	0,7863	0,0001***	<0,0001***	0,0003***
α -TCP		.	0,2774	0,0007***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***
Algipore®			.	0,9348	0,0007***	<0,0001***	0,0012**
BioOss®				.	<0,0001***	<0,0001***	0,0002***
Bioglas					.	0,0029**	0,3093
Kollagen Typ-I						.	0,4230

Tabelle 13: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den verschiedenen Träger mit rhBMP-2 im Kieferwinkeldefekt

Kalottentrepanationsdefekt:

Wie bei den Unterkieferproben, zeigte sich bei den Kalotten die größte Knochenneubildung nach 28 Tagen bei ICBM mit rhBMP-2 im Mittel $16,4 \pm 2,2 \text{ mm}^2$, gefolgt von α-TCP, Algipore®, BioOss®, HA, Bioglas, Ethisorb® und Kollagen Typ-I jeweils in Kombination mit rhBMP-2 (vgl. *Abbildung 12*).

Auch bei den Kalottentrepanationsdefekten kam es zur Ausbildung von Exostosen, die jedoch geringer ausfielen als im Kieferwinkel-Defektmodell.

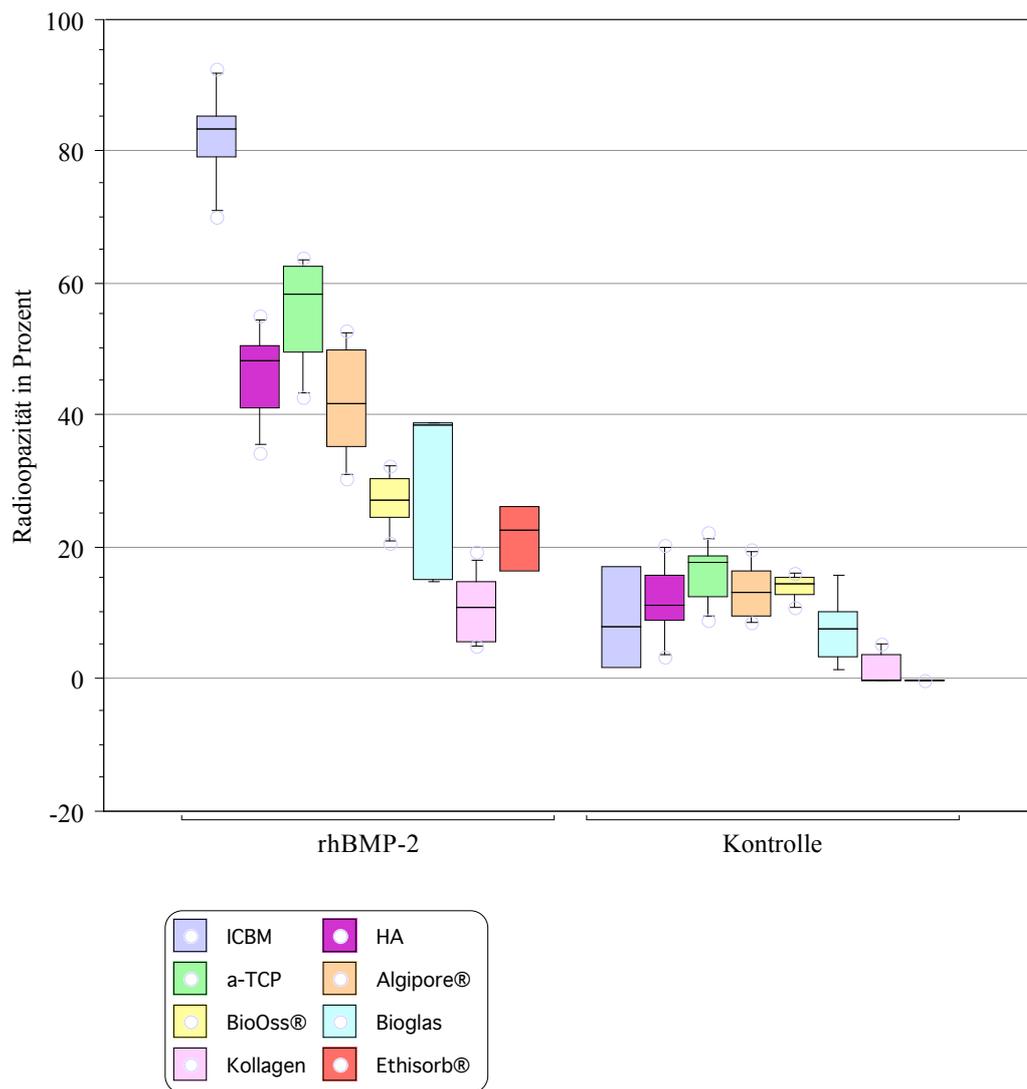


Abbildung 12: Kalottentrepanationsdefekt; Ossifikationsgrad in % der Defektfüllung (n=6)

Table 14 zeigt die signifikanten Unterschiede zwischen den Trägersystemen mit rhBMP-2 zueinander. Als Signifikanzgrenzen wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) angenommen.

10 µg rhBMP-2	HA	α -TCP	Algipore®	BioOss®	Bioglas	Kollagen Typ-I	Ethisorb®
ICBM	<0,0001***	0,0012**	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***	<0,0001***
HA	•	0,1452	0,2578	0,0008***	0,0182*	<0,0001***	0,0018**
α -TCP		•	0,0195*	<0,0001***	0,0033**	<0,0001***	0,0005***
Algipore®			•	0,0035**	0,0813	<0,0001***	0,0051**
BioOss®				•	0,7038	<0,0001***	0,1739
Bioglas					•	0,0037**	0,3206
Kollagen Typ-I						•	0,0205*

Tabelle 14: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den verschiedenen Träger mit rhBMP-2 im Kalottentrepanationsdefekt

Femurkontinuitätsdefekt:

Im Femurkontinuitätsdefekt war die größte Knochenneubildung, nach 63 Tagen, bei ICBM zu beobachten, im Mittel $35,9 \pm 9,1 \text{ mm}^2$, gefolgt von α-TCP, Algipore®, HA, BioOss®, Ethisorb®, Bioglas und Kollagen Typ-I, jeweils in Kombination mit rhBMP-2. (vgl. *Abbildung 13*)

Bei den Femura kam es zu einer vernachlässigbaren Exostosenbildung.

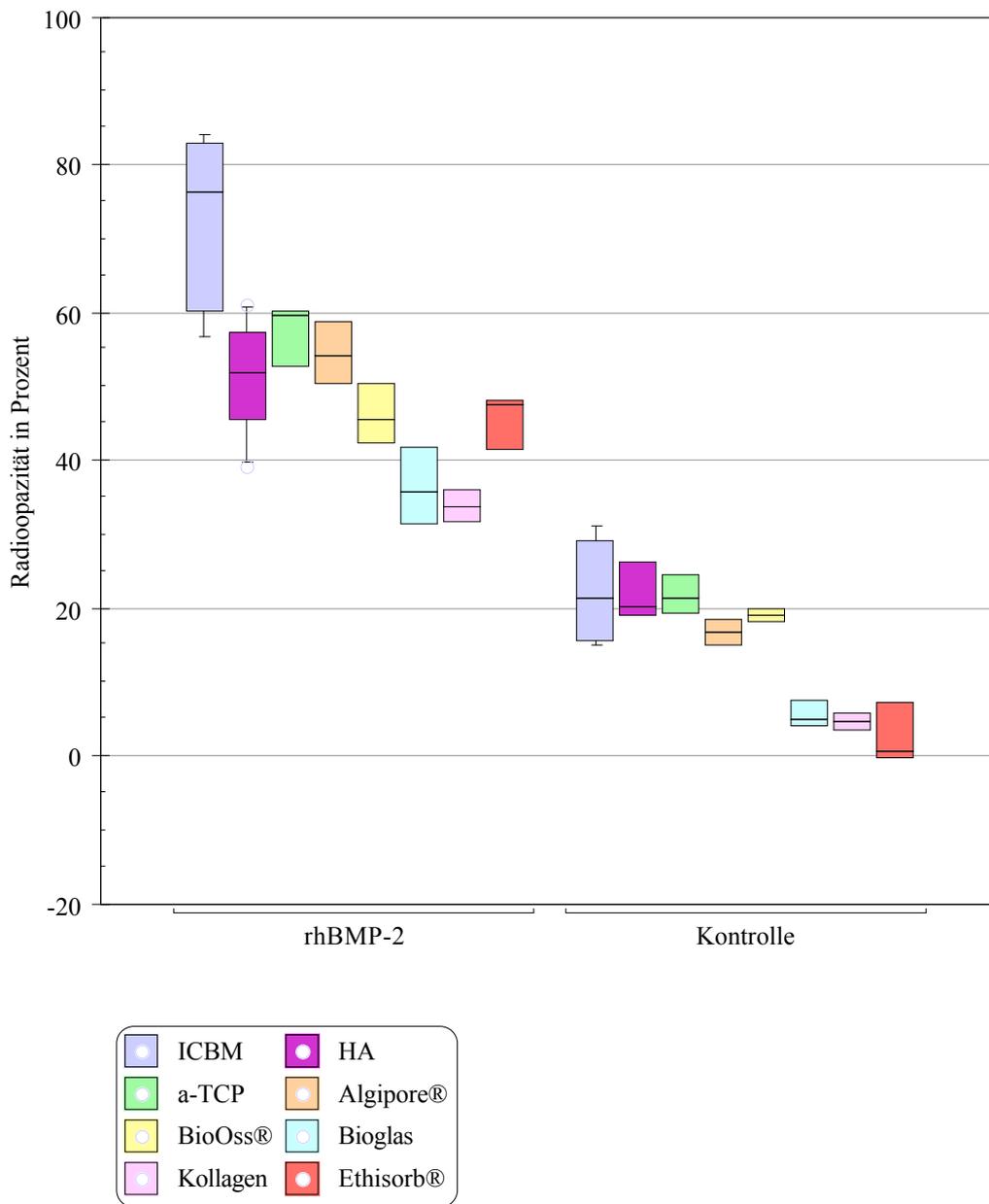


Abbildung 13: Femurkontinuitätsdefekt; Ossifikationsgrad in % der Defektfüllung (n=6)

Tabelle 15 zeigt die signifikanten Unterschiede zwischen den Trägersystemen mit rhBMP-2 zueinander. Als Signifikanzgrenzen wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) angenommen.

10 μg rhBMP-2	HA	α -TCP	Algipore®	BioOss®	Bioglas	Kollagen Typ-I	Ethisorb®
ICBM	0,0334*	0,1505	0,1344	0,0236*	0,0025**	0,0163*	0,0199*
HA	•	0,5626	0,7837	0,3414	0,0319*	0,0668	0,2770
α -TCP		•	0,8016	0,0834	0,0096**	0,0245*	0,0629
Algipore®			•	0,2663	0,0402*	0,0953	0,2206
BioOss®				•	0,0955	0,0622	0,8007
Bioglas					•	0,6173	0,1250
Kollagen Typ-I						•	0,0693

Tabelle 15: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den verschiedenen Träger mit rhBMP-2 im Femurkontinuitätsdefekt

Es konnte gezeigt werden, dass es bei allen Proben mit rhBMP-2 nach Ablauf von 63 Tagen zu einer knöchernen Konsolidierung der Kontinuitätsunterbrechung gekommen war. Die undotierten Knochenersatzmaterialien zeigten eine wesentlich geringere Knochenneubildung. Kein Material bewirkte alleine eine knöcherne Überbrückung der Defekte. Bei den nicht osteokonduktiven Materialien kam es zur Ausbildung von Pseudoarthrosen ohne Hinweis auf eine Knochenneubildung an den Defekträndern.

5.2 Polychrome Sequenzmarkierung

Abbildungen 14-16 zeigen die nach 14 Tagen, 21 Tagen und nach 28 Tagen erfolgte Knochenneubildung in Abhängigkeit des verwendeten Träger mit rhBMP-2 in Prozent an.

Kieferwinkeldefekt:

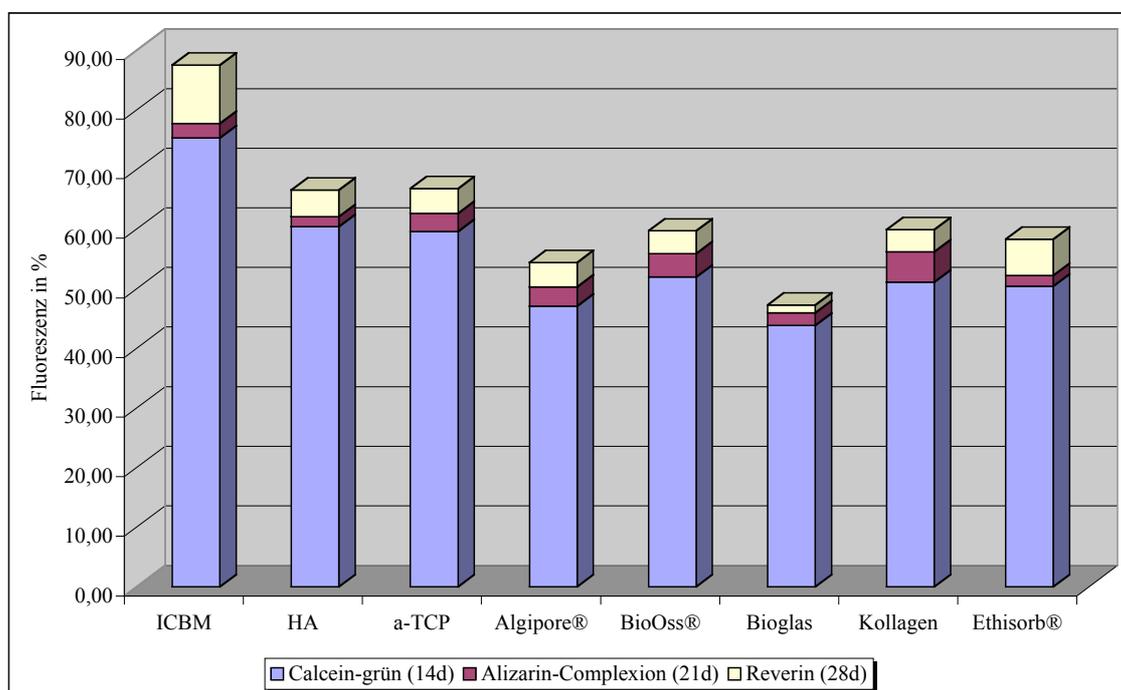


Abbildung 14: Knochenneubildungsrate im Kieferwinkeldefekt in Prozent

Nach 14 Tagen war der größte Zuwachs an neu gebildeten Knochen bei ICBM zu beobachten, im Mittel $75,3 \pm 2,8$ %, gefolgt von HA/ α -TCP, BioOss®, Kollagen Typ-I, Ethisorb®, Algipore® und der Bioglas-Serie, jeweils in Kombination mit rhBMP-2.

Nach Ablauf von 21 Tagen war die Knochenneubildung prozentual bei ICBM am höchsten, gefolgt von α -TCP/HA, Kollagen Typ-I, BioOss®, Ethisorb®, Algipore® und Bioglas. Am Ende des Untersuchungszeitraumes zeigte sich folgendes Ranking für die

Knochenneubildungsraten: ICBM, HA, α -TCP, BioOss[®], Kollagen Typ-I, Ethisorb[®], Algipore[®] und Bioglas.

Kalottentrepanationsdefekt:

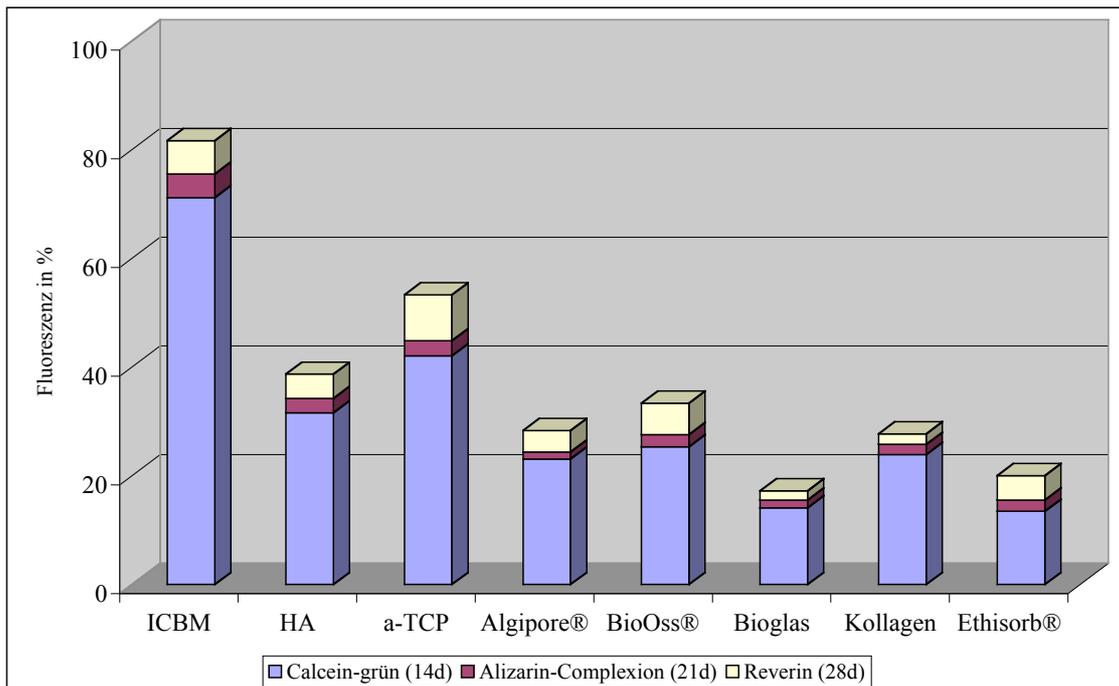


Abbildung 15: Knochenneubildungsrate im Kalottentrepanationsdefekt in Prozent

Nach 14 und 21 Tagen dominierte die Knochenneubildungsrate von ICBM mit $71,3 \pm 2$ %, die „slowly delivery systems“ α TCP und HA zeigten in der ersatzschwachen Kalotte eine erniedrigte Knochenbildungsrate gefolgt von BioOss[®], Kollagen Typ-I, Algipore[®] und mit weiterem Abstand Bioglas und Ethisorb[®], jeweils in Kombination mit rhBMP-2. Nach Ablauf von 28 Tagen war der größte Zuwachs an neu gebildeten Knochen bei der ICBM-Serie zu erkennen, gefolgt von α -TCP, HA, Kollagen Typ-I und Algipore[®], mit Abstand Ethisorb[®] und BioOss[®].

