

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Eine der größten Herausforderungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie der zahnärztlichen Chirurgie ist die Wiederherstellung und Überbrückung von knöchernen Defekten. Diese können durch angeborene Erkrankungen wie Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten, ablativer Tumorchirurgie, Traumata oder Infekte im Sinne von Parodontalerkrankungen, um lediglich einige zu nennen, bedingt sein. Einen weiteren und nicht zu vernachlässigenden Grund stellt die Knochenresorption nach Zahnextraktionen.

Der Goldstandard in der Versorgung und Rekonstruktion solcher Defekte ist das autologe Knochentransplantat (Kübler 2002). Eine nahezu gesicherte Einheilung des Transplantats ist auf Grund seiner hohen osteogenetischen Potenz immer noch das Mittel der ersten Wahl (Neukam und Buser 1996). Die Grundlagen dieser Therapiemöglichkeit wurden schon Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt (Barth 1893).

Das Knochentransplantat kann bei kleineren Defekten im Kieferwinkelbereich oder aus dem Kinnbereich entnommen werden. Bei größeren Defekten sind Transplantate aus dem Beckenkamm als freies Knochentransplantat zu entnehmen. Eine weitere Spenderregion bietet das mikrochirurgisch zu anastomosierende Transplantat der Fibula oder der Skapula.

Die Vorteile des autologen Knochens liegen in der fehlenden Antigenität sowie der Sicherheit, keine viralen Infektionen (Hepatitisen oder HIV) zu übertragen. Ein Nachteil liegt in der Eröffnung eines zweiten Operationsgebietes, in dem es zu Hämatombildungen, Infektionen und postoperativen Beschwerden und Schmerzen kommen kann. Die begrenzte Verfügbarkeit an autologem Knochen, die Schwierigkeit der Formanpassung des Transplantates an den Defektbereich und die Morbidität in der Entnahmeregion (Cricchio und Lundgren 2003; Joshi und Kostakis 2004) sowie seine Resorptionsneigung (Wiltfang et al. 2005) limitieren den Behandler in seiner Therapie.

Wenn über Prinzipien der Knochenregeneration gesprochen wird, ist sich vor Augen zu halten, dass diese sich auf drei Grundelemente der Knochenbiologie stützen: Osteoblasten, Matrix und Wachstumsfaktoren (Lynch et al. 1999). Die

Applikation von Wachstumsfaktoren tragen zu einer beschleunigten und verbesserten Knochenheilung bei.

Faktoren wie PDGF (platelet derived growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und die BMP's (bone morphogenetic proteins) sind an Umbauprozessen des Knochens beteiligt (Lane et al. 1999). Die Wachstumsfaktoren können heute über rekombinante Techniken hergestellt oder aus Thrombozyten gewonnen werden (PDGF, TGF- $\beta$ , IGF).

Zur Versorgung knöcherner Defekte werden verschiedene Knochenersatzmaterialien herangezogen. Die Erforschung dieser Materialien und der Anspruch an eine osteokonduktive Wirkung dieser stellen die größte Herausforderung dar.

Der Prozess der Osteokonduktion bedeutet, dass das Material in seiner Eigenschaft so gewählt wird, dass dieses eine Leitstruktur (Matrix) bilden kann, um perivaskuläres Gewebe, sowie Kapillaren und Knochenzellen einwachsen lassen zu können, die daraufhin für die Neubildung von Knochen zuständig sind.

Im Gegensatz dazu steht die Osteoinduktion, die die Wirkung der Wachstumsfaktoren oder des Periostes, welche die Umwandlung mesenchymaler Vorläuferzellen in

Osteoprogenitor-Zellen mit anschließender Osteogenese in Gang setzt, umfasst. Osteoinduktivität konnte bisher allein durch natürliche anorganische Knochenersatzmaterialien nicht erreicht werden (Wolfe et al. 1994; Kübler 1997; Feifel 1996).

## 1.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren wie das PDGF und die aus der TGF- $\beta$  Gruppe zeigten *in vitro* und *in vivo* einen proliferativen Effekt auf Präosteoblasten und Osteoblasten. Sie haben also ausschließlich einen zellvermehrenden Effekt und keinen differenzierenden. Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), welche zur Proteinfamilie TGF- $\beta$  zählen, zeigen einen morphogenen Effekt. Hierbei transformieren sich undifferenzierte Zellen in Osteoblasten. Unter den BMPs weisen das BMP – 7 und das BMP – 2 den höchsten morphogenen Effekt auf, sodass durch die Applikation von BMPs in einem Trägermaterial ektope Knochen gebildet werden kann (Urist 1965). Ein geeignetes Trägermaterial ist zur Anwendung von BMP erforderlich, da sonst die ektope

Knochenbildung nicht oder nur unzureichend induziert wird (Zellin et al. 1996).

### 1.3 Bone Morphogenetic Proteins

Den Namen Bone Morphogenetic Proteins (BMP) prägten Urist et al. erst 1979. Der Effekt der ektopen Knochenneubildung der BMP wurde bereits 1965 vom gleichen Autor beschrieben. 1973 wurden BMPs erstmals charakterisiert (Wozney et al. 1988; Wang et al. 1988). Heute werden sie auf Grund der Aminosäuresequenz zu den TGF- $\beta$  gezählt (Wozney et al. 1998). Es gibt circa 40 bekannte BMPs, wobei die BMP-2 und BMP-7 den größten Einfluss auf die osteogenetischen Prozesse haben (Ripamonti et al. 1997 und Küsswetter et al. 1999). Dadurch können diese in wesentlich geringeren Dosen verwendet werden als die übrigen BMPs (Ripamonti und Duneas 1998). Die morphogenetische Potenz ist dosisabhängig (Noda et al. 1989; Kübler 1998; Küsswetter 1999). Die *in vivo* Dosierung gehört zu den bisher ungelösten Problematiken (Geesink et al. 1999). In der Embryogenese spielen BMPs eine entscheidende Rolle wie beispielsweise in

der Differenzierung der Nieren, des Nervensystems, der Leber, der Augen und auch des Herzens (Bechtel W. et al. 2009). Nicht unerwähnt soll auch ein positiver Effekt im Bereich der Dentinogenese (Jepsen et al. 1997) und der Zementogenese (Ripamonti et al. 1996) bleiben. Wozney et al. (1988) und Ozkaynak et al. (1990) gelang es die BMPs auf rekombinante Art herzustellen, nachdem sie die Struktur der c-DNA und der Aminosäuresequenz identifizierten. Dieses Herstellungsverfahren erleichterte die Verfügbarkeit und damit die Handhabung sehr. Bis dahin mussten BMPs durch dissoziative Extraktion aus Knochenmatrix (Sampath et al. 1981) gewonnen werden.

Seitdem konnten am Tiermodell und am Menschen *critical size defects* mit BMP und einem Trägermaterial sowohl in der kraniofazialen (Toriumi et al. 1991; Sailer et a.. 1994; Mayer et al. 1996; Boyne et al. 1998; Terheyden et al. 1999 und 2001) als auch in der orthopädischen Chirurgie (Johnson et al. 1992; Cook et al.1994) versorgt werden. Cook verglich bei seiner Studie zusätzlich die mechanische Stabilität an langen Röhrenknochen. Hierbei stellte sich der mit BMP-7 induzierte Knochen als stabiler heraus als ein autologes Knochentransplantat. Weiterhin konnte eine signifikant

schnellere Osseointegration von Titanimplantaten beobachtet werden (Rutherford et al. 1992; Xiang et al. 1993; Nevins et al. 1996; Kirker-Head et al. 1997; Ong et al. 1999).

Jepsen und Mitarbeiter zeigten 1996, dass BMP-7 zur Versorgung einer eröffneten Pulpa einen positiven Effekt aufweist. Die BMPs können auch hier allerdings nur in Verbindung mit einem geeigneten Trägermaterial eingesetzt werden. Diese beinhalten hauptsächlich minerale oder kollagenartige Grundsubstanz. Ebenso gibt es polymere Strukturen auf Zuckerbasis wie die Polylactide (Kubies et al. 2000). Die Mund -, Kiefer - und Gesichtschirurgie ist in den letzten Jahren vermehrt dazu übergegangen, BMP in Verbindung mit Knochenersatzmaterialien zu verwenden (Terheyden et al. 1997), wie auch in der vorliegenden Arbeit.

#### 1.4 Knochenersatzmaterialien (KEM)

Knochenersatzmaterialien stellen einen wichtigen Teilaspekt in der derzeitigen Forschung dar, wenn es um die Wiederherstellung knöcherner Defekte geht.

Die BMPs haben einen positiven Effekt auf Knochenneubildung. Der limitierende Faktor ist immer noch, dass die verfügbaren Trägermaterialien die idealen Kriterien eines Knochenersatzmaterials, nämlich Resorbierbarkeit und Degradation, nicht erfüllen. Sie sollen hierbei als Trägermaterial dienen, welche osteokonduktiv wirken und durch *bone remodeling* nachhaltig durch neuen, vitalen Knochen ersetzt werden. Ohne Trägermaterial kommt es zu einer Streuung der BMPs im Gewebe und damit einer Auflösung in Wasser, wodurch die Wirkung der BMPs verfehlt wird (Cook et al. 1994). Bei diesen Materialien spielt das Resorptionsverhalten eine enorme Rolle.

Knochenersatzmaterialien lassen sich in drei Gruppen unterteilen:

Allogenes Knochenersatzmaterial

Xenogenes Knochenersatzmaterial

Alloplastisches Knochenersatzmaterial

Die bedeutsamen Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien sind Biokompatibilität, fehlendes Infektionsrisiko, Porengeometrie mit resultierender Osteokonduktivität,

Abbauverhalten, mechanische Stabilität sowie ausreichende Verfügbarkeit (Jerosch et al. 2002).

Allogenes Material ist humanen Ursprungs - xenogenes Material findet seinen Ursprung aus einer anderen Spezies wie Schweinen oder Rindern. Diese Knochenersatzmaterialien werden speziellen Aufbereitungsmaßnahmen unterzogen; der organische Anteil wird dabei eliminiert, um eine Antigenität sowie das Infektionsrisiko zu minimieren.

Alloplastische Materialien sind synthetisch hergestellte Knochersatzmaterialien. Bioverträgliche Materialien sind hierbei Keramiken auf Kalziumphosphat – Basis, insbesondere aus Hydroxylapatit (HA). Auch Tricalciumphosphat (TCP) stellte sich als geeignetes Trägermaterial heraus (Osborn 1985). Diese zeigen eine gute Osteokonduktivität (Gosain et al. 2005). HA und TCP unterscheiden sich grundsätzlich in ihrem Resorptionsverhalten. Während HA lediglich bedingt resorbiert wird, wird das TCP in kurzer Zeit vollständig abgebaut. Aufgrund dessen werden vermehrt Mischungen dieser beiden Materialien, die sog. biphasischen Calciumphosphate (BCP) verwendet. So auch in der vorliegenden Arbeit (Zhang et al. 2001; Daculsi et al. 2004; Bodde et al. 2007, Detsch et al. 2008).

Die 3D Konfiguration des Materials spielt eine entscheidende Rolle. Das KEM sollte eine gewisse Porosität aufweisen, damit es zu einer Einsprossung von Gefäßen und Osteoblasten kommen kann (King 2004; Yang et al. 2001). Die Porosität sollte hierbei bei ca. 70 – 80% liegen (Karageorgiou et al. 2005). Die Mindestanforderung der Porengröße liegt bei 100µm – wobei die stärkste Knochenneubildung zwischen 300 – 600µm zuerkennen ist (Tsuruga et al. 1997; Flautre et al. 2001; Krut et al. 2003; Pamula et al. 2008).

Neben den synthetisch hergestellten Materialien werden häufig xenogene KEM verwendet. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass auch diese eine ausgezeichnete Osteokonduktivität besitzen (Valdrè et al. 1995; Berglundh und Lindhe 1997; Açil et al. 2000; Roldán et al. 2010).

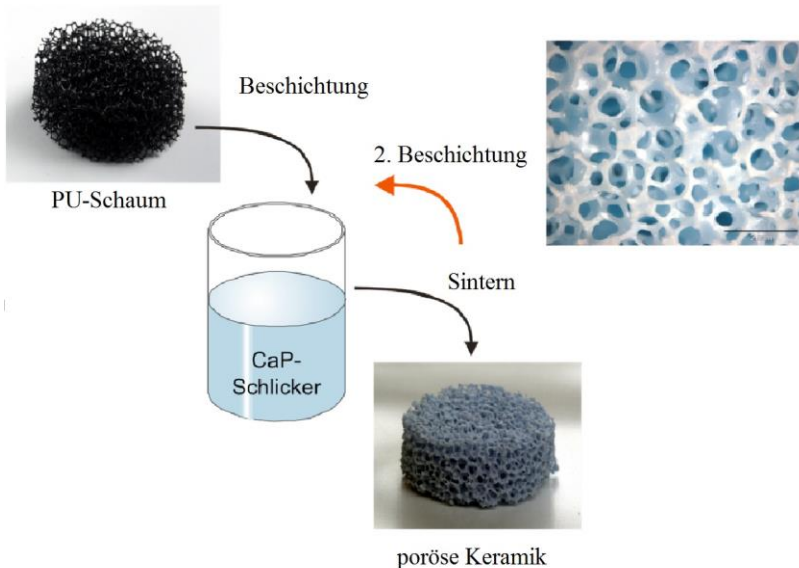
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt von BMPs auf das Abbauverhalten der unterschiedlichen Kalziumphosphatkeramiken am Großtier (Göttinger Minischwein) zu untersuchen.

#### 1.4.1 Herstellung der in der vorliegenden Arbeit benutzten Knochenersatzmaterialien

In der vorliegenden Arbeit wurden 3 verschiedene Knochenersatzmaterialien verwendet, eine Hydroxylapatit – Keramik (HA), eine Tricalciumphosphat – Keramik ( $\beta$ -TCP) sowie eine biphasische Calciumphosphat – Keramik (BCP) im Mischungsverhältnis 60:40 (HA:TCP), welche am Friedrich – Baur – Forschungsinstitut für Biomaterialien an der Universität Bayreuth entwickelt und hergestellt wurden.

Es wurde die PU – Replika Technik (Schwartzweld–Verfahren) zur Herstellung dieser Schäume benutzt (Kim et al. 2003; Ranito et al. 2005). Hierzu wurden PU–Schäume mit den Dimensionen von 19mm im Durchmesser, einer Höhe von 6,5mm und 45ppi (ppi – pores per inch) benutzt, was zu einer Porengröße von 200 – 1000 $\mu$ m führte; größere Poren sind mit kleineren Poren verbunden – die CaP – Keramik ist somit bimodal. Eine ausreichende Porosität (91 – 96 Vol.% ; durchschnittlich 92%) ist damit gegeben. Die PU–Schäume wurden in einen CaP-Schlick getaucht. Der PU–Schaum verbrennt bei 400°C rückstandlos. Danach wird die CaP-Keramik für 1h bei ca. 1300°C gesintert. Nach einer zweiten

Tauchbeschichtung wurden die CaP-Keramiken ein weiteres Mal gesintert (Abb. 1). Auf Grund der hohen thermischen Behandlung unterliegen die Keramiken einer 20%igen Schrumpfung, sodass sich eine Größe von  $d=15\text{mm} \times h=5\text{mm}$  ergab.



(Quelle: FBI, mit freundlicher Genehmigung)

**Abb. 1:** PU-Replika-Technik (Schwartzfeld-Verfahren): Herstellung der CaP-Keramiken (Friedrich-Baur Institut für Biomaterialien (FBI) an der Universität Bayreuth)

Die CaP-Keramiken hatten einen Durchmesser von 1,5 cm bei einer Höhe von 0,5 cm (Deisinger 2004). Die vorher genannten Mikroporositäten, die auf Grund der 3-D Konfiguration entstehen, ermöglichen das Einwachsen des Knochens in das Material, wie bereits an der Maus beschrieben worden ist (Roldán et al. 2010; Detsch et al. 2008).

#### 1.4.2 Kommerziell erhältliche Knochenersatzmaterialien

Es sind allein in Deutschland circa 106 kommerziell vertriebene Knochenersatzmaterialien erhältlich (Vgl.: Marktübersicht Knochenersatzmaterialien, *Implantology Journal* p14-16; 4/2011), wobei mittlerweile weit mehr alloplastische als allogene und xenogene Materialien erhältlich sind. Der Großteil dieser alloplastischen Materialien entspringt den Calciumphosphat – Keramiken. Es werden sowohl HA–, TCP– als auch BCP–Keramiken verwendet. Bei den biphasischen Keramiken gibt es ausschließlich HA – reiche Keramiken (55 - 80 Gew. %).

## 1.5 Die ektope Knochenbildung

Die Präfabrikation von Gewebe in einem ektope Lager stellt statt der *in vitro* Präkultivierung eine Alternative zum Tissue Engineering dar. So beschrieben z.B. Stevens et al. 2005 einen sog. Bioreactor. Sie luxierten das Periost der Tibia bei Kaninchen und züchteten entlang des Knochens, diesen identischen Knochen. Es gibt den Ansatz, mit Hilfe eines Trägermaterials Knochen ektop in der Muskulatur zu züchten. 1990 zeigte Ogushi, dass es mit Knochenersatzmaterialien wie HA und TCP in einem Tiermodell (Ratte) zu keiner Knochenbildung kam, wohl aber in Verbindung mit Stammzellen. 2001 konnte Ripamonti et al. eine Knochenbildung bei einem mit BMP-7 beschickten Hydroxylapatit nachweisen. Er zeigte auch, dass es mit dem reinen KEM zu einer minimalen Knochenbildung kam.

Roldán et al. konnte 2010 eine ektope Knochenneubildung an der Maus in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren nachweisen. In der Studie von Roldán et al. (2010) wurde das gleiche Material wie in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Bei der ektope Knochenbildung besteht allerdings das Problem der Formgebung des gezüchteten Knochens. Es lassen

sich keine exakten Vorhersagen bezüglich der Form und auch der Menge des neugebildeten Knochens treffen.

#### 1.6 Die orthotope Knochenbildung und der *critical size defect*

Das orthotope Modell dient zur Evaluierung der Degradation und Resorption in Anwesenheit von Osteoklasten und der Knochenneubildung unter Anwendung von BMP-7 am adulten Großtier (Göttinger Minischwein).

Zur Verbesserung der Knochenneubildung und Integration werden KEM häufig mit autologem Knochen verwendet.

Das Tiermodell für Defekte kritischer Größe [*critical size defects* (CSD)] mittels des Kraniotomiemodells an Kaninchen wurde bereits ausführlich beschrieben (Albee 1923; Holland 1973; Hofmann et al. 1984; Hollinger und Kleinschmidt 1990, Hollinger und Winn 1999; Albrektsson und Johansson 2001; Al Ruhaimi 2001; Aldini et al. 2002; Fialkov et al. 2003; Holy et al. 2003; Abdul Razak et al. 2004; Bayne 2005; Hernández-Alfaro et al., 2005; Hollister et al. 2005; Alam et al. 2007; Marques 2010). Defekte einer Größe, die während der gesamten Lebenszeit des Tieres nicht heilen, werden als

Defekte kritischer Größe (CSDs) bezeichnet (Schmitz und Hollinger 1986). Dieses Modell ist interessant, da die Dura exponiert ist. Die Dura hat eine sehr gute Durchblutung, daher ist die Heilung an der Stelle sehr gut. In dem vorliegenden Versuch sahen wir im Unterschied die Schleimhaut der Stirnhöhle. Diese Beobachtung lag an Pneumatisierung der Stirnhöhle beim adulten Tier.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die verschiedenen Knochenersatzmaterialien (KEM) auf Resorptions- und Degradations-Verhalten mit und ohne Verwendung von BMP-7 zu untersuchen. Die Herausforderung an das KEM ist es, in großen Defekten eine klinisch akzeptable Suffizienz in mechanischer Stabilität und Abbauverhalten zu gewährleisten.

## 1.7 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der orthotopen Knochenneubildung am Kraniotomiemodell im Göttinger Minischwein, sowie der Degradation und Resorption von Kalziumphosphatkeramiken. Das Material befindet sich in der

Entwicklungsphase und wird in diesem Projekt erstmalig am Großtier untersucht.

Es werden drei verschiedene KEM jeweils mit und ohne BMP-7 untersucht.

Wie und in welchem Umfang werden die verschiedenen nativen KEM *in vivo* zellulär abgebaut (Resorption) und wie groß ist die Degradation (Auflösbarkeit)? Es ist zu untersuchen, ob der Effekt von BMP-7 hilfreich bei der Ausheilung der gesetzten Defekte ist. Welchen Einfluss und/oder Effekt hat das BMP-7 auf das Abbauverhalten (Resorption) und die Auflösbarkeit (Degradation) der KEM. Inwieweit ist die Verwendung von BMP-7 und KEM essentiell bei der Ausheilung von Defekten kritischer Größe?

Das Ziel dieser Studie beinhaltet nicht nur die Darstellung des Resorptions- und Degradationsverhalten der angewandten verschiedenen Calcium-Phosphat-Keramiken, sondern soll ein knocheninduzierendes Verhalten nachweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

Zehn Göttinger Minischweine wurden in zwei Gruppen (Gruppe I: HA vs. BCP Gruppe II:  $\beta$ -TCP vs. BCP) unterteilt. Der Tierversuch wurde durch die Regierung der Oberpfalz gemäß dem Tierschutzgesetz – TierSchG - §8 Abs.1 genehmigt (Ethikantragsnummer: 54-2531.1-02/07) und aus Mitteln des Bundes vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert (Projektnr.: 3614801). Die Dauer des Versuches beschränkte sich auf 3 Monate.

Fünf Kraniotomie-Bohrungen (Abb. 2, Abb. 3 und Abb. 4) wurden im *os frontale* (Stirnbein) unter Erhalt der Stirnhöhenschleimhaut gesetzt (Durchmesser 14mm): Zwei Implantate je Gruppe wurden mit je 250 $\mu$ l Bone Morphogenetic Protein – 7 (BMP-7) befüllt, dies wurde mit einer Pipette *in situ* durchgeführt. Die anderen identischen beiden Kalziumphosphakeramiken blieben ohne Vorbehandlung. Die Keramiken wurden in einem

alternierenden Rotationsverfahren in den verschiedenen Tieren implantiert.

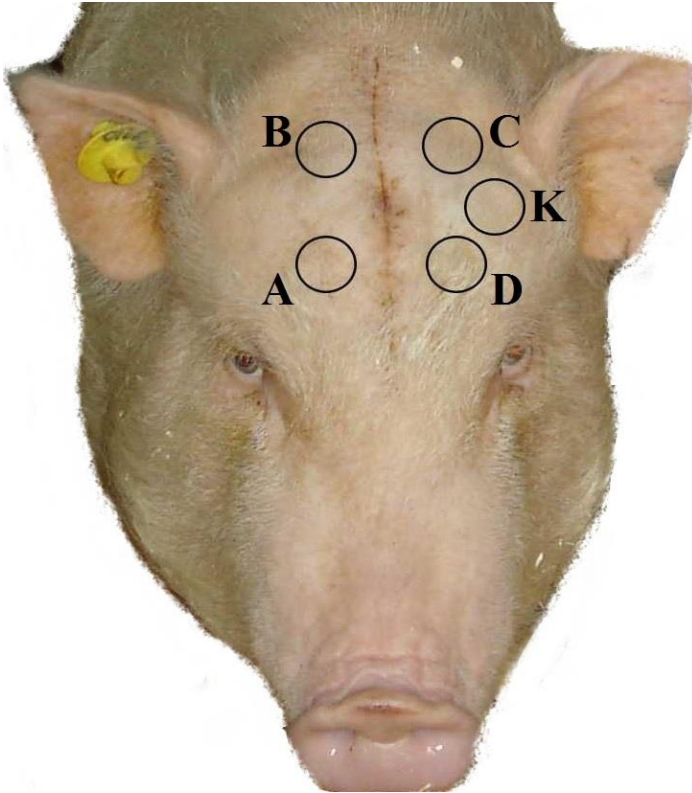


Abb. 2: OP-Schema zur Skizzierung der Implantatpositionen (Aufnahme *post OP*) ; A-D + K orthotope Positionierung der Keramiken

Das fünfte Bohrloch diente als Kontrolle (K) ohne Knochenimplantat. Die verschiedenen CaP – Keramiken sind Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit und eine biphasische Keramik aus 60 Anteilen Hydroxylapatit und 40 Teilen Tricalciumphosphat (folgend mit TCP, HA und HA60 abgekürzt). Jede CaP-Keramik wurde mit und ohne BMP-7 implantiert. Daraus erschlossen sich konsequenterweise 6 verschiedene Gruppen, die man vergleichen konnte. Diese waren:

Gruppe 1 : nHA60 = 5;

Gruppe 2 : nHA60 mit BMP-7 = 5;

Gruppe 3 : nHA = 10;

Gruppe 4 : nHA mit BMP-7 = 10;

Gruppe 5 : nTCP = 5 und

Gruppe 6 : nTCP mit BMP-7 = 5

Die Operation wurde in Intubationsnarkose von einer Fachärztin für Anästhesie (Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Regensburg) durchgeführt.

Bei 6 Tieren (drei Tiere pro Gruppe) wurde nach einer Woche eine Computertomographie in intravenöser Narkose bei Spontanatmung durchgeführt. Hier konnte die korrekte Implantatposition und die Ausgangsdichte der Implantate sowie der Zustand des Kontrolldefektes dokumentiