

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Kübler

**Die Unterkieferrekonstruktion mit osteoinduktiven Implantaten
beim Göttinger Minischwein
- Eine biomechanische Untersuchung -**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Daniel Savić
aus Düsseldorf

Würzburg, Dezember 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. K. Würzler

Korreferent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2009

Der Promovend ist Zahnarzt

Meinen Eltern in Dankbarkeit

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Theoretische Grundlagen | 3 |
| 2.1 Knochengewebe | 3 |
| 2.1.1 Funktion | 3 |
| 2.1.2 Knochenstruktur | 3 |
| 2.1.3 Zellen der Knochensubstanz | 4 |
| 2.1.4 Biochemischer Knochenaufbau | 7 |
| 2.1.5 Adaptiver Knochenumbau | 8 |
| 2.1.6 Frakturmechanik | 10 |
| 2.1.7 Wachstumsfaktoren | 12 |
| 2.2 Osteogene Regeneration | 12 |
| 2.2.1 Osteogenese | 12 |
| 2.2.2 Osteokonduktion | 13 |
| 2.2.3 Osteoinduktion | 14 |
| 2.2.3.1 Physiologie der Osteoinduktion | 14 |
| 2.3 Bone Morphogenetic Proteins | 15 |
| 2.3.1 Geschichtliche Entwicklung | 15 |
| 2.3.2 Aufbau der BMPs | 16 |
| 2.3.3 Signaltransduktion (Rezeptoren / Smads) | 17 |
| 3. Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Versuchsübersicht vorausgehende Studie | 18 |
| 3.1.1 Herstellung von rhBMP-2 / T4 | 18 |
| 3.1.2 Herstellung des „extrahierten xenogenen Knochenkollagens“ (EXKK) | 18 |
| 3.1.3 Dotierung von EXKK mit BMP-2 / T4 | 20 |
| 3.1.4 Übersicht Implantationsmodelle | 20 |
| 3.1.5 Übersicht Tiermodell | 21 |
| 3.1.6 Vorbereitung der Tiere | 21 |
| 3.1.6.1 Narkose | 21 |
| 3.1.6.2 Vorbereitende Zahnextraktion | 21 |
| 3.1.6.3 Unterkiefer-Teilresektion | 22 |
| 3.1.6.4 Tierhaltung und Schmerzmanagement | 24 |
| 3.1.6.5 Euthanasie der Tiere | 24 |
| 3.2 Biomechanische Grundlagen | 25 |
| 3.2.1 Elastische / Plastische Verformung | 25 |
| 3.2.2 Hookesches Gesetz | 25 |
| 3.2.3 Elastizitätsmodul E | 26 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.4 | Drei-Punkt-Biegeversuch | 27 |
| 3.3 | Versuchsdurchführung - aktuelle Studie | 28 |
| 3.3.1 | Vorbereitung der Unterkiefer | 29 |
| 3.3.1.1 | Mandibulae in toto (Übersicht cranial-caudal) | 29 |
| 3.3.1.2 | Vorbereitung der Präparate | 30 |
| 3.3.1.3 | Partes mandibulae dextrae verplattet (lateral/cranial-caudal) | 31 |
| 3.3.1.4 | Partes mandibulae dextrae verplattet (lateral) | 34 |
| 3.3.1.5 | Freilegung und Entfernung der Rekonstruktionsplatten | 35 |
| 3.3.1.6 | Partes mandibulae dextrae n. Plattenentfernung (lateral/cranial-caudal) | 36 |
| 3.3.2 | Biomechanische Testung | 39 |
| 3.4 | Auswertung | 40 |
| 3.4.1 | Röntgenverlaufskontrolle | 40 |
| 3.4.2 | Fotodokumentation | 40 |
| 3.4.3 | Statistik der biomechanischen Auswertung | 40 |
| 4. | Ergebnisse | 42 |
| 4.1 | Radiologische Beurteilung | 42 |
| 4.1.1 | Röntgenologische Dokumentation nach Fraktur (lateral/cranial-caudal) | 42 |
| 4.2 | Biomechanik | 46 |
| 4.2.1 | Regressionsdiagramme der getesteten Kiefer | 46 |
| 4.3 | Zusammenfassung der biomechanischen Ergebnisse | 49 |
| 4.3.1 | Übersicht Kiefer gesamt | 49 |
| 4.3.2 | Vergleich der maximal tolerierten Kräfte | 51 |
| 4.3.3 | Durchschnitt der maximal tolerierten Kräfte | 52 |
| 4.3.4 | Vergleich der E-Moduln | 53 |
| 4.3.5 | Durchschnitt der E-Moduln | 54 |
| 5. | Diskussion | 55 |
| 5.1 | Parameter der Defektheilung | 55 |
| 5.2 | Standard-Rekonstruktionsverfahren | 56 |
| 5.2.1 | Autologer Knochen | 56 |
| 5.2.2 | Allogener Knochen | 57 |
| 5.2.3 | Xenogener Knochen | 58 |
| 5.2.4 | Alloplastisches Knochenersatzmaterial | 58 |
| 5.3 | Der „ideale“ Knochenersatz | 59 |
| 5.4 | Kombination EXKK + Bone Morphogenetic Proteins | 60 |
| 5.4.1 | EXKK - Herstellung und Eigenschaften | 60 |
| 5.4.2 | Dotierungssubstanz rhBMP-2 / T4 | 61 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.4.3 | Vorausgehende tierexperimentelle Studie | 61 |
| 5.5 | Aktuelle Studie | 62 |
| 5.6 | Schlussfolgerung | 66 |
| 6. | Zusammenfassung | 67 |
| 7. | Literaturübersicht | 68 |
| 8. | Danksagung | 80 |
| 9. | Lebenslauf | 81 |

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Darstellung des ARF-Zyklus
- Abbildung 2: Mechanik des Biegebruchs
- Abbildung 3: A: Die TGF- β Superfamilie; B: Molekulare Struktur der BMPs
- Abbildung 4: Unterkiefer-Teilresektion
- Abbildung 5: Röntgenübersicht cranial-caudal (EXKK + T4)
- Abbildung 6: Röntgenübersicht cranial-caudal (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 7: Röntgenübersicht cranial-caudal (autologer Knochen)
- Abbildung 8: Verplattet - laterale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 9: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 10: Verplattet - laterale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 11: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 12: Verplattet - laterale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 13: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 14: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 15: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 16: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 17: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 18: Röntgenbild nach Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 19: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 20: Röntgenbild n. Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 21: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 22: Röntgenbild n. Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 23: Versuchsaufbau Universalprüfmaschine Zwick
- Abbildung 24: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 25: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)
- Abbildung 26: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 27: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (EXKK+rhBMP-2)
- Abbildung 28: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (autologer Knochen)
- Abbildung 29: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)

Tabellenverzeichnis

| | |
|------------|---|
| Tabelle 1: | Rekonstruktionsmethode und Anzahl der implantierten Tiere |
| Tabelle 2: | Überblick Rekonstruktionsmethoden, E-Moduln und max. Kräfte |
| Tabelle 3: | max. Kraft aller biomechanisch getesteten Kiefer |
| Tabelle 4: | Darstellung der Mittelwerte (max. Kraft) |
| Tabelle 5: | E-Moduln aller biomechanisch getesteten Kiefer |
| Tabelle 6: | Darstellung der Mittelwerte (E-Modul) |
| Tabelle 7: | Vergleich der Mittelwerte (max. Kraft in %) |
| Tabelle 8: | Vergleich der Mittelwerte (E-Modul in %) |

Graphikverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Graphik 1: | Elastische / Plastische Deformation |
| Graphik 2: | Elastizitätsmodul E |
| Graphik 3: | Versuchsanordnung Drei-Punkt-Biegeversuch |
| Graphik 4: | Übersicht Versuchsablauf (Flow-Chart) |
| Graphik 5: | Beispiel Regressionsdiagramm |
| Graphik 6: | Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit EXKK+T4 |
| Graphik 7: | Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit EXKK+rhBMP-2 |
| Graphik 8: | Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit autologem Knochen |
| Graphik 9: | Regressionsdiagramm für Kontrollkiefer |

1 Einleitung

Rekonstruktive Maßnahmen zur Behandlung knöcherner Defekte können bis in das 17. Jahrhundert zurückverfolgt werden. Zu dieser Zeit wurden sowohl allogene als auch xenogene Knochenersatzmaterialien verwendet, vorwiegend humaner und tierischer Abstammung. Die erste dokumentierte Implantation xenogenen Knochens führte der holländische Chirurg Meekren 1668 durch. Er deckte bei einem Soldaten mit traumatischem Defekt der Schädelkalotte diesen mit einem Stück Hundecalvaria ^[74]. Fortwährend verbesserte chirurgische Fähigkeiten und Techniken machten es im weiteren geschichtlichen Verlauf möglich, auch autologe Transplantationen durchzuführen. Einer der ersten schriftlich belegten Autolog-Transfers gehen auf Walter im Jahr 1821 zurück, der das bei Trepanation gewonnene Knochenmaterial zur Defektversorgung herannahm ^[141]. Diese Technik verbesserte ganz entscheidend die Defektheilung bedingt durch die Verpflanzung körpereigener vitaler Zellen. Der Vorteil war die ausbleibende Abstoßungsreaktion aufgrund immunologischer Akzeptanz. Es stellte sich heraus, daß Osteoblasten eine wichtige Voraussetzung zur Knochenheilung sind (sog. Osteogenese) und diese auch aus defektfernen Arealen gehoben werden können. Desweiteren kristallisierte sich im Laufe der Entwicklung die Notwendigkeit einer porösen Leitstruktur heraus, in die aus der Defektumgebung Zellen einwachsen können und so eine knöcherne Konsolidierung bewirken (sog. Osteokonduktion). Urist beobachtete in den 1960er Jahren eine de novo Knochenbildung nach intramuskulärer Implantation demineralisierten Knochens. Die Publikation seiner Ergebnisse war ein Meilenstein in der Knochenforschung ^[136]. Er gab diesen für die Osteoinduktion verantwortlichen Proteinen den Namen „Bone Morphogenetic Proteins“.

Der heutige Goldstandard bei Versorgung ausgedehnter knöcherner Defekte ist nach wie vor die Transplantation autologen Knochens. Durch die osteogenetische, osteokonduktive und osteoinduktive Wirkung ist diese Therapiemethode zur Zeit noch allen anderen Materialien überlegen ^[122]. Die

Anwendung ist jedoch durch die zusätzliche operative Maßnahme mit erhöhten Risiken für den Patienten verbunden ^[99]. Desweiteren ist die Verfügbarkeit autologen Knochens limitiert. Der transferierte Knochen entspricht dabei keinesfalls den biomechanischen Anforderungen im Defektareal, sondern wird im Laufe der Einheilung adaptiv umgebaut (Boneremodelling).

In dieser Studie werden neue osteoinduktive Implantate beschrieben, die in ausgedehnten Unterkieferrekonstruktionen am Göttinger Minischwein ausgetestet und für diese Studie biomechanischen Belastungsversuchen unterzogen wurden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Knochengewebe

2.1.1 Funktion

Knochengewebe zählt zu den hochdifferenzierten Binde- und Stützgeweben, es ist fest gegen Zug, Druck, Biegung und Torsion mit der Fähigkeit, sich durch funktionelle Adaptation optimal den biomechanischen Anforderungen anzupassen. Neben den mechanischen zählen auch die metabolischen Aufgaben (Stoffwechselreservoir für Mineralsalze) und die Hämatopoese (rotes Knochenmark als Ort der Blutbildung) zu den Hauptfunktionen des Knochengewebes ^[105].

2.1.2 Knochenstruktur

Im Allgemeinen besteht Knochen aus einer äußeren Substantia compacta (kortikaler Knochen) und einer inneren Substantia spongiosa (trabekulärer Knochen). Die Substantia compacta als feste umgebende Struktur schützt vor äußerer Deformation, während die Substantia spongiosa ihre Festigkeit und Leichtbauweise durch die trajektoriell ausgerichteten trabekulären Verstrebungen erhält und hauptverantwortlich für den Knochenmetabolismus (ca. 70 %) ist ^[81]. Außen aufliegend ist das gefäß- und nervenführende, osteogenetisches Potential besitzende Periost, innen umkleidet das Endost die Markräume ^[54].

Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen der Spongiosa werden durch das rote und gelbe Knochenmark ausgefüllt. Zur Zeit der Geburt ist das rote Knochenmark Hauptort der Erythropoese, an einem ausgewachsenen Skelett ist nur noch das Knochenmark der Wirbel, Rippen, Schädel- und

Beckenknochen sowie des proximalen Femurs blutbildend. Der Rest wird durch gelbes Knochenmark ersetzt, wobei die Mengenverhältnisse des roten und gelben Knochenmarks annähernd identisch sind. Bei Bedarf ist jedoch beim Erwachsenen das gelbe Knochenmark in der Lage, sich in blutbildendes rotes Mark zurückzuwandeln ^[105].

2.1.3 Zellen der Knochensubstanz

- Osteoblasten

Osteoblasten gehen aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) hervor ^[54]. Die MSC können aus dem Knochenmark, den Gefäßen, subperiostalen Lokalisationen und anderen Geweben isoliert werden und sind zur Bildung von Knochen, Knorpel, Fettgewebe, Ligament- und Bindegewebe fähig ^[48].

Die Osteoblasten-Differenzierung wird induziert durch die Sekretion von lipid-modifizierten Glykoproteinen der wingless (wnt) familie, BMPs und verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Runx2 / Osterix) ^[16,28,45,20,80]. Der wnt-Signalweg bewirkt über den Transkriptionsfaktor β -Catenin im Zellkern eine Änderung der Genexpression und wird maßgeblich beeinflusst von dem Co-Rezeptor LRP-5 (Lipoprotein-Related Protein 5) ^[87]. BMPs sind in der Lage, den osteogenen Differenzierungsweg in mesenchymalen Vorläufern einzuleiten, und die Expression von osteoblastenspezifischen Proteinen (alkalische Phosphatase, Osteocalcin, osteogener Transkriptionsfaktor Runx2) zu induzieren ^[54,55]. Die Präsenz von Runx2 ist essentiell, da ohne die Expression von Runx2 kein Knochengewebe ausgebildet werden kann aufgrund einer Blockade der Osteoblastenreifung ^[58]. Runx2 ermöglicht eine Aktivierung osteoblastenspezifischer Gene in mesenchymalen Stammzellen und somit die Expression von Osteocalcin, Osteopontin, alkalischer Phosphatase und Kollagen Typ I ^[36]. Der Transkriptionsfaktor Osterix ist Runx2 ähnlich und von ebenso essentieller Notwendigkeit für die Osteoblastendifferenzierung ^[80].

Osteoblasten liegen in Clustern der Knochenoberfläche auf und synthetisieren Knochenmatrix durch Abscheidung von Kollagen Typ I. Sie sezernieren alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Proteoglykan, Bone Sialoprotein (BSP) und Osteopontin. Anschließend wird die Kollagenmatrix durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase, deren genaue Funktion in diesem Zusammenhang noch nicht abschließend geklärt ist, mineralisiert [143].

Neben der Knochenneubildung sind Osteoblasten involviert in den Differenzierungsprozess der Osteoklasten. Durch die Produktion von RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B Ligand) bzw. OPG (Osteoprotegerin) modulieren sie die Osteoklastenaktivität [126].

▪ Osteoklasten

Osteoklasten reifen aus monozytären Vorläufern (Osteoklasten-Precursor) und sind Zellen des hämatopoetischen Monozyten- / Makrophagen-Differenzierungswegs [128,96]. Diese Vorläuferzellen haben das Potenzial, sich in Makrophagen, dendritische Zellen, Osteoklasten, Kupffer-Sternzellen der Leber, Mikroglia des Gehirns u.a. zu differenzieren.

Die Osteoklastenbildung wird induziert von koloniestimulierenden Faktoren (M-CSF), RANKL und kalziumabhängigen Hormonen [54,128]. M-CSF bindet direkt an seinen Rezeptor (c-fms) auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläuferzelle und ermöglicht somit via Signalinduktion die Proliferation [128]. Desweiteren schützt M-CSF vor der Osteoklasten-Apoptose und steigert dadurch die allgemeine Aktivität der Osteoklasten [96,31]. RANKL ist Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF) -Rezeptor-Familie und der zweite wichtige Osteoklasten-Aktivator, der durch Parathormon (PTH), Interleukin-1 (IL-1) oder Prostaglandine vermehrt auf der Oberfläche von unreifen Osteoblasten exprimiert wird [16,54,59,66,96,125]. RANKL bindet an den Rezeptor RANK, der auf der Oberfläche der Osteoklasten-Precursor-Zellen lokalisiert ist und stimuliert deren Differenzierung zu aktivierten Osteoklasten [89,131]. Osteoprotegerin (OPG), ebenfalls der TNF-Rezeptor-Familie zugehörig, ist

ein weiteres von Osteoblasten exprimiertes Zytokin und fungiert regulatorisch kompetitiv mit RANK um RANKL ^[117,150]. Das Verhältnis von RANKL / OPG ist ein wichtiger Regulator der Knochenresorption und Knochenstärke ^[59]. Parathormon (PTH) bindet an Osteoblasten und induziert die Produktion der Oberflächenproteine M-CSF und RANKL. Auf diese Weise stimuliert PTH die Reifung von Osteoklasten ^[89]. Calcitonin, hormoneller Antagonist von PTH, hemmt die Knochenresorption über direkte Wirkung auf die Rezeptoren der Osteoklasten ^[89,13].

Der Knochenabbau beginnt mit der Migration von Osteoklasten in das zu resorbierende Gebiet. Die Anheftung der Osteoklasten funktioniert über integrinvermittelte Adhäsionsmechanismen ^[21,132]. Es kommt zur Ausformung einer basolateralen Membran, die mit dem Knochen nicht in Kontakt steht, einer Verbindungszone („sealing zone“), die am Knochen angeheftet ist und einem ringförmigen Resorptionssaum („ruffled border“), der von der Verbindungszone umgeben ist ^[6]. Die Verbindungszone bildet eine Diffusionsbarriere zur Aufrechterhaltung der definierten Konzentrationen an Protonen und Proteasen, die von dem Resorptionssaum sezerniert werden ^[138]. Das saure und proteasenreiche Milieu der Resorptionslakunen dient dem Abbau des Knochenmaterials mithilfe von Salzsäure. Die während der Resorption steigende Kalziumkonzentration auf bis zu 40 mM wird über Kalziumsensoren der Osteoklasten wahrgenommen und führt in Folge dessen zur Inhibierung des osteoklastischen Abbaus und endet in der Apoptose der Osteoklasten ^[116,71].

- Osteozyten

Osteozyten sind von einer vorwiegend aus Kollagen Typ I bestehenden extrazellulären Knochenmatrix umgeben ^[84,8]. Sie bilden ein zelluläres Netzwerk im Inneren des Knochens anhand von untereinander verbundenen Zytoplasmafortsätzen, die in den Kanalikuli von einem Flüssigkeitssaum umschlossen sind. An deren Spitze sorgen gap junctions für die Zell-zu-Zell Kommunikation zwischen Osteozyten einerseits, aber auch zur Membran

der Osteoblasten und lining cells auf der Knochenoberfläche kann auf diese Weise Kontakt zur Informationsübermittlung generiert werden [14,84,127].

Die im Knochen eingebetteten Osteozyten stellen die mechanosensorischen Zellen des Knochens dar. Mechanische Stimuli werden über die Flüssigkeitsbewegung in den Kanalikuli registriert und über die Mechanotransduktion in weiterführende elektrische und biomechanische Signale konvertiert [85]. Diese leiten mutmaßlich die ersten Schritte zur Reparatur ein [8,95,118].

Die Regulation der Knochenmasse wird wesentlich durch das osteozytenspezifische Protein Sclerostin beeinflusst. Es inhibiert die BMP-induzierte Osteoblasten-Differenzierung und hemmt auf diesem Weg die Knochenbildung [129]. Osteozyten wirken ebenso über direkten Kontakt mit den Osteoblasten auf die Knochenbildung ein [52].

2.1.4 Biochemischer Knochenaufbau

Biochemisch setzt sich Knochen aus folgenden Fraktionen zusammen:

anorganische Bestandteile (65 %)

Der Mineralanteil besteht vorwiegend aus Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat, aber auch aus Nitrat, Eisen, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffen. Im Knochen sind diese Mineralien in Form von Apatitkristallen geordnet, hauptsächlich als Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Lokalisiert sind die stäbchenförmigen Kristalle in oder längs der Kollagenfibrillen [105,119].

▪ organische Verbindungen (25 %)

Der wasser- und mineralienfreie organische Knochenanteil (sog. Knochenmatrix) besteht im adulten Knochen mit 95 % aus Kollagen, vorwiegend Kollagen Typ I.

Die restlichen 5 % macht die nichtkollagene Matrix (NCM) aus. Diese besteht aus Proteoglykanen (u.a. Versican, Decorin, Biglykan), strukturellen Glykoproteinen (u.a. alkalische Phosphatase, Osteonektin, Thrombospondin, Vitronektin, Osteopontin), verschiedenen Polypeptiden als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren [u.a. Transforming growth factors (TGF- β), Insulin-like growth factors (IGF), Fibroblast growth factor (FGF), Platelet-derived growth factors (PDGF), Osteogenic growth peptide (OGP), Bone morphogenetic proteins (BMP)] und Serumproteinen (u.a. Albumin). Die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, welche eine unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen, machen aber weniger als 0,2 % der NCM aus ^[24,119].

- Hydratationswasser (10 %)

Zur Aufrechterhaltung des Ionenaustausches sind die Hydroxylapatitkristalle mit einem Hydratmantel umschichtet, durch welchen die Einlagerung bzw. die Mobilisierung von Kalzium und Phosphat zwischen Hydroxylapatitkristall und Umgebung erleichtert wird ^[70].

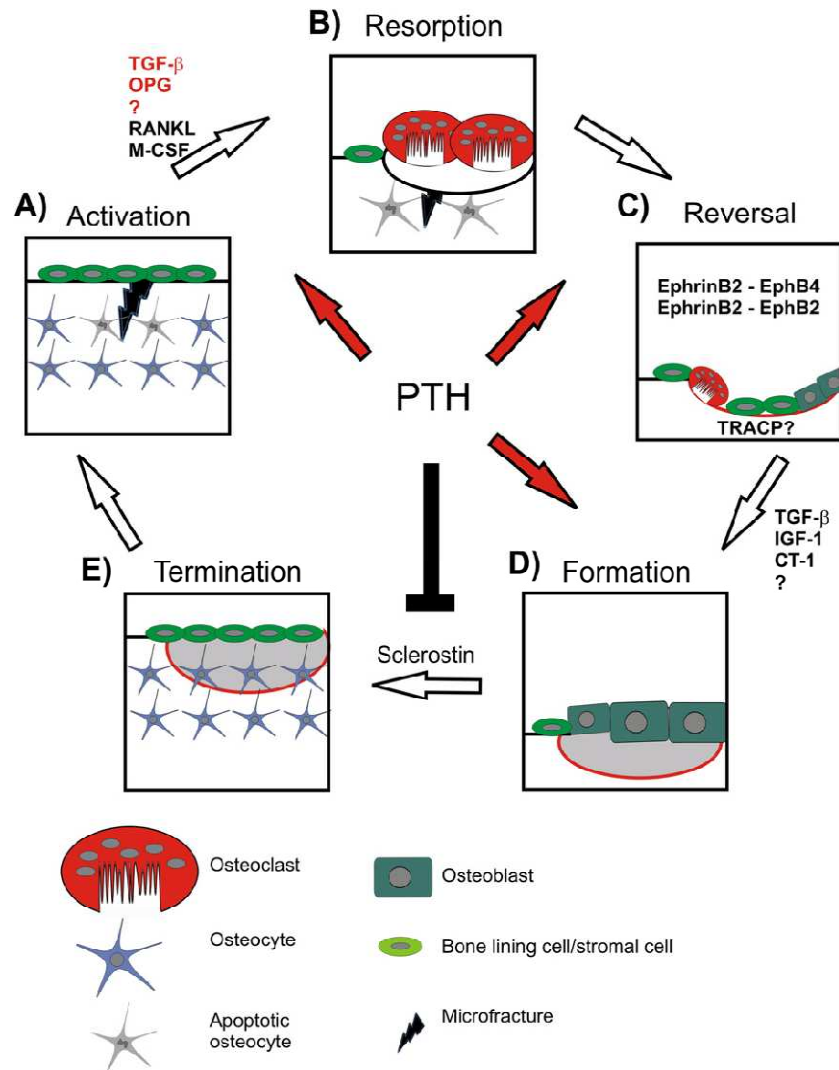
2.1.5 Adaptiver Knochenumbau

Das Knochengewebe unterliegt einem ständigen Remodellierungsprozess zur Aufrechterhaltung der Stabilität und strukturellen Integrität sowie zur Anpassung an veränderte biomechanische Konditionen ^[114]. Jedes Jahr werden ca. 10 % des Knochenmaterials erneuert ^[67].

Das komplexe Zusammenspiel von Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten bei der Knochen-Remodellierung spielt sich in einem sequentiellen Aktivierung-Resorption-Formierung (ARF) Zyklus ab (siehe Abbildung 1) ^[33].

Die Aktivierung erfolgt durch mechanischen Stress hervorgerufene Mikrotraumata, in Folge dessen benachbarte Osteozyten apoptotisch reagieren. Es kommt zur Produktion von proosteoklastischen Signalen, oder die bis dato inhibitorisch wirkenden Signale werden aufgehoben. Dies erfolgt entweder

direkt in den Osteozyten oder über einen noch unbekanntem Mechanismus, der die bone lining cells zur Produktion von RANKL und M-CSF stimuliert. Die Anzahl an Osteoklasten wird über die Produktion der antiosteoklastischen Zytokine OPG und TGF- β reguliert. Die Osteoklasten resorbieren den Knochen im Bereich des Mikrotraumas und scheinen Knochenzement abzulagern. Im Anschluss reinigen die bone lining cells die Resorptionsgruben. Direkte Zell-zu-Zell Kontakte durch die Signalkaskaden von Ephrin-Eph könnten in dieser Phase wichtig sein. Nachdem die Reinigung der Resorptionsgruben abgeschlossen ist, differenzieren sich die lining cells in knochenbildende Osteoblasten, oder werden durch diese über einen von IGF-I, TGF- β und Cardiotropin-1 (CT-1) kontrollierten Prozess ersetzt. Nach Abschluss der Knochenneubildung scheint es so zu sein, daß die Sekretion von Sklerostin durch die neu entstandenen und während der Knochenformierung eingeschlossenen Osteozyten den Zyklus beendet und die bone lining cells wieder die Knochenoberfläche bedecken. PTH scheint in die Regulation des Zyklus involviert zu sein, es stimuliert die Produktion von RANKL und EphrinB2-EphB2, wirkt über IGF-I und reduziert letztendlich die Expression von Sklerostin durch die Osteozyten^[42].

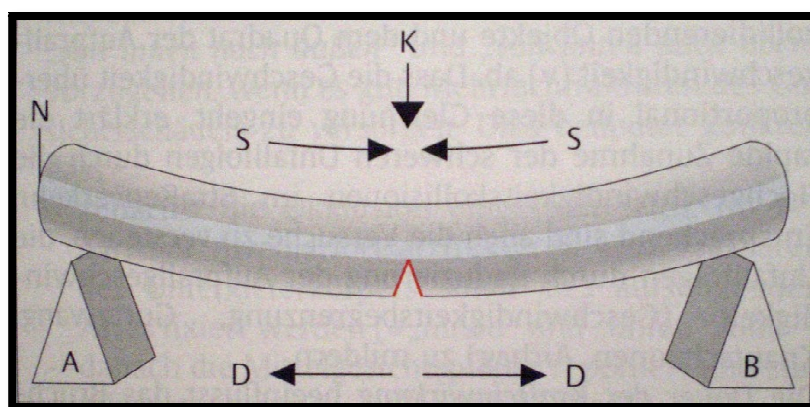
Abbildung 1: Darstellung des ARF-Zyklus ^[42]

2.1.6 Frakturmechanik

Unter dem Begriff Fraktur versteht man eine durch direkte oder indirekte Krafteinwirkung induzierte Unterbrechung der Knochenkontinuität, wobei die Belastung sowohl statisch als auch dynamisch erfolgen kann.

Das Knochengewebe ist in der Lage, die einwirkenden Kräfte mittels Energieabsorption bis zu einem gewissen Grad zu tolerieren. Dieser Mechanismus umfasst das Zurückweichen z.B. des Unterkiefers, die Verformung der Weichteile sowie die elastische Verformung der Knochen- und

Knorpelstrukturen. Bei einer Energieeinwirkung über diese Absorptionsgrenzen hinaus kommt es zur Fraktur, dabei sind die zu absorbierende Energie, die Lastverteilung (Kraft / Fläche) und die Dauer der Krafteinwirkung die maßgeblichen Parameter, wobei kurzzeitig auftretende Belastungsspitzen zu einer höheren Energietoleranz im Knochen führen als längerandauernde Krafteinwirkung. Dieser Mechanismus basiert auf dem kristallinen Aufbau des Knochens, der eine Ausrichtung der zur Belastungsrichtung ungünstig liegenden Kristalle in eine biomechanisch günstigere Lage bewirkt, es kommt es zu einer initialen Verfestigung des Knochens. Bleibt die Beanspruchung weiter bestehen, kommt es trotz gleichbleibender Energieeinwirkung zur Fraktur. Der Widerstand, den der Knochen einer auf ihn einwirkenden Kraft (F) entgegensetzt, ist vom gleichen Betrag (Actio=Reactio, Kräftegleichgewicht) und wird als Spannung (σ) bezeichnet, welche sich als Schub-, Zug-, Druck- oder Biegespannung darstellt. Die Biegespannung beschreibt einen Sonderfall, bei dem an der konvexen Fläche Zugspannungen und an der konkaven Fläche Druckspannungen wirken. In der neutralen Schicht ist die Spannung gleich null, sie bezeichnet den Übergang von Druck- zu Zugbelastung. Frakturen werden auf der Konvexseite eingeleitet, da Knochen eine erheblich größere Druck- als Zugfestigkeit aufweist^[113].



A,B = Lagerkräfte / K = Biegelast / S = Stauchung / D = Dehnung / N = neutrale Schicht
(Schwenzer, Ehrenfeld; Spezielle Chirurgie; 2002)

Abbildung 2: Mechanik des Biegebruchs

2.1.7 Wachstumsfaktoren

Im Knochengewebe sind zahlreiche Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren vorhanden. Sie sind regulatorisch wirksam bei der Chondro- und Osteogenese während der Embryonalentwicklung, bei der Organogenese und der Knochenregeneration^[5,110,145]. Im Speziellen sind dies^[61,65,1]:

- Platelet-derived growth factor (PDGF)
- Transforming growth factors (TGF- α / - β)
- Insulin-like growth factors (IGF-I/ -II)
- Acidic/Basic fibroblast growth factor (a- / bFGF)
- Vascular endothelial growth factor (VEGF)
- Epidermic growth factor (EGF)
- Cementum-derived growth factor (CGF)
- Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)
- Osteogenic growth peptide (OGP)
- Bone morphogenetic proteins (BMP)

Alleinig implantiert sind nur bestimmte BMP`s (BMP-2, -4, -6, -7, -9) in der Lage, eine heterotope Knochenneubildung zu induzieren^[61,17,53].

2.2 Osteogene Regeneration

2.2.1 Osteogenese

Die Osteogenese stellt einen Mechanismus der Knochenregeneration dar, bei dem vitale, körpereigene Zellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) an den Ort des Defektes verpflanzt werden. Diese autogenen Transplantate, bei denen keine immunologisch bedingten Abstoßungsreaktionen zu erwarten sind,

können aus defektfernen Skelettabschnitten stammen, dabei weist die zellreiche und gut revaskularisierbare Spongiosa im Vergleich zur Kortikalis die höhere osteogenetische Potenz auf ^[111,112]. Die vitalen Präosteoblasten und Osteoblasten des Transplantats werden durch Diffusion ernährt, wobei ein Großteil der Zellen vor der Revaskularisierung zugrunde geht. Folglich wirkt sich die Diffusionsstrecke und somit die zu versorgende Defektgröße als limitierender Faktor aus. Eine zusätzliche Patienten-Belastung stellt die Entnahmeoperation der autogenen Knochentransplantate dar.

2.2.2 Osteokonduktion

Die Osteokonduktion basiert auf der Verwendung von operativ eingebrachten Knochenersatzmaterialien, die den vom Lagergewebe aus einwachsenden Knochen und Gefäßen als poröse Leitstruktur dienen und dadurch eine Überbrückung bzw. knöchernen Konsolidierung bewirken können.

Dieser passive Leitschieneneffekt der Biomaterialien erfüllt die Aufgaben einer künstlichen Extrazellulärmatrix, an der die Osteoblasten des Lagerknochens appositionell in den Defekt einwachsen können. Das verwendete Knochenersatzmaterial muss, im Hinblick auf seine Stabilität, dem Druck des umgebenden Weichgewebes und der biomechanischen Belastung des zu rekonstruierenden Knochenabschnitts bis zur funktionellen Adaptation des neu gebildeten Knochengewebes standhalten. Dabei wird das Knochenersatzmaterial resorbiert oder osteointegriert. Das appositionelle Knochenwachstum erfordert eine geeignete Oberflächenstruktur, Biokompatibilität, Porosität und chemische Zusammensetzung. Ungünstige Defektgrößen, -lokalisationen und -formen sowie mechanische Instabilität können zu einer bindegewebigen Durchwachsung und unvollständigen knöchernen Regeneration des Defektes führen ^[130].

Ein weiterer limitierender Faktor der Osteokonduktion ist der alleinig vom Lagergewebe ausgehende Stimulus zur Knochengewebusbildung und -

regeneration, so daß die Kontaktfläche zum Implantatlager so groß wie maximal möglich gewählt werden muß ^[61,136].

2.2.3 Osteoinduktion

Unter Osteoinduktion versteht man eine vom Implantat ausgehende Stimulation zur Knochenneubildung durch Differenzierung osteogener Zellen aus pluripotenten, mesenchymalen Stammzellen. Die Induktion und Steuerung dieser Prozesse erfolgt durch dem Implantat zugesetzte Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Somit übernimmt, im Unterschied zur Osteokonduktion, das Knochenersatzmaterial nicht nur die Funktion einer Leitschiene (extrazelluläre Matrix), sondern ist gleichzeitig Trägermaterial der BMPs. Dabei kann eine de novo Knochenbildung sowohl orthotop, im Knochengewebe, als auch heterotop, außerhalb des Knochengewebes, realisiert werden. Die Osteoinduktion ist folglich unabhängig von einem knöchernen Lager ^[61,130].

Zusammengefaßt gibt es drei sich gegenseitig beeinflussende Faktoren der Osteoinduktion (Matrix / BMPs / Mesenchymale Stammzellen). Dabei übernimmt die Matrix im Idealfall mehrere Funktionen, sie dient der mechanischen Stabilität bis zur Resorption bzw. Osteointegration und setzt zugleich die pharmakokinetisch notwendigen Mengen an induktiven Faktoren frei.

2.2.3.1 Physiologie der Osteoinduktion

1991 konnten Reddi und Carrington zeigen, daß die postnatale Osteoinduktion dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation entspricht und in einem mehrstufigen Prozess abläuft ^[11,94,90].

Innerhalb weniger Tage kommt es durch Chemotaxis zu einer Migration ortsnaher, pluripotenter, mesenchymaler Stammzellen an den Ort der BMP-Implantation und einer darauffolgenden Anlagerung an die implantierte Matrix.

Die mesenchymalen Stammzellen befinden sich als Zielzellen der BMPs im Knochenmark, in der Muskulatur, im Periost und im subkutanen Gewebe. Das BMP-vermittelte Signal induziert die Stammzellproliferation mit darauffolgender Differenzierung in Chondroblasten und die Ausbildung extrazellulärer Matrix. Es kommt zur Kalzifizierung des knorpeligen Gewebes und zur Einsprossung von Blutkapillaren. Die aus Vorläuferzellen neu gebildeten Chondroblasten und Osteoblasten ersetzen im Anschluß das Knorpelgewebe gemäß der enchondralen Ossifikation durch neuentstandenes Knochengewebe. Der so gebildete Geflechtknochen wird durch Remodelling-Prozesse im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umgebaut ^[91,92,120].

2.3 Bone Morphogenetic Proteins

2.3.1 Geschichtliche Entwicklung

Mitte der 60er Jahre beobachtete Urist im Tierversuch die de novo Knochenbildung nach Implantation von demineralisiertem, allogenen Knochen in Muskelgewebe ^[136]. Einige Jahre später wurde aus dem Knochengewebe ein Proteinextrakt isoliert, der genauso osteogene Eigenschaften im Weichteillager besaß und nachfolgend „Bone Morphogenetic Protein“ genannt wurde ^[137].

1987 gelang A.H. Reddi et al. die erfolgreiche Reinigung und Charakterisierung von BMP-7 ^[103]. Weitere osteoinduktive Faktoren (BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7) wurden fast zeitgleich von J. Wozney et al. identifiziert ^[146,12]. Nachfolgend gelang es durch neue molekularbiologische Techniken weitere Wachstumsfaktoren zu entschlüsseln, so daß mittlerweile 20 verschiedene BMPs identifiziert wurden, die nicht nur an der Entwicklung von Knorpel und Knochen, sondern auch an der Organogenese beteiligt sind ^[140,144]. Sie sind in sehr geringer Konzentration (1 µg pro kg Knochengewebe) in der Knochenmatrix vorhanden ^[72,142].

2.3.2 Aufbau der BMPs

Die BMPs sind aus zwei identischen Polypeptidsträngen aufgebaute Proteine, die nach Abspaltung ihrer jeweiligen Propeptidsequenz als biologisch aktive Proteine wirken ^[93]. Mit Ausnahme von BMP-1, welches als Prokollagen-C-Proteinase identifiziert wurde und somit eine eigene Entität darstellt ^[44], gehören BMP-2 bis BMP-15 der speziesübergreifenden Familie des Wachstumsfaktors TGF- β (Transforming Growth Factor beta) an, welche weitere wichtige Proteine enthält, die an der Steuerung der embryonalen Entwicklung von Organsystemen (Knochen, Zähne, Knorpel, Muskel, Herz, Niere, Haut, Reproduktiv-Trakt) involviert sind ^[82,99,86].

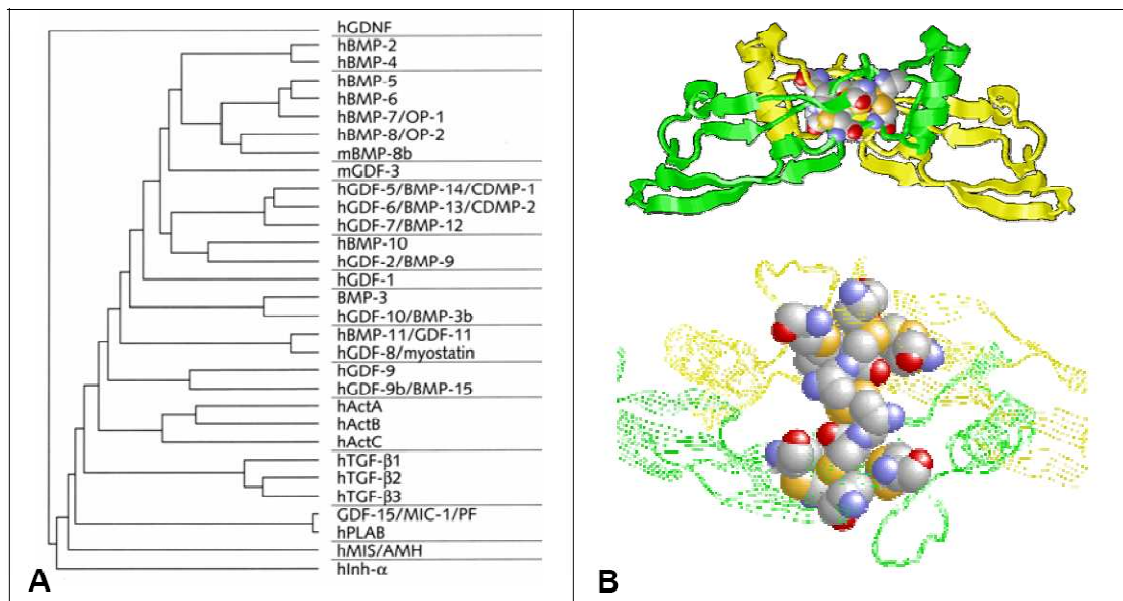


Abbildung 3: **A:** Die TGF- β Superfamilie; **B:** Molekulare Struktur der BMPs, Cysteine als Kugeln dargestellt: Cystein- Knoten

2.3.3 Signaltransduktion (Rezeptoren / Smads)

Die Signaltransduktion der Proteine der TGF- β -Superfamilie erfolgt durch Bindung an transmembranöse Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen, wobei zwei strukturell ähnliche, homodimere Rezeptorklassen unterschieden werden ^[2]. Nach bisherigem Stand sind 12 Typ-I-Rezeptoren und 7 Typ-II-Rezeptoren identifiziert ^[99].

Aufgrund unterschiedlicher Ligandenaffinität binden BMPs zuerst an den Typ-I-Rezeptor ^[30], TGF- β s dagegen an den Typ-II-Rezeptor ^[2,3,22,26,147]. Daraufhin erfolgt die Einbeziehung des jeweils anderen Rezeptors ^[2,3,22,26,30,147], es kommt zur Bildung eines aktivierten, heteromeren Komplexes aus Ligand, Typ-I- und Typ-II-Rezeptor mit Kinaseaktivität. Dieser phosphoryliert cytoplasmatische Signalmoleküle (Smads), welche mit einem Co-Smad heteromere Komplexe bilden, in den Nucleus eindringen und dort die Transkription steuern ^[75]. Die Weiterleitung des Signals vom Rezeptorkomplex über die Smads wird zusätzlich von inhibitorischen Smads reguliert.

Die Bezeichnung Smad wurde in Anlehnung an die Nomenklatur von zuerst bei *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* entdeckten Proteinen vergeben. Es werden drei Subklassen unterschieden ^[38,47,79]:

- signalübertragende **R-Smads** (“receptor regulated Smads”)
[Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8]
- **Co-Smads** (“common mediator Smads”)
[Smad4]
- inhibierende **I-Smads** (“inhibitory Smads”)
[Smad6, Smad7]

BMP-Rezeptoren des Typs I nutzen zur Signaltransduktion die R-Smads 1,5,8, wohingegen die TGF- β -Rezeptoren des Typs II auf die R-Smads 2,3 zurückgreifen ^[2,41,73].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsübersicht vorausgehende Studie

3.1.1. Herstellung von rhBMP-2 / T4

Die rekombinanten Morphogene wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Sebald, Lehrstuhl für physiologische Chemie II der Universität Würzburg, hergestellt ^[101]. Zur Produktion von rhBMP-2 (im Folgenden vereinfacht BMP-2) und T4 wurde das bakterielle Expressionssystem von *Escherichia coli* herangezogen ^[62,63,64].

Im Unterschied zu BMP-2 besitzt die Variante T4 am N-Terminus vier zusätzliche basische Tripletts (positive Ladung), wodurch die Bindung an die extrazelluläre Matrix (negative Ladung) gesteigert wird und im Zuge dessen auch die Ortsständigkeit am Implantationsort ^[82].

Die Lagerung der rekombinanten BMPs erfolgte bis zur Anwendung in gefriergetrocknetem, pulverförmigem Zustand in der Tiefkälteruhe bei -80°C .

3.1.2 Herstellung des „extrahierten xenogenen Knochenkollagens“ (EXKK)

Die standardisierten EXKK-Blöcke wurden durch ein nachfolgend beschriebenes Herstellungsverfahren aus equinem, spongiösem Knochen gewonnen ^[60,148]:

▪ **Aufbereitung und Zuschnitt der Spongiosa**

- Einfrieren der Femur-Kondylen bei -80°C , für ca. 24 h
- Zuschnitt entsprechend der gewünschten Masse mit der Knochensäge
- Auswahl von homogen strukturierten Spongiosa-Proben
- Auftauen in 50°C heißem Wasser (ca 10 Minuten)

- Entfernung des Marks mittels Zentrifuge und Wasserdampfstrahler
- **Entfettung**
 - Einlegen in Chloroform/Methanol (3:1), bei RT, für 24 Stunden, unter ständigem Agitieren, evtl. mehrmaliger Mediumswechsel
 - Waschen der Spongiosa-Scheiben in Aqua destillata und trocknen
- **Demineralisation und Formgebung**
 - Vollständige Demineralisation in 0,5M HCl, bei RT, mehrmalige Säurewechsel
 - Röntgenologische Kontrolle der Demineralisation: Kodak X-OMAT-MA Film, Faxitron Röntgengerät, bei U=25 kV, t= 35 s
 - Evtl. erneute Demineralisation in 0,5M
 - Waschen der Zylinder in Aqua destillata
 - Endgültige Formgebung
- **Extraktion löslicher induktiver Matrixproteine**
 - 4 M GuHCl/50mM Tris (pH=7,4 bei 4°C) über 24h
 - Waschen in Aqua destillata
 - Trocknen
- **Bleichen**
 - ca. 15 min., in 3%igem Wasserstoffperoxid
 - Waschen in Aqua destillata
- **Sterilisation**
 - Sterilisieren Chloroform/Methanol (1:1), bei RT, für 24 h
 - Evaporation unter der Sterilbank
 - mehrmaliges Spülen mit sterilem Aqua ad injectabilia
- **Lyophilisation**

3.1.3 Dotierung von EXKK mit BMP-2 / T4

Die Rehydrierung der EXKK-Blöcke erfolgte mit sterilem Aqua destillata für 15 Minuten, Überschüsse wurden mit sterilen OP-Tüchern entfernt. Im zweiten Schritt wurden die rekombinanten Morphogene in entsprechender Dosierung als wässrige Lösung auf die Implantate aufgebracht. Es wurde darauf geachtet, die EXKK-Blöcke gleichmäßig und ohne Flüssigkeitsaustritt zu benetzen. Abschließend erfolgte die Lyophilisierung, sterile Verpackung und Lagerung bei 4°C.

3.1.4 Übersicht Implantationsmodelle

Die direkte rechtsseitige Mandibularekonstruktion wurde mit Blöcken ($50 \times 25 \times 15 \text{ mm}^3 = 18,75 \text{ cm}^3$) aus extrahiertem, xenogenen Knochenkollagen (EXKK) durchgeführt, welche mit dem Morphogen BMP-2 bzw. dem BMP-Analog T4 dotiert waren.

4 Tiere wurden mit EXKK+T4 ($300 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) und 4 Tiere mit EXKK+BMP-2 ($400 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) rekonstruiert. In der Kontrollgruppe wurde ausschließlich autologer Knochen zur Rekonstruktion verwendet.

| Anzahl | Implantat | Morphogen |
|--------|-------------------|-----------|
| 4 | EXKK | T4 |
| 4 | EXKK | BMP2 |
| 1 | autologer Knochen | --- |

Tabelle 1: Rekonstruktionsmethode und Anzahl der implantierten Tiere

3.1.5 Übersicht Tiermodell

Als Versuchstiere dienten Göttinger Minischweine männlichen und weiblichen Geschlechts im Alter von 1 ½ bis 2 Jahren und einem Gewicht von 42,5 bis 63 kg. Im Hinblick auf die Unterkieferresektion wurden die Versuchstiere im Seitenzahnbereich zunächst vollständig entzahlt und die Ausheilung abgewartet.

Die Unterkiefer-Teilresektionen, die unter Mitnahme des Periosts durchgeführt wurden, wiesen eine Länge von 5 cm auf und wurden direkt mit osteoinduktiven Implantaten rekonstruiert. Nach 12 Wochen erfolgte die Euthanasie der Tiere.

3.1.6 Vorbereitung der Tiere

3.1.6.1 Narkose

Die Tiere wurden mit Stresnil® und bei Bedarf zusätzlich mit Ketavet® ansediert. Zur Narkose wurden die Tiere intubiert und eine Inhalationsnarkose mit Halothan® durchgeführt. Zur Schmerzausschaltung wurde Dipidolor i.v. nach Bedarf dosiert gegeben.

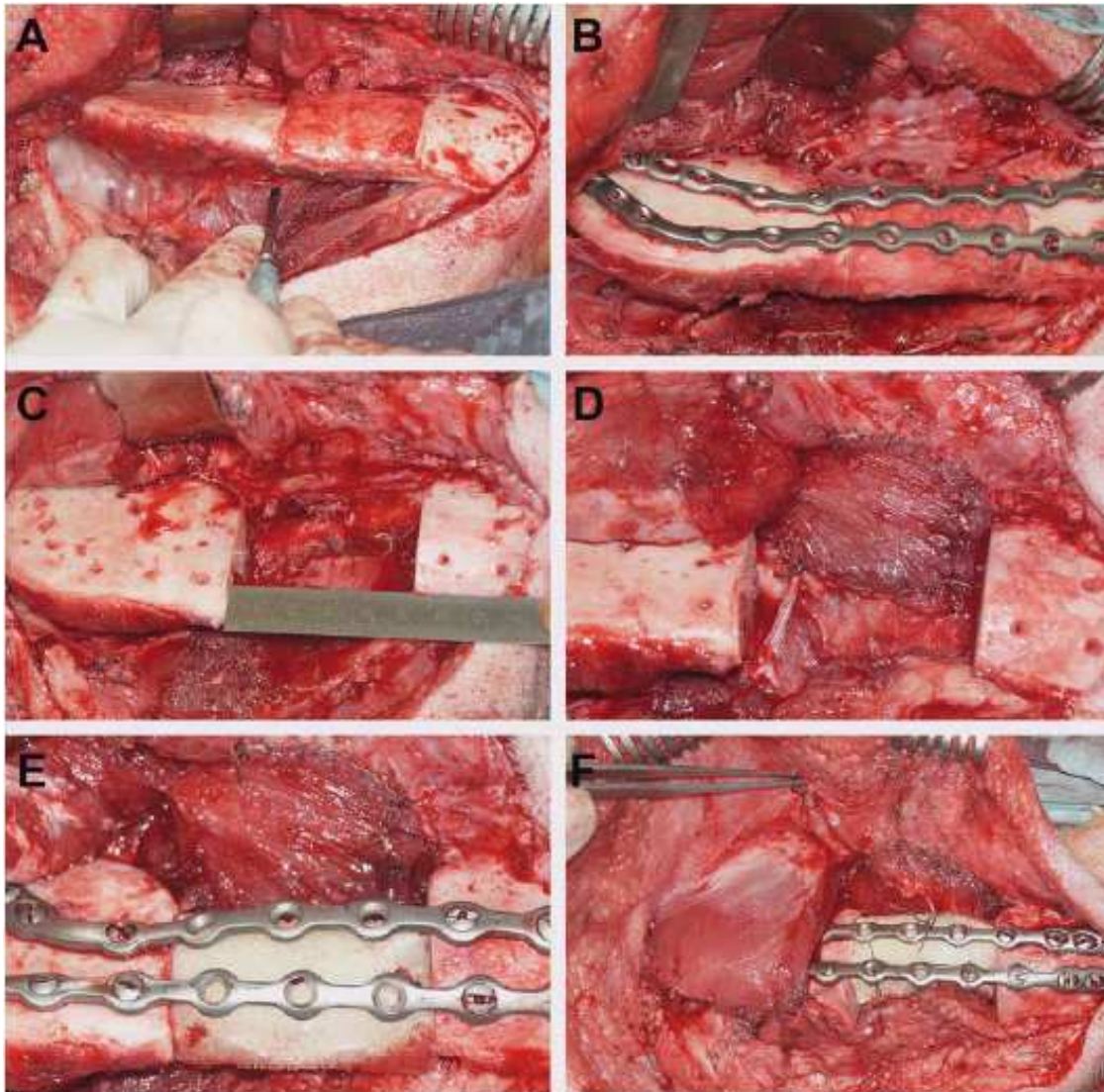
3.1.6.2 Vorbereitende Zahnextraktion

Mindestens acht Wochen vor der Rekonstruktion wurden die Schweine in Narkose auf der geplanten Resektionsseite im Seitenzahnbereich vollständig entzahlt. Nach Glättung der Knochenkanten wurde ein Kollagen-Vlies (4 x 7cm) in den Defekt eingebracht und die Wunde mit Vicryl 3/0 primär speicheldicht verschlossen.

3.1.6.3 Unterkiefer-Teilresektion

Nach Lagerung und steriler Abwaschung (intra- und extraoral Braunol[®], extraoral zusätzlich Dibromol[®]) und Abdeckung wurden Kutis, Subkutis und Platysma scharf durchtrennt und das faziale Gefäß-Nervenbündel, Corpus mandibulae, Masseter-Pterygoid-Schlinge und M. mylohyoideus dargestellt. Nach Unterbindung der Facialgefäße wurden die Resektionsgrenzen eingezeichnet und das Periost in diesem Bereich umschnitten. Nach subperiostaler Ablösung von M. masseter, M. pterygoideus und M. mylohyoideus wurde der Unterkiefer zirkulär aus seinem Weichteillager gelöst. Zwei Rekonstruktionsplatten wurden der Unterkieferkontinuität angepasst, mit Schrauben vorfixiert und sämtliche Löcher vorgebohrt. Nach Entfernung der Platten wurde das markierte Segment (l = 5 cm) mit dem bedeckenden Periost reseziert. Zur Vermeidung von Perforationen nach intraoral wurde ein schmaler Streifen Periost im Bereich der ehemaligen Extraktionswunde belassen. Um einen sicheren speicheldichten Abschluss zur Mundhöhle zu gewährleisten, wurde ein cranial gestielter Muskellappen aus dem anterioren Anteil des M. masseter gebildet und zur Unterfütterung der Schleimhaut des ehemaligen Alveolarkammes nach ventral verlagert und mit Vicryl 2/0 eingenäht.

Nach Blutstillung wurden die Knochenkanten geglättet und die Rekonstruktionsplatten refixiert. Das Implantat wurde in den Defekt eingelagert und mit Vicryl-Nähten gesichert. Die Masseter-Pterygoid-Schlinge wurde refixiert und die Wunde schichtweise mit Vicryl 2/0 und Hautklammern verschlossen und mit einem Sprühverband abgedeckt.



| | | | |
|----------|---|----------|--|
| A | Ablösung der Muskulatur vom Unterkiefer, Periost im Resektionsbereich belassen | B | Anpassung der Rekonstruktionsplatten |
| C | Z.n. Ostektomie des Unterkiefersegmentes einschließlich des bedeckenden Periostes | D | Muskelplastik mit dem ventralen Anteil des M. masseter zur sicheren Abdeckung nach intraoral |
| E | Eingelagertes Implantat | F | Rekonstruktion der Masseter-Pterygoidschlinge und Refixation der Mundbodenmuskulatur |

Abbildung 4: Unterkiefer-Teilresektion

3.1.6.4 Tierhaltung und Schmerzmanagement

Die Schweine wurden im Tierhaus der Würzburger Universitätsklinik in mit Stroh ausgestreuten Stallungen gehalten und einmal täglich mit Altromin Standard-Diät 9020[®] gefüttert. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Die postoperative Analgesie erfolgte mit Tramal[®] (Tramadolhydrochlorid) und Novalgin[®] (Metamizol):

- Tag 0-3: Zweimal täglich jeweils eine Ampulle Tramal[®] (2ml/100 mg) und Novalgin[®] (2,5ml / 1,25 g) subkutan
- Tag 4-7: Zweimal täglich Tramal long[®] (1 Tbl./100mg Tramadolhydrochlorid) und 20 Tropfen Novalgin[®] im Futter

Nach Eingriffen am Kiefer erhielten die Tiere wegen eingeschränkten Kauvermögens jeweils sieben Tage lang zweimal täglich Fresubin[®], dann für weitere sieben Tage in Wasser eingeweichte Pellets (Altromin Standard-Diät 9020[®]).

3.1.6.5 Euthanasie der Tiere

Nach 12 Wochen wurden die Tiere mit hohen Dosen von Stresnil[®] und Ketavet[®] sediert und durch intrakardiale Injektion von T61[®] geopfert.

3.2 Biomechanische Grundlagen

3.2.1 Elastische / Plastische Verformung

Die elastische Verformung ist vollständig reversibel, d.h. nach Wegfall der einwirkenden Kraft nimmt der Knochen wieder seine ursprüngliche Form an. Im Gegensatz dazu tritt bei der plastischen Verformung eine bleibende, irreversible Deformation auf.

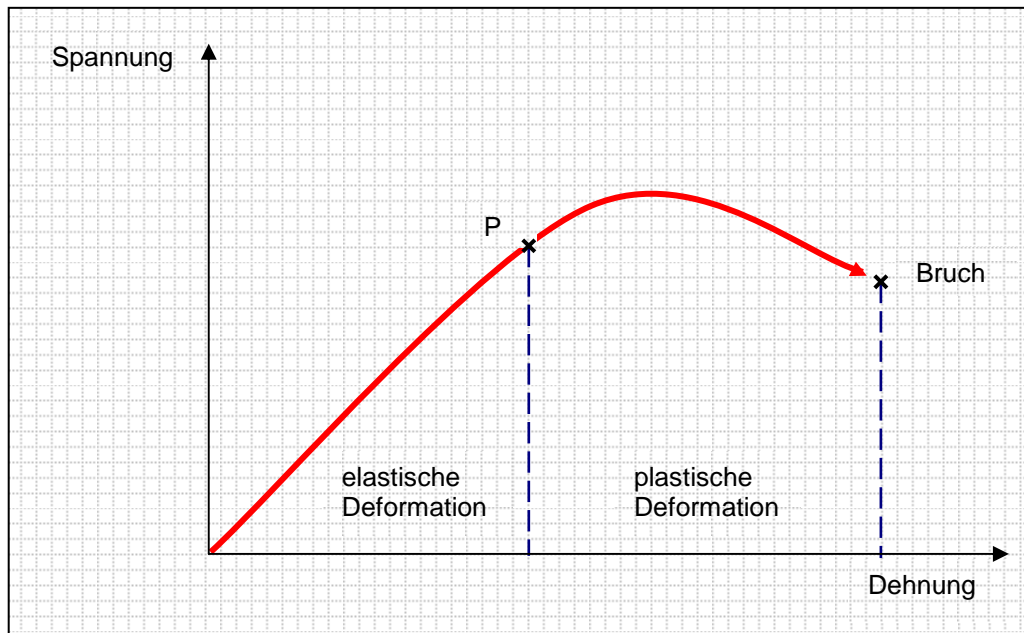
3.2.2 Hookesches Gesetz (*Robert Hooke, 1635-1703*)

Knochengewebe ist elastisch und darüber hinaus, bis zur Fraktur, plastisch verformbar. Für den elastischen Bereich gilt das Hookesche Gesetz:

$$\sigma = E \times \varepsilon$$

mit: σ = Spannung
 E = Elastizitätsmodul
 ε = Dehnung

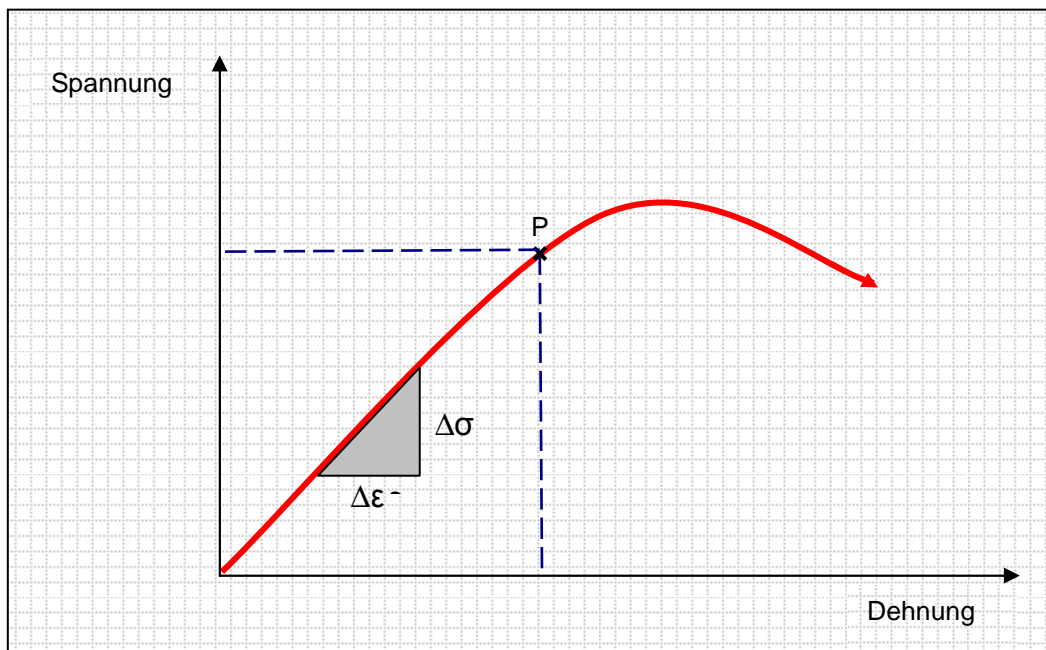
Nach dem Hookeschen Gesetz ist die Spannung bis zur Grenze P proportional zur Dehnung. Diese sogenannte Proportionalitätsgrenze P markiert das Ende des linear-elastischen Bereichs, über diese Spannung hinaus besteht keine Proportionalität mehr zwischen Spannung und Dehnung, es kommt zur plastischen (nichtlinear-elastischen) Deformation und im weiteren Verlauf zur Fraktur ^[15].



Graphik 1: Elastische / Plastische Deformation

3.2.3 Elastizitätsmodul E

Die Steigung der Strecke im linear-elastischen Bereich zwischen Null und P ist der Elastizitätsmodul E. ^[19]



Graphik 2: Elastizitätsmodul E

Der E-Modul wird berechnet aus $\Delta\sigma/\Delta\varepsilon$ und ist ein Maß für die Steifigkeit des Werkstoffs.

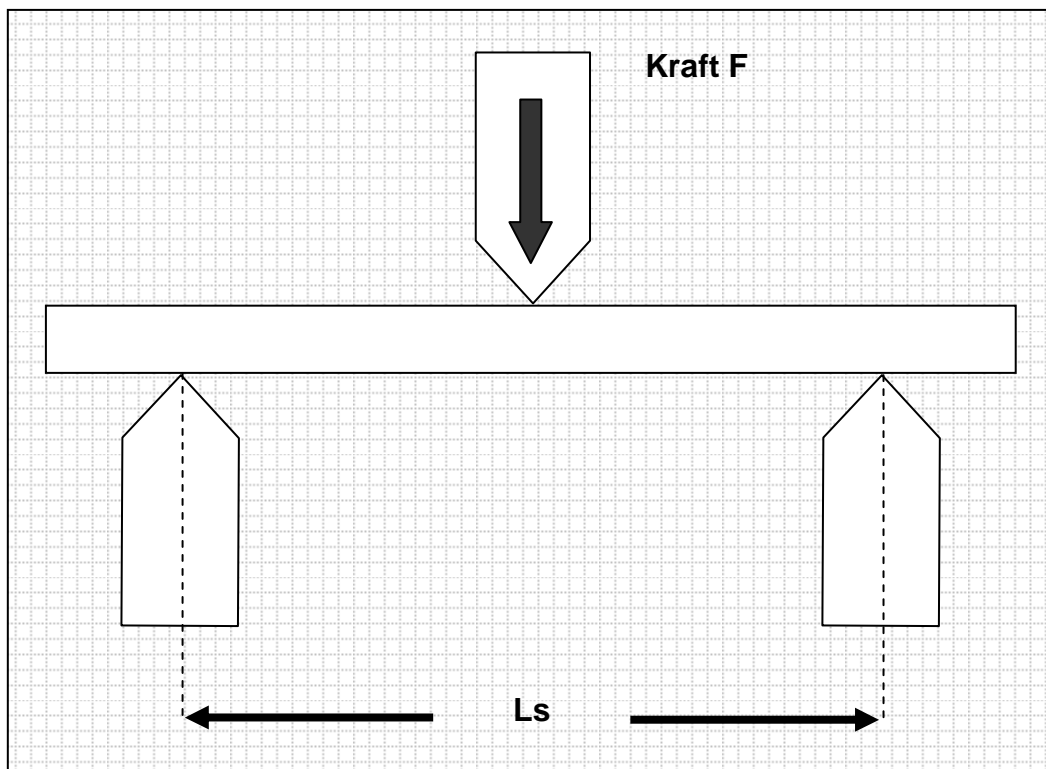
3.2.4 Drei-Punkt-Biegeversuch

Für die Versuchsanordnung und den Verlauf des Biegemomentes beim Drei-Punkt-Biegeversuch gilt folgende Beziehung: ^[7]

$$M_{b,max} = \frac{F_{max} \times L_s}{4}$$

mit:

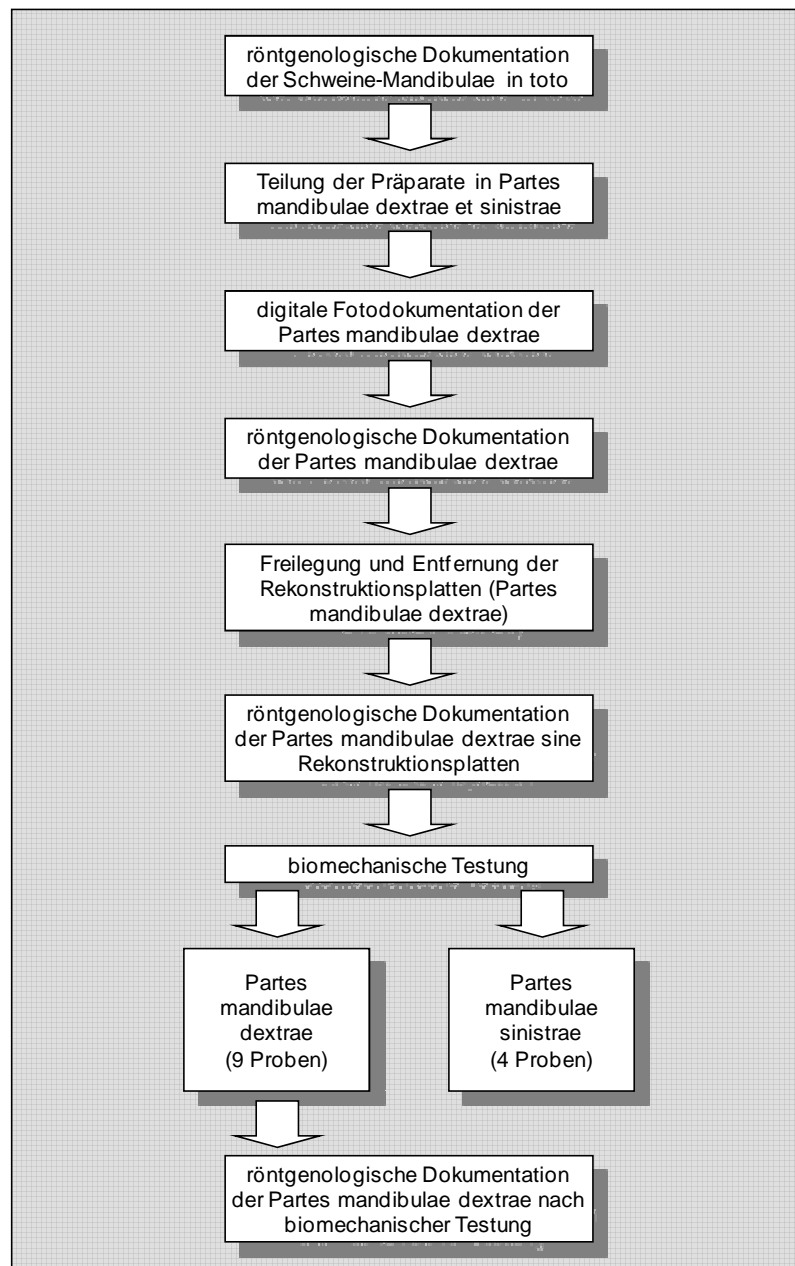
- $M_{b,max}$ = maximaler Biegemoment
- F_{max} = einwirkende Kraft durch Prüfstempel
- L_s = Abstand zwischen den Auflagepunkten



Graphik 3: Versuchsanordnung Drei-Punkt-Biegeversuch

3.3 Versuchsdurchführung - aktuelle Studie

Im weiteren Verlauf werden exemplarisch die Röntgenbilder und Digitalfotos von drei Schweine-Mandibulae dargestellt, jeweils rekonstruiert mit EXKK+T4, EXKK+BMP-2 und autologem Knochen. Der Flow-Chart in Graphik 4 gibt einen Überblick über den gesamten Versuchsablauf.



Graphik 4: Übersicht Versuchsablauf (Flow-Chart)

3.3.1 Vorbereitung der Unterkiefer

3.3.1.1 Mandibulae in toto (Übersicht cranial-caudal)



Abbildung 5: Röntgenübersicht cranial-caudal (EXKK+T4)

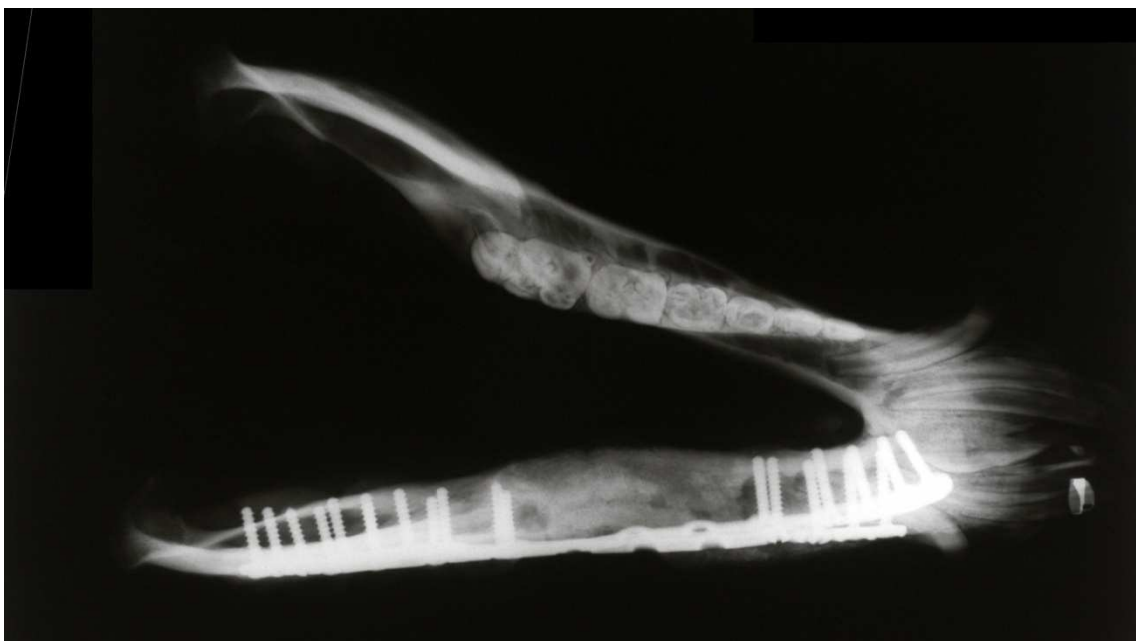


Abbildung 6: Röntgenübersicht cranial-caudal (EXKK+BMP-2)



Abbildung 7: Röntgenübersicht cranial-caudal (autologer Knochen)

3.3.1.2 Vorbereitung der Präparate

Die Schweine-Mandibulae wurden im Rahmen der Versuchsvorbereitung mittels Knochensäge in eine Pars dextra et sinistra geteilt.

3.3.1.3 Partes mandibulae dextrae verplattet (lateral / cranial-caudal)



Abbildung 8: Verplattet - laterale Ansicht (EXKK+T4)



Abbildung 9: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)



Abbildung 10: Verplattet - laterale Ansicht (EXKK+BMP-2)

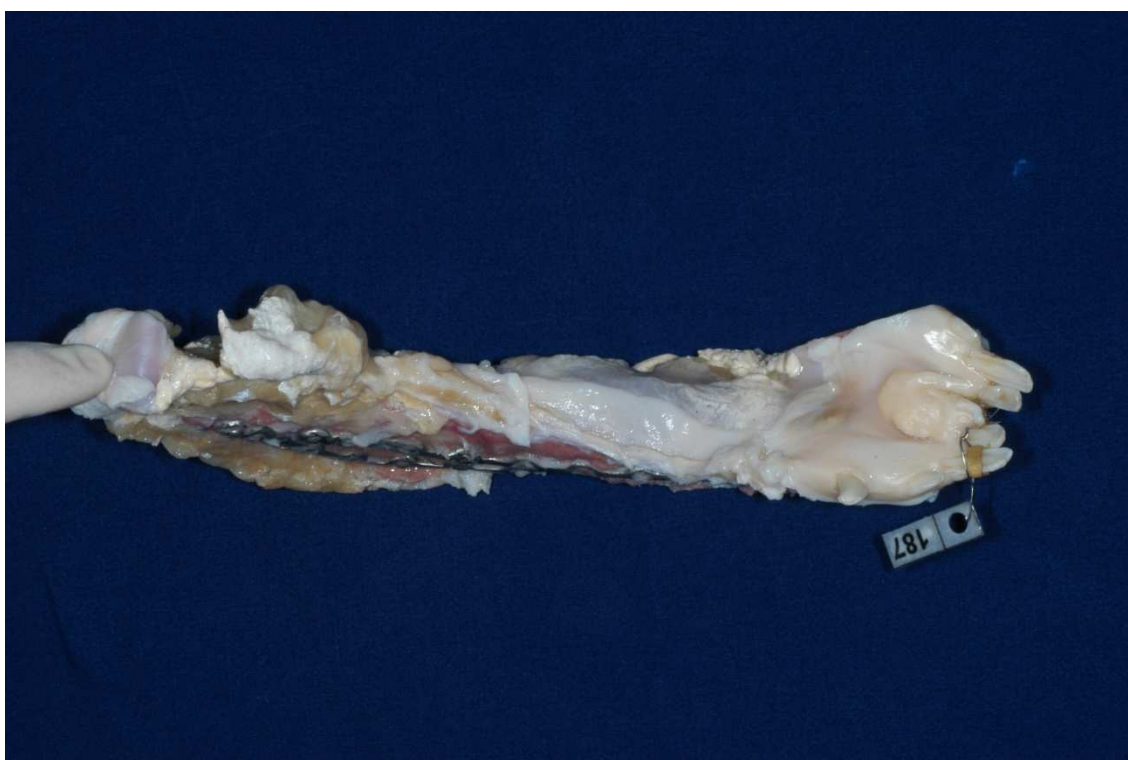


Abbildung 11: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (EXKK+BMP-2)



Abbildung 12: Verplattet - laterale Ansicht (autologer Knochen)



Abbildung 13: Verplattet - cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)

3.3.1.4 Partes mandibulae dextrae verplattet (lateral)

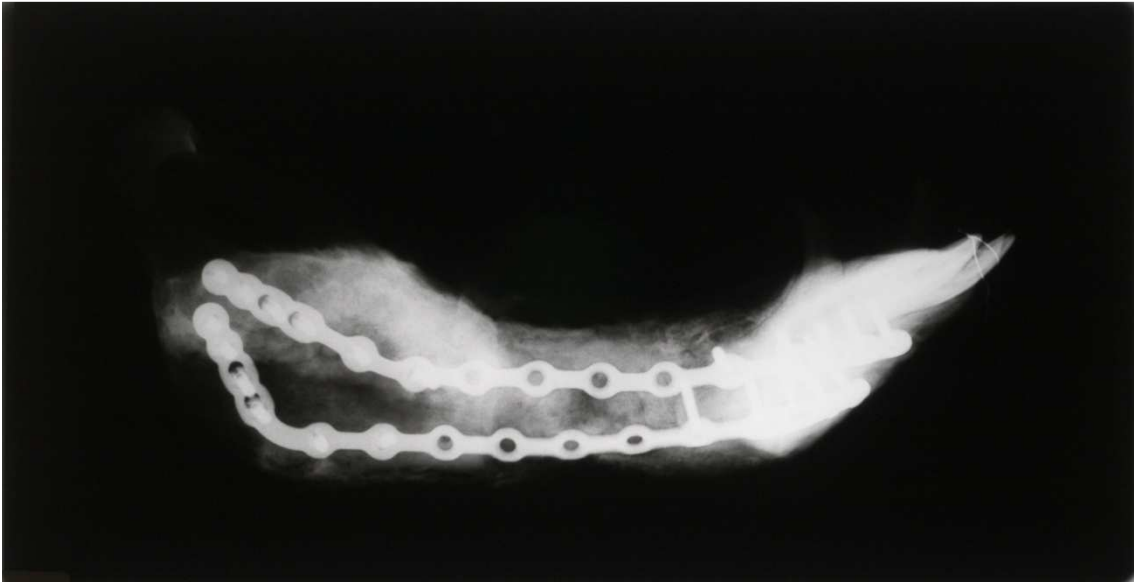


Abbildung 14: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (EXKK+T4)

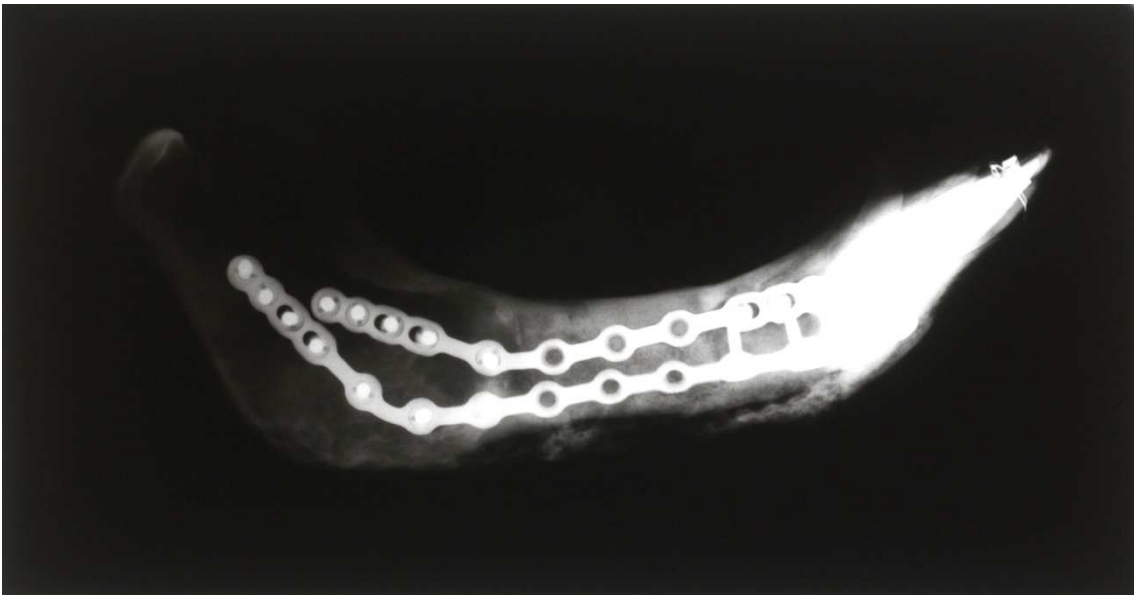


Abbildung 15: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (EXKK+BMP-2)

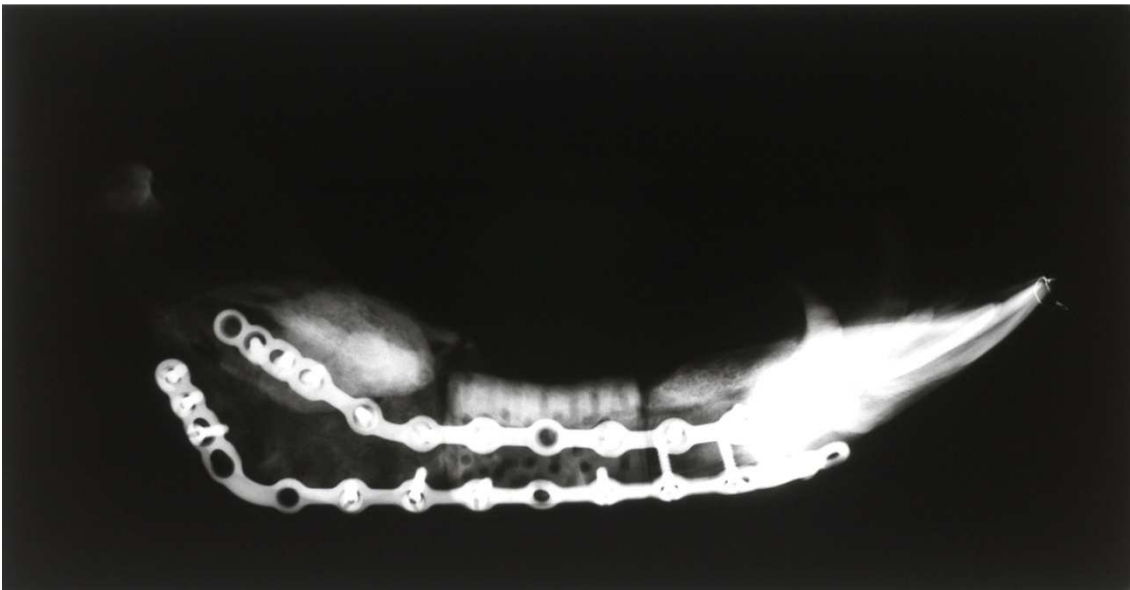


Abbildung 16: Röntgenbild verplattet - laterale Ansicht (autologer Knochen)

Das autologe Transplantat wurde intraoperativ an der Kortikalis perforiert, um eine im Einheilungsprozess bessere Durchbauung zu erreichen.

Die röntgenologische Auswertung zeigt deutlich die Lockerung der Osteosynthese-Schrauben und Platten. Im Bereich des Transplantates ist es zu keiner knöchernen Konsolidierung gekommen.

3.3.1.5 Freilegung und Entfernung der Rekonstruktionsplatten

Die Freilegung der Rekonstruktionsplatten und Schrauben erfolgte mit Hilfe von Rosenbohrern verschiedener Größe unter größtmöglicher Schonung des Knochens. Zur darauffolgenden Entfernung der Schrauben und Rekonstruktionsplatten wurden passende Schraubendreher sowie Raspatorium und Spitzzange verwendet.

3.3.1.6 Partes mandibulae dextrae nach Plattenentfernung (lateral / cranial-caudal)

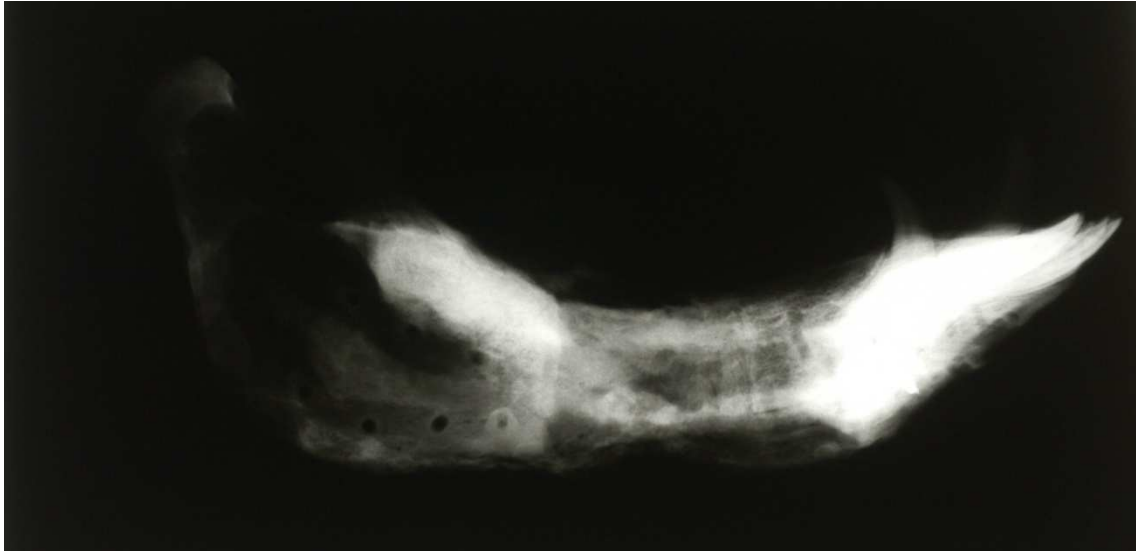


Abbildung 17: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (EXKK+T4)



Abbildung 18: Röntgenbild nach Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)

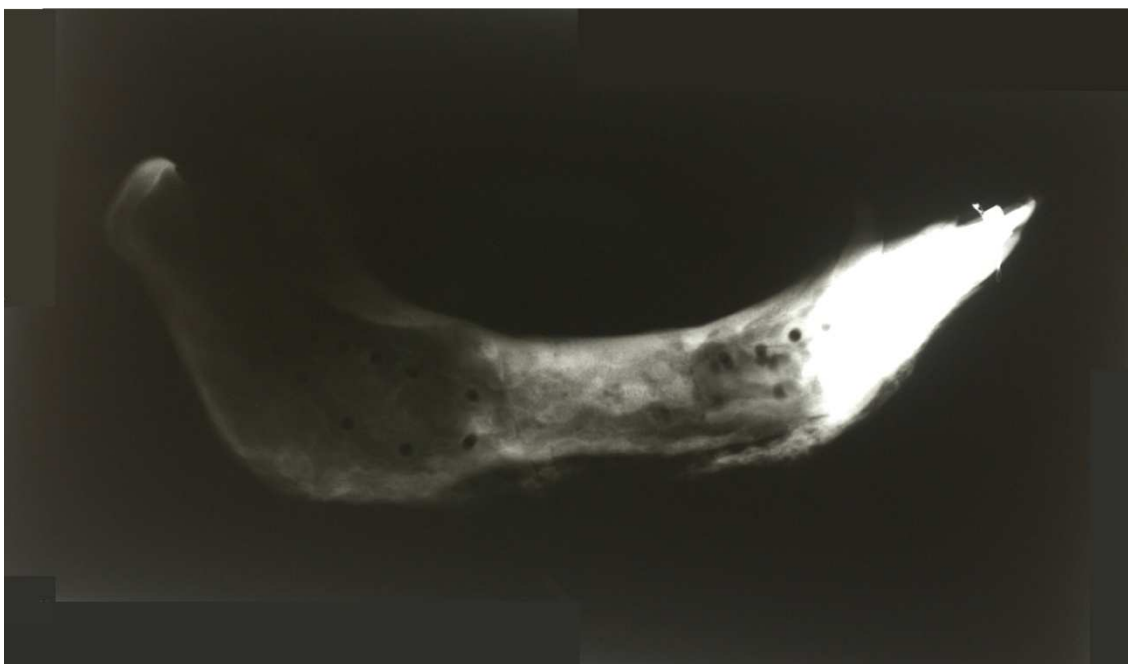


Abbildung 19: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (EXKK+BMP-2)



Abbildung 20: Röntgenbild nach Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (EXKK+BMP-2)

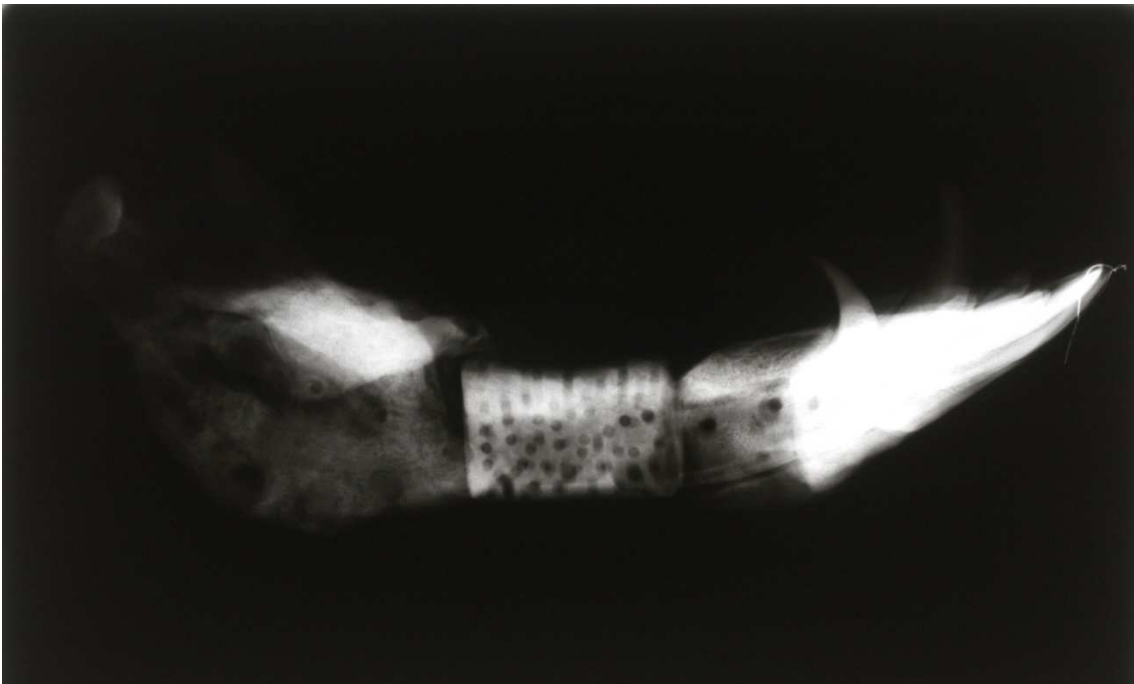


Abbildung 21: Röntgenbild nach Plattenentfernung - laterale Ansicht (autologer Knochen)



Abbildung 22: Röntgenbild nach Plattenentfernung – cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)

3.3.2 Biomechanische Testung

Nach Entfernung des Osteosynthese-Materials wurden die Elastizitätsmodule der explantierten Partes mandibulae im Drei-Punkt-Biegeversuch mit der Universalprüfmaschine der Firma Zwick aus Ulm (Gerätetyp 1445) ermittelt.

Die für die biomechanische Testung erforderliche Fixation der Proben (Partes dextrae) auf der Prüfmaschine erfolgte mit Hilfe handelsüblicher großer Schraubzwingen. Der Abstand zwischen den Auflagepins betrug 10 cm. Im Prüfraum herrschte eine relative Luftfeuchtigkeit von 58% und eine Raumtemperatur von 20°C. Für die Prüfmaschinen-Parameter wurde eine Vorkraft von 10 N, eine Prüfgeschwindigkeit von 10 mm pro Minute und eine Bruchabschaltswelle von 40 % der Maximalkraft festgesetzt.

Als Ansatz für die einwirkende Kraft des Prüfstempels wurde die Regio der Rekonstruktion gewählt. Die Biegung der Unterkiefer erfolgte in cranio-caudaler Richtung, wobei die craniale Fläche der Druck- und die caudale Fläche der Zugspannung ausgesetzt war. Für vergleichsrelevante Daten wurden vier nicht-rekonstruierte Partes sinistrae ebenfalls der Messung unterzogen.



Abbildung 23: Versuchsaufbau Universalprüfmaschine Zwick

3.4 Auswertung

3.4.1 Röntgenverlaufskontrolle

Zur Verlaufsdocumentation des gesamten Versuches wurden alle neun Schweine-Mandibulae in toto, jede Pars dextra vor Entfernung der Platten, nach Entfernung der Platten und nach biomechanischer Testung geröntgt. Die Belichtungszeit betrug 5 mAs bei einer Spannung von 47 kV und einem Fokus-Objekt-Abstand von ca. 1m.

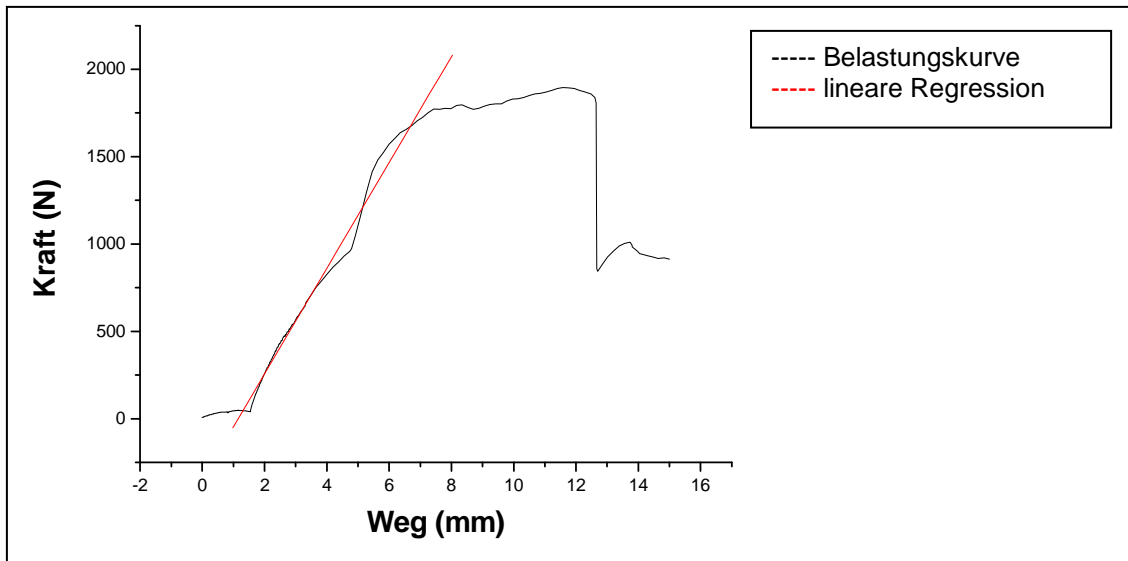
3.4.2 Fotodokumentation

Die digitale Fotodokumentation der neun Partes mandibulae dextrae umfasste die Situation vor Plattenentfernung und die Versuchsdurchführung an der Universalprüfmaschine Zwick. Die Fotos wurden mit der Kamera NIKON D 100 durch die Fotoabteilung der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Universität Würzburg geschossen.

3.4.3 Statistik der biomechanischen Auswertung

Zur Auswertung der Daten des Drei-Punkt-Biegeversuchs wurde die Software Origin[®] 7.0 (Firma OriginLab Corporation) und das Programm Excel[®] (Firma Microsoft) verwendet. Es wurden für den linear-elastischen Kurvenbereich Regressionsdiagramme der Schweineunterkiefer erstellt, aus welchen sich über die Steigung die Elastizitätsmodule errechneten. Die ermittelten Elastizitätsmodule wurden in Excel-Diagramme implementiert und in Korrelation zueinander gesetzt.

Das Regressionsdiagramm für einen rekonstruierten Kiefer wird in Graphik 5 exemplarisch dargestellt.



Graphik 5: Beispiel Regressionsdiagramm

4 Ergebnisse

4.1 Radiologische Beurteilung

4.1.1 Röntgenologische Dokumentation nach Fraktur (lateral / cranial-caudal)

Die Röntgenbilder (Abbildung 23-28) zeigen den Frakturverlauf. Die Bruchlinien sind durchgehend. In Abbildung 23 erkennt man caudal an der Frakturlinie die Bildung eines Biegekeils, der oft bei Biegebrüchen beobachtet werden kann. Bei dem mit autologem Knochen rekonstruierten Präparat löste sich im Zuge der biomechanischen Testung das Rekonstruktionsmaterial vollständig aus dem nur bindegewebigen Verbund, so daß es auf den Abbildungen 27 und 28 fehlt.

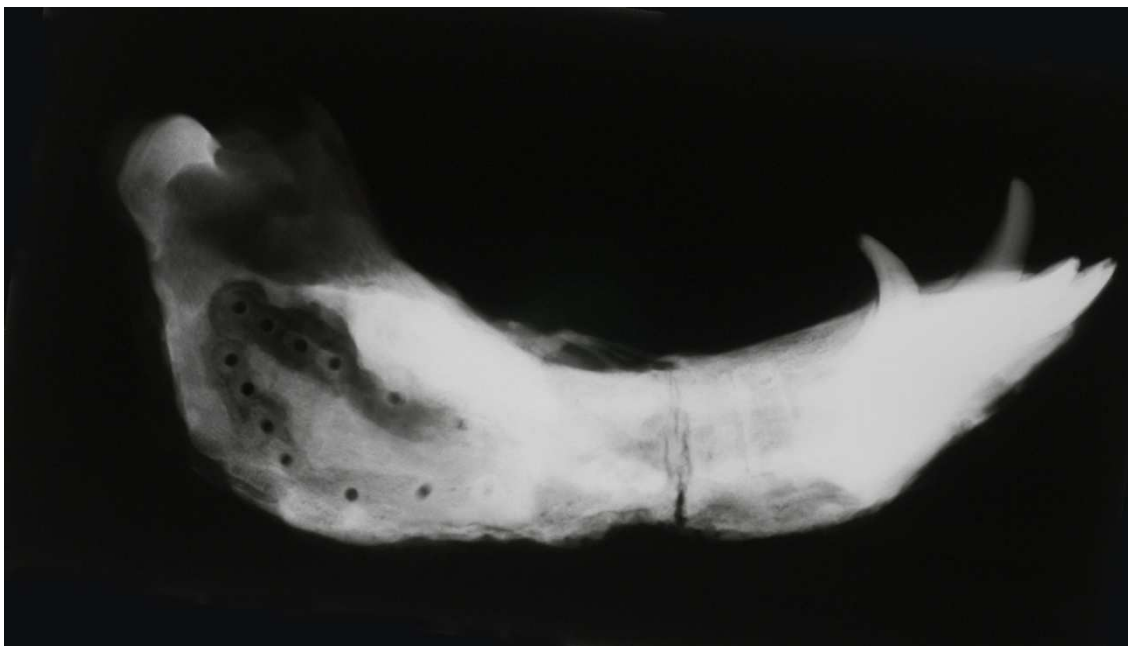


Abbildung 24: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (EXKK+T4)

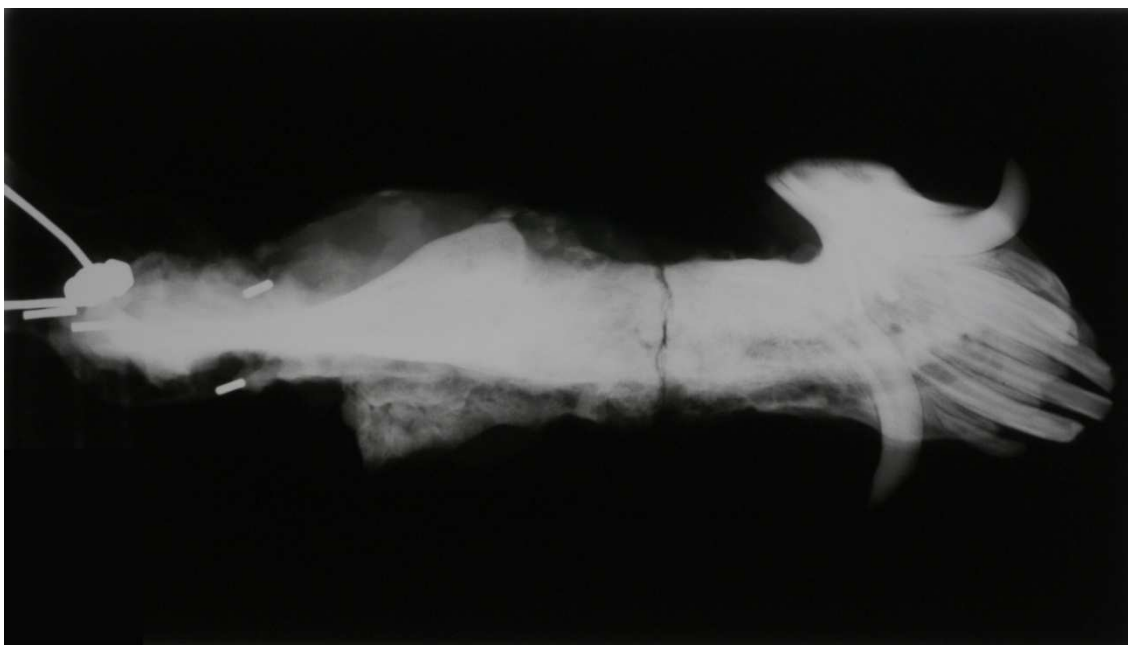


Abbildung 25: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (EXKK+T4)

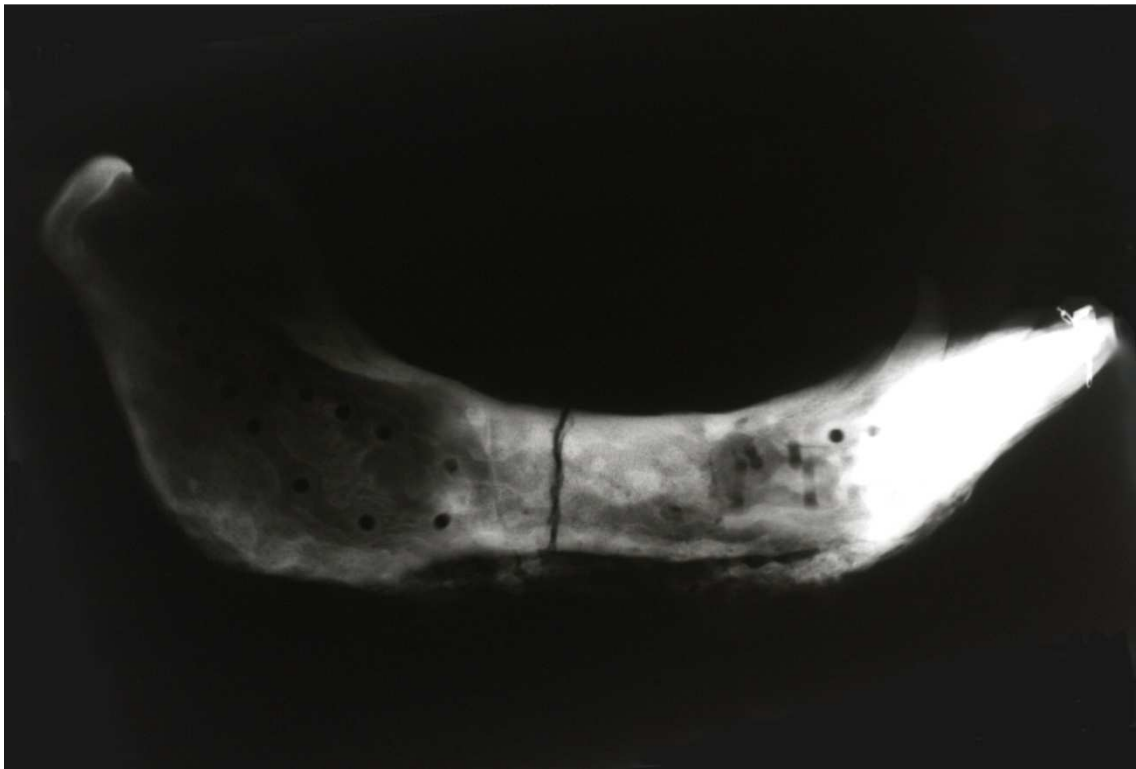


Abbildung 26: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (EXKK+BMP-2)

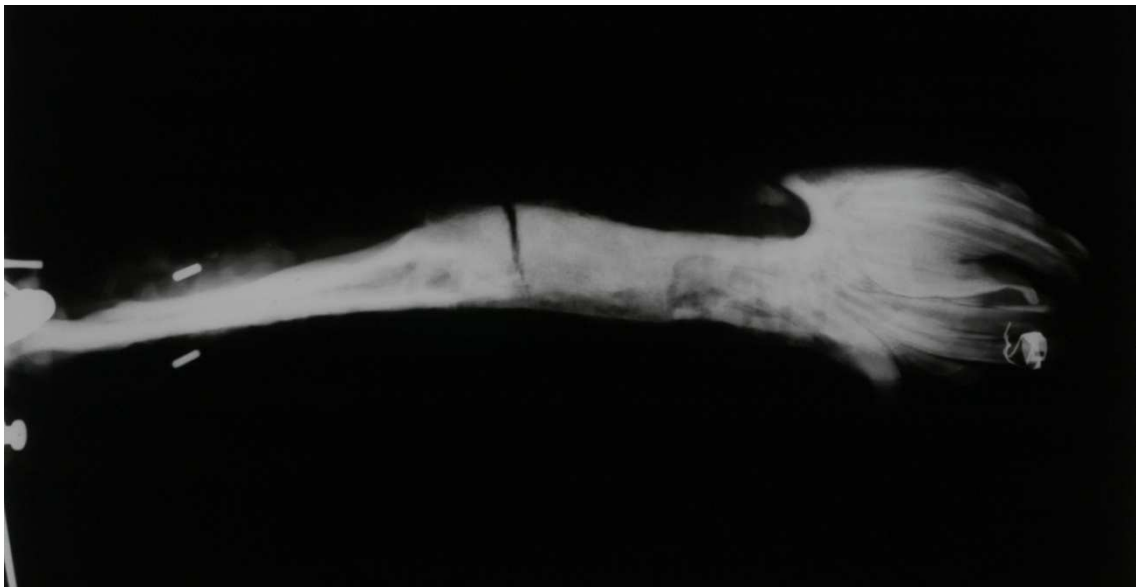


Abbildung 27: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (EXKK+BMP-2)



Abbildung 28: Fraktur-Röntgenbild – laterale Ansicht (autologer Knochen)

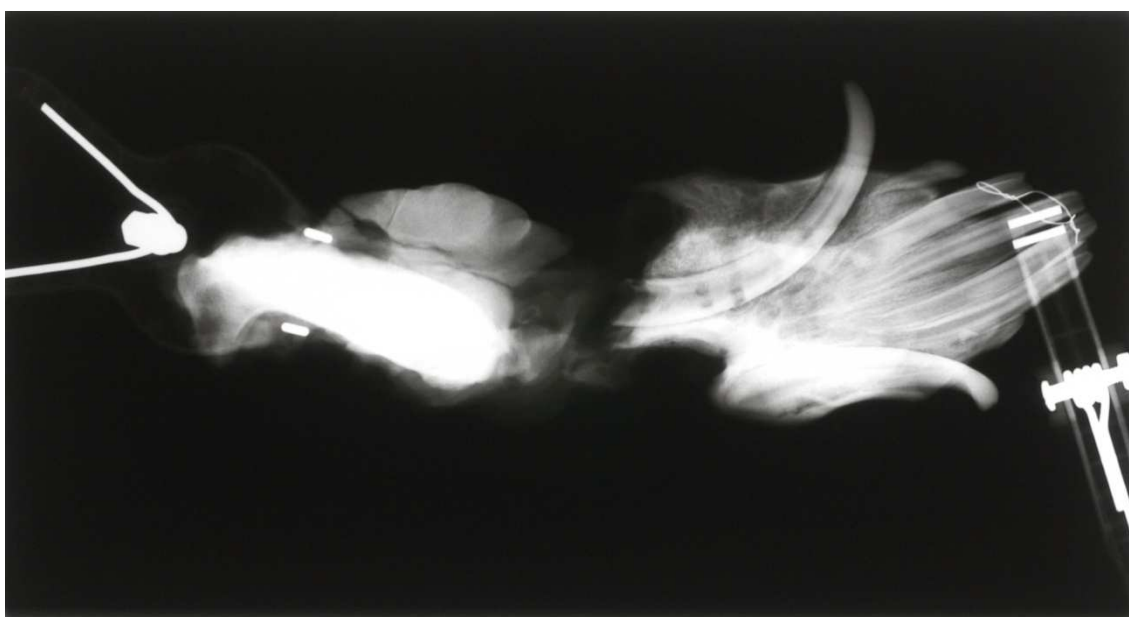


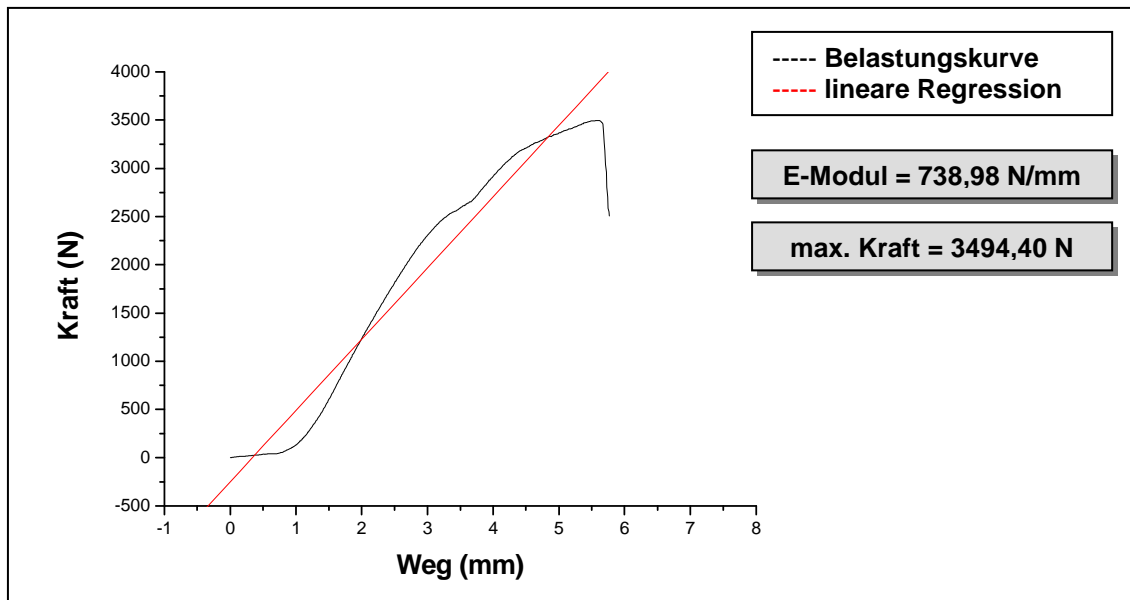
Abbildung 29: Fraktur-Röntgenbild – cranial-caudale Ansicht (autologer Knochen)

4.2 Biomechanik

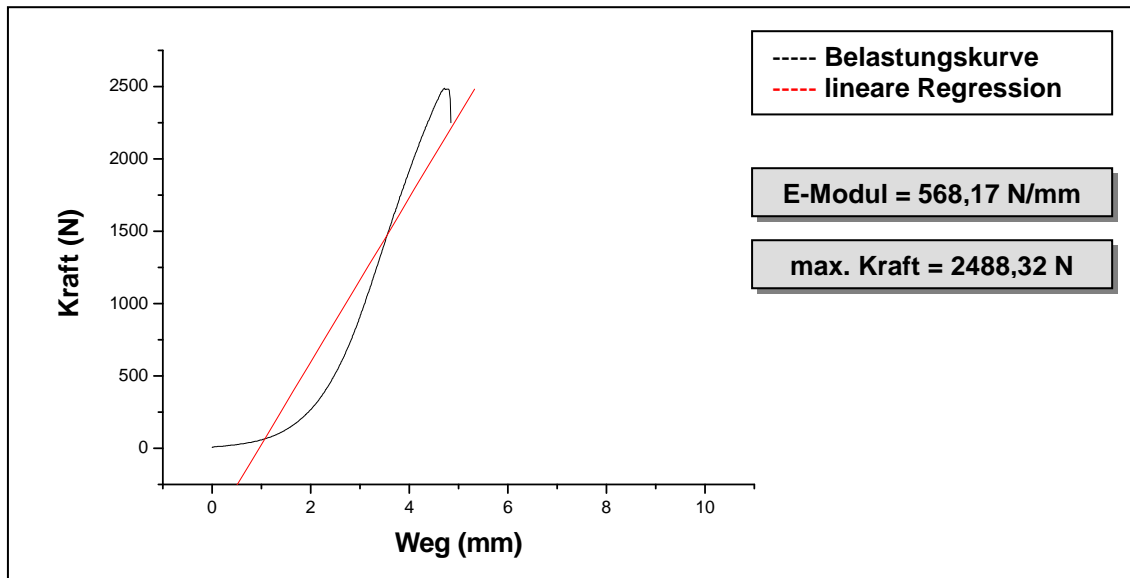
4.2.1 Regressionsdiagramme der getesteten Kiefer

Die Graphiken 6-9 zeigen exemplarisch die Regressionsdiagramme der Kiefer (EXKK+T4, EXKK+BMP-2, autologer Knochen, Kontrolle), die daraus errechneten E-Moduln und die im Versuch maximal tolerierten Kräfte.

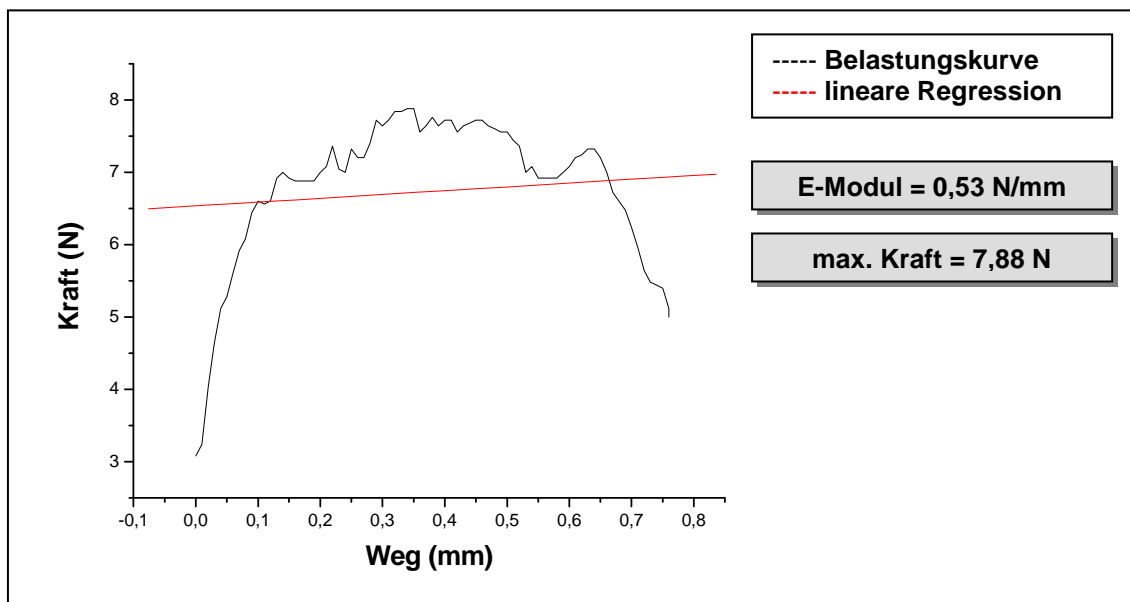
Die Geraden der linearen Regression stellen sich steil dar. Die Ausnahme bildet das autologe Transplantat, bei dem die Steigung nahezu horizontal verläuft.



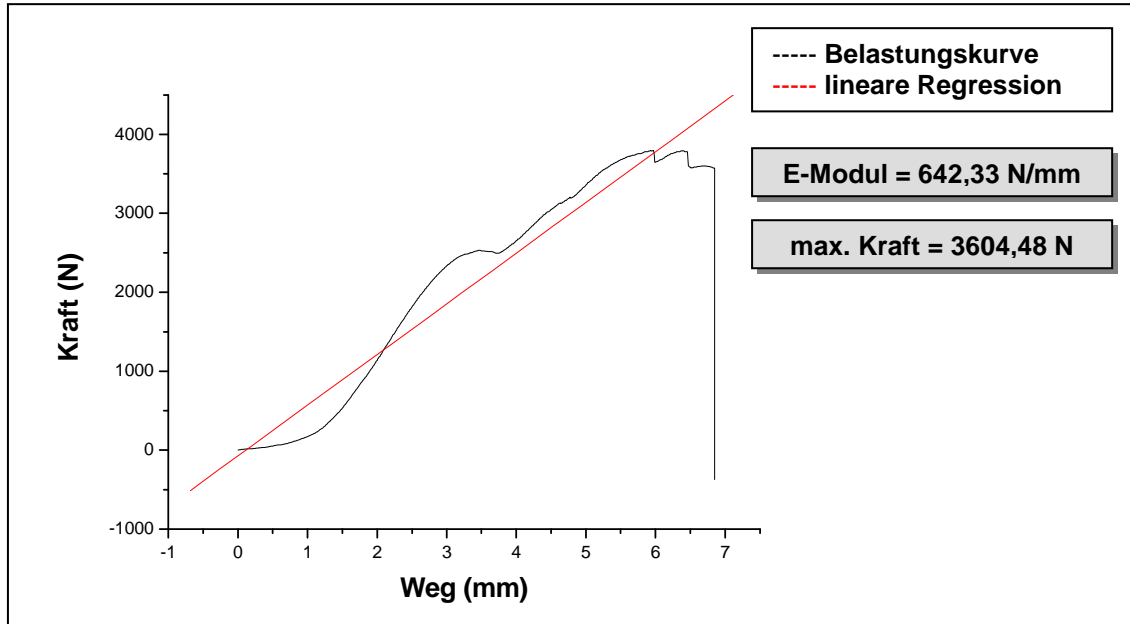
Graphik 6: Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit EXKK+T4



Graphik 7: Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit EXKK+BMP-2



Graphik 8: Regressionsdiagramm für Rekonstruktion mit autologem Knochen



Graphik 9: Regressionsdiagramm für Kontrollkiefer

4.3 Zusammenfassung der biomechanischen Ergebnisse

4.3.1 Übersicht Kiefer gesamt

Die Tabelle 2 umfaßt die Rekonstruktionsmethode, den E-Modul und die maximal tolerierte Kraft vor Fraktur. Die ebenfalls biomechanisch getesteten Kontrollkiefer (Partes mandibulae sinistrae) liefern die vergleichsrelevanten Daten.

Alle mit EXKK+T4 und EXKK+BMP2 wiederhergestellten Kiefer weisen E-Moduln zwischen 209,8 N/mm und 738,98 N/mm auf. Im Vergleich dazu liegen die E-Moduln der intakten, nicht rekonstruierten Kontrollkiefer zwischen 569,16 N/mm und 739,48 N/mm. Auffallend ist ein nahezu nicht meßbarer E-Modul von 0,53 N/mm des mit autologem Knochen rekonstruierten Kiefers.

Bei der maximal tolerierten Kraft erreichen die mit EXKK+T4 und EXKK+BMP2 rekonstruierten Kiefer Werte zwischen 1282,56 N und 3494,40 N. Die Kontrollkiefer liegen zwischen 3348,54 N und 3892,12 N. Die autologe Rekonstruktion liefert mit 7,88 N den niedrigsten Wert.

| Anzahl | Rekonstruktion mit: | E-Modul (N/mm) | max. Kraft (N) |
|--------|---------------------|----------------|----------------|
| 4 | T4 | 302,99 | 1895,68 |
| | T4 | 212,56 | 2056,36 |
| | T4 | 474,24 | 2489,60 |
| | T4 | 738,98 | 3494,40 |
| 4 | BMP2 | 448,67 | 2001,92 |
| | BMP2 | 209,80 | 1282,56 |
| | BMP2 | 568,17 | 2488,32 |
| | BMP2 | 210,16 | 2268,16 |
| 1 | autologem Knochen | 0,53 | 7,88 |
| 4 | Kontrollkiefer | 642,33 | 3604,48 |
| | Kontrollkiefer | 739,48 | 3892,12 |
| | Kontrollkiefer | 569,16 | 3348,54 |
| | Kontrollkiefer | 645,92 | 3588,48 |

Tabelle 2: Überblick Rekonstruktionsmethoden, E-Moduln und max. Kräfte

4.3.2 Vergleich der maximal tolerierten Kräfte

Das Säulendiagramm in Tabelle 3 zeigt die maximal tolerierten Kräfte aller biomechanisch getesteten Kiefer im Vergleich. Die Säule des mit autologem Knochen rekonstruierten Kiefers wurde gesondert hervorgehoben, da ansonsten die Kraft in einem graphisch nicht darstellbaren Bereich gewesen wäre.

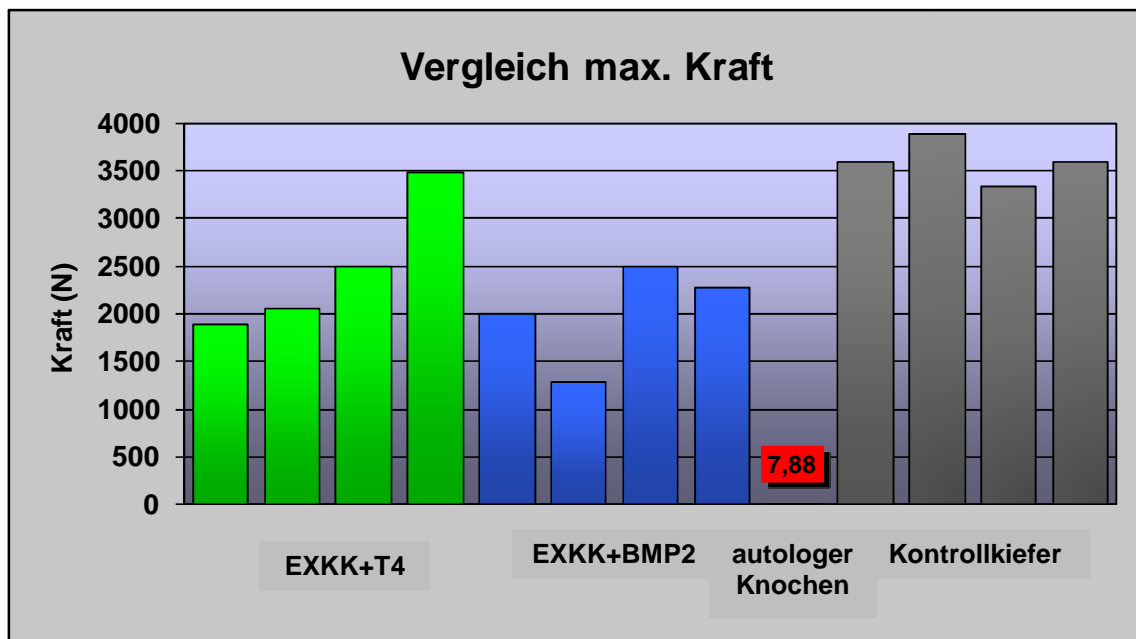


Tabelle 3: max.Kraft aller biomechanisch getesteten Kiefer

4.3.3 Durchschnitt der maximal tolerierten Kräfte

Die Tabelle 4 zeigt die Kraft-Mittelwerte der jeweils mit EXKK+T4 und EXKK+BMP2 rekonstruierten Gruppe in Gegenüberstellung zum ermittelten Durchschnittswert der Kontrollkiefer.

Der Mittelwert der EXKK+T4-Gruppe beträgt 2484,01 N, der Mittelwert der EXKK+BMP2-Gruppe liegt bei 2010,24 N. Im Vergleich dazu ergab die biomechanische Testung der Kontrollkiefer einen Durchschnittswert von 3608,41 N.

Die Daten des mit autologem Knochen rekonstruierten Kiefers (Kraft-Wert von 7,88 N) wurden nicht in die Tabelle implementiert.

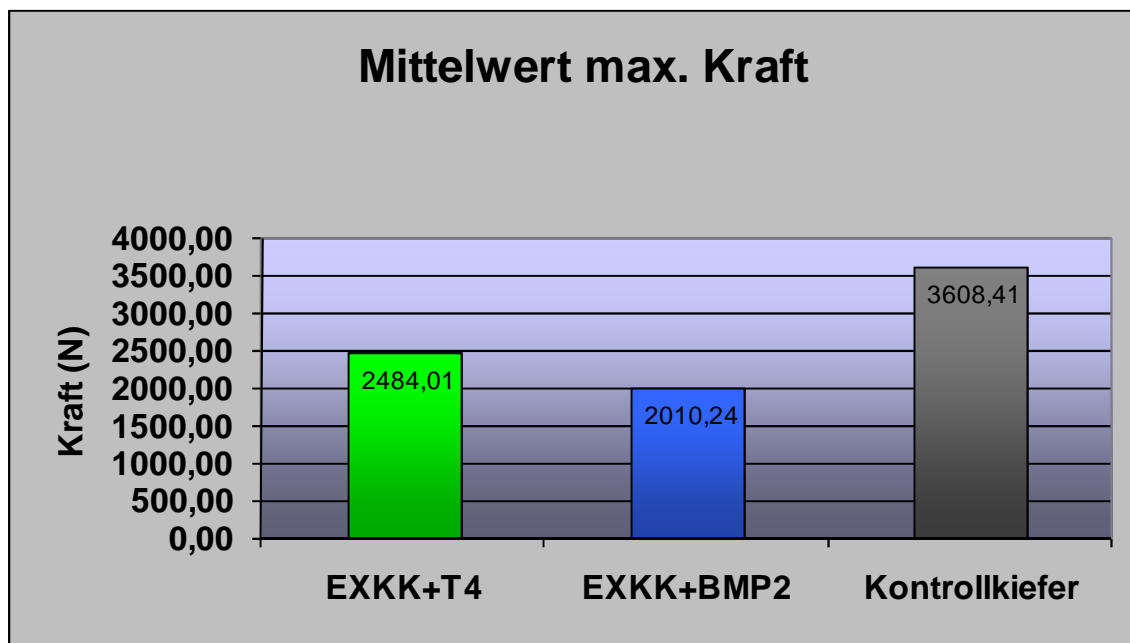


Tabelle 4: Darstellung der Mittelwerte (max. Kraft)

4.3.4 Vergleich der E-Moduln

Das Säulendiagramm in Tabelle 5 zeigt die E-Moduln aller biomechanisch getesteten Kiefer. Die Säule des mit autologem Knochen rekonstruierten Kiefers wurde gesondert hervorgehoben, da ansonsten der E-Modul in einem graphisch nicht darstellbaren Bereich gewesen wäre.

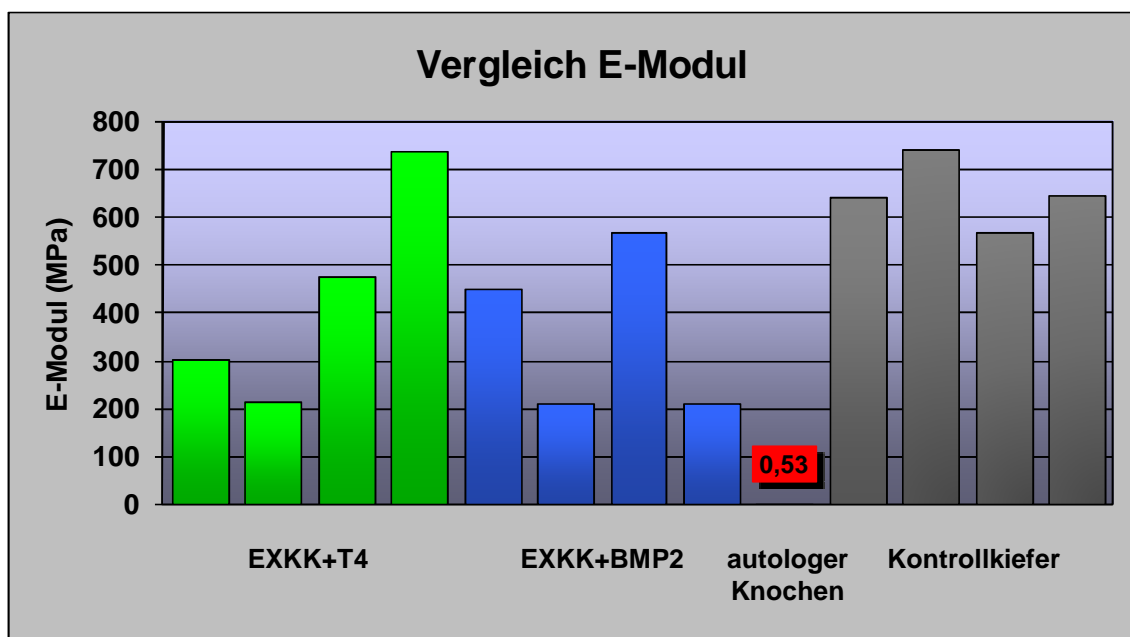


Tabelle 5: E-Moduln aller biomechanisch getesteten Kiefer

4.3.5 Durchschnitt der E-Moduln

Die Tabelle 6 zeigt die E-Moduln-Mittelwerte der jeweils mit EXKK+T4 und EXKK+BMP2 rekonstruierten Gruppe in Gegenüberstellung zum gemittelten E-Modul der Kontrollkiefer.

Der Mittelwert der EXKK+T4-Gruppe beträgt 432,19 N/mm, der Mittelwert der EXKK+BMP2-Gruppe liegt bei 359,20 N/mm. Im Vergleich dazu ergab die biomechanische Testung der Kontrollkiefer einen Durchschnittswert von 649,22 N/mm.

Die Daten des mit autologem Knochen rekonstruierten Kiefers (E-Modul von 0,53 N/mm) wurden nicht in die Tabelle implementiert.

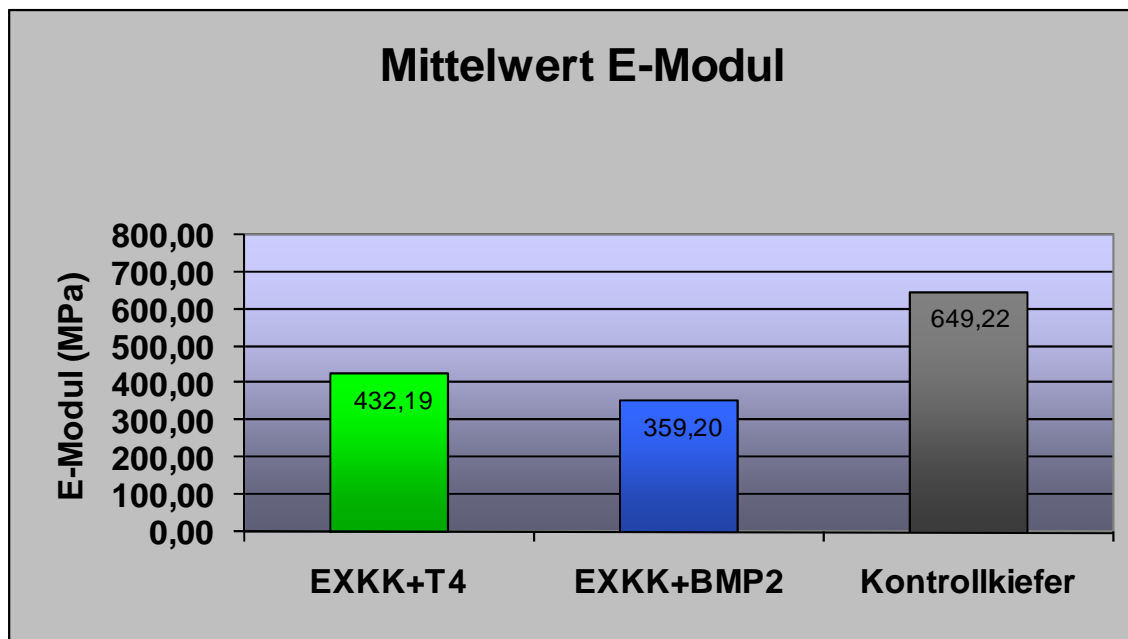


Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte (E-Modul)

5 Diskussion

Das Problem der Wiederherstellung ausgedehnter knöcherner Defekte, welche aufgrund von Traumata, Erkrankungen oder genetisch determiniert entstanden sind, stellt sich im Besonderen der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Die Erwartungshaltung an das Rekonstruktionsergebnis ist sowohl aus funktioneller als auch aus ästhetischer Sicht hoch.

Bezogen auf alle Eingriffe der Wiederherstellungschirurgie wird zur Defekttherapie ein Knochenersatz in etwa 15 Prozent aller Fälle erforderlich [139].

5.1 Parameter der Defektheilung

Entscheidend für den Erfolg der körpereigenen Reossifikation sind drei Faktoren:

- Die Defektgröße, bis zu der die spontane Regenerationsfähigkeit ausreicht („Critical Size Defect“) [49,108]
- Die mechanische Stabilität, limitiert durch die normativen, biomechanischen Anforderungen an das Defektareal
- Die Vaskularisation des Lagergewebes (Unterteilung nach Lexer in die drei Kategorien *ersatzstark*, *ersatzschwach* und *ersatzunfähig* [68])

Werden diese biologischen und biomechanischen Parameter überschritten, ist eine vom Körper alleinig induzierte Genesung nicht mehr möglich. Um dennoch eine komplette knöcherne Defektausheilung zu erzielen, werden Knochentransfer- bzw. Knochenersatzmaterialien benötigt, wobei die Lagerqualität die Auswahl bestimmt. Im ersatzschwachen Lager ist ein Transplantat mit höherer biologischer Potenz notwendig als im ersatzstarken Lager [35,43].

5.2 Standard-Rekonstruktionsverfahren

5.2.1 Autologer Knochen

Der Transfer autologen Knochens zur Rekonstruktion knöcherner Defekte ist der heutzutage immer noch gültige Goldstandard in der Chirurgie ^[98,97,122]. Körpereigenes Gewebe wirkt osteogen, osteokonduktiv und osteoinduktiv, des weiteren kommt es unter steriler Entnahme und Weiterverwendung, bedingt durch die identische Antigenstruktur, zu keinen immunologischen Abwehrreaktionen ^[4,25,121].

Generell hat das autologe spongiöse Knochentransplantat aufgrund des Zellreichtums und der guten Revaskularisierung eine sehr hohe osteogene Potenz ^[111,112]. Factor limitans des spongiösen Transplantates ist der biomechanisch beanspruchte, ausgedehnte Defekt, in dem keine hinreichende Primärstabilität gewährleistet ist.

Kleinere Defekte und augmentative Verfahren werden mit freien Transplantaten aus Regionen wie Kieferwinkel (Linea obliqua externa, aufsteigender Ast), Kinn oder Tuber maxillae versorgt bzw. durchgeführt. Sind größere Mengen an autologem Knochen nötig, wie z.B. für komplexe Augmentationen im Oberkiefer, bedient man sich ergiebigerer Donatorstellen. Die Hauptentnahmeregion für diese Volumina ist der Beckenkamm (Crista iliaca anterior superior et posterior). Bei sehr ausgedehnten Defekten werden gestielte oder mikrochirurgisch revaskularisierte Knochentransplantate aus Schulter, Rippen, Tibia und Beckenkamm verwendet.

Die Nachteile der Versorgung von Defekten mit autologem Material sind:

- Zusätzliche Belastung des betroffenen Patienten durch den operativen Zweiteingriff und die dadurch bedingte längere Operationsdauer mit allen Risiken ^[29,32,106,107]
- Morbidität des Transplantates ^[76]
- Wundinfektionen und Hämatombildung am Entnahmeort

- Sensibilitätsstörungen der im Entnahmegebiet liegenden Nerven ^[23,37,83,115]
- Frakturen an der Donatorstelle
- Unterschiedliche biomechanische Architektur von Donator- und Akzeptorstelle
- notwendige Überkonturierung (bis zu 30%) zum Resorptionsausgleich
- begrenzte Verfügbarkeit
- begrenzte Lagerfähigkeit

5.2.2 Allogener Knochen

Eine weitere Möglichkeit des Knochenersatzes ist die Implantation allogenen Spenderknochens. Der Vorteil liegt in der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit und der Vermeidung des operativen Zweiteingriffs, jedoch ist die Lagerung und Bereitstellung an den Betrieb einer aufwendigen und kostenintensiven Knochenbank gebunden ^[124].

Aufgrund des notwendigen Aufbereitungsprozesses enthält allogener Knochen, im Vergleich zum autologen Transplantat, nahezu keine vitalen Zellen, der Gehalt variiert allerdings je nach Verfahren. Infolgedessen geht vom allogenen Implantat keine zelluläre Knochenneubildung aus, im Idealfall wird das Knochenimplantat im Sinne einer „creeping substitution“ komplett abgebaut und durch Empfängerknochen ersetzt ^[34]. Damit ist es bei der Defektheilung dem autogenen Knochen unterlegen, welcher eine Knochenneubildung im Transplantat induziert.

Hinsichtlich der Herkunft ist eine Infektionsübertragung oder die Gefahr einer Antigenität und Abstoßungsreaktion, hervorgerufen durch Fremdeiweiße, nicht ausgeschlossen ^[109,133,57,46]. Ein weiteres Problem besteht aus forensischer Sicht in der Aufklärungs- und Haftungsfrage.

5.2.3 Xenogener Knochen

Xenogener Knochen ist vorwiegend boviner oder equiner Herkunft und enthält aufgrund chemischer und thermischer Vorbehandlungen keine zellulären Bestandteile. Er wirkt osteokonduktiv, vermeidet den Zweiteingriff für den Patienten und ist unbegrenzt verfügbar. Der entscheidende Unterschied liegt in der Lagerung, da xenogenes Material nicht an Knochenbanken gebunden ist und somit dezentral und unbürokratisch zur Verfügung steht. Die Problematik der Antigenität, inhomogener Chargen und Kontamination ist derjenigen des allogenen Knochenersatzmaterials ähnlich.

5.2.4 Alloplastisches Knochenersatzmaterial

Diese Art des Knochenersatzes ist unbegrenzt verfügbar, biokompatibel, lagerfähig und optimalerweise resorbierbar. Von dem Material sollte keine Infektionsgefahr für den Empfänger ausgehen. Die Kollagene natürlichen Ursprungs sind nach Deatherage et al. als geringgradig immunogen einzustufen [18]. Rüger teilt die alloplastischen Materialien in vier Klassen ein [100]:

1) Biologisch-organische Substanzen

z.B.: Knochenmatrixextrakte, EXKK, Knochenwachstumsfaktoren, Kollagen

2) Synthetische, anorganische Materialien

z.B.: synthetische Kalziumphosphatpräparationen, halbsynthetische Kalziumphosphatpräparationen

3) Synthetische, organische Verbindungen

z.B.: Kopolymere: Ethisorb®

4) Komposite

Mischungen der Klassen I-III

Alloplastische Knochenersatzmaterialien wirken osteokonduktiv, sie dienen dem Empfängerknochen als Leitschiene für einwachsenden Knochen^[10]. Dabei gibt es verschiedene Integrationsmöglichkeiten an der Implantationsstelle. Idealerweise findet eine gesteuerte Resorption bzw. ein Umbau in vitalen, ortsständigen Knochen statt. Nichtresorbierbare alloplastische Ersatzmaterialien sollten hingegen reizlos im Knochen integriert werden. Dieses führt jedoch zu einer lebenslangen Persistenz im Körper und weiterhin zu der Frage, ob eine nötige Remodellationsfähigkeit und dauerhafte Funktionsstabilität gegeben ist. Nach Schenk gibt es keine Alternative zu autogener Spongiosa, sollten die Knochenersatzstoffe nach 6 Monaten im Tierversuch nicht vollständig resorbiert und ersetzt worden sein^[104].

5.3 Der „ideale“ Knochenersatz

Der ideale Knochenersatz ist durch drei Kardinalanforderungen gekennzeichnet [27,77].

- osteogene Wirkung (Knocheneigensynthese)
- osteoinduktive Wirkung (Knochenwachstumsfaktoren)
- osteokonduktive Wirkung (Leitschiene-funktion)

Zusätzlich sollte das Material folgende biologischen und klinischen Bedingungen erfüllen:

- Remodellationsfähigkeit
- Sterilität
- Atoxizität und Akanzerogenität
- immunologische Akzeptanz
- vollständiger Ein- und Umbau
- ausreichende Formstabilität
- geringe Kosten
- einfache Handhabung
- Lagerfähigkeit

- unbegrenzte Verfügbarkeit
- Röntgenopazität
- Patientencompliance

Zahlreiche Autoren empfehlen eine Kombination aus vollständig resorbierbarem, osteokondktivem Trägermaterial und osteoinduktiven Faktoren, da über dieses Freisetzungssystem ein Retardeffekt am Wirkort erzielt wird und eine schnelle Abdiffusion ins umliegende Gewebe temporär unterbleibt ^[123,97]. Der lokale Wirkstoffspiegel kann über einen längeren Zeitraum annähernd konstant gehalten werden. Dieser Forderung kommt das in vorangegangenen Studien beschriebene extrahierte, xenogene Knochenkollagen (EXKK) in Verbindung mit Bone Morphogenetic Proteins nach.

5.4 Kombination Extrahiertes Xenogenes Knochenkollagen (EXKK) + Bone Morphogenetic Proteins (BMP`s)

5.4.1 EXKK - Herstellung und Eigenschaften

EXKK wird aus spongiösem Knochen equiner Herkunft gewonnen und besitzt eine gummiartige Konsistenz, die eine effektive Volumenkonstanz im umliegenden Gewebe ermöglicht. Der Herstellungsprozess (siehe Kapitel 3.1.2) beinhaltet die vollständige Entfernung des Knochenmarks durch physikalische Verfahren (Zentrifugation und Ausstrahlung mit Wasserdampf) und die Sterilisation durch Einsatz von Chloroform und Methanol. Zusätzlich wird Wasserstoffperoxid zur Mazeration verwendet. Dieses so gewonnene Trägermaterial ist nach alleiniger Implantation vollständig resorbierbar und nicht induktiv wirksam. Die spongiöse Struktur erleichtert das Einwachsen gefäßreichen Bindegewebes, welches eine suffiziente Nährstoffversorgung sichert und das Einwandern autologer Stammzellen begünstigt ^[51]. In Studien der Arbeitsgruppe Würzler et al. an Ratten war EXKK allen anderen getesteten

Materialien (Kollagen Typ I, Bioglas, Ethisorb, HA, α -TCP, BioOss[®], Algipore[®]) als Trägersubstanz für induktive Proteine (rhBMP-2) klar überlegen^[69]. Schon nach 9 Wochen ist EXKK von osteoblastären Zellen besiedelt. Nach Abschluß der vollständigen knöchernen Integration und Mineralisation ist EXKK originärem Knochen gleichzusetzen. Die Arbeitsgruppe Kirker-Head et al. konnte für eine ähnliche Kollagenpräparation (ICBM) zeigen, daß diese nach einem Jahr nicht mehr nachzuweisen ist^[56].

5.4.2 Dotierungssubstanz rhBMP-2 / T4

Als osteoinduktive Wirksubstanz wird rekombinantes humanes BMP-2 bzw. das Analog T4 eingesetzt (Herstellung siehe 3.1.1). Diese BMP-2-Mutante besitzt eine deutlich gesteigerte Affinität zu Heparin. Die Herstellung in *E. coli* durch die Arbeitsgruppe von Prof. Sebald (Physiologische Chemie II, Biozentrum, Universität Würzburg) liefert die erforderliche Menge an reinen Proteinen, die für Untersuchungen im hochentwickelten Säugetier benötigt werden.

5.4.3 Vorausgehende tierexperimentelle Studie

Dieser Studie vorausgehend wurde von der Arbeitsgruppe Würzler et al. die Effizienz der Kombination EXKK+rhBMP-2 bzw. T4 in einem biomechanisch hochgradig beanspruchten Gebiet erforscht^[40]. Als präklinisches Defektmodell dienten ausgewachsene Göttinger Minischweine, da diese eine gute Kongruenz des Knochenstoffwechsels sowie der metabolischen Aktivität zu denen des Menschen besitzen.

In dieser Studie wurde ein unilateraler, fünf Zentimeter langer Unterkieferkontinuitätsdefekt gesetzt (siehe 3.1.3.3). Diese ausgedehnte Kontinuitätsresektion (Critical Size Defect) in einem fortwährend durch mastikatorische Aktivitäten biomechanisch stark belasteten Gebiet stellte eine bei weitem höhere Anforderung an das induktive Implantat als Bohrloch- oder

segmentale Defekte, da trotz Titanplatten mit bikortikaler Fixation keine dauerhafte, suffiziente Stabilisierung möglich war.

Die Rekonstruktion erfolgte mit induktiven Implantaten, bestehend aus EXKK-Träger (50 x 25 x 15 mm³) dotiert mit 400 µg/cm³ rhBMP-2 bzw. 300 µg/cm³ T4. Der gesetzte Defekt wurde nach 8 Wochen vollständig und funktionsstabil knöchern durchbaut und nach 12 Wochen war ein Umbau im Sinne einer funktionellen Adaptation festzustellen, mit teilweise überschießender Knochenneubildung. Die ausschließlich mit autologem Knochen rekonstruierte Kontrollgruppe zeigte keine knöcherne Konsolidierung. Statt dessen kam es innerhalb von 6-8 Wochen zu Lockerungen der Platten, Resorptionen des ortständigen Knochens mit anschließenden intraoralen Perforationen und zum Teil Fistelungen nach intra- und extraoral.

5.5 Aktuelle Studie

In der vorliegenden Studie an Göttinger Minischweinen wurde die biomechanische Festigkeit der mit EXKK und rhBMP-2 / T4 bzw. autologem Knochen rekonstruierten Unterkiefer (Partes dextrae) im Vergleich zur kontralateralen Seite ermittelt. Vor Versuchsbeginn wurden an den Präparaten die Osteosynthese-Platten und -Schrauben unter größtmöglicher Schonung des Knochens entfernt. Die Testung erfolgte im Drei-Punkt-Biegeversuch mit der Universalprüfmaschine.

Differenziert wurden die Ergebnisse nach maximal tolerierter Krafteinwirkung und E-Modul. Die Mittelwerte der jeweils gleichartig rekonstruierten Kiefer wurden in Relation zur Mittelung der Kontrollkiefer gesetzt. In Bezug zu den Kontrollkiefern (=100%) erreichten die vier mit EXKK+rhBMP-2 (400 µg/cm³) rekonstruierten Partes mandibulae dextrae im Mittel einen Wert von 56% (maximale Krafteinwirkung) und 55% (E-Modul). Die vier mit EXKK+T4 (300 µg/cm³) rekonstruierten Kiefer erreichten dagegen höhere Werte. Diese gemittelten Werte lagen im Vergleich zum Kontrollkiefer bei 69% (maximale Krafteinwirkung) und 67% (E-Modul).

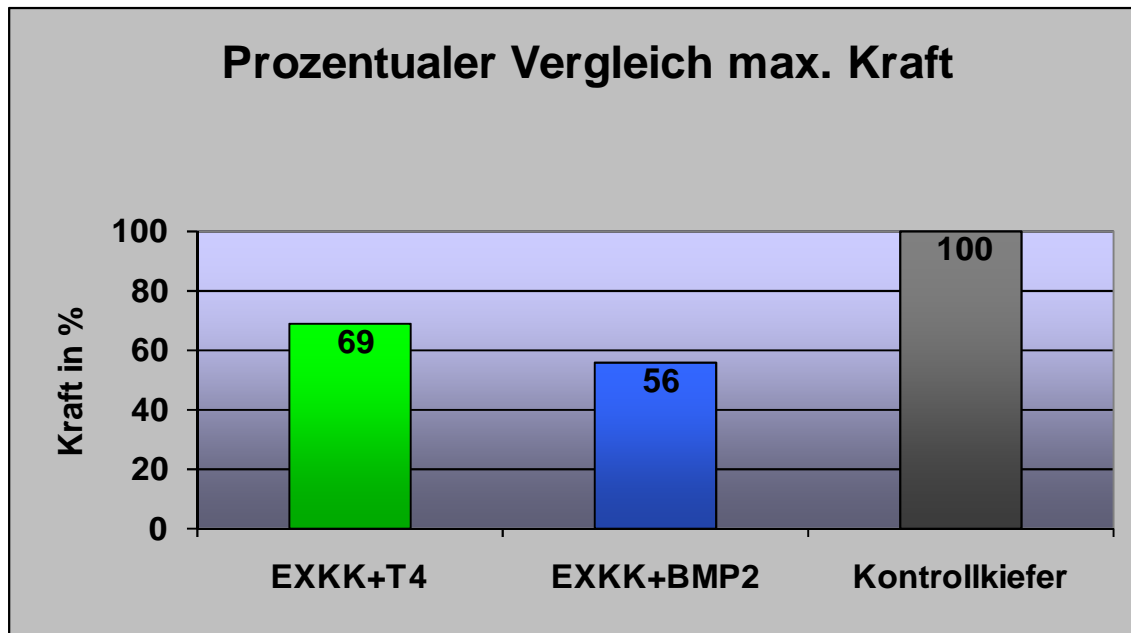


Tabelle 7: Vergleich der Mittelwerte (max. Kraft in %)

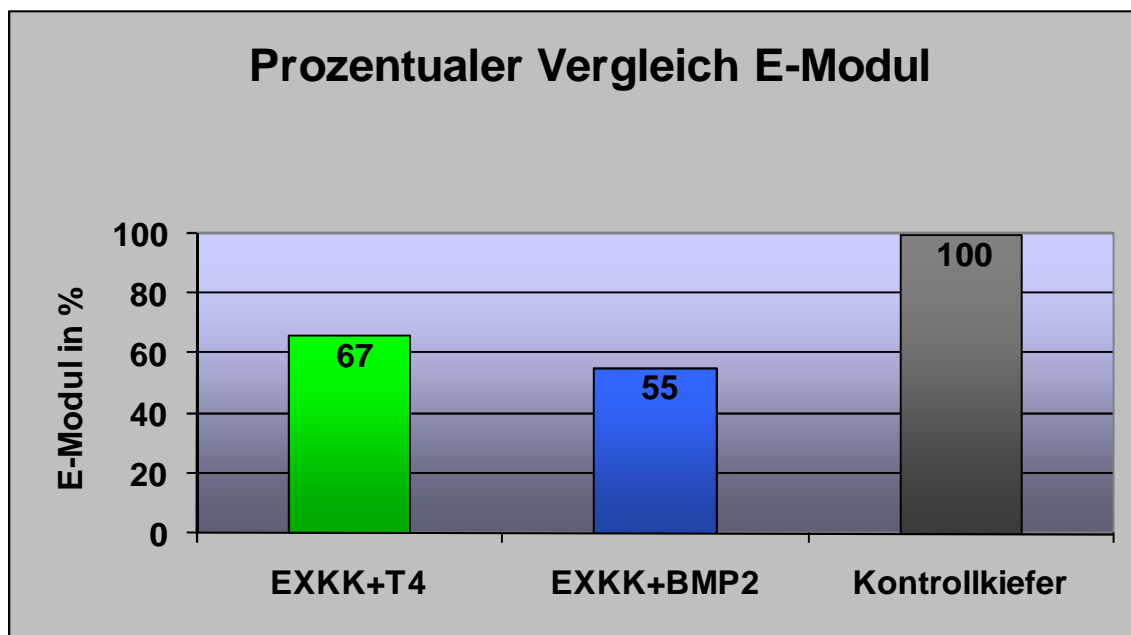


Tabelle 8: Vergleich der Mittelwerte (E-Modul in %)

Die Messwerte des autologen Rekonstruktes waren aufgrund nicht vorhandener knöcherner Konsolidierung im nahezu nicht meßbaren Bereich.

Sowohl bei der maximalen Krafteinwirkung als auch beim ermittelten E-Modul konnte deutlich die wiederhergestellte Stabilität und Elastizität der mit EXKK+rhBMP-2 bzw. T4 wiederhergestellten Unterkiefer gezeigt werden,

obgleich die andauernde Mastikation der gewünschten Wundbettruhe entgegenstand. Der entscheidende Faktor bei Defektmodellen dieser Ausdehnung und biomechanischen Dauerbelastung ist die Geschwindigkeit der funktionellen Regeneration. Es ist folglich gelungen, in kürzester Zeit ein funktionsstabiles Regenerat zu erzielen.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Toriumi et al. im Versuch mit Hunden. Die 3 cm langen Kontinuitätsdefekte im Unterkiefer wurden mit einer Kombination aus inaktiver caniner Knochenmatrix und rhBMP-2 direkt rekonstruiert. 10 Wochen später erfolgte die Entfernung der Rekonstruktionsplatten. Sie konnten für die Defekte einen signifikanten Anstieg der biomechanischen Belastbarkeit zwischen dem 3. und 6. Monat feststellen. Nach 6 Monaten war eine vollständige, funktionsstabile knöchernen Überbrückung der Defekte vorzufinden. Die biomechanische Testung nach 6 Monaten ergab in Relation zur kontralateralen Seite (=100%) einen Durchschnittswert von 27% ^[134]. Die Langzeitstudie am caninen Modell (30 Monate) zeigte Resorptionen des knöchernen Regenerates, die sich nach 11 Monaten stabilisierten. Im Defektareal nahm der prozentuale Anteil des rhBMP-2 induzierten Knochens über 30 Monate hinweg zu ^[135]. Die Beobachtungen von Boyne an Rhesusaffen mit Unterkieferkontinuitätsdefekten weisen in dieselbe Richtung. Es wurden 2,2 cm lange Critical Size Defects am Unterkiefer gesetzt, die direkte Rekonstruktion erfolgte mit rhBMP-2 und Kollagen Typ-I Schwämmen (Helistat). Bei allen Tieren kam es 5 Monate postoperativ zu einer vollständigen knöchernen, kortikalen Regeneration ^[9].

Por et al. führten Studien an Beageln mit Critical Size Defects der Calvaria durch. Nach 3 Monaten wies die mit demineralisierter Knochenmatrix und rhBMP-2 direkt rekonstruierte Gruppe eine komplette knöchernen Regeneration der suturalen Defekte auf ^[88]. Die Arbeitsgruppe Hecht et al. untersuchte rhBMP-2 unter dem Aspekt der therapeutischen Förderung von Wirbelfusionen. Als Studienobjekte zur Lumbalfusion dienten Rhesusaffen. Die mit rhBMP-2 und absorbierbaren Kollagenschwämmen operierte Gruppe zeigte eine schnellere knöchernen Fusion der Wirbel als die Kontrollgruppe mit autogenem Knochen ^[39]. Jovanovic untersuchte die Knochenneubildung im extensiven

Alveolarkammdefekt am Hundemodell nach Implantation eines absorbierbaren Kollagenschwammes dotiert mit rhBMP-2 und kam zu dem Ergebnis, daß die getestete Kombination eine effektive Alternative zur Guided Bone Regeneration darstellt ^[50].

Besonderes Augenmerk richtet sich auf die Dosismenge der eingesetzten osteoinduktiven Substanzen. Diese wirkt sich, wie u.a. Salamon et al. ^[102] im Rattenmodell mit BMP-7 in Kombination mit ICBM darlegen konnten, entscheidend auf den Erfolg der Knochenneubildung aus.

In der eigenen Studie konnte gezeigt werden, daß durch die optimierte Ortsständigkeit der Mutante T4 gegenüber rhBMP-2 ein tendenziell stabileres knöchernes Regenerat induziert wurde, bei gleichzeitiger Dosiseinsparung von 25% (T4 = 0,3 mg/cm³ zu rhBMP-2 = 0,4 mg/cm³). Die verbesserte Ortsständigkeit führt zu einer hinausgezögerten Freisetzungskinetik und in Folge dessen zu einer erhöhten Osteoinduktion.

Vergleicht man die oben genannte Dosierung für die Göttinger Minischweine (Körpergewicht 50-70 kg, Critical Size Defect 5 cm) mit der von Boyne angegebenen Dosierung von 0,8 mg/cm³ für seine Versuche am Rhesusaffen (Körpergewicht 5-10 kg, Critical Size Defect 2,2 cm) ^[9], ist festzustellen, daß die Dosismenge für die Mutante T4 um den Faktor 21 und für rhBMP-2 um den Faktor 16 niedriger ist als in der Studie von Boyne. Daraus ist die deutlich geringere Applikationsmenge ersichtlich, obwohl die biomechanische Beanspruchung im porkinen Defektmodell um ein vielfaches höher liegen dürfte.

5.6 Schlussfolgerung

Wie in dieser Studie gezeigt, führen osteoinduktive Substanzen in Verbindung mit vollständig resorbierbaren, osteokonduktiven Trägern zu einer de novo Knochenbildung mit physiologisch-funktionellen Adaptationsprozessen im Sinne eines Boneremodellings. Die klinische Ausheilung dieser kritischen Defekte geht einher mit wiederhergestellter biomechanischer Belastbarkeit der rekonstruierten Gebiete. Im Gegensatz dazu werden nicht resorbierbare Knochenersatzmaterialien osteointegrativ im Defekt eingebaut, wobei nicht geklärt ist, ob biomechanisch höchst beanspruchte Defektareale durch persistierende Materialien sowohl dauerhaft als auch funktionsstabil wiederhergestellt werden können. Die osteoinduktiven Implantate dieser Studie sind in der Lage, den bei autologen Transplantaten notwendigen operativen Zweiteingriff mit allen dadurch verbundenen Risiken zu vermeiden und somit die Belastung des Patienten zu reduzieren. Dieses wirkt sich durch kürzere Krankenhausaufenthalte sowohl auf die Rehabilitation als auch auf die Kosten positiv aus. Die Anwendung ist jedoch auch limitiert durch die notwendige Anwesenheit von BMP-induzierbaren Zielzellen im Implantatlager. Ist dieses durch entzündliche Prozesse oder Bestrahlung vorgeschädigt, mit der Folge einer reduzierten Vaskularisation und verminderten Anzahl induzierbarer Zellen, ist eine Regeneration basierend auf osteoinduktiven Faktoren nicht mehr in vollem Umfang gegeben.

Aktuelle Ergebnisse von Yamanaka et al. auf dem Gebiet der Stammzellforschung zeigen neuartige Möglichkeiten der Regeneration auf. Ihnen ist mithilfe von 4 Transkriptionsfaktoren die Reprogrammierung von Mäusefibroblasten in sogenannte „induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)“ gelungen, die sich nahezu wie embryonale Stammzellen verhalten^[149] und in unterschiedlichste Gewebezellen weiterentwickeln können. In darauffolgenden Versuchen ist Ihnen sogar die Gewinnung menschlicher iPS aus dermalen Fibroblasten gelungen^[78]. Diese vorgestellten Methoden eröffnen für die Zukunft ganz neuartige Behandlungskonzepte.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden biomechanische Versuche an unilateral rekonstruierten Unterkiefern des Göttinger Minischweins durchgeführt. Die 5 cm langen Mandibulardefekte (Critical Size Defects) wurden in vorangegangener Studie mit osteoinduktiven Implantaten direkt versorgt und durch Fixation mit Osteosynthesematerialien stabilisiert. Dotiert wurde der kollagene Träger (EXKK, extrahiertes xenogenes Knochenkollagen; 50x25x15 mm³) mit rekombinantem humanem BMP-2 (400 µg/cm³) bzw. der Mutante T4 (300 µg/cm³). Die Rekonstruktion der Kontrollgruppe erfolgte mit autologem Knochen. 12 Wochen postoperativ wurden die Versuchstiere geopfert und die Kiefer explantiert. Die Testung der Präparate im Drei-Punkt-Biegeversuch zeigte biomechanisch äußerst belastbare Knochenregenerate. Differenziert nach E-Modul und maximal tolerierter Krafteinwirkung erreichten die mit osteoinduktiven Implantaten rekonstruierten Kiefer im Vergleich zur kontralateralen Seite (=100%) Belastungswerte zwischen 55% und 69%. Die Messergebnisse für EXKK+T4 lagen im Mittel 18% (E-Modul) und 19% (maximal tolerierte Krafteinwirkung) über denen für EXKK+rhBMP-2. Bei der ausschließlich mit autologem Knochen rekonstruierten Kontrollgruppe war aufgrund fehlender osteogener Regeneration keine biomechanische Festigkeit nachzuweisen. Durch die verbesserter Ortsständigkeit der Mutante T4 gegenüber rhBMP-2 konnte eine 25%ige Dosisersparung (300 µg/cm³ zu 400 µg/cm³) erzielt werden.

Es ist für die rechtsseitige Unterkieferrekonstruktion im Göttinger Minischwein gelungen, ein auch unter biomechanischen Gesichtspunkten funktionsstabiles knöchernes Regenerat mithilfe vollständig resorbierbarer, osteoinduktiver Implantate im Critical Size Defect zu implementieren. Der Vorteil dieser Methode ist eine von Beginn an stattfindende, direkte funktionelle Ausrichtung des knöchernen Regenerates an die geforderte Biomechanik des Defektes und der vermeidbare, zur Gewinnung eines Transplantates notwendige, operative Zweiteingriff.

7 Literaturübersicht

1. American Academy of Periodontology: *Position Paper: The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration*, J Periodontol, 67 (1996), 545-553.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et al., *Signal proteins of the TGF- β superfamily act through rezeptor serine/threonine kinases and smads*, in B. Alberts, ed., *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York, 2002, 887-889.
3. Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J., et al., *Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors*, Cell, 75 (1993), 671-680.
4. Axhausen, G., *Über den historischen Vorgang bei der Transplantation von Gelenkenden*, Archiv der Klin Chir, 99 (1912), 1-50.
5. Bani-Yaghoub, M., Felker, J. M., Sans, C. and Naus, C. C., *The effects of bone morphogenetic protein 2 and 4 (BMP2 and BMP4) on gap junctions during neurodevelopment*, Exp Neurol, 162 (2000), 13-26.
6. Bar-Shavit, Z., *The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell*, J Cell Biochem, 102 (2007), 1130-1139.
7. Blumenauer, H., *Werkstoffprüfung*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 6. Auflage, Stuttgart (1994).
8. Bonewald, L. F. and Johnson, M. L., *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*, Bone, 42 (2008), 606-615.
9. Boyne, P. J., *Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction*, Bone, 19 (1996), 83S-92S.
10. Burchardt, H., *The biology of bone graft repair*, Clin Orthop Relat Res (1983), 28-42.
11. Carrington, J. L. and Reddi, A. H., *Parallels between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone*, Bioessays, 13 (1991), 403-408.
12. Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., et al., *Identification of transforming growth factor beta family members*

- present in bone-inductive protein purified from bovine bone*, Proc Natl Acad Sci U S A, 87 (1990), 9843-9847.
13. Chambers, T. J. and Moore, A., *The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin*, J Clin Endocrinol Metab, 57 (1983), 819-824.
 14. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*, Arch Biochem Biophys, 473 (2008), 188-192.
 15. Cochran, G. V. B., *Orthopädische Biomechanik*, Bücherei des Orthopäden, Bd. 51 F. Enke, Stuttgart, 1988, 69-72.
 16. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. and Varanasi, S. S., *The cell biology of bone metabolism*, J Clin Pathol, 61 (2008), 577-587.
 17. De Biase, P. and Capanna, R., *Clinical applications of BMPs*, Injury, 36 Suppl 3 (2005), S43-46.
 18. Deatherage, J. R. and Miller, E. J., *Packaging and delivery of bone induction factors in a collagenous implant*, Coll Relat Res, 7 (1987), 225-231.
 19. Domke, W., *Werkstoffkunde und Werkstoffprüfung*, Cornelsen Verlag Schwan Giradet, 10. Auflage, Düsseldorf (1986).
 20. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*, Cell, 89 (1997), 747-754.
 21. Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I. and Rodan, G. A., *Integrins and signaling in osteoclast function*, Matrix Biol, 19 (2000), 97-105.
 22. Ebner, R., Chen, R. H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T. F., et al., *Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor*, Science, 260 (1993), 1344-1348.
 23. Ebraheim, N. A., Elgafy, H. and Xu, R., *Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications*, J Am Acad Orthop Surg, 9 (2001), 210-218.
 24. Fleisch, H., *Bisphosphonate bei Knochenkrankungen: vom Labor zum Patienten*, Huber, Bern; Göttingen; Toronto; Seattle, 1997.
 25. Foitzik, C. and Vietor, K., *Knochenentnahme am Tibiakopf zur Defektauffüllung oder autologen Transplantation*, Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir, 20 (1996), 110-113.

26. Franzen, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., et al., *Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor*, Cell, 75 (1993), 681-692.
27. Friedlaender, G. E., *Bone grafts - The basic science rationale for clinical applications*, J Bone Joint Surg Am, 69 (1987), 786-790.
28. Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., et al., *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression*, J Biol Chem, 280 (2005), 33132-33140.
29. Gerngross, H., Burri, C., Kinzl, L., Merk, J. and Muller, G. W., *Komplikationen an den Entnahmestellen autologer Spongiosatransplantate*, Aktuelle Traumatol, 12 (1982), 146-152.
30. Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I., et al., *Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors*, Mol Biol Cell, 11 (2000), 1023-1035.
31. Glantschnig, H., Fisher, J. E., Wesolowski, G., Rodan, G. A. and Reszka, A. A., *M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase*, Cell Death Differ, 10 (2003), 1165-1177.
32. Grob, D., *Probleme an der Entnahmestelle bei autologer Knochentransplantation*, Unfallchirurg, 89 (1986), 339-345.
33. Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*, Ann N Y Acad Sci, 1092 (2006), 385-396.
34. Hahn, T. R. and Kübler, N. R., *Erfolgreiche Kombination: Knochentransplantate, Knochenersatzmaterialien und Membranen*, ZWP-Spezial, Ausgabe 10, OEMUS MEDIA, Leipzig, 2007.
35. Hanslik, L., *Der klinische Wert des Knochentransplantates*, Langenbecks Arch Chir, 329 (1971), 996-1005.
36. Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., et al., *Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation*, J Biol Chem, 274 (1999), 6972-6978.
37. Harpf, C., Gabl, M., Reinhart, C., Schoeller, T., Bodner, G., et al., *Small free vascularized iliac crest bone grafts in reconstruction of the scaphoid bone: a retrospective study in 60 cases*, Plast Reconstr Surg, 108 (2001), 664-674.

38. Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., et al., *The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling*, Cell, 89 (1997), 1165-1173.
39. Hecht, B. P., Fischgrund, J. S., Herkowitz, H. N., Penman, L., Toth, J. M., et al., *The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model*, Spine, 24 (1999), 629-636.
40. Heisterkamp, C. M., *Die Wiederherstellung der Unterkieferkontinuität mittels rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) nach ausgedehnten Resektionen im Minischwein*, Würzburg, Univ., Diss., 2003.
41. Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P., *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*, Nature, 390 (1997), 465-471.
42. Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F. and Karsdal, M. A., *Local communication on and within bone controls bone remodeling*, Bone (2009).
43. Hierholzer, G. and Zilch, H., *Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 1980.
44. Hofbauer, L. C. and Heufelder, A. E., *Updating the metalloprotease nomenclature: bone morphogenetic protein 1 identified as procollagen C proteinase*, Eur J Endocrinol, 135 (1996), 35-36.
45. Hogan, B. L., *Bone morphogenetic proteins in development*, Curr Opin Genet Dev, 6 (1996), 432-438.
46. Hönig, J. F., Merten, H. A. and Heinemann, D. E., *Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy*, Plast Reconstr Surg, 103 (1999), 1324-1325.
47. Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., et al., *Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily*, Nature, 389 (1997), 622-626.
48. Jakob, F., Seefried, L. and Ebert, R., *Pathophysiologie des Knochenstoffwechsels*, Internist (Berl), 49 (2008), 1159-1169.
49. Johner, R., *Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße*, Helv Chir Acta, 39 (1972), 409-411.

50. Jovanovic, S. A., Hunt, D. R., Bernard, G. W., Spiekermann, H., Wozney, J. M., et al., *Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects*, Clin Oral Implants Res, 18 (2007), 224-230.
51. Kadiyala, S., Young, R. G., Thiede, M. A. and Bruder, S. P., *Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro*, Cell Transplant, 6 (1997), 125-134.
52. Kamioka, H., Honjo, T. and Takano-Yamamoto, T., *A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy*, Bone, 28 (2001), 145-149.
53. Kang, Q., Sun, M. H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A. G., et al., *Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery*, Gene Ther, 11 (2004), 1312-1320.
54. Katagiri, T. and Takahashi, N., *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*, Oral Dis, 8 (2002), 147-159.
55. Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., et al., *Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage*, J Cell Biol, 127 (1994), 1755-1766.
56. Kirker-Head, C. A., Gerhart, T. N., Schelling, S. H., Hennig, G. E., Wang, E., et al., *Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2*, Clin Orthop Relat Res (1995), 222-230.
57. Knaepler, H., Koch, F. and Bugany, H., *Untersuchungen zur HIV-Inaktivierung in allogenen Knochentransplantaten durch chemische Desinfektion und radioaktive Bestrahlung*, Unfallchirurgie, 18 (1992), 1-6.
58. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*, Cell, 89 (1997), 755-764.
59. Kostenuik, P. J., *Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength*, Curr Opin Pharmacol, 5 (2005), 618-625.
60. Kuberasampath, T. and Ridge, R. J., *US Pat. No. 5171574*, (1992).
61. Kübler, N. R., *Osteoinduktion und -reparation*, Mund Kiefer Gesichtschir, 1 (1997), 2-25.

62. Kuebler, N. R., *Herstellung und Biologie der bone morphogenetic proteins*, BIOMaterialien, 1 (2000).
63. Kuebler, N. R., Reuther, J. F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., et al., *Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system*, Int J Oral Maxillofac Surg, 27 (1998), 305-309.
64. Kuebler, N. R., Wuerzler, K., Reuther, J. F., Faller, G., Sieber, E., et al., *EHBMP-2: Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften*, Mund Kiefer Gesichtschir, 3 Suppl 1 (1999), S134-139.
65. Kukoschke, K. G. and Mayer, H., *Bedeutung von Protein-Wachstumsfaktoren für die lokale Regulation des Knochenwachstums*, Dtsch Med Wochenschr, 115 (1990), 1921-1926.
66. Lee, S. K. and Lorenzo, J. A., *Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation*, Endocrinology, 140 (1999), 3552-3561.
67. Lerner, U. H., *Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis*, J Dent Res, 85 (2006), 584-595.
68. Lexer, E., *Die freien Transplantationen*, Neue Deutsche Chirurgie Enke, Stuttgart, 1919-1924.
69. Liebl, O., *Knochenregeneration mit rhBMP-2 und unterschiedlichen Trägermaterialien; Biomechanische, fluoreszenzmorphometrische und radiomorphometrische Untersuchungen im Rattenmodell*, Würzburg, Univ., Diss., 2005.
70. Löffler, G., Petrides, P. E. and Neumann, S., *Stoffwechsel spezifischer Gewebe*, Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997.
71. Lorget, F., Kamel, S., Mentaverri, R., Wattel, A., Naassila, M., et al., *High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis*, Biochem Biophys Res Commun, 268 (2000), 899-903.
72. Luyten, F. P., Cunningham, N. S., Ma, S., Muthukumar, N., Hammonds, R. G., et al., *Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation*, J Biol Chem, 264 (1989), 13377-13380.
73. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*, Annu Rev Biochem, 67 (1998), 753-791.

74. Meek'ren, J. v., *Heel- en geneeskonstige aenmerkingen*, by Hermanus Kentlink, boekverkooper#agter het Stadhuis#, Te Rotterdam, 1730.
75. Miyazono, K., Kusanagi, K. and Inoue, H., *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling*, J Cell Physiol, 187 (2001), 265-276.
76. Moran, C. G. and Wood, M. B., *Vascularized bone autografts*, Orthop Rev, 22 (1993), 187-197.
77. Mulliken, J. B., Kaban, L. B. and Glowacki, J., *Induced osteogenesis--the biological principle and clinical applications*, J Surg Res, 37 (1984), 487-496.
78. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*, Nat Biotechnol, 26 (2008), 101-106.
79. Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., et al., *Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling*, Nature, 389 (1997), 631-635.
80. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*, Cell, 108 (2002), 17-29.
81. Neumann, E. and Schett, G., *Knochenstoffwechsel: Molekulare Mechanismen*, Z Rheumatol, 66 (2007), 286-289.
82. Nickel, J., Dreyer, M. and Sebald, W., *Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction*, in S. Vukicevic and K. T. Sampath, eds., *Bone morphogenetic proteins : from laboratory to clinical practice*, Birkhäuser Verlag, Basel; Boston, 2002, 61-86.
83. Niedhart, C., Pingsmann, A., Jurgens, C., Marr, A., Blatt, R., et al., *Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm - eine prospektive, kontrollierte Studie*, Z Orthop Ihre Grenzgeb, 141 (2003), 481-486.
84. Noble, B. S., *The osteocyte lineage*, Arch Biochem Biophys, 473 (2008), 106-111.
85. Papachroni, K. K., Karatzas, D. N., Papavassiliou, K. A., Basdra, E. K. and Papavassiliou, A. G., *Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease*, Trends Mol Med (2009).
86. Paralkar, V. M. and Grasser, W. A., *Prostate-derived factor and growth and differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF-β superfamily*, in S. Vukicevic and K. T. Sampath, eds., *Bone*

- morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 2002, 19-30.
87. Piters, E., Boudin, E. and Van Hul, W., *Wnt signaling: a win for bone*, Arch Biochem Biophys, 473 (2008), 112-116.
 88. Por, Y. C., Barcelo, C. R., Salyer, K. E., Genecov, D. G., Troxel, K., et al., *Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model*, Ann Acad Med Singapore, 36 (2007), 911-919.
 89. Ramasamy, I., *Recent advances in physiological calcium homeostasis*, Clin Chem Lab Med, 44 (2006), 237-273.
 90. Reddi, A. H., *Bone and cartilage differentiation*, Curr Opin Genet Dev, 4 (1994), 737-744.
 91. Reddi, A. H., *Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection*, Pediatr Nephrol, 14 (2000), 598-601.
 92. Reddi, A. H., *Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens*, Cytokine Growth Factor Rev, 8 (1997), 11-20.
 93. Reddi, A. H., *Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications*, J Bone Joint Surg Am, 83-A Suppl 1 (2001), S1-6.
 94. Reddi, A. H., Wientroub, S. and Muthukumaran, N., *Biologic principles of bone induction*, Orthop Clin North Am, 18 (1987), 207-212.
 95. Richards, J. B., Rivadeneira, F., Inouye, M., Pastinen, T. M., Soranzo, N., et al., *Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study*, Lancet, 371 (2008), 1505-1512.
 96. Roodman, G. D., *Regulation of osteoclast differentiation*, Ann N Y Acad Sci, 1068 (2006), 100-109.
 97. Rueger, J. M., *Knochenersatzmittel - Heutiger Stand und Ausblick*, Orthopäde, 27 (1998), 72-79.
 98. Rueger, J. M., *Knochenersatzmittel. State of the art und: Wohin gehen wir?*, Der Unfallchirurg, 99 (1996), 228-236.
 99. Rüter, D. C., *Biochemistry of bone morphogenetic proteins*, in S. Vukicevic and K. T. Sampath, eds., *Bone morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, 2002, 1-18.

100. Rüger, J. M., *Knochenersatzmittel. State of the art und: Wohin gehen wir?*, *Der Unfallchirurg*, 99 (1996), 228-236.
101. Ruppert, R., Hoffmann, E. and Sebald, W., *Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity*, *Eur J Biochem*, 237 (1996), 295-302.
102. Salamon, M. L., Althausen, P. L., Gupta, M. C. and Laubach, J., *The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model*, *J Spinal Disord Tech*, 16 (2003), 90-95.
103. Sampath, T. K., Muthukumaran, N. and Reddi, A. H., *Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (1987), 7109-7113.
104. Schenk, R. K., *Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen*, *Unfallheilkunde*, 216 (1991), 23-35.
105. Schiebler, T. H., Schmidt, W. and Zilles, K., *Anatomie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997.
106. Schliephake, H., *Entnahmetechniken autogener Knochentransplantate. Teil I: Spenderareale im Kopf-Hals-Bereich*, *Implantologie 4* (1994), 317-327.
107. Schliephake, H., *Entnahmetechniken autogener Knochentransplantate. Teil II: Spenderareale außerhalb des Kopf-Hals-Bereiches*, *Implantologie 3* (1995), 39-45.
108. Schmitz, J. P. and Hollinger, J. O., *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*, *Clin Orthop Relat Res* (1986), 299-308.
109. Schnettler, R. and Markgraf, E., *Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochentransplantate*, L. Guertler aus: *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren* (1997), 8-11.
110. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. and Benvenisty, N., *Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000), 11307-11312.
111. Schweiberer, L., *Der heutige Stand der Knochentransplantation*, *Chirurg*, 42 (1971), 252-257.

112. Schweiberer, L., Eitel, F. and Betz, A., *Spongiosatransplantation*, Chirurg, 53 (1982), 195-200.
113. Schwenzer, N. and Ehrenfeld, M., *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde : Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung. Band 2 Spezielle Chirurgie*, Thieme, Stuttgart, 2002.
114. Seeman, E. and Delmas, P. D., *Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility*, N Engl J Med, 354 (2006), 2250-2261.
115. Seiler, J. G., 3rd and Johnson, J., *Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications*, J South Orthop Assoc, 9 (2000), 91-97.
116. Silver, I. A., Murrills, R. J. and Etherington, D. J., *Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*, Exp Cell Res, 175 (1988), 266-276.
117. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*, Cell, 89 (1997), 309-319.
118. Skerry, T. M., *The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis*, Arch Biochem Biophys, 473 (2008), 117-123.
119. Soldner, E. and Herr, G., *Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien*, Trauma Berufskrankh, 3 (2001), 256-269.
120. Solheim, E., *Growth factors in bone*, Int Orthop, 22 (1998), 410-416.
121. Spiekermann, H., *Implantologie*, Farbatlant der Zahnmedizin, Bd. 10 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
122. Spiessl, B., *Grundsätzliches zur Knochentransplantation*, Fortschr Kiefer Gesichtschir, 20 (1976), 14-17.
123. Stutzle, H., Hallfeldt, K., Mandelkow, H., Kessler, S. and Schweiberer, L., *Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien*, Orthopäde, 27 (1998), 118-125.
124. Stutzle, H., Kessler, S., Mandelkow, H. and Schweiberer, L., *Knochenbankorganisation*, Unfallchirurg, 94 (1991), 619-623.
125. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*, Endocr Rev, 20 (1999), 345-357.

126. Takahashi, N., Udagawa, N. and Suda, T., *A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function*, *Biochem Biophys Res Commun*, 256 (1999), 449-455.
127. Taylor, A. F., Saunders, M. M., Shingle, D. L., Cimbala, J. M., Zhou, Z., et al., *Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions*, *Am J Physiol Cell Physiol*, 292 (2007), C545-552.
128. Teitelbaum, S. L., *Bone resorption by osteoclasts*, *Science*, 289 (2000), 1504-1508.
129. ten Dijke, P., Krause, C., de Gorter, D. J., Lowik, C. W. and van Bezooijen, R. L., *Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling*, *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1 (2008), 31-35.
130. Terheyden, H., *Verwendung von Knochenersatzmaterialien in der chirurgischen Zahnheilkunde*, Stellungnahme der DGZMK V1.0, Stand: 9/00 DZZ, 55 (2000).
131. Theill, L. E., Boyle, W. J. and Penninger, J. M., *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*, *Annu Rev Immunol*, 20 (2002), 795-823.
132. Tolar, J., Teitelbaum, S. L. and Orchard, P. J., *Osteopetrosis*, *N Engl J Med*, 351 (2004), 2839-2849.
133. Tomford, W. W., *Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts*, *J Bone Joint Surg Am*, 77 (1995), 1742-1754.
134. Toriumi, D. M., Kotler, H. S., Luxenberg, D. P., Holtrop, M. E. and Wang, E. A., *Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation*, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 117 (1991), 1101-1112.
135. Toriumi, D. M., O'Grady, K., Horlbeck, D. M., Desai, D., Turek, T. J., et al., *Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long-term follow-up in a canine model*, *Laryngoscope*, 109 (1999), 1481-1489.
136. Urist, M. R., *Bone: formation by autoinduction*, *Science*, 150 (1965), 893-899.
137. Urist, M. R. and Strates, B. S., *Bone morphogenetic protein*, *J Dent Res*, 50 (1971), 1392-1406.
138. Väänänen, H. K. and Laitala-Leinonen, T., *Osteoclast lineage and function*, *Arch Biochem Biophys*, 473 (2008), 132-138.

139. Vilmar, K. and Bachmann, K.-D., *Richtlinien zum Führen einer Knochenbank*, Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, Deutsches Ärzteblatt, Ausgabe 34-35 (1996).
140. Vukicevic, S., Latin, V., Chen, P., Batorsky, R., Reddi, A. H., et al., *Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes*, Biochem Biophys Res Commun, 198 (1994), 693-700.
141. Walter, P. v., *Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe*, J Chir Augenheilk. (1821), 571.
142. Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., et al., *Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors*, Proc Natl Acad Sci U S A, 85 (1988), 9484-9488.
143. Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., et al., *Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice*, J Bone Miner Res, 15 (2000), 1879-1888.
144. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. and Hogan, B. L., *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*, Genes Dev, 9 (1995), 2105-2116.
145. Wozney, J. M. and Rosen, V., *Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair*, Clin Orthop Relat Res (1998), 26-37.
146. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*, Science, 242 (1988), 1528-1534.
147. Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., et al., *TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex*, Cell, 71 (1992), 1003-1014.
148. Würzler, K.-K., *Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten*, Würzburg, Univ., Habil.-Schr., 2004.
149. Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors*, Cell Prolif, 41 Suppl 1 (2008), 51-56.
150. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95 (1998), 3597-3602.

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. K. K. Würzler gilt mein herzlicher Dank für die Idee zu dieser Arbeit, die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates. Seine Anleitung und freundschaftliche Betreuung waren mir bei der Durchführung dieser Arbeit eine sehr große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. F. Jakob möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates sowie die Prüfung im zweiten Fachbereich bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Margit Schleyer für die allzeitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