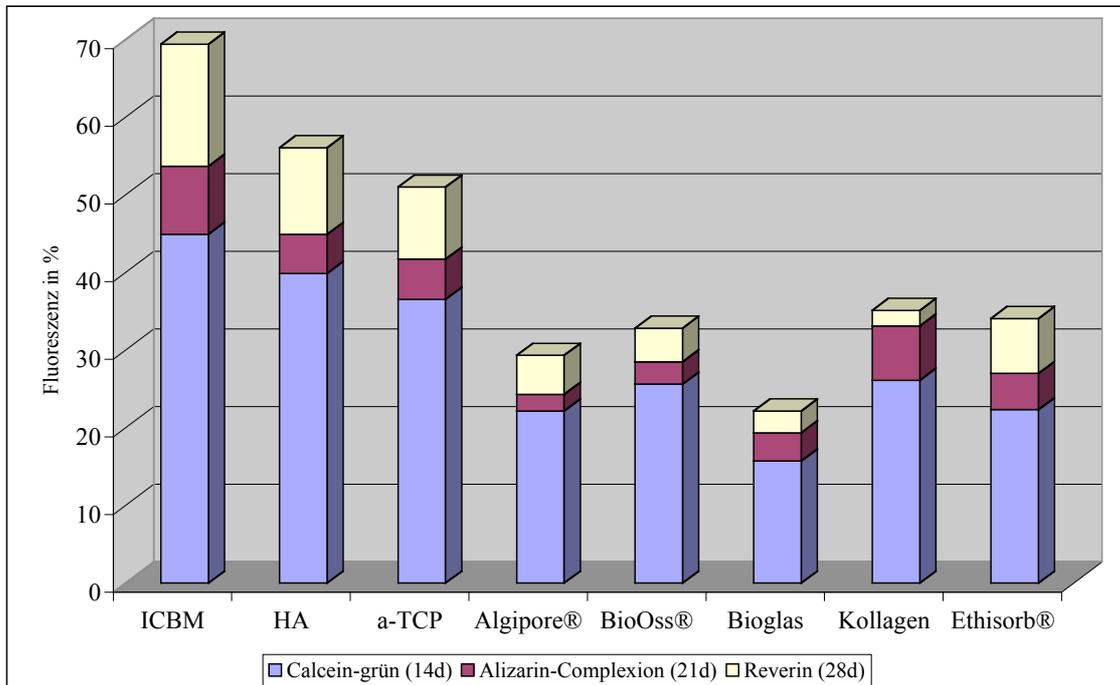
Femurkontinuitätsdefekt:

Abbildung 16: Knochenneubildungsrate im Femurkontinuitätsdefekt in Prozent

Nach 2 Wochen war die größte Knochenneubildung bei ICBM zu vermessen, gefolgt von HA und α -TCP und mit Abstand den Materialien Kollagen Typ-I, BioOss[®], Ethisorb[®] und Bioglas.

Am Versuchsende zeigte sich, dass ICBM in Kombination von rhBMP-2 am günstigsten auf die Knochenbildungsrate auswirkte.

5.3 Drei-Punkt-Biegeversuch

Die biomechanische Testung bestätigte die mikroradiographischen und fluoreszenz-morphometrischen Ergebnisse.

Bemerkenswert ist, dass die beiden Kollagene (Kollagen Typ-I und ICBM) zu guten Resultaten in der Festigkeitsprüfung führten. Jedoch erzielte nur α -TCP mit rhBMP-2 ein dem ICBM/rhBMP-2 vergleichbares E-Modul.

Ethisorb[®] führte in Kombination mit rhBMP-2 zum mechanisch instabilsten Regenerat. Auch Bioglas, welches die Mineralisation des neu gebildeten Knochens inhibierte, erwies sich als biomechanisch wenig geeignetes Material (vgl. *Abbildung 17*).

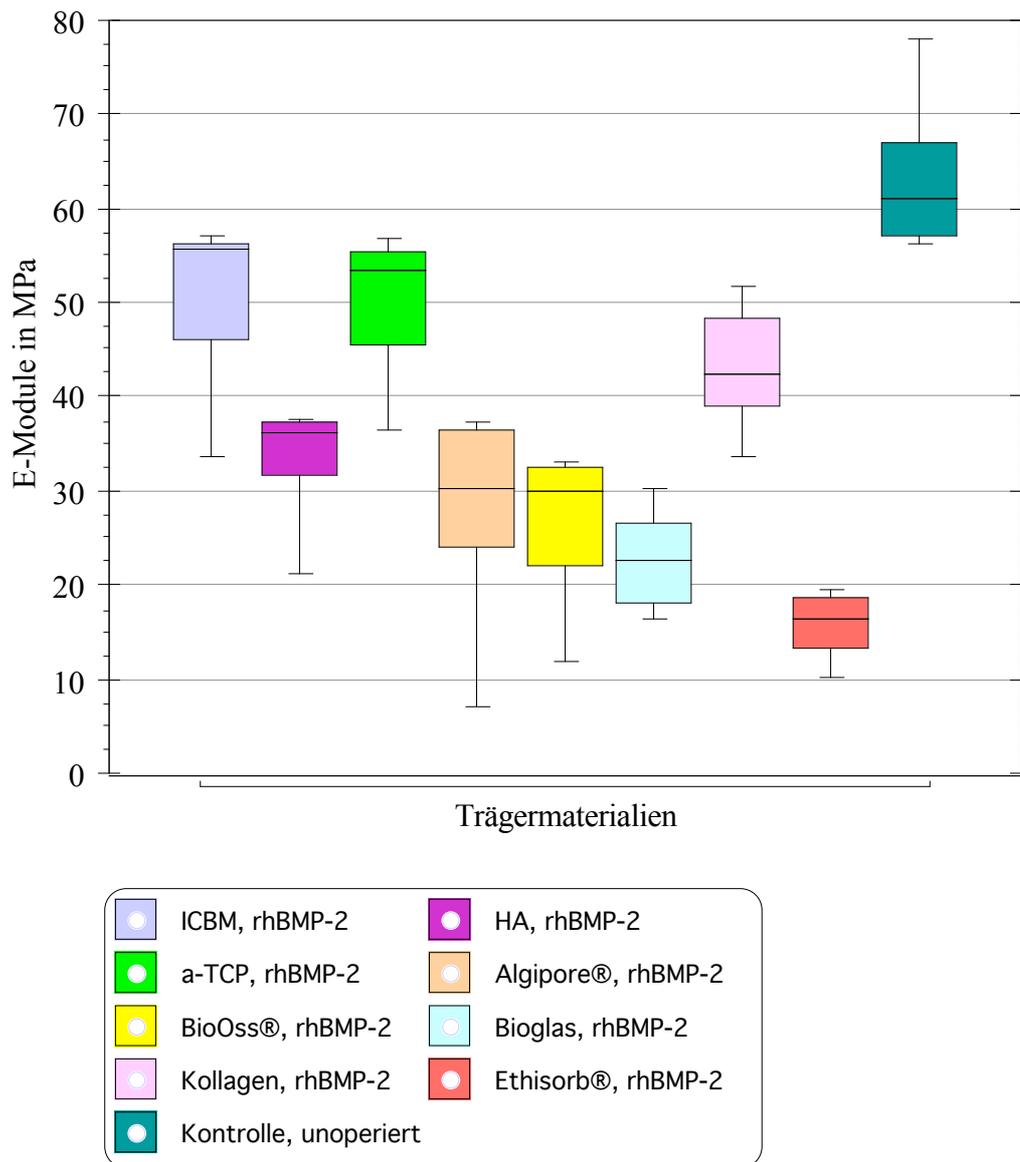


Abbildung 17: E-Module der unterschiedlichen Femurproben beim Drei-Punkt-biegeversuch in kPa im Vergleich zu einer unoperierten Kontrollgruppe

Tabelle 16 zeigt die signifikanten Unterschiede der einzelnen Träger bei der biomechanischen Prüfung. Als Signifikanzgrenzen wurden $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) angenommen.

10 µg rhBMP-2	HA	α -TCP	Algipore®	BioOss®	Bioglas	Kollagen Typ-I	Ethisorb®
ICBM	0,559	0,996	0,231	0,093	0,035*	0,893	0,007**
HA	•	0,563	0,503	0,261	0,122	0,630	0,026*
α -TCP		•	0,233	0,094	0,036*	0,897	0,007**
Algipore®			•	0,704	0,456	0,257	0,144
BioOss®				•	0,703	0,101	0,237
Bioglas					•	0,036*	0,381
Kollagen Typ-I						•	0,006**

Tabelle 16: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien mit rhBMP-2 beim Drei-Punkt-Biegeversuch

6. Diskussion

Die Wiederherstellung und der Aufbau von knöchernem Hartgewebe stellt ein schwieriges Aufgabengebiet der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie dar. Komplexe und ausgeprägte Hartgewebsdefekte können nicht spontan durch körpereigene Reparaturmechanismen regeneriert werden und bedürfen häufig operativer Maßnahmen.

Autogener Knochen gilt als „*goldener Standard*“ bei der Therapie knöcherner Defekte [43, 44, 46]. Er zeigt keine immunologischen Abwehrreaktionen, wirkt sowohl osteoinduktiv als auch osteokonduktiv, weist eine maximale Biokompatibilität auf.

Autogener Knochen ist allerdings nur bedingt lagerfähig. Er steht nur im begrenzten Umfang zur Verfügung, erfordert zusätzliche operative Maßnahmen -oft verbunden mit Komplikationen am 2. Operationssitus- und bedingt eine verlängerte Operationsdauer. Um diese Nachteile zu vermeiden wurde eine Vielzahl körperfremder Materialien als Knochenersatz verwendet. In der Literatur finden sich zahlreiche Publikationen zum Thema Knochenersatz. Die Beurteilung der verschiedensten allogenen, xenogenen und alloplastischen Materialien, die an Tier und Mensch experimentell überprüft wurden, erweist sich je nach Versuchsmethodik und Einsatzgebiet jedoch als schwierig und zum Teil kontrovers.

An ein ideales Knochenersatzmaterial müssen folgende Anforderungen gestellt werden [43]:

- keine immunologische Abstossungsreaktionen,
- keine toxischen oder mutagenen Nebenwirkungen,
- keine Kontamination mit Krankheitserregern (vgl. Kapitel 1.6.2),
- vollständiger knöcherner Ein- und Umbau, vollständige Resorption,
- osteoinduktive Wirkung (Freisetzung von Knochenwachstumsfaktoren),
- osteokonduktive Wirkung (Leitschieneffekt),

- biomechanische Eigenschaften (Festigkeit, E-Modul, Belastbarkeit etc.),
- einfache Verarbeitung,
- freie Verfügbarkeit in Größe und Menge,
- gute Lagerfähigkeit,
- niedrige Kosten.

Keines der bislang bekannten, oder in Erforschung befindlichen, Knochenersatzmaterialien erfüllt sämtliche der oben genannten Eigenschaften. Ziel der medizinischen Forschung muss es sein neue Materialien oder Kombinationsstoffe zu entwickeln die diesen Idealen in weiten Teilen entsprechen oder sehr nahe kommen.

Ein neuer Ansatz ist es, bekannte Knochenersatzmittel, als Trägersubstanz, mit Wachstumsfaktoren, wie z.B. den "Bone Morphogenetic Proteins", zu kombinieren.

Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte die Existenz der BMPs durch die Arbeitsgruppe um *Urist* nachgewiesen werden [14, 16]. Die Verbesserung der Aufbereitung von Knochenpräparaten führte zu den in Knochenbanken lagerfähigen AAA-Knochen [34]. *Wozney et al.* gelang es in den 80 er Jahren die BMPs weiter aufzubereiten, zu isolieren und zu charakterisieren und schließlich erfolgreich humanes BMP zu klonieren [35]. So wurde es möglich BMPs gentechnisch herzustellen.

Mittlerweile stehen BMPs in ausreichender Menge und in chemisch reiner Form zur Verfügung. Ein Träger für die Handhabung und Steuerung des induktiven Effektes ist notwendig, da BMPs schon in geringen μg Quantitäten wirksam sind.

Toriumi et al. postulierten folgende Anforderungen an das Trägermaterial [38]:

- größtmögliche Oberfläche des Transplantates im Lagergewebe,
- gleichmäßige Abgabe des Induktors ohne Ausschwemmen über die Grenze des Implantates,
- biodegradierbares, bzw. resorbierbares Material,
- biokompatibel und für den Empfänger ungefährliches Material,

- Geschwindigkeit der Trägerresorption soll gleich der Geschwindigkeit der Osteogenese sein,
- gute Formbarkeit des Trägermaterials.

Auch die Porenverteilung und die Größe der spezifischen Oberfläche des Trägers kann das in vivo Verhalten der Knochenersatzmaterialien beeinflussen, da die physikalisch-chemischen und zellulären Wechselwirkungen mit der Umgebung an der Oberfläche beginnen. Während Makroporositäten für den „Leitschieneneneffekt“ der Knochenersatzmaterialien verantwortlich sind, ist ein Einfluss der Mikro- und Mesoporen auf das Resorptionsverhalten anzunehmen [71].

Die Kombination aus geeigneten Trägermaterialien und osteoinduktiven Proteinen soll in der Lage sein die Knochenneubildungsrate, die Menge, die Qualität und die biomechanischen Parameter des neu gebildeten Knochens positiv zu beeinflussen.

Für diese Studie wurden acht verschiedene Materialien für rhBMP-2 ausgewählt. Mit Hilfe der Mikroradiographie, der Fluoreszenzmorphometrie und des Drei-Punkt-Biegeversuches, als biomechanische Testung, sollte die Qualität der einzelnen Materialien ermittelt werden, um so das effektivste Trägermaterial für rhBMP-2 zu ermitteln.

Die verwendeten Defektmodelle sind bei Ratten gut untersucht. Die Lagerqualitäten sowie die „kritische Größe“ sind für die Trepanationsdefekte an der Kalotte und im Kieferwinkelbereich, und für den Kontinuitätsdefekt am Femur hinlänglich bekannt [58, 72].

Okubo et al. konnten im heterotopen Tiermodell nachweisen, dass eine intra-, bzw. intermuskuläre Implantation von rhBMP-2 zu signifikant stärkerer Knochenneubildung führte als im Fettgewebe. Sie führten dies auf die bessere Durchblutung von Muskelgewebe zurück [73]. Für die Knochenneubildung entscheidend ist aber vor allem das Vorhandensein pluripotenter mesenchymaler Zellen. Diese stehen im Muskelgewebe und Knochenmark in ausreichender Zahl zur Verfügung um von freiwerdenden, oder zugesetzten, induktiven Proteinen zur osteoblastären

Differenzierung angeregt zu werden [74]. *Groeneveld et al.* folgerten aus dieser Tatsache, dass osteoinduktive Proteine bei intra-, bzw. intermuskuläre Implantation in niedrigerer Dosierung verabreicht werden können um eine Osteoinduktion zu bewirken [75].

Sowohl bei den Kalotten-, als auch bei den Kieferwinkelreparationsdefekten wurde dieselbe Menge rhBMP-2 verwendet. Bei den Versuchen mit dem Femurkontinuitätsdefekt wurde eine größere Menge des Proteins verabreicht um eine sichere Konsolidierung der Segmente zu gewährleisten.

Nach *Lexer* unterscheidet man ersatzstarke, ersatzschwache und ersatzunfähige Transplantat- bzw. Implantatlager (vergleiche Kapitel 1.6.1.1) [49].

Die Kalotte der Ratte ist aufgrund ihrer geringen Vaskularisierung und dem Mangel an Knochenmark als ersatzschwach anzusehen und führte auch bei vorliegender Studie zur schwächsten Reaktion. *Wang und Glimcher* konnten nachweisen, dass die undifferenzierten Stammzellen in diesem Defektmodell hauptsächlich aus der Dura stammen [76].

Femur und Unterkiefer sind besser durchblutet und zählen zu den ersatzstarken Lagern. Die im Vergleich zum Unterkiefer geringere Reaktion des Femurs ist durch den Versuchsaufbau zu erklären. Nach Entfernen des Knochensegmentes und Darstellung des Kontinuitätsdefektes wurde das Knochenmark aus den Femurstümpfen ausgespült, um einen zusätzlichen Wachstumsstimulus zu verhindern. Die dichte Struktur und die geringe Durchblutung der Kortikalis verhindern einen raschen Ablauf der Osteoinduktion, zusätzlich formt die kräftige zirkuläre Muskelmanschette das knöcherne Regenerat und mindert eine überschießende Reaktion.

Am stärksten war die Knochenneubildung am Unterkiefer zu beobachten. Die biomechanischen Biegekräfte die durch die Muskulatur auf den Kieferwinkelbereich einwirken dienen neben der Anhäufung undifferenzierter Progenitorzellen aus dem umgebenden muskulären Gewebe und den beim Kauen entstehenden Druckkräften als zusätzlicher Wachstumsstimulus. Die teilweise im Unterkiefer entstandenen Pseudozysten lassen sich durch das exostosenartige Wachstum und den damit

einhergehenden Veränderungen der Durchblutung, der Muskelzüge und des Trajektoriensystems der Kieferwinkelproben erklären. Versuche den Kieferwinkeldefekt, mit Hilfe von e-PTFE Membranen, von der Muskulatur zu trennen zeigten ein verringertes Auftreten von Exostosen und Zystenbildung [77].

Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Implantation der verwendeten Trägersysteme zusammen mit rhBMP-2 in nahezu allen Defektmodellen zur knöchernen Regeneration führte, als Träger für osteoinduktive Proteine erwiesen sich somit alle Materialien als erfolgreich. Die alleinige Implantation der Träger führte nicht zu einer knöchernen Überbrückung der Defekte. Die osteoinduktive Potenz von rhBMP-2 konnte eindeutig nachgewiesen werden.

Unlösliche kollagene Knochenmatrix (ICBM)

1965 konnte *Urist* nachweisen, dass demineralisierte Knochenmatrix (DBM) in der Lage ist, bei subkutaner Implantation, die knöcherne Hartgewebsbildung bei Ratten zu induzieren [14]. ICBM stellt eine osteoinduktiv inaktive Matrix dar, die mit induktiven Proteinen rekonstituiert werden kann. In zahlreichen Tierversuchen wie zum Beispiel an Kaninchen-Unterkiefern [14], Ratten- und Schafs-Femura [14, 78] und Ratten-Schädeln [79] wurde ICBM als Trägersystem für osteoinduktiv wirkende Proteine untersucht [80, 81]. Bereits in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts rekonstituierte die Forschergruppe um *Sampath* und *Reddi* ICBM mit BMP-3, implantierte es subkutan bei Ratten und konnte eine heterotope Knochenbildung de novo nachweisen. ICBM alleine war allerdings nicht zu einer Osteoinduktion befähigt [81]. Die Gruppe um *Wang* und *Wozney* konnte nachweisen, dass ICBM zusammen mit rekombinantem humanem BMP-2 in einem heterotopen Implantatlager zu einer Knochenbildung führt [82]. Später untersuchten *Yasko et al.* ICBM als Trägermaterial für rhBMP-2 bei Defekten kritischer Größe in einem orthotopen Tiermodell. Sie konnten nachweisen, dass die Kombination ICBM mit rhBMP-2 osteoinduktiv wirkt, und es zu einer knöchernen Konsolidierung

des 5mm großen Defektes kam. Bei der Kontrollgruppe konnte, nach Ablauf der 9 wöchigen Testphase, keine Knochenneubildung nachgewiesen werden [81]. Auch *Toriumi et al.* konnten bei Untersuchungen mit Defekten kritischer Größe radiologisch und histologisch beweisen, dass es beim Einsatz von ICBM mit rhBMP-2 zu einer Osteogenese am orthotopen Implantationsort kommt, wohingegen die Anwendung von reinem ICBM keine Osteoinduktion bewirken konnte [83]. *Marden et al.* untersuchten 1994 Defekte kritischer Größe an Rattenkalvarien und verglichen die osteogene Potenz von reinem ICBM, ICBM versetzt mit 2,2 mg rhBMP-2, ICBM versetzt mit 6,5 mg rhBMP-2 und demineralisierter Knochenmatrix. Dabei zeigte sich, dass ICBM mit der höheren rhBMP-2 Dosierung den anderen Systemen überlegen war und so die Osteoregeneration beschleunigt werden konnte [79]. Die Gruppe um *Kenley* hat in einer Studie den Einsatz von ICBM und Polylactid-Coglycolid, jeweils in Kombination mit rhBMP-2, an Defekten kritischer Größe an Rattenkalotten miteinander verglichen. Bei beiden Trägern kam es zu einer knöchernen Konsolidierung der Trepanationsdefekte, wobei der Träger ICBM bei Verwendung von 10µg rhBMP-2 signifikant mehr Knochen bildete als Polylactid-Coglycolid bei gleicher rhBMP-2 Zugabe. Bei Verwendung von 30µg rhBMP-2 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Trägersystemen. *Kenley et al.* folgerten daraus, dass auch nichtkollagene Träger in Verbindung mit rhBMP-2 osteoinduktiv wirksam sind, dass ICBM aber anderen Systemen bei niedriger Dosierung überlegen ist [78]. Diese Ergebnisse bestätigte auch die Gruppe um *Smith*, die unter anderem synthetische Trägersysteme (D,L-Laktid-Coglycolid) mit ICBM verglichen. Bei einer niedrigen Dosierung von rhBMP-2 konnte mit ICBM/rhBMP-2 ein höherer Verknöcherungsgrad erzielt werden als mit D,L-Laktid-Coglycolid. Erst bei einer höheren Dosis (30 µg) erwies sich , wie auch bei *Kenley et al.*, das synthetische Trägersystem als gleichwertig [84]. *Ripamonti et al.* untersuchten den Einfluss von ICBM in Kombination mit bovinen BMP an parodontalen Defekten an Affen. Er konnte eine Regeneration von sowohl Knochen, als auch Zement und Faserapparat nachweisen [82]. Die vorliegende Arbeit konnte die

osteoinduktive Wirkung von ICBM in Kombination mit rhBMP-2 eindeutig nachweisen und bestätigte die in der Literatur gefundenen Ergebnisse.

Bei der statistischen Auswertung der **mikroradiographischen** und der **fluoreszenz-morphometrischen Untersuchungen** zeigte das ICBM-rhBMP-2-System die stärkste Knochenneubildung aller getesteten Systeme. Die geringe Röntgenopazität des Trägers erlaubt eine eindeutige röntgenologische Beurteilung. Analog zu den Ergebnissen von *Kenley et al.* und der Gruppe um *Smith* konnte hier die Überlegenheit von ICBM gegenüber den anderen getesteten Trägern bei niedriger rhBMP-2-Dosierung nachgewiesen werden [84, 85]. Wie bei *Marden et al.* zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen alleiniger Einbringung der bovinen Matrixpräparation und der Implantation von ICBM zusammen mit osteoinduktiven Morphogenen [84].

Zwar zeigten teilweise andere Knochenersatzmaterialien, wenn sie ohne rhBMP-2 implantiert wurden, ein gering höheres Maß an Verschattungen im Röntgenbild, dies lässt sich aber auf die Eigenopazität der nicht abgebauten Träger zurückführen. ICBM ist vollständig resorbierbar und wirkt, wie auch die anderen untersuchten Träger, nicht osteoinduktiv. Analog zu den Versuchen der Gruppe um *Smith et al.* zeigten sich bei dem Kalottendefektmodell ohne Zusatz von rhBMP-2 nur minimale Verknöcherungen, die hauptsächlich vom Defektrand ausgingen. Diese Tatsache deckt sich mit früheren Untersuchungen, dass die gewählte Defektgröße auch tatsächlich einem Defekt kritischer Größe bei Rattenkalotten entspricht [82, 86]. Bei der Kombination rhBMP-2 mit ICBM konnten, wie auch bei *Smith et al.*, signifikante Radioopazitäten festgestellt werden, auch die fluoreszenzmorphometrischen Ergebnisse entsprechen weitgehend dieser Arbeit [84].

Vor allem in den Unterkieferproben dominierte ICBM. Schon bei der makroskopischen Auswertung der Proben konnten auffällige Exostosen und Pseudozysten festgestellt werden. Ursächlich für diese starke, überschießende Knochenneubildung erscheint die Kombination aus einwandernden, undifferenzierten Progenitorzellen der umgebenden Muskelschlinge und der starken biomechanischen Belastung des Unterkiefers [84].

Die **morphometrischen Untersuchungen** zeigten, dass bereits nach 2 Wochen eine signifikant höhere Knochenneubildung stattgefunden hat als bei allen anderen Materialien. Auch nach 21 und 28 Tagen konnte ICBM eindrucksvoll seine überragenden Eigenschaften als Träger demonstrieren und zeigte eine höhere und schnellere knöcherne Überbrückung des Defektes.

Bei der **biomechanischen Testung** in Form des Drei-Punkt-Biegeversuches wies ICBM, mit Ausnahme von α -TCP, das höchste E-Modul auf. Im Vergleich mit den Kollagen Typ-I- und Ethisorb[®]-Trägern konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die unoperierten Kontrollgruppen zeigten signifikant höhere Youngshear-Module auf als alle getesteten Materialien.

Besonders das rasche Resorptionsverhalten und die gute knöcherne Integration des Trägermaterials ICBM bedingen diese positiven Ergebnisse.

Die Ergebnisse der **mikroradiographischen, morphometrischen und biomechanischen Untersuchungen** zeigen, dass ICBM die osteogene Potenz von rhBMP-2 positiv zu beeinflussen vermag. *Smith et al.* führten dies auf ein besseres Freisetzungsverhalten für rhBMP-2 und die Geometrie von ICBM zurück, die die zelluläre Infiltration und Proliferation besser ermöglicht, verglichen mit anderen Trägermaterialien [84]. Auch die Anwesenheit von Kofaktoren in der ICBM-Fraktion, die zwar selbst nicht osteoinduktiv wirksam sind, aber eine synergistische Wirkung auf rhBMP-2 besitzen, könnten für die guten Ergebnisse mitverantwortlich sein. Bei zahlreichen Untersuchungen konnte bereits die positive Wirkung von TGF- β auf die Knochenneubildung nachgewiesen werden [14, 84, 87, 88]. Auch die in der ICBM-Zubereitung nachgewiesenen Bone-derived Growth Factors I und II [62], die Skeletal Growth Factors [89], die Insulin-like Growth Factors [90] und die Endothelial Growth Factors [91] könnten eine synergistische Wirkung auf rhBMP-2 haben. Inwieweit jedoch diese Wachstumsfaktoren bei der Herstellung und Aufbereitung von ICBM inaktiviert werden ist noch unklar.

Beim Einsatz von bovinem ICBM müssen immunologische Aspekte und das Risiko einer möglichen Krankheitsübertragung, gerade in Hinblick auf die Prionen-Problematik beachtet und kritisch bewertet werden.

Die Gruppe der Kalziumphosphatkeramiken

Seit nahezu 30 Jahren werden Kalziumphosphatkeramiken als Knochenersatzmaterialien in der Chirurgie und Orthopädie eingesetzt. Die Forschungsgruppen um *Heide* und *Köster* führten bereits in den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts tierexperimentelle Untersuchungen an Kalziumphosphatkeramiken durch und setzten es später auch klinisch ein [92, 93]. Vor allem α -, β -TCP, synthetische und halbsynthetische Hydroxylapatitkeramiken mit einem stöchiometrischen Ca-/P-Verhältnis von 1,5 bzw. 1,67 weisen eine optimale biologische Kompatibilität auf; dabei zeigen TCP-Keramiken eine ausgeprägte Resorbierbarkeit [94]. Bei den β -TCP-Keramiken ist diese biologische Reaktion besonders stark ausgeprägt [95]. *Lemons* teilte die keramischen Knochenersatzmaterialien nach ihren Wechselwirkungen zum umgebenden Gewebe ein, um sie mit anderen Keramiken zu vergleichen. Dabei wurden unter anderem Hydroxylapatit als mäßig aktiv, bzw. bioaktiv, und Trikalziumphosphat als aktiv, bzw. biologisch abbaubar charakterisiert [96]. Nach *Osborn* sollen zumindest Hydroxylapatitkeramiken nach orthotoper Implantation bioaktiv wirken, d. h. sie sollen die Knochenheilung fördern [97].

In Folge positiver klinischer Erfahrungen im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie [98], und durch die viel versprechenden Ergebnisse klinischer Untersuchungen im Rahmen von Defektauffüllungen in der Parodontalchirurgie [99] erweiterte sich im Laufe der Zeit der Anwendungsbereich der Kalziumphosphatkeramiken auf fast alle Disziplinen der Humanmedizin.

Tracy et al. und *Daculsi et al.* konnten durch ultrastrukturelle Untersuchungen der Kontaktfläche zwischen nativen Knochen und implantierten

Calciumphosphatkeramiken nachweisen, dass sich an der Grenzfläche der Materialien eine reaktive Apatitschicht ausbildet [99]. Synthetische Hydroxylapatitkeramiken werden zunehmend zur Beschichtung von dentalen Implantaten und Endoprothesen verwendet, da ihre oberflächliche Osteokonduktivität einen sicheren Knochen-Implantat-Verbund gewährleistet [100]. Die unsicheren biomechanischen Eigenschaften - vor allem die geringe Zugkraft und die niedrige Toleranz gegenüber Scherkräften - müssen dabei jedoch besonders kritisch gewertet werden [69, 96]. Letztendlich wirken die Kalziumphosphatkeramiken nur osteokonduktiv und setzen ersatzstarkes knöchernes Lagergewebe voraus [101, 102].

Dies und die unsichere biologische Reaktion des Organismus in Bezug auf die Resorbierbarkeit und die funktionellen Integration in das Lagergewebe zeigen die großen Probleme der Kalziumphosphatkeramiken auf [103].

BMPs besitzen eine gute Affinität zu Trägermaterialien aus dem Bereich der Kalziumphosphatkeramiken [104]. Bei der Kombination mit BMP, oder BMG, kommt es nachweisbar zu einer Überbrückung des Knochendefektes und zu einer Osteogenese [105].

Synthetisches Hydroxylapatit (HA)

Synthetische hochreine Hydroxylapatitkeramiken, wie die in dieser Studie verwendete Keramik des Hersteller Biovision, zeichnen sich vor allem durch ihre gute Biokompatibilität aus. Es bestehen keine Bedenken über Karzinogenität, Toxizität oder immunologische Abstoßungsreaktionen [96]. Bedingt durch den Sinterungsprozess bei der Herstellung entstehen vorwiegend amorphe, phasenreine Kalziumphosphatverbindungen mit einem kristallinen HA-Anteil von über 95%.

Hydroxylapatitkeramiken werden nur extrem langsam resorbiert und sind die unlöslichsten und somit stabilsten Vertreter der Calciumphosphate [103]. Nach Implantation erfolgt ein physikalisch-chemischer Abbau, der von der Struktur und Geometrie der Keramik abhängig ist [46]. Aufgrund des niedrigen lysosomalen pH

erfolgt eine zelluläre Auflösung des HA, wobei eine Beteiligung von Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten in der Literatur diskutiert wird [46, 106].

Andere Forschungsgruppen jedoch, wie *Schepers et al.* und *Rueger et al.* konnten keine Resorption der Hydroxylapatitkeramiken nachweisen; *Rueger* beschrieb lediglich einen Abbau „in einem nicht messbaren Ausmaß“ [43].

In dieser Studie konnte nach Ablauf der Versuchzeit keine signifikante Resorption der Hydroxylapatitkeramiken festgestellt werden.

Nach *Katthagen et al.* verhindert ein derartiges Resorptionsverhalten eine vollständigen Durchdringung des Implantates durch neu gebildeten Knochen [104]. Selbst im ersatzstarken Lager findet kaum eine Resorption oder ein Remodelling statt. Ausschlaggebend für die Langzeitstabilität der HA-Keramiken sind das, zum TCP unterschiedliche, Lösungsverhalten [107] und die Größe der Kristallite. Diese zum Teil mehrere Mikrometer (ca. 1000 Å) großen Bestandteile können vom Organismus nicht abgebaut werden.

Weinländer et al. führten diese, in der Literatur beschriebenen, teilweise widersprüchlichen Ergebnisse auf unterschiedliche Versuchsbedingungen und -tiere, Implantationsorte und -methoden, sowie unterschiedliche Darreichungsformen des HA zurück [108]. In Publikationen von *Pinholt et al.* und *Ripamonti et al.* wurde der Einfluss der geometrischen Beschaffenheit von Keramiken ausführlich dargestellt. Dichte HA-Partikel ohne Poren und granuläre HA-Implantate wiesen keine Beziehung zu neu formierten Knochen auf. Knochenneubildung fand nur in porösen Material statt [109, 110]. *Kühne et al.* konnten nachweisen, dass auch der Porendurchmesser einen wesentlichen Einfluss auf die knöcherne Durchbauung des Implantates ausübt. In ersatzstarkem Knochengewebe zeigten Keramikimplantate mit großem Porendurchmesser eine bessere Defektheilung als kleinporige Hydroxylapatitkeramiken [111]. Die Poren müssen einen Mindestdurchmesser von 75-100µm aufweisen, damit Knochengewebe einwachsen kann. In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass ein Durchmesser im Bereich von 500 µm die Defektheilung am geringsten behindern soll. Ein interkonnektierendes Porensystem begünstigt die knöcherne Durchbauung von

keramischen Implantaten [112]. Technisch sind solche Porensysteme aber nur schwer realisierbar und kommen nur in Kalziumphosphaten biologischen Ursprungs vor [113]. Aufgrund dieser geometrischen Besonderheit weisen synthetische Hydroxylapatitkeramiken nur eine spezifische Oberfläche von 0,6-1,8 m²/g auf, menschliche Spongiosa dagegen 50-100 m²/g [97, 113]. Sie werden deshalb nur oberflächlich knöchern eingebaut und es kommt nur zu einem randständigen Einwachsen des neu gebildeten Knochens [44, 97]. Im Vergleich mit natürlichem Knochen sind Kalziumphosphatkeramiken sehr spröde. Die Festigkeit ist stark abhängig vom Herstellungsverfahren und von der Geometrie. Bei zunehmender Porosität nimmt die Festigkeit ab.

Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass es bei allen rhBMP-2 haltigen Proben zu einer Knochenneubildung mittleren Ausmaßes kam. Die **mikroradiographischen Untersuchungen** zeigen deutlich, dass im ersatzstarken Lager, Femur- und Kieferwinkeldefekt, eine signifikant stärkere Knochenneubildung stattgefunden hat, als in der ersatzschwachen Kalotte. In der Literatur publizierten Ergebnisse zeigen übereinstimmend dieses lagerkritische Verhalten der HA-Keramiken [97, 114]. Im Vergleich zu ICBM zeigte sich das synthetische HA als Träger in den hier getesteten Defektmodellen unterlegen. Im ersatzstarken Lager konnte die gemessene Knocheninduktion durch HA-rhBMP-2 keine signifikanten Unterschiede zu den anderen getesteten Kalziumphosphatkeramiken erkennen lassen. Es bleibt zu beachten, dass aufgrund der hohen Röntgendichte der Keramiken und der unsicheren Resorption die Mineralisation des neu gebildeten Knochens im Röntgenbild nur unsicher zu beurteilen ist und daher eine Knochenneubildung nur unsicher bewertet werden kann [115].

Im Vergleich zu ICBM und α -TCP als Trägermaterialien zeigte sich bei den **fluoreszenzmorphometrischen Untersuchungen** im ersatzschwachen Gewebe eine verzögerte Osteoinduktion durch HA-Keramiken. Nach 28 Tagen konnten fluoreszenzmikroskopisch immer noch weite knochenfreie Areale nachgewiesen werden. *Horisaka et al.* konnten bei der subperiostalen Implantation von

Hydroxylapatitscheiben mit BMP nachweisen, dass erst nach 28 Tagen Knochen im Zentrum des Trägers nachzuweisen war [116]. Im Femurdefekt war, gegenüber α -TCP, eine erhöhte Knochenneubildungsrate zu beobachten, die auch *Lemons* bei Tibialäsionen an Kaninchen zeigen konnte [115].

Die **biomechanischen Untersuchungen** zeigten für die HA-Keramiken ein niedrigeres Elastizitätsmodul als bei ICBM und α -TCP. Im Vergleich mit den anderen Knochenersatzmaterialien war es größer, wenngleich auch keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Das schlechte Resorptionsverhalten der HA-Keramiken [115, 117] und das Ausbleiben eines Remodellingprozesses führten nur zu einem, auch von *Günther, Rüger* und *Ochsner* in der Literatur dargestellten, oberflächlichem und randständigem Einsprießen neu gebildeten Knochens in das Keramikimplantat, eine funktionelle Ausrichtung der Knochenbälkchen ist nicht gegeben [44]. Für ein, im Vergleich zu ICBM, geringeres Youngscher'sches Modul scheint vor allem die Porosität, und damit die erniedrigte Festigkeit [98], die fehlende Interkonnektivität des Porensystems [113] und der nur oberflächliche Einbau der synthetischen HA-Keramik [98] verantwortlich zu sein.

Synthetisches α -Tricalciumphosphat (α -TCP)

Die synthetische Kalziumphosphatkeramik TCP zeichnet sich, wie auch die HA-Keramik, durch ihre gute Biokompatibilität und Gewebeverträglichkeit aus [113]. Obwohl beide Keramiken einen ähnlichen chemischen Aufbau aufweisen unterscheiden sie sich stark in ihrem biologischen und mechanischen Verhalten. Nach *Rueger et al.* lässt sich dies auf unterschiedliche Stöchiometrie, Kristallform und -größe, Herstellungsverfahren, Phasenreinheit und den entstehenden pH-Wert nach Implantation zurückführen [104]. Ähnlich den HA-Keramiken erfolgt die Herstellung über die Umsetzung der Ausgangsmaterialien und anschließender Sinterung. Dabei entsteht die kristalline, phasenreine Form des TCP. Es lassen sich die Hochtemperatur-, α -TCP, und die Tieftemperaturmodifikation, β -TCP, unterscheiden. Die

Umwandlungstemperatur liegt bei ca. 1125°C. Obwohl chemisch identisch, unterscheiden sich beide in ihrem physiologischen Verhalten. Die bei Raumtemperatur metastabile Hochtemperaturphase ist reaktiver als β -TCP [118]. Nach *Foitzik und Merten* ist die α -Phase nur langsam resorbierbar und auch „nach Jahren im Knochen nachweisbar, wohingegen die β -Phase des TCP bereits nach acht bis zwölf Monaten [...] vollständig resorbiert und vom natürlichen Knochen ersetzt wird“ [119]. Im Gegensatz dazu ordneten *Rameselaar et al.* die Resorbierbarkeit von β -TCP zwischen den schwer löslichen Hydroxylapatitkeramiken und dem leicht resorbierbaren α -TCP ein [120]. Diese widersprechenden Ergebnisse hinsichtlich des Resorptionsverhaltens der α - und β -Phase der TCP-Keramiken lassen sich wahrscheinlich auf unterschiedlich dimensionierte Granula zurückzuführen. Die Resorption erfolgt, aufgrund ihrer physiologischen Löslichkeit, über eine hydrolytischer Halisterese sowie über einen zellulären Angriff durch Phagozytose mit anschließendem knöchernen Ersatz im Sinne der „creeping substitution“ [121-123]. Nach *Rueger et al.* stimulieren TCP-Keramiken einen anhaltenden Resorptionsprozess über Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, der jedoch nicht in der Lage ist das Ersatzmaterial vollständig abzubauen [122]. Keramische Phasen des TCP sind chemisch sehr stabil, unterliegen kaum einer Resorption und werden heute nur noch selten als Knochenersatzmaterial verwendet [122]. Die Porendurchmesser und die spezifische Oberfläche üben einen großen Einfluss auf die knöchernen Durchbauung des Knochenersatzmaterials aus. Nach *Shimazaki et al.* wirkt sich ein Porendurchmesser von ca. 500 μ m auf die Defektheilung am günstigsten aus [122]. Bei dieser Größe scheint sich eine verbesserte kapillare Wirkung und schnellere Vaskularisation des Trägers einzustellen. Ein interkonnektierendes Porensystem ist auf Grund des Herstellungsprozesses der TCP-Keramiken nicht realisierbar. Ähnlich den synthetischen HA-Keramiken liegt die spezifische Oberfläche bei TCP-Implantaten nach *Weibrich et al.* bei 0,7-1,3 m²/g [124].

Rueger et al. konnten in tierexperimentellen Versuchen beweisen, dass sowohl bei HA- als auch bei TCP-Keramiken keine vollständige Resorption stattfindet und neu gebildeter Knochen nur randständig in das Implantat einwächst [104].

An der Kontaktfläche zum Defektrand führt die hydrolytische Korrosion zu einer mit Calcium- und Phosphat-Ionen angereicherten Reaktionsschicht, in die Kollagen und Zellen eingelagert werden und anorganische Knochensubstanz abgegeben wird. Die Defektheilung beruht auf dem Mechanismus der Verbundosteogenese, wobei knöchern eingehheilte Implantatreste vom Knochen exponiert werden und einem weiterem Abbau und Remodelling unterliegen [125]. Die poröse TCP-Keramik dient als angioosteokonduktive Leitschiene für die vom Defektrand, inter- und intragranulär, einsproßenden Knochenregenerate [117].

Die Eignung von TCP-Keramiken als Träger für BMP konnte die Forschungsgruppe um *Urist et al.* schon vor ca. 20 Jahren demonstrierten, als sie induktive Proteine mit TCP kombinierten [117]. Bei Defekten kritischer Größe an Hundeschädeln hat die Kombination von β -TCP und BMP zu einer knöchernen Defektheilung geführt. Allerdings konnte nach Versuchsende immer noch mehr als die Hälfte der implantierten Keramik im Knochen nachgewiesen werden [126]. *Hotz et al.* untersuchten makroporöses TCP, neben anderen Kalziumphosphatkeramiken. TCP kann wie die synthetischen Hydroxylapatitkeramiken, als „slowly delivery system“ für osteoinduktive Proteine bezeichnet werden [126].

Mikroradiographisch und **morphometrisch** konnte in der vorliegenden Studie eine gesteigerte Knochenneubildung bei der Kombination von synthetischem α -TCP mit rhBMP-2 nachgewiesen und die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen nachvollzogen werden. Quantitativ fallen die Ergebnisse allerdings geringer aus, als bei der ICBM-rhBMP-2-Gruppe. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, ohne Zugabe von rhBMP-2, zeigte sich in allen Lokalisationen eine signifikante Erhöhung der Knochenbildung. Beim ersatzstarken Femur fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu der Knochenneubildung anderer Kalziumphosphatkeramiken, die Geschwindigkeit der Knochenneubildung war, wie auch schon von *Lemons* beobachtet wurde, etwas geringer

als die der HA-Keramik [115]. Im Kieferwinkel- und im Kalottendefekt zeigte sich im direkten Vergleich dagegen eine erhöhte Knochenneubildung, wobei eine breite Streuung der Werte für das Unterkieferdefektmodell eine genauere Vorhersagbarkeit der Osteoinduktion verhindert. Bei der Fluoreszenzmorphometrie konnte im Kieferwinkeldefekt gegenüber HA keine beschleunigte Reaktion nachgewiesen werden, im Kalottendefekt dagegen zeigte α -TCP eine erhöhte Kinetik, womit α -TCP auch als Knochenersatzmaterial im ersatzschwachen Lager zu verwenden ist. Im funktionsbelasteten Unterkiefer lässt sich die hohe Knochenneubildungsrate dadurch erklären, dass sich bedingt durch ein ausbildendes Trajektoriensystem Knochen von der Oberfläche des Implantats löst, diese freigibt und ein weiteres Remodelling stattfinden kann [127]. Es ist anzunehmen, dass TCP-Keramiken eine höhere Affinität zu BMP aufweisen, als andere Kalziumphosphatkeramiken [115]. Auffallend war, dass synthetisches α -TCP als einziger Vertreter der Kalziumphosphatkeramiken in dieser Studie einem nachweisbaren resorptiven Effekt unterlag, jedoch nicht in dem Ausmaß, wie von einigen anderen Autoren postuliert wurde [127].

Im **Drei-Punkt-Biegeversuch** konnte für synthetisches α -TCP, neben ICBM, das größte Elastizitätsmodul nachgewiesen werden. Nach Untersuchungen von *Lemons* ist TCP ein biologisch aktiver und resorbierbarer Träger [96]. Auch die Forschungsgruppen um *Groot* und *Ramselaar* konnten für α -TCP Resorptionsvorgänge nachweisen [94, 114]. Das stattfindende Remodelling und der Einbau der Keramik in Form einer Verbundosteogenese erklären die gute biomechanische Eignung von α -TCP als Träger für rhBMP-2. Dennoch scheint die Ausbildung eines regelrechten Trabekelsystems, wie auch bei den anderen Vertretern der Kalziumphosphatkeramiken, nicht gewährleistet zu sein.

Halbsynthetisches Algipore®

Das phytotrophe Algipore® gehört zu den Vertretern der halbsynthetischen Kalziumphosphatkeramiken und wurde erstmals 1985 aus dem kalkinkrustierenden

Exoskelett von Meeresalgen gewonnen [94, 96]. Aufgrund seiner natürlichen Herkunft weist es ein interkonnektierendes Porensystem mit Porengrößen zwischen 500 und 1000µm auf und besitzt eine relativ hohe spezifische Oberfläche (10-50 m²/g), die der menschlichen Spongiosa (50-100 m²/g) sehr ähnlich ist [94, 128, 129]. Nach *Ewers et al.* garantiert dies eine bessere Knocheninterposition des Materials und das Einwachsen von neu gebildetem Knochen in die Mikroporositäten [130]. *Ohgushi et al.* konnten in tierexperimentellen Studien herausstellen, dass koralline Kalziumphosphatkeramiken mit Porendurchmessern zwischen 200 und 600µm besonders schnell knöchern durchbaut werden [72]. In zahlreichen Studien zeigten koralline HA-Keramiken die Fähigkeit zur Osteokonduktion und Defektreparation im Sinne einer Verbundosteogenese [128, 129, 131]. Nach Angaben des Herstellers, Friadent GmbH, findet die Ersatzresorption bei Algipore[®] innerhalb von 12-24 Monaten statt. Obwohl korallinen HA-Keramiken von einigen Autoren eine bessere Abbaubarkeit als anderen Kalziumphosphatkeramiken eingeräumt wird [132], kann eine vollständige Resorption von Algipore[®] wohl ausgeschlossen werden, da es nach zwei Jahren immer noch nachweisbar war [131]. In der humanen Anwendung von Algipore[®] konnten *Schumann et al.* in Nachuntersuchungen „nicht nur eine optimale Knocheninterposition, und ein konduktives Verhalten, sondern auch eine Reossifikation auf dem Wege einer Ersatzresorption“ feststellen [133].

Verschiedene Autoren untersuchten koralline HA-Keramiken in Kombination mit induktiven Proteinen und konnten ihre Eignung als Trägermaterialien bestätigen. So beschrieben *Terheyden et al.* die verhältnismäßig starke Knochenneubildung und Fähigkeit zur Osteoinduktion bei der Kombination aus Algipore[®] und rhOP-1 bei der Unterkieferaugmentation und in Unterkieferkontinuitätsdefekten an Ratten [131, 133]. *Feifel et al.* untersuchten Algipore[®] als Träger für osteoinduktive Proteinkomplexe an Kaninchen [133]. Die Gruppe um *Gao* konnte zeigen, dass die Kombination koralline HA-Keramik, Typ-IV-Kollagen und mBMP in der Lage ist mehr Knochen zu bilden als die Kontrollgruppe aus korallinen HA-Keramik-Implantaten [133]. *Tuominen et al.*

konnten den positiven Effekt von BMP auf koralline HA-Implantate am Hundedefektmodell nachweisen [134].

Auch in dieser Studie konnte die Eignung von Algipore® als Träger für rhBMP-2 nachgewiesen werden. **Mikroradiographisch** zeigte sich eine Knochenneubildung mittleren Ausmaßes ähnlich den anderen getesteten Vertretern der Kalziumphosphatkeramiken. In der ersatzschwachen Kalotte ähnelt es stark den synthetischen HA-Keramiken. Eine, wie von *Hotz et al.*, beobachtete, bis zu 2,5-fach gesteigerte Knochenneubildung gegenüber anderen Trägern für BMP, konnte nicht festgestellt werden [135]. Durch den vollkommenen knöchernen Einschluss kleinerer Granula entziehen sich die Partikel einem direkten zellulären Angriff, wodurch das Abbauverhalten deutlich reduziert wird. Größere Algipore®-Granula verhindern so nachhaltig das funktionelle Remodelling, so dass eine funktionelle, strukturelle Adaption des neu gebildeten Knochens nur im begrenzten Umfang erfolgen kann.

Fluoreszenzmorphometrisch zeigte sich, bei unseren Untersuchungen, eine Verlangsamung der Knochenneubildungsrate gegenüber den Vertretern der synthetischen Kalziumphosphatkeramiken.

Für die Kombination aus Algipore® und rhBMP-2 konnten bei der **biomechanischen Untersuchung** im Vergleich zu ICBM-rhBMP-2 signifikant niedrigere E-Module festgestellt werden. Der Vergleich mit den anderen Materialien zeigte, dass Algipore® ähnliche Werte aufweist wie BioOss®, Bioglas, Kollagen Typ-I und Ethisorb®. Die vollsynthetischen HA- und α -TCP-Keramiken ergaben höhere Youngsher-Module.

Aufgrund der Fähigkeit zur Verbundosteogenese und den Vorhandensein eines interkonnektierendes Porensystem wäre eine bessere biomechanische Eignung des Trägers zu erwarten gewesen [113, 131, 136]. Allerdings verhindert die Größe der Algipore®-Partikel und der knöchernen Einschluss der Granula einen vollständigen knöchernen Umbau des Materials und eine funktionelle Ausrichtung des Regenerates.

Untersuchungen von *Gao et al.* zeigten, dass koralline Hydroxylapatitkeramiken in Verbindung mit Typ-IV-Kollagen und mBMP niedrigere biomechanische Werte im Vergleich zu unadsorbierten korallinen HA-Keramiken aufweisen [132]. Das

Vorhandensein von BMP scheint die Knochenbildung soweit beschleunigt zu haben, dass die Granula knöchern eingeschlossen wurden und sich einem weiteren Resorptionsprozess und dem damit verbundenen funktionellen Remodelling entzogen haben.

Halbsynthetisches BioOss®

Gemäß seiner natürlichen Herkunft aus vollständig enteiweißten, pyrolisierten und chemisch inaktivierten Rinderknochen [137] weist das allogene Knochenersatzmaterial alle Merkmale natürlicher, boviner Spongiosa auf. Bei der Implantation bleibt die Trabekelstruktur bovinen Ursprungs erhalten. BioOss® besteht aus einem Apatitgerüst mit einem Kalzium-Phosphationen-Verhältnis von 2:1. Die Porengröße beträgt zwischen 100 und 1500 µm. Aufgrund der vollständigen Poreninterkonnektivität und der verhältnismäßig kleinen Kristallite (ca. 10-30 nm) beträgt die spezifische Oberfläche ca. 80 m²/g [138]. Das allogene Knochenersatzmaterial BioOss® ähnelt somit sehr stark der menschlichen Spongiosa, die Kristallitgröße übersteigt aber die der humanen Apatitkristallite um den Faktor 100, weswegen bovine HA-Keramiken als nicht resorbierbar gelten [46]. Neben vielen anderen Studien konnte unter anderem *Schlegel* in der humanen Anwendung keine Resorption nachweisen [139]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten weder die Anwendung des Granulats noch der implantierte Spongiosablock Anzeichen von Resorptionsprozessen.

Die osteokonduktiven Eigenschaften von BioOss® wurden von *Jensen at al.* als „exzellent“ beschrieben [46]. In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, dass bovine HA-Keramiken bei metaphysärer Implantation und mechanischer Ruhigstellung knöchern durchbaut werden [139]. Allerdings erfolgt fast nur äußerlicher Knochenanbau, eine Vaskularisierung in die inneren Bereiche oder Remodelling konnte von *Donath* nicht bestätigt werden [140]. BioOss® findet, wie andere biologisch alloplastische Knochenersatzmaterialien, hauptsächlich Verwendung als formstabiler

Knochenersatz, Füllmaterial , z. B. zur Sinusbodenelevation, und als Augmentationsmaterial, z. B. von Knochendefekten [139, 140].

Tuominen et al. untersuchten mit BMP versetzte bovine Knochenimplantate an Hunden. Die Gruppe konnte allerdings keine signifikante Verbesserung zu dem Einsatz unsubstituierter boviner Knochenimplantate feststellen, sie führten dies auf eine zu rasche Resorption ihres Trägermaterials zurück [139]. Im Gegensatz dazu konnte, in der hier vorgestellten Studie, im Ablauf des Untersuchungszeitraumes keine signifikante Resorption des Materials festgestellt werden.

In vorliegender Arbeit zeigten die **mikroradiographischen Untersuchungen**, dass der Einsatz von BioOss[®] in Verbindung mit rhBMP-2 im ersatzstarken Lager eine Knochenneubildung mittleren Ausmaßes bewirkte (Femur- und Kieferwinkeldefekt). Im Vergleich zu anderen Vertretern der Kalziumphosphatimplantate zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Osteoneogenese, die Mittelwerte waren aber in allen untersuchten Lokalisationen geringer. Das BioOss[®]-Implantat ohne rhBMP-2 führte nur zu einer unvollständigen Defektheilung und vernachlässigbaren Knochenneubildung. Die Ergebnisse im Femurkontinuitätsdefekt sind kritisch zu bewerten, da der eingebrachte BioOss[®]-Spongiosablock mikroradiographisch nur schwer von neu gebildeten Knochen zu differenzieren war. In der ersatzschwachen Kalotte zeigte das bovine Knochenersatzmaterial geringere Werte als die anderen getesteten Kalziumphosphatkeramiken, im Vergleich zu α -TCP sogar signifikante Unterschiede. Im Wesentlichen decken sich die Ergebnisse mit den Beobachtungen von *Terheyden et al.*, die BioOss[®] mit rhBMP-7 implantierten. Sie konnten in zahlreichen Untersuchungen die Eignung als Trägermaterialien für rhBMP-7 (=rhOP-1) bestätigen [134, 139]. *Terheyden et al.* untersuchten unter anderem die Sinusbodenaugmentation am Minischwein mittels BioOss[®] und OP-1 zur Implantatvorbereitung [135] und die erfolgreiche heterotope Knochenneubildung bei der Kombination BioOss[®] mit rhOP-1 im Latissimus dorsi Muskel des Göttinger Minischweines [134].

Morphometrisch zeigte die bovine HA-Keramik eine, im Vergleich mit den anderen Kalziumphosphatkeramiken, niedrigere Knochenneubildungsrate. BioOss[®] weist gemäß

seines bovinen Ursprunges ein interkonnektierendes Porensystem auf [141], allerdings wurde in zahlreichen Studien belegt, dass es als nicht resorbierbar einzustufen ist [46, 139]. Obwohl die Trabekelstruktur von BioOss[®] erhalten bleibt kommt es zu keinem funktionellen Remodelling, da lediglich ein äußerlicher Knochenanbau stattfindet, was in einer erniedrigten biomechanischen Belastbarkeit und Festigkeit resultiert [140]. Die **biomechanischen Untersuchungen** vorliegender Studie zeigten, dass das ermittelte durchschnittliche E-Modul geringer ausfiel als bei ICBM, synthetischem Hydroxylapatit und synthetischem α -TCP.

Bioglas

Als Vertreter der synthetischen, anorganischen Trägermaterialien wurde die amorphe Glaskeramik Bioglas verwendet. Glaskeramiken unterscheiden sich in ihren unterschiedlichen Anteilen an Silizium, Alkali, Erdalkali und Phosphaten, die das biologische Verhalten der Knochenersatzstoffe beeinflussen [139]. Der Hersteller *Biovision* gibt die Zusammensetzung für Bioglas mit 45 Gew.% SiO₂, 24,5 Gew.% CaO, 24,5 Gew.% Na₂O und 6 Gew.% P₂O₅ an. Die Größe der Glaspartikel beträgt 200-500 μ m, der Anteil an Mikro- und Makroporositäten wird mit 60% angegeben. Entgegen den Aussagen von *Berens et al.* [140] und *Wheeler et al.* [142] musste die Forschungsgruppe um *Weibrich* bei ihren Untersuchungen zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche verschiedener Knochenersatzmaterialien ein interkonnektierendes Porensystem bei Biogläsern ausschließen. Für das von ihnen untersuchte Biogran[®], welches nach den Gewichtsanteilen identisch zu dem hier verwendete Bioglas ist, konnte nur eine spezifische Oberfläche von 0,2 m²/g festgestellt werden [143]. Nach Herstellerangaben soll die Degradation des Knochenersatzmaterials 6-24 Monate betragen, dieser Zeitraum konnte von *Griss et al.* im Schafsdefektmodell bestätigt werden [144].

Ein Ionenaustausch von Calcium- und Siliziumionen zwischen Glaspartikeln und organischem Gewebe (Korrosion) führt zu einer von Kalzium-Phosphationen umhüllten Siliziumoxyd-Gelschicht [145, 146]. Nach *Schepers et al.* kann bei einer geeigneten Größe zwischen 300-360 μm das ganze Partikel in dieses Gel umgewandelt werden. Phagozyten können diese Siliziumoxyd-Schicht penetrieren und resorbieren. In den entstehenden Resorptionslakunen soll es zu einer Differenzierung von Mesenchymalzellen in Osteoblasten kommen [146]. Die chemische Zusammensetzung beeinflusst die Osteogenese durch Biogläser. Nach vergleichenden Studien von *Berens et al.* erlauben „Höhere Anteile von Kalzium- und Kaliumoxid [...] eine schnellere Mineralisation. [...] Höhere Anteile von Phosphat, Natriumoxid, und Magnesiumoxid führen zu einem weitgehenden Ausbleiben der Mineralisierung“ [147].

Bioaktive Gläser werden seit ca. 30 Jahren klinisch angewendet. *Hench et al.* untersuchten erstmals 1973 das Verhalten von bioaktiven Gläsern auf Gewebe. Im Knochen implantiert konnten sie eine oberflächliche Knochenauflagerung auf das Implantat beobachten [148]. Bei der Implantation von Biogläsern konnte in zahlreichen Studien eine innige Verbindung zwischen Glaskeramik und Knochen nachgewiesen werden. So z. B. von *Griss et al.* [148, 149], *Merwin et al.* [144] und *Kokubo* [145], beschrieben. Diese starke Knochen-Implantat-Verbindung, resultiert aus Wechselwirkungen zwischen der Kalzium-Phosphatreichen Hydroxylapatit-Schicht an der Oberfläche der Glaskeramik und dem Kollagen und der Glykoproteine des Knochens [150]. In der Literatur findet sich die osteokonduktive Wirkung von bioaktiven Gläsern bestätigt. *Schepers et al.* beschrieben in ihren Versuchen die gute Leitschienenfunktion von Biogran[®] [145], in Untersuchungen von *Schliephake et al.* haben sich Glaskeramiken in Bezug auf ihre Osteokonduktivität gegenüber α -TCP und anderen Keramiken als überlegen erwiesen [151], *Berens et al.* stellten im Calvariadefektmodell an Ratten die osteokonduktive Potenz der Keramiken heraus [152]. *Yuan et al.* wollen sogar als Erste eine osteoinduktive Potenz des Bioglas bei heterotoper Implantation festgestellt haben [148].

Soderling et al. konnten bei „prekorrodierten“ Gläsern, d. h. Gläser die schon eine Kalzium-Phosphatreiche Oberflächenschicht ausgebildet haben, eine bessere Bindung zu Proteinen beobachten [147]. Es ist anzunehmen, dass solche vorbehandelten Biogläser eine höhere Biokompatibilität aufweisen und sich als Träger für induktive Proteine empfehlen.

Unsere **mikroradiographischen Untersuchungen** zeigten, dass die Kombination von rhBMP-2 mit der Glaskeramik Bioglas, im Gegensatz zur alleinigen Implantation, zu einer deutlichen Knochenneubildung führt. Im direkten Vergleich der getesteten Materialien befand sich Bioglas zwischen den Vertretern der Kalziumphosphatkeramiken und den Kollagen Typ-I-, Ethisorb[®]-Trägern. Zu dem untersuchten ICBM-rhBMP-2-System zeigten sich signifikante Unterschiede. Zwischen der untersuchten Lokalisationen fanden, sich bezüglich des Bioglas-Implantates, keine Unterschiede Da Bioglas im Untersuchungszeitraum kaum resorbiert wurde und das radioopake Material mineralisierte Knochenareale überlagert, müssen die Ergebnisse der mikroradiographischen Untersuchung kritisch betrachtet werden, eine Wertung dieser Befunde ist abschließend nicht möglich. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch das verwendete Trägermaterial eine Mineralisation des Knochens verhindert wurde. Nach *Berens et al.* ist die Hemmung der Mineralisation typisch für Biogläser mit größeren Anteilen von Phosphat, Natriumoxid und Magnesiumoxid. Erschließt eine spätere Mineralisation des Knochens aber nicht aus [153]. Die Bioglaspartikel werden vom Osteoid eingeschlossen und entziehen sich einem Resorptions- und Remodelationsprozesses.

Fluoreszenzmorphometrisch zeigte sich eine, im Vergleich zu den anderen Trägern, geringere Knochenneubildungsrate. Auffällig war ein gewisses „Plateauverhalten“, die Geschwindigkeit der Osteogenese nahm ab dem 14. Tag post operationem kaum zu. Vermutungen liegen nahe, dass die initiale Osteoidbildung und die mangelnde Resorption des Trägers zu diesem Ergebnis führten. Auch bei *Wheeler et al.* zeigte sich bei der Bioglas-Implantation nur eine anfängliche Phase stärkeren Knocheneinbaus [144].

Bioglas zeigte im **Drei-Punkt-Biegversuch** neben Ethisorb® die niedrigsten Werte. Das durchschnittliche E-Modul von $32,3 \pm 5,9$ kPA lässt sich durch den Verbund zwischen Glaskeramik und Knochen erklären [154-156]. *Hench et al.* und *Glowacki et al.* konnten nachweisen, dass vor allem die Ausbildung einer reaktiven und biologisch aktiven Kalzium-Phosphatreichen Oberflächenschicht für diesen Verbund verantwortlich ist [145, 150]. Höhere Youngscher-Module werden durch die mangelnde Mineralisation des neu gebildeten Knochens und durch die Ausbildung von funktionell ungünstigen Osteoid verhindert [145]. Die mangelnde Resorption des Trägers und die lange Verweildauer der Bioglas-Partikel am Implantationsort stellen eine zusätzliche mechanische Schwächung des funktionell belasteten Femurs dar.

Kollagen Typ-I

Knochengewebe besteht zu ca. 70% aus mineralischen Substanzen und zu ca. 30% aus organischem Material [145, 151]. Die extrazelluläre Matrix des Knochens besteht zu ca. 90% Kollagen Typ-I-fibrillen und nur zu etwa 10 % nichtkollagenhaltigen Bestandteilen. *Yang et al.* konnten immunohistochemisch nachweisen, dass BMPs neben ihrem Vorkommen in Periostzellen, Knochenmarkszellen und im verkalkten Knochenmark sich vor allem entlang der Kollagenfasern räumlich orientieren [152]. *Shi et al.* konnten durch in vitro Versuchen zeigen, dass Kollagen Typ-I in der Lage ist, die Differenzierung zu Osteoblasten zu stimulieren [144]. Die Bindungsfähigkeit zu osteoinduktiven Proteinen, das natürliche Vorkommen und die hohe Biokompatibilität des Kollagen Typ-I lassen einen Einsatz als Knochenersatzmaterial als besonders günstig erscheinen.

Die Resorptionszeit von Kollagen Typ-I wird mit 4-6 Wochen angegeben. Der Abbau erfolgt enzymatisch über spezielle, mit Osteoklastenaktivität assoziierten, Kollagenasen. Durch eine Erniedrigung des pH-Wertes werden Hydroxylapatitkristalle aus der Matrix

herausgelöst, Tropokollagene werden gespalten und über spezifische Proteasen weiter zerkleinert [157].

Wegen ihrer Affinität zu bestimmten Zelltypen werden Kollagene schon seit geraumer Zeit in der Labormedizin als Trägermaterial verwendet [158]. In Tierversuchen erwiesen sie sich als ideale Träger für Antibiotika [157, 159] und Impfstoffe [160]. Vor allem im Bereich der Augenheilkunde ist der klinische Einsatz von Kollagenen, z. B. als resorbierbares Nahtmaterial [161], oder als Medikamententräger [162], gut dokumentiert. Seit mehr als 25 Jahre wird Kollagen zum Ersatz von Bändern, Ligamenten und als Material zur Wunddeckung in der Klinik verwendet [163].

Aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen empfahlen *Joos et al.* und *Krekeler et al.* lyophilisiertes Kollagen als Füllungsmaterial parodontaler Knochentaschen [163, 164]. Bereits 1987 beschrieben *Deatherage et al.* die erfolgreiche in vivo Testung von humanem Kollagen Typ-I als Träger für osteoinduktive Proteine an Ratten. Bei subkutaner Implantation zeigte sich eine deutliche Ossifikation [163]. *Moore et al.* konnten bei Implantation von Kollagen Typ-I und osteoinduktiven Proteinen in Schädeldefekten kritischer Größe eine 91%ige Defektfüllung nachweisen [163]. *Gao et al.* untersuchten in verschiedenen Studien Kollagen Typ-IV als Trägermaterial für BMP an Mäusen und Schafen [165-167]. Sie konnten bei heterotoper Implantation eine Steigerung der Knochenneubildung, eine Neovaskularisation und eine stärkere Resorption des Trägermaterials im Vergleich zu unsubstituierten Kollagen Typ-IV Implantaten beobachten. Gleichzeitig zeigten sie, dass die Kombination aus BMP und Kollagen Typ-IV einer alleinigen Einbringung von BMP überlegen ist. Sie gingen von einer kovalenten Bindung des BMP an Kollagen Typ-IV aus, die eine stetige Freisetzung der induktiven Proteine bei gleichzeitiger Resorption des Trägers garantiert. Die finnische Forschergruppe führte den positiven Effekt des Kollagen Typ-IV auf eine Chemotaxis der Progenitor Zellen, eine gesteigerte Vaskularisierung, die niedrige Immunogenität und das schnelle Resorptionsverhalten des Trägers zurück [168]. Weitere Untersuchungen der Gruppe um *Gao* beschäftigten sich mit Kompositen aus verschiedenen Trägermaterialien und BMP [169, 170]. So zeigten Komposite aus

porösem korallinem Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Kollagen Typ-IV und BMP vom Elch sehr gute Ergebnisse [171]. Am Schaf wurden Komposite aus TCP, Kollagen Typ-IV und Schafs-BMP (sBMP) getestet. Sie erwiesen sich als osteoinduktiv und -konduktiv und wiesen eine hohe mechanische Festigkeit auf [169].

Entgegen der Darstellungen der Gruppen um *Deatherage* und um *Gao*, Kollagen sei wenig immunogen [170, 171], müssen Beobachtungen von *Mullins et al.* in einer kritischen Bewertung von Kollagenpräparaten berücksichtigt werden. Sie berichteten von immunologischen Reaktionen nach Verwendung von Corneaimplantaten und Nahtmaterial auf Basis von Rinderkollagen und warnten vor möglichen allergischen Kreuzreaktionen und der Gefahr eines anaphylaktischen Schocks [170]. Immunologische Reaktionen werden vor allem auf die Telopeptide zurückgeführt. *Takaoka et al.* konnten durch Filtration diese Telopeptide aus dem Kollagen entfernen und so die Immunantwort bei xenogener Implantation abschwächen [171]. Obwohl beim Einsatz von allogenen und xenogenen Kollagenen und Kollagenderivaten erhöhte Antikörpertiter nachweisbar sind, zeigten *DeLustro et al.* und *Geesink et al.*, dass diese keinen negativen Einfluss auf die Knochenneubildung haben [167, 169]. *Aragona* gibt die Empfehlung, auf die Verwendung xenogener Kollagenimplantate zu verzichten [172]. Kritisch zu bewerten bleibt allerdings das Risiko einer möglichen Krankheitsübertragung, über allogene und xenogene Kollagenimplantate, wie von *Tomford* und *Buck et al.* beschrieben [172, 173].

Unsere **mikroradiographischen Untersuchungen** zeigten, dass die Kombination von rhBMP-2 mit Kollagen eine relativ geringe Osteoinduktion hervorruft. Die neu gebildete Knochenmenge unterscheidet sich signifikant von ICBM/rhBMP-2. Die rasche Resorption des Trägermaterials verhindert eine Leitschiene-funktion, Kollagen wirkt nicht osteokonduktiv. Im Vergleich zu ICBM, HA, α -TCP, Algipore[®] und BioOss[®] zeigte Kollagen eine verringerte Osteoinduktivität, die sich nicht signifikant von Bioglas und Ethisorb[®] unterschied.

Die **morphometrischen** Ergebnisse ähnelten in der Knochenneubildungsrate Bioglas/rhBMP-2 und Ethisorb[®]/rhBMP-2. Kollagen konnte, entsprechend der

Veröffentlichung von *Winn et al.*, eine anfängliche starke Knochenneubildung induzieren die sich jedoch ab dem 14. Tag reduzierte [173].

Das E-Modul für Kollagen war mit $27,9 \pm 3,3$ MPa im mittleren Drittel des Versuchsfeldes einzuordnen und signifikant niedriger als bei ICBM. Kollagen weist im Implantatlager keinerlei mechanische Stabilität zum Schutz vor einem Prolaps der Weichgewebe auf. Eine Platzhalterfunktion kann nicht erfüllt werden. Zudem wird nach *Gao et al.* die rasche Resorption des Materials durch die Anwesenheit von BMP stark begünstigt was eine Osteokonduktion nachhaltig verhindert [174].

Ethisorb[®]

Das in dieser Studie verwendete „Ethisorb H510 rapid“[®] (Ethicon, Norderstedt) ist ein Copolymer aus Polyglactin 910 (Vycril, PGA) und Poly-p-Dioxanon (PDS). Polyglactin-filamente sind thermoplastisch mit monofilen Polydioxanon zu einem Vlies verschmolzen. Die Resorption erfolgt, innerhalb von ca. 60 Tagen, über eine hydrolytische Spaltung der Vycrilbestandteile in L-Lactid (Milchsäure) und Glykolid (Glykolsäure). Die entstandenen Zwischenstufen werden über eine Glykolysekette und dem Citratzyklus weiter dem Stoffwechsel zugeführt [175, 176]. Auch die Polydioxanon-Schmelzen durchlaufen beim Abbau den Weg über die Hydrolyse, zu p-Dioxanon mit anschließender Glykolyse. Die Produkte werden größtenteils mit dem Urin und dem Stuhl ausgeschieden oder als CO₂ ausgeatmet. Der Abbau der PDS-Schmelzen dauert bis zu 6 Monaten [177]. In verschiedenen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass sich das Resorptionsverhalten beschleunigte, wenn Polymere mit BMP dotiert wurden [178].

Polyglactin- und Polydioxanonimplantate werden in der Chirurgie als resorbierbare Nahtmaterialien und Membranen eingesetzt [179]. Seit gut 18 Jahren werden Polymere als resorbierbares, synthetisches Osteosynthesematerial erfolgreich eingesetzt [180]. Klinische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die rasche Degradation dieser Polyester

eine Senkung der Biegefestigkeit der Implantate bedingt [181]. Auch Osteolysen, Fisteln und Gewebereaktionen wurden in der Literatur beschrieben [182]. *Schildhauer et al.* schlossen aus diesen Erkenntnissen, dass „die klinische Anwendung von biodegradierbaren Polymeren [...] noch sehr begrenzt und auf wenige Indikationen eingeschränkt“ ist [181]. Durch Weiterentwicklung der Polymermischungen und Beimischung von Copolymeren konnte die Duktilität und Festigkeit der Polymere maßgeblich verbessert werden [183].

Polymere sind nicht osteokonduktiv [183], jedoch zeigte die Kombination von PLGA und BMP in zahlreichen Tierversuchen viel versprechende Ergebnisse [184-186]. Im Jahr 2000 stellten *Kübler et al.* dar, dass dem Poly(D, L-Laktid-Co-Glykolid) im belasteten Gewebe die notwendige Standfestigkeit fehlt um einer Platzhalterfunktion gerecht zu werden [187]. 1995 verglichen *Kenley et al.* in einer tierexperimentellen Studie ICBM mit Poly(D, L-Laktid-Co-Glykolid) als Träger für rhBMP-2 in Defekten kritischer Größe an Rattenkalotten. Nach 21 Tagen zeigten beide Systeme in Kombination mit rhBMP-2 deutliche Verknöcherungen, PLGA wurde zum großen Teil schon resorbiert. *Kenley et al.* konnten nachweisen, dass bei einer genügend hohen Menge rhBMP-2 das PLGA- dem ICBM-System gleichwertig ist. Bei einem niedrigen rhBMP-2-Gehalt jedoch ICBM überlegen ist (vergleiche Kapitel 6.2) [188]. Diese Ergebnisse konnten von *Smith et al.* im darauf folgenden Jahr bestätigt werden, sie führten dies auf ein besseres Freisetzungsverhalten und eine günstigere Geometrie des ICBM zurück [84]. Sowohl bei Untersuchungen von *Kenley et al.* als auch von *Lee et al.* stellte sich eine PLGA-Partikelgröße von ca. 250µm als ideal heraus [189, 190].

In den **mikroradiographischen und fluoreszenzmorphometrischen Untersuchungen** vorliegender Studie zeigte sich, dass die Kombination von rhBMP-2 mit Ethisorb[®] osteoinduktiv wirkte. Die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen konnten bestätigt werden [189, 191, 192]. Die quantitative Auswertung zeigte eine mittelstarke Knochenneubildung im unteren Versuchsfeld die sich signifikant von der gebildeten Knochenmenge des ICBM/rhBMP-2 Systems unterschied. Im Femur konnte eine leicht erhöhte Knochenmenge in Vergleich zu den anderen Lokalisationen festgestellt werden.

Ob dies auf das ersatzstarke Lager oder, entsprechend der Ergebnisse von *Kenley et al.* und *Smith et al.*, auf die erhöhte rhBMP-2-Dosierung zurückzuführen ist konnte nicht nachgewiesen werden [84, 193]. Im ersatzstarken Unterkiefer- und im ersatzschwachen Kalottenmodell zeigten sich in der Menge des gebildeten Knochens keine Unterschiede zu Bioglas und Kollagen. Die Knochenneubildungsrate entsprach in allen Lokalisationen in etwa den Materialien Bioglas und Kollagen und war signifikant niedriger als beim ICBM/rhBMP-2 System.

Die **biomechanischen Untersuchungen** zeigten für Ethisorb[®] das niedrigste Youngscher-Modul. Das E-Modul war im Drei-Punkt-Biegeversuch signifikant niedriger als bei ICBM, α -TCP, HA und Kollagen. Wie von *Törmälä et al.* und *Öpen* beobachtet, scheint eine rasche Degradation des Trägers die Biegefestigkeit herabzusetzen [181, 182]. Wie schon dargestellt beschleunigt die Zugabe osteoinduktiver Proteine die Resorption maßgeblich [181, 182]. Ethisorb[®] kann keine Platzhalterfunktion im Implantatlager wahrnehmen und weist keine osteokonduktiven Eigenschaften auf.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, acht verschiedene Materialien auf ihre Eignung als Träger für rhBMP-2 zu untersuchen. Es kamen dazu unlösliche kollagene bovine Knochenmatrix - ICBM, die synthetischen Kalziumphosphatkeramiken Hydroxylapatit und α -TCP, die halbsynthetischen Kalziumphosphatkeramiken Algipore[®] und BioOss[®], das vollsynthetische und anorganische Knochenersatzmaterial Bioglas, sowie Kollagen und das Copolymer Ethisorb[®] zur Anwendung.

Bei erwachsenen, männlichen Spargue-Dawley-Ratten wurden Trepanationsdefekte kritischer Größe im Kieferwinkelbereich (5mm) und in der Kalotte (7mm) gesetzt. Im Femur wurde ein Kontinuitätsdefekt von 8mm Länge gesetzt. Die Defekte im Unterkiefer und der Kalotte wurden mit den jeweiligen Träger in Kombination mit 10 μ g rhBMP-2 implantiert. Im Femurkontinuitätsdefekt wurden die Materialien mit 25 μ g rhBMP-2 dotiert.

Für synthetisches HA, Algipore[®] und BioOss[®] konnte nach Versuchsablauf keine Resorption festgestellt werden. α -TCP und Bioglas zeigten geringe resorptive Prozesse. Bei ICBM und Ethisorb konnten deutlich ausgeprägte Resorptionsvorgänge nachgewiesen werden.

Nach Opferung der Versuchstiere wurden die explantierten Proben mikroradiographisch, fluoreszenzmorphometrisch und biomechanisch getestet. Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Träger zusammen mit rhBMP-2 eine deutliche Knochenneubildung induzierten. Teilweise konnte der gesetzte Defekt vollständig überbrückt und knöchern konsolidiert werden.

In den mikroradiographischen und morphometrischen Untersuchungen konnten für ICBM die größte und schnellste Zunahme an neu gebildeten Knochen nachgewiesen werden. Die Kalziumphosphatkeramiken unterschieden sich innerhalb der Gruppe nur unwesentlich voneinander. Die geringste Knochenneubildung zeigten die Träger Bioglas, Kollagen und Ethisorb[®]. Bei allen Materialien war die Knochenneubildung im Kieferwinkelbereich am stärksten. Die Femurproben wurden mit Hilfe des Drei-Punkt-

Biegeversuches biomechanisch untersucht. Für ICBM, und die synthetischen Kalziumphosphatkeramiken α -TCP und Hydroxylapatit konnten die höchsten Elastizitätsmodule nachgewiesen werden.

ICBM als Träger für rekombinantes humanes BMP-2 eignete sich in allen Untersuchungen am besten. Es wurde weitgehend in den neu gebildeten Knochen integriert und zeigte ein ausgezeichnetes Resorptionsverhalten.

Der zeitliche Ablauf und die Koordination der Osteoinduktion und der Resorptions- und Remodellationsvorgänge scheint bei der Wahl eines geeigneten Trägermaterials für rhBMP-2 eine entscheidende Rolle zu spielen. Vor allem die Ausbildung eines Trajektoriensystems und die funktionelle Adaption des induzierten Knochens werden von diesen Faktoren determiniert.

8. Übersicht der verwendeten Abkürzungen:

AAA	<i>autolysierter, antigenextrahierter, allogener Knochen</i>
aFGF	<i>saurer Fibroblast Growth Factor</i>
AP	<i>alkalische Phosphatase</i>
bFGF	<i>basischer Fibroblast Growth Factor</i>
BIP	<i>Bone induction principle</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic Protein</i>
<i>rhBMP</i>	<i>rekombinantes humanes Bone morphogenetic Protein</i>
<i>sBMP</i>	<i>Bone morphogenetic Protein vom Schaf</i>
BSE	<i>Bovine Spongiforme Enzephalopathie</i>
BSP	<i>Bone Sialo Protein</i>
CSD	<i>Critical sized defect</i>
DBM	<i>Demineralized bone matrix</i>
DFDB	<i>Demineralized freeze-dried bone allograft</i>
DMFDB	<i>Demineralized freeze-dried bone</i>
EGF	<i>Epidermic growth factor</i>
GAG	<i>Glykosaminoglykane</i>
GMA	<i>Glykolmethacrylat</i>
HA	<i>Hydroxylapatit</i>
ICBM	<i>insoluble collagenous bone matrix</i>
IGF-I/-II	<i>Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren</i>
KEM	<i>Knochenersatzmittel</i>

MI	<i>Metabolischer Index</i>
MPa	<i>Mega Paskal</i>
NCP	<i>Non collagenous Protein</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDS	<i>Polydioxanon</i>
PLGA	<i>Poly(D,L-lactide-co-glycolid)</i>
PTH	<i>Parathormon</i>
rhOP-1 (= <i>rhBMP-7</i>)	<i>rekombinantes humanes Osteogenic Protein 1</i>
TCP	<i>TriCalciumPhosphat</i>
α-TCP	<i>α-Phase des TriCalciumPhosphat</i>
β-TCP	<i>β-Phase des TriCalciumPhosphat</i>
TGF-α	<i>Transforming growth factor-α</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>

9. Literaturverzeichnis:

1. Nussbaum, V., *Ueber die Behandlung unglücklicher Vorkommnisse nach einfachen und complicirten Beinbrüchen, insbesondere über Knochentransplantationen*. Ärztliches Intelligenzblatt, ed. Graf, V., Kerschensteiner, Ranke, H., Rothmund, V., Schleisse, V., und Seitz. 1875, München: Herausgeber. 72-75.
2. Walter, P. V., *Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe*. J Chir Augenheilk, 1821(2): S. 571.
3. Ollier, L., *Traité experimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. 1867: Herausgeber.
4. Hegedus, Z., *The rebuilding of the alveolar processes by bone transplantation*. Dental Cosmos, 1923. **65**: S. 736.
5. Inclan, A., *The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery*. J Bone Jt Surg, 1942. **A 24**: S. 81.
6. Bush, L.F. und Garber, C. Z., *The bone bank*. JAMA, 1948: S. 588-594.
7. Bundesärztekammer, Bundesgesundheitsamt Und Wissenschaftlicher Beirat Der, *Richtlinien zum Führen einer Knochenbank*, in *Deutsches Ärzteblatt*, Bundesvereinigung, Bundesärztekammer (Arbeitsgemeinschaft Der Deutschen Ärztekammern) Und Kassenärztliche, Editor. 1990, Deutscher Ärzte Verlag GmbH: Köln. S. 41-44.
8. Bundesärztekammer, Wissenschaftlicher Beirat Der, *Richtlinien zum Führen einer Knochenbank*, Bundesvereinigung, Bundesärztekammer (Arbeitsgemeinschaft Der Deutschen Ärztekammern) Und Kassenärztliche, Editor. 1996, Deutscher Ärzte Verlag GmbH: Köln. S. A2166-A2171.
9. W. W. Tomford, B. Fortini. *Musculoskeletal Allografts in 1990-1992: A survey of US Tissue Banks AATB*. in *AATB-16th annual meeting*. 1992. San Diego.
10. T. V. Garrel, L. Gotzen, *Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking*. Unfallchirurg, 1998. **101**: S. 713-727.
11. J. Jerosch, W. H. Castro, M. Granroth, H. Rosin, *Knochenbanken in der BRD-Ergebnisse einer Befragung*. Unfallchirurg, 1990. **93**: S. 334-338.
12. H. Knaeppler, T. V. Garrel, L. Gürtler, *Die allogene Knochentransplantation-eine aktuelle Standortbestimmung*. Deutsches Ärzteblatt, 1994. **91**(Heft 15): S. A1052-A1057.
13. G. Pfeifer, R. Schmitz, G. Ehmann, *Freie Transplantate in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie, ed. K. Schuchardt, H. Scheunemann. 1976: Herausgeber.
14. Urist, M. R., *Bone: Formation by autoinduction*. Science, 1965(150): S. 893-911.
15. M. R. Urist, A. Mikulski, A. Lietze, *Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein*. Natl Acad Sci, 1979. **76**(4): S. 1828-1832.

16. M. R. Urist, B. F. Silverman, K. Buring, F. L. Dubuc, J.M. Rosenberg, *The bone induction principle*. Clin ortop, 1967. **53**: S. 243-283.
17. Kübler, N.R., *Osteoinduktion und -reparation*. Mund Kiefer GesichtsChir, 1997. **1**: S. 2-25.
18. P. Ducy, G. Karsenty, *The family of bone morphogenetic proteins*. Kidney International, 2000. **57**: S. 2207-2214.
19. Abendroth, K., *Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation*, in *Aktuelle Aspekte der Osteologie (A: Übersichtsreferate)*, Ittel, T. H., Sieberth, H.-G., und Matthiaß, H.H., Editors. 1992, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 10-17.
20. Dietsch, P., *Biochemie des Osteoklasten*, in *Aktuelle Aspekte der Osteologie (A: Übersichtsreferate)*, T. H. Ittel, H.-G. Sieberth, H.H. Matthiaß, Editor. 1992, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
21. Th. Rakosi, I. Jonas, *Kieferorthopädie-Diagnostik*, in *Farbatlant der Zahnmedizin*, Rateitschak, H., Editor. 1989, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. S. 8-12.
22. Pauwels, F., *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. 1965, Berlin: Herausgeber.
23. Caplan, A. I., *Bone development*, in *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues-Cyba Foundation Symposium 136*. 1988, John Wiley & sons: Chichester. S. 3-21.
24. H. Schiebler, F. Schneider, L. C. Junqueira, J. Carneiro, *Histologie*. 1991: Herausgeber.
25. Schenk, R. K., *Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen*. Hefte Unfallheilkunde, 1991. **216**: S. 23-35.
26. Terheyden, H., *Verwendung von Knochenersatzmaterialien in der chirurgischen Zahnheilkunde*. DZZ, 2000. **55**(00).
27. M. R. Urist, P. H. Hay, K. Buring, *osteogenetic competence*. Clin Orthop, 1969. **64**: S. 134-220.
28. Reddi, A. H., *Bone morphogenetic proteins and skeletal development: The kidney-bone connection*. Pediatr Nephrol, 2000. **14**: S. 598-601.
29. Reddi, A. H., *bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogones*, in *Cytokine and Growth Factor Review*. 1997, Elsevier Science Ltd. S. 11-20.
30. Solheim, E., *Growth factors in bone*, in *International Orthopaedics*. 1998, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg. S. 410-416.
31. K. G. Kuboschke, H. Mayer, *Bedeutung von Protein-Wachstumsfaktoren für die lokale Regulation des Knochenwachstums*. Dtsch Med Wschr, 1990. **115**: S. 1921-1926.
32. D. J. Kibblewhite, A. G. Bruce, D. M. Strong, S. M. Ott, A. F. Purchio, W.F. Larrabee Jr., *transforming growth factor-beta accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model*. Growth Factors, 1993(9): S. 185-193.

33. M. R. Urist, B. S. Strates, *mechanisms of growth and development: bone morphogenetic proteins*. J Dent Res, 1971. **50**: S. 1391-1406.
34. Urist, M. R., *Chemosterilized, antigen-extracted surface-demineralized autolysed allogenic (AAA) bone for arthrodesis*, in *Osteochondral allograftsbiology, banking and alinical applications*, Friedlaender, G. E., Mankin, H. J., und Sell, K. W., Editors. 1983, Little, Brown and Co.: Boston. S. 193-201.
35. J. M. Wozney, V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, M. Hewick, E. A. Wang, *novel regulation of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): S. 1528-1534.
36. M. R. Urist, H. Iwata, P. A. Cecotti, R. L. Dorfmann, S. D. Boyd, R. M. Mcdowell, C. Chien, *Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1973. **70**: S. 3511-3515.
37. T. K. Sampath, J. C. Maliakal, P. V. Hauschka, W. K. Jones, H. Sasak, R. F. Tucker, K. H. White, J. E. Coughlin, M. M. Tucker, R. H. Pang, *recombinant human osteogenetic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenetic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro*. J Biol Chem, 1992. **267**: S. 20352-20362.
38. E. A. Wang, V. Rosen, P. Cordes, R. M. Hewick, M. J. Kritiz, D. P. Luxenburg, B. S. Sibley, J. M. Wozney, *purification and characterization of other distinct bone-inducing factors*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988. **85**: S. 9484-9488.
39. Kübler, N. R., *Knochenbildende Proteine- Neue Therapiekonzepte in der Knochenchirurgie*. Zbay Zahnärzte in Bayern, 1999. **10**: S. 1-5.
40. Urist, M.R., *Die ersten drei Dekaden der Erforschung des "Bone Morphogenetic Protein"*. Osteologie, 1995. **4**.
41. Ch. Foitzik, H.-A. Merten, *Knochenersatz- und Knochenaufbaumaterialien in der Implantologie und bei der Behandlung von Knochendefekten*, in *Restitutio ad integrum - Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau*, Heinenberg, B.-J., Editor. 2000, Spitta Verlag, Balingen. S. 16.
42. N. Schwenzer, M. Ehrenfeld, *Plastische und wiederherstellende Mund-, Kiefer-, Gesichts-Chirurgie*, in *Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde: Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung - Band 2: spezielle Chirurgie*, N. Schwenzer, M. Ehrenfeld, Editor. 2001, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. S. 379-416.
43. Rueger, J. M., *Knochenersatzmittel - heutiger Stand und Ausblick*. Der Orthopäde, 1998. **27**(2): S. 72-79.
44. Rueger, J. M., *Knochenersatzmittel*. Hefte Unfallheilkunde, 1992. **213**: S. 17-19.
45. Grob, D., *Autologous bone grafts: problems at the donator site*, in *Bone Transplantation*, Aebi, M. und Regazzoni, P., Editors. 1989, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
46. Rueger, J. M., *Allogener Knochen und Knochenersatzmittel*, in *Unfallchirurgie*, Rüter, A., Trentz, O., und Wagner, M., Editors. 1995, Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore.

47. Gürtler, L., *Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochentransplantate*, in *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Schnettler, R. und Markgraf, E., Editors. 1997, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. S. 8-11.
48. Rübsamen-Waigmann, H., *Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten*, in *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Schnettler, R. und Markgraf, E., Editors. 1997, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. S. 1-7.
49. Lexer, E., *Die freien Transplantationen*. Neue dtsh Chir, 1924. **26b**.
50. Hanslick, L., *Der klinische Wert des Knochentransplantates*. Langenbecks Arch Klin Chir, 1971. **329**: S. 996-1003.
51. G. Hierholzer, H. Zilch, *Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren*. 1980: Herausgeber.
52. H.-E. Schrott, J. L. Spyra, *Experimentelle Untersuchungen zur Einheilung und Antigenität von sterilisierten Knochentransplantaten*. Der Chirurg, 1997. **68**: S. 77-83.
53. F. Lord, M. Gebhardt, W. W. Tomford, H. Mankin, *infection in bone allografts*. J Bone Jt Surg, 1988. **70-A(3)**: S. 369-376.
54. R. J. Simmonds, S. D. Holmberg, R. L. Hurwitz, *transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor*. N Engl J Med, 1992. **326**: S. 726-732.
55. Gürtler, L., *Blood-bone viral infections*. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1994. **5(3)**: S. 5-10.
56. R. Ruppert, E. Hoffmann, W. Sebald, *human bone morphogenetic protein-2 contains a heparin binding site which modifies its biological activity*. Eur J Biochem, 1996. **237(1)**: S. 295-302.
57. N. Cerletti, G. K. McMaster, D. Cox, A. Schmnitz, B. Meyhack, *US Pat Nr. 5171574*. 1992.
58. C. Bosch, B. Melsen, K. Vargervik, *importance of the critical size defect in testing boneregeneration materials*. J craniofac Surg, 1998. **9(4)**: S. 310-316.
59. J. O. Hollinger, A. O. Kleinschmidt, *Animal models in bone research*, in *Bone Grafts and Bone Substitution*, M. B. Habal, A. H. Reddi, Editor. 1992, W. B. Saunders, New York. S. 133-146.
60. M. Aaboe, E. M. Pinholt, E. Hansen, *unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8mm*. J craniofac Surg, 1994. **5(3)**: S. 201-203.
61. L. J. Marden, J. O Hollinger, A. Chaudhari, T. Turek, R. G. Schaub, E. Ron, *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats*. J Biomed Mater Res, 1994. **28(10)**: S. 1127-1138.
62. K. Sato, M. R. Urist, *Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs*. Clin ortop, 1985. **197**: S. 301-311.

63. Draenert, K., *Studying bone regeneration with the scanning electron microscop*. Scan. Electron. Microsc., 1983. **1**: S. 247-354.
64. Rahn, B. A., *Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochenanbaus*. Zeiss Information, 1976. **22**: S. 36-39.
65. *Gebrauchsinformationen Technovit 7200VLC*. Heraeus Kulzer GmbH, Bereich Kulzer, Werheim.
66. Donath, K., *Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. Apparate- und Methodenbeschreibung*. 1995, Norderstedt: Herausgeber. 1-16.
67. *Bedienungsanleitung Exakt-Mikroschleifsystem*. Exakt Apparatebau, Norderstedt.
68. Blumenauer, H., *Werkstoffprüfung 6. Auflage*. 1994, Stuttgart: Herausgeber.
69. Cochran, G. Van B., *Orthopädische Biomechanik*, in *Bücherei des Orthopäden Band 51*, Otte, P. und Schlegel, K.-F., Editors. 1988, Ferdinand Enke Verlag: Stuttgart. S. 69-72.
70. Austermann, K. H., *Frakturen des Gesichtsschädels*, in *Zahn- Mund- Kiefer-Heilkunde: Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung - Band 2: spezielle Chirurgie*, Schwenger, M. und Ehrenfeld, M., Editors. 2001, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. S. 275-378.
71. D. M. Toriumi, K. Robertson, *Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery*. Fac Plast Surg, 1993. **9**(1): S. 29-36.
72. G. Weibrich, R. Trettin, S. H. Gnoth, H. Götz, H. Duschner, W. Wagner, *Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien mittels Gasadsorption*. Mund Kiefer GesichtsChir, 2000. **4**: S. 148-152.
73. S. M. Lemperle, C. J. Calhoun, R. W. Curran, R. E. Holmes, *Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft-tissue interposition: A comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction and cancellous autografting in dogs*. Plast Reconstr Surg, 1998. **101**(3): S. 660-672.
74. Y. Okubo, K. Bessho, K. Fujimura, Y. Konishi, K. Kusumoto, Y. Ogawa, T. Iizuka, *Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2000. **29**: S. 62-66.
75. T. Katagiri, A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, T. Suda, *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*. J Cell Biol, 1994. **127**: S. 1755-1766.
76. Wang, J. und Glimcher, M. J., *Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II Origins of bone forming cells*. Calcif Tissue Int, 1999. **65**: S. 486-493.
77. Lexer, E., *Über freie Transplantationen*. Langenbecks Arch Klin Chir, 1911. **95**: S. 827-851.

78. D. M. Toriumi, H. S. Kotler, D. P. Luxenberg, M. E. Holtrop, E. A. Wang, *Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor*. Arch Otolaryng Neck Surg, 1991. **117**: S. 1101-1112.
79. A. W. Yasko, J. M. Lane, E. J. Fellingner, V. Rosen, E. A. Wang, *The healing of segmental defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2*. J Bone Jt Surg, 1992. **74**: S. 659-671.
80. T. N. Gerhart, C. A. Kirker-Head, M. J. Kriz, M. F. Holtrop, G. E. Hennig, J. Hipp, S. H. Schelling, E. Wang, *Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein*. Clin Orthop, 1993. **293**: S. 317-326.
81. T. K. Sampath, A. H. Reddi, *Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1981. **78**(12): S. 7599-7603.
82. R. A. Kenley, K. Yim, J. Abrams, E. Ron, T. Turek, L. J. Marden, J. O. Hollinger, *Biotechnology and bone graft substitutes*. Pharmac Res, 1993. **10**(10): S. 1393-1401.
83. E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, P. Lapan, D. P. Luxenburg, D. Mcquaid, I. Katsoutsos, J. Nove, J. M. Wozney, *recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1990. **87**(2220-2224).
84. J. L. Smith, L. Jin, Th. Parsons, Th. Turek, E. Ron, C. M. Philbrook, R. A. Kenley, L. Marden, J. Hollinger, M. P. G. Bostrom, E. Tomin, J. M. Lane, *Osseous regeneration in preclinical models using bioabsorbable delivery technology for recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2)*. Journal of Controlled Release, 1995. **36**: S. 183-195.
85. U. Ripamonti, M. Heliotis, B. Van Der Heever, A. H. Reddi, *Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (Papio ursinus)*. J Periodont Res, 1994. **68**: S. 131-138.
86. L. J. Marden, N. C. Quigley, A. H. Reddi, J. O. Hollinger, *Temporal Changes during bone regeneration in the calvarium induced by osteogenin*. Calcif Tissue Int, 1993. **53**(4): S. 262-268.
87. C. A. Kirker-Head, T. N. Gerhart, S. H. Schelling, G. E. Hennig, E. Wang, M. E. Holtrop, *Long term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2*. Clin Orthop, 1995. **318**: S. 222-230.
88. T.C. Lindholm, T. S. Lindholm, I. Alitalo, M. R. Urist, *Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) induced repair of skull trephine defects in sheep*. Clin Orthop, 1988. **227**: S. 265-268.
89. K. Takagi, M. R. Urist, *The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects*. Clin Orthop, 1982. **171**: S. 224-231.
90. E. Canalis, W. A. Peck, L. G. Raisz, *Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvaria*. Science, 1980. **201**: S. 1021-1023.
91. J. R. Farley, D. J. Baylink, *Purification of skeletal growth factor from human bone*. Biochemistry, 1982. **21**: S. 3502-3507.

92. G. D. Klapper, M. E. Svoboda, J. J. Van Wyk, *Sequence analysis of somatomedin-C: Confirmation of identity with insuline-like growth factor I*. *Endocrinology*, 1983. **112**: S. 2215-2217.
93. K. Köster, E. Karbe, H. Kramer, H. Heide, R. König, *Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Kalziumphosphatkeramik*. *Lengenbecks Arch Chir*, 1976. **341**: S. 77-86.
94. Groot, K. De, *Bioceramics of calciumphosphate*. 1983, Boca Raton: Herausgeber.
95. M. M. A. Ramselaar, F. C. M. Driessens, W. Kalk, J. R. De Wijn, R. J. Van Mullem, *Biodegradation of four calcium phosphate ceramics; in vivo rats and tissue interactions*. *J Mat Sci Materials in Medicine*, 1991. **2**: S. 63-78.
96. Lemons, J. E., *Bioceramics: Is there a difference?* *Clin Orthop*, 1990. **261**: S. 153-158.
97. Osborn, J. F., *Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik - Grundlagen und klinische Anwendung*. 1985, Berlin, Chicago: Herausgeber.
98. Osborn, J. F., *Die Tuberkulumplastik mit poröser Hydroxylapatitkeramik*. *Zahnärztl Mitteilungen*, 1988. **9**: S. 1012-1019.
99. Steegmann, B., *Vierjährige klinische Anwendung von Hydroxylapatit bei der Auffüllung parodontaler Knochentaschen*. *Dtsch Zahnärztl Z*, 1988. **43**: S. 53-56.
100. G. Daculsi, R. Z. Legeros, C. Deudon, *Scanning and transmission electron microscopy, and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. Osseo-coalescence versus osseo-integration*. *Scanning Microsc*, 1990. **4**(2): S. 309-314.
101. H. K. Mandelkow, K.K. J. Hallfeldt, S. B. Kessler, M. Gayk, M. Siebeck, L. Schweiberer, *Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken*. *Unfallchirurg*, 1990. **93**: S. 376-379.
102. T. Katoh, K. Sato, M. Kawamura, H. Iwata, T. Miura, *osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein*. *Clin Orthop*, 1993. **287**: S. 266-275.
103. H. Ohgushi, M. Okumura, *Osteogenetic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics*. *Acta Orthop Scand*, 1990. **61**(5): S. 431-434.
104. J. M. Rueger, W. Linhart, D. Sommerfeldt, *Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen*. *Orthopäde*, 1998. **27**: S. 89-95.
105. P. Ragni, T. S. Lindholm, *Interactions of allogenic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits*. *Clin Orthop*, 1991. **272**: S. 292-299.
106. P. S. Egli, W. Müller, R. K. Schenk, *Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbit*. *Clin Orthop Rel Res*, 1988. **232**: S. 127-138.
107. B. D. Katthagen, H. Mittelmeier, *Bone regeneration with collagen-apatite. Biological and biomechanical performance of biomaterials*. Elsevier Science Publisher B.V., 1986: S. 39-44.
108. H. F. Sailer, F. E. Weber, *Knochenersatzmaterialien*. *Mund Kiefer GesichtsChir*, 2000. **4**(1): S. 384-391.

109. C. P. A. T. Klein, A. A. Driessen, K. De Groot, A. Van Den Hooff, *Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue*. J Biomed Mater Res, 1983. **17**: S. 769-778.
110. M. Weinländer, H. Plenk, E. Halwax, A. Nikiforov, *In-vitro Untersuchungen verschiedener Hydroxylapatitmaterialien*. Z Stomatol, 1988. **85**(7): S. 399-404.
111. U. Ripamonti, S. Ma, A. H. Reddi, *The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein*. Matrix, 1992. **12**(3): S. 202-212.
112. E. M. Pinholt, G. Bang, H. R. Haanaes, *Alveolar ridge augmentation by osteoinduction in rats*. Scand. J. Dent. Res., 1990. **98**(5): S. 434-441.
113. Roesgen, M., *Die Regenerationsfähigkeit des Beckenkamms nach Spongiosaentnahme beim Menschen-Induktion durch Phosphatkeramiken?* Unfallchirurg, 1990. **16**(5): S. 258-265.
114. C. P. A. T. Klein, A. A. Driessen, K. De Groot, *Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry*. Biomaterials, 1984. **5**: S. 157-160.
115. Lemons, J. E., *Inorganic-organic combinations for bone repair*, in *Biological and biomechanical Performance of biomaterials*, Christel, P., Meunier, A., und Lee, A. J. C., Editors. 1986, Elsevier Science Publisher B.V.: Amsterdam. S. 51-56.
116. P. Nolan, P. Templeton, R. A. Molla, D. J. Wilson, *Osteoinductive potential of human demineralised bone and a bioceramic in abdominal musculature of the rat*. J Anat (England), 1991. **174**: S. 97-102.
117. Katthagen, B. D., *Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien*. 1986, Berlin, Heidelberg, New York: Herausgeber.
118. R. E. Holmes, R. W. Wardrop, L. M. Wolford, *Hydroxylapatite as a bone graft substitute in orthognatic surgery*. J oral maxillofac surg, 1988. **46**: S. 661-671.
119. G. Kaiser, W. Wagner, P. Tetsch, K. Köster, *Zur Regeneration knöcherner Defekte nach der Implantation resorbierbarer Kalziumphosphatkeramike. Eine vergleichende klinische Untersuchung*. Dtsch Zahnärztl Z, 1980. **35**(108).
120. V. Thieme, E. I. Müller, . Mägdefessel, G. Raabe, G. Berger, *Zur Füllung zystischer Knochendefekte mit oberflächenmodifiziertem Alpha-Trikalziumphosphat*. Deutsch Z Mund Kiefer GesichtsChir, 1988. **12**(88).
121. Barth, A., *Ueber histologische Befunde nach Knochenimplantationen*. Arch Klin Chir, 1893. **46**: S. 409-417.
122. Rueger, J. M., *Synthetische resorbierbare Materialien: Eine Alternative zum Transplantat?* Hefte Unfallchirurg, 1998. **265**(261-269).
123. Nishina, H., *An experimental comparative study of hydroxylapatite and tricalciumphosphate as bone substitutes*. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1989. **63**: S. 1237-1247.

124. J. Lu, M. Descamps, J. Dejou, G. Koubi, P. Hardouin, J Lemaitre, J. P. Proust, *The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(4): S. 408-412.
125. C. Foitzik, H.-A. Merten, *Restitutio ad integrum - Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau*, in *Innovationen für die Zahnheilkunde*, Heinenberg, B.-J., Editor, Spitta Verlag GmbH: Balingen.
126. Roesgen, M., *Knöcherner Regeneration und Calciumphosphatkeramiken*, in *Traumatologie aktuell*, S. Weller, G. Hierholzer, Editor. 1991, Thieme: Stuttgart, New York.
127. Mittelmeier, W., *Vitalisierung von mineralischem Knochenersatzmaterial mittels autologer Markinokulation - Zur Bedeutung von Implantatstruktur und Lager*, in *Knochenersatz in der Orthopädie und Traumatologie*, Noack, W., Editor. 1992, Potenagel: Bochum. S. 41-51.
128. R. Ewers, C. Kasperk, B. Simons, *Biologisches Knochenimplantat aus Meeresalgen*. Zahnärztl Prax, 1987. **9**: S. 318-320.
129. C. Kasperk, R. Ewers, B. Simons, R. Kasperk, *Knochenersatzmaterial aus Algen*. Dtsch Zahnärztl Z, 1988. **43**: S. 116-119.
130. D. Roy, S. Linnehan, *Hydroxylapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange*. Nature, 1977. **247**: S. 220.
131. Schumann, B., *Algipore® - Knochenneubildung nach Resorption des Hydroxylapatitmaterials*. Dent Implantol, 1997. **2**: S. 68-73.
132. P. H. Kehr, A. G. Graftiaux, F. Gosset, I. Bogorin, K. Bencheikh, *Coral as graft in cervical spine surgery*. Orthop Traumatol, 1993. **3**: S. 287-293.
133. B. Schumann, Rasse, M., Sudasch, G., und Salzer-Kuntschik, M., *Verwendung von Algipore als Implantationsmaterial in der Kieferchirurgie*, in *Plastisch-rekonstruktive Maßnahmen bei Knochen- und Weichteildefekten*, Schumann, E., Editor. 1994, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
134. H. Terheyden, S. Jepsen, S. Vogeler, M. Tucker, D. C. Rueger, *Recombinant human osteogenetic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier*. Mund Kiefer GesichtsChir, 1997. **1**: S. 272-275.
135. H. Terheyden, S. Jepsen, Ch. Ahrens, D. Rueger, *Experimentelle Unterkieferrekonstruktion durch humanes rekombinantes Osteogenetic Protein 1 in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien*, in *Plastisch-rekonstruktive Chirurgie*, H. Hübner, U. P. Press, Editor. 1998, Einhorn Presse Verlag: Reinbek. S. 214-216.
136. T. J. Gao, T. S. Lindholm, B. Kommonen, P. Ragni, A. Parronzini, T. C. Lindholm, P. Jalovaara, M. R. Urist, *The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep*. International Orthopaedics, 1997. **21**(3): S. 194-200.
137. Troester, S. D., *Die Hydroxylapatitkeramik Endobon - Eine alternative Therapiemöglichkeit für Knochendefekte*, in *Jahrbuch der Orthopädie*, R. Vernbrocks, G. Von Salis-Soglio, Editor. 1993, Biermann Verlag: Zürich. S. 231-246.

138. Yukna, R. A., *Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects*. J Periodontol, 1994. **65**: S. 177-185.
139. Schlegel, A. K., *Langzeitergebnisse mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss®*. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 1996. **106**.
140. Donath, K., *Der Einbau von Knochenersatzmaterialien im Kieferknochen - morphologische Befunde*. Dtsch Zahnärztl Z, 1988. **43**: S. 16-21.
141. H. Terheyden, S. Jepsen, D. R. Rueger, *Mandibular reconstruction in miniatur pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenetic protein-1: a preliminary study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **28**: S. 461-463.
142. Wheeler, D. L., Stokes, K. E., Park, H. M., und Hollinger, J. O., *Evaluation of particulate bioglass in a rabbit radius osteotomy model*. J Biomed Mater Res, 1997. **35**: S. 249-255.
143. Weibrich, G., Trettin, R., Gnoth, S. H., Götz, H., Duschner, H., und Wagner, W., *Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien mittels Gasadsorption*. Mund Kiefer GesichtsChir, 2000. **4**: S. 148-152.
144. A. Berens, H. Schliephake, S. Dilmaghani, A. Schuster, *Einfluss von Glaskeramiken auf die Knochenneubildung in Calvariadefekten*. Mund Kiefer GesichtsChir, 2000. **4(2)**: S. 522-526.
145. Kokubo, T., *Surface chemistry of bioactive glass-ceramics*. J Noncrystal Solids, 1995. **120**: S. 138-151.
146. Hensch, L. L., *Bioactive ceramics*. Ann Ny Acad Si, 1988. **523**: S. 54-71.
147. E. J. Schepers, P. Ducheyne, L. Barbier, S. Schepers, *Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects*. Implant Dentistry, 1993. **2(3)**: S. 151-156.
148. E. J. Schepers, M. De Clercq, P. Ducheyne, R. Kempeneers, *Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions*. J Oral Rehabil, 1991. **18**: S. 439-452.
149. T. Furusawa, K. Mizunumaka, *Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone grafting material*. Implant Dentistry, 1997. **6**: S. 93-101.
150. G. E. Merwin, L. W. Rodgers, J. Wilson, R. G. Martin, *Facial bone augmentation using bioglass in dogs*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1986. **112(3)**: S. 280-284.
151. L. L. Hench, J. Wilson, *Surface active biomaterials*. Science, 1984. **226**: S. 630-636.
152. J. Glowacki, J. B. Mulliken, *Demineralized bone implants*. Clin Plast Surg, 1985. **12**: S. 233-241.
153. H. Schliephake, K. Redecker, T. Kage, *Reconstruction of calvarial defects by bioresorbable ceramics: an experimental study in rats*. Mund Kiefer GesichtsChir, 1997. **1**: S. 115-120.
154. H. Yuan, J. D. De Bruijn, X. Zhang, C. A. Van Blitterswijk, K. De Groot, *Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (45S5)*. J Biomed Mater Res, 2001. **58(3)**: S. 270-276.

155. E. Soderling, K. Herbst, E. Larmas, A. Yli-Urpo, *Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to precorrosion*. J Biomed Mater Res, 1996. **31**(4): S. 525-531.
156. P. Griss, E. Werner, G. Heimke, R. Buchinger, *Comparative experimental investigations with bioglass (L. L. Hench), Al₂O₃-ceramic and Al₂O₃-ceramic coated with a modified bioglass. I. Results of experiments under non-loaded conditions*. Arch Orthop Unfallchir, 1977. **90**(1): S. 15-27.
157. Stryer, L., *Biochemistry*, Freeman and Co.: San Francisco. S. 139-152.
158. S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten*. Angew Chem, 2002. **114**: S. 3260-3277.
159. B. M. Gebhardt, H. E. Kaufman, *Collagen as a delivery system for hydrophobic drugs: studies with cyclosporine*. Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics, 1995. **11**(3): S. 319-327.
160. T. Elsdale, J. Bard, *Collagen substrate for studies on cell behaviour*. J Cell Biol, 1972. **54**: S. 626-637.
161. A. Stevens, J. Lowe, *Histologie*, in *Histologie*. 1992, Chapman & Hall, London, Weinheim.
162. M. Higaki, Y. Azechi, T. Takase, R. Igarashi, S. Nagahara, A. Sano, K. Fujioka, N. Nakagawa, C. Aizawa, Y. Mizushima, *Collagen minipellet as a controlled release delivery system for tetanus and Diphtheria toxoid*. Vaccine, 2001. **19**(23-24): S. 3091-3096.
163. Khor, E., *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses*. Biomaterials, 1997. **18**(95-105).
164. Rao, K. P., *Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1995. **7**: S. 623-645.
165. U. Joos, G. Ochs, *Heterologes Kollagen als Mineralisationskeim für die Knochenmineralisation*. Dtsch Zahnärztl Z, 1980. **35**: S. 15 ff.
166. G. Krekeler, J. Düker, A. Fabinger, *Der Einfluß von lyophilisiertem Kollagen auf die Heilung der parodontalen Knochentasche*. Dtsch Zahnärztl Z, 1980. **35**: S. 758 ff.
167. J. R. Deatherage, E. J. Miller, *Packaging and delivery of bone induction factors in a collagenous implant*. Collagen and related research, 1987. **7**(3): S. 225-231.
168. J. C. Moore, V. J. Matukas, J. R. Deatherage, E. J. Miller, *Craniofacial osseous restoration with osteoinductive proteins in a collagenous delivery system*. Int J Oral Maxillofac Surg, 1990. **19**(3): S. 172-176.
169. T. J. Gao, T. S. Lindholm, A. Marttinen, T. Puolakka, *Bone inductive potential and dose-dependent response of bovine bone morphogenetic protein combined with type IV collagen carrier*. Ann Chir Gynaecol Suppl, 1993. **207**: S. 77-84.
170. T. J. Gao, T. S Lindholm, A. Marttinem, M. R. Urist, *Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral*

- hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics*. Int Orthop, 1996. **20**(5): S. 321-325.
171. T. J. Gao, T. S Lindholm, B. Kommonen, P. Ragni, A. Paronzini, T. C. Lindhol, T. Jamsa, P. Jalovaara, *Enhanced healing of segmental tibia defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein and type IV collagen*. Biomed Mater Res, 1996. **32**(4): S. 505-512.
172. Aragona, F., *Is bovine collagen safe?* J Urol, 1991. **97**(6): S. 279-281.
173. Tomford, W. W., *Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts*. Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, 1995. **77**: S. 1742-1754.
174. B. E. Buck, L. Resnick, S. M. Shah, T. I. Malinin, *Human immunodeficiency virus cultured from bone: implications for transplantation*. Clinical orthopaedics and related research, 1990. **251**: S. 249-253.
175. Muxfeldt, H., *Synthetisch und doch resorbierbar - Die neue Ära des chirurgischen Nahtmaterials*. Ethicon OP Forum, 1976. **85**: S. 1-6.
176. Brin, M., *The synthesis and metabolism of lactid isomers*. Ann N Y Acad Sci, 1965. **119**: S. 943-956.
177. Maurer, P. K., *Vycril (polyglactin 910) mesh as a dural substitute*. J Neurosurg, 1985. **63**: S. 448-452.
178. Williams, D. F., *Biodegradation of surgical polymers*. J Mater Sci, 1982. **17**: S. 1233-1246.
179. U. Saller, J. Holste, *Ethisorb: Ein neues resorbierbares Implantat für die Chirurgie*. Ethicon OP Forum, 1991. **148**: S. 1-15.
180. M. Knoop, B. Lünstedt, A. Thiede, *Maxon und PDS - Bewertung physikalischer und biologischer Eigenschaften monofiler, absorbierbarer Nahtmaterialien*. Langenbecks Arch Klin Chir, 1987. **371**(13 ff.).
181. Öpen, R. Von, *Injection moulding of biodegradable implants*, in *Biodegradable implants in orthopaedic surgery*, Hofmann, G. O., Editor. 1990, Technik und Kommunikationsverlag: Berlin.
182. Törmälä, P., *Biodegradable self-reinforced composite materials, manufacturing, structure and mechanical properties*. Clin Mater, 1992. **10**: S. 29 ff.
183. Hofmann, G. O., *Biodegradable implants in orthopaedic surgery - a review on the state-of-the-art*. Clin Mater, 1992. **10**: S. 75ff.
184. T. A. Schildhauer, C. J. E. Gekle Und G. Muhr, *Neue Biomaterialien am Skelettsystem*. Chirurg, 1999. **70**: S. 888-896.
185. H. Pistner, J. Reuther, J. Mühling, J. Bill, M. Kraus, *Konzeption von biodegradierbaren Polylactid-Implantaten zur Osteosynthese am Gesichtsschädel*, in *Plastische und Wiederherstellungschirurgie: Gewebeverbund, Lokalanästhesie, Psyche und Plastische Chirurgie*, Berghaus, A., Editor. 1996, Einhorn-Press Verlag GmbH: Reinbeck. S. 110-114.

186. M. C. Meikle, S. Papaioannou, T. J. Ratledge, P. M. Speight, S. R. Watt-Smith, P. A. Hill, J. J. Reynolds, *Effect of poly D,L-lactide-co-glycolide implants and xenogenic bone matrix-derived growth factors on calvarial bone repair in the rabbit*. *Biomaterials*, 1994. **15**: S. 513-521.
187. K. Bessho, D. L. Carnes, R. Cavin, J. L. Ong, *Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *J Biomed Mater Res*, 2002. **61**(1): S. 61-65.
188. M. Mori, M. Isobe, Y. Yamazaki, K. Ishihara, N. Nakabayashi, *Restoration of segmental bone defects in rabbit radius by biodegradable capsules containing recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **50**(2): S. 191-198.
189. S. Miyamoto, K. Takaoka, T. Okada, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, S. Suzuki, K. Ono, *Evaluation of polylactid acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein*. *Clin Ort Rel Res*, 1992. **278**: S. 274-285.
190. N. R. Kübler, K. K. Würzler, J. F. Reuther, E. Sieber, T. Kirchner, W. Sebald, *Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs*. *Mund Kiefer GesichtsChir*, 2000. **4**: S. 465-469.
191. R. Kenley, L. Marden, T. Turek, L. Jin, E. Ron, J. O. Hollinger, *Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)*. *Journal of Biomedical Materials and Research*, 1994. **28**: S. 1139-1147.
192. S. Lee, M. Shea, M. A. Battle, K. Kozitza, E. Ron, T. Turek, R. G. Schaub, W. C. Hayes, *Healing of large segmental defects in rat femors is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix*. *J Biomed Mater Res*, 1994. **28**: S. 1149-1156.
193. M. Mayer, J. Hollinger, E. Ron, J. Wozney, *Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier*. *Plast Reconstr Surg*, 1997. **100**(5): S. 1361 ff.

Lebenslauf von Oliver Liebl:

- 13.5.1974 Geboren in Marktheidenfeld als zweites Kind des Dipl. Kaufmannes Peter Liebl und seiner Ehefrau Anne, geborene Rudlof, verstorben am 01.02.1995
- 1980-1984 „*Friedrich-Fleischmann-Volksschule*“, Marktheidenfeld
- 1984-1994 Abitur am „*Balthasar-Neumann-Gymnasium*“, Marktheidenfeld
- 1995-1999 Studium der Zahnmedizin an der „*Bayerischen Julius-Maximilians Universität*“, Würzburg
- 17.1.2000 Approbation als Zahnarzt
- 1.3.2000-30.4.2001 Zahnärztlicher Vorbereitungsassistent in der Praxis:
D.M.D Cristina Saldana-Mühe, Ettlingen
- 1.3.2000-30.6.2000 Zahnärztlicher Vorbereitungsassistent in der Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie: *Dr. Dr. James Zanker*, Karlsruhe
- 1.5.2001-31.8.2001 Zahnärztlicher Vorbereitungsassistent in der Praxis:
Dr. Karl Braun, Weiden in der Oberpfalz
- 1.9.2001-30.11.2003 Weiterbildungsassistent für das Fach Kieferorthopädie in der Praxis:
Dr. Christina Braun, Weiden in der Oberpfalz
- seit 1.12.2003 Weiterbildungsassistent für das Fach Kieferorthopädie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena Zentrum für Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde, *Abteilung für Kieferorthopädie*
- seit 1.5.2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Drittmittelprojekt Kst. 821138:
Aufbau g-scan Ambulanz in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut Angewandte Optik und Feinmechanik (IOF), Jena

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Reuther und Herrn Prof. Dr. Dr. N. R. Kübler danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Dr. K. K. Würzler gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und den wissenschaftlichen Denkanstößen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Renk möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates sowie die Prüfung im zweiten Fachbereich bedanken.

Bei Frau Dr. S. Mäusle bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Herstellung der Proben und Hilfe bei den Laborarbeiten.

Bei Herrn Dr. C. F. Käding und Herrn Dr. S. A. Biebl möchte ich mich für die Operationen der Ratten und die Vorversuche bedanken.

Weiterhin möchte ich Frau M. Schleyer für ihre Hilfe bei den Laborarbeiten und Frau K. Berr für den wissenschaftlichen Rat danken.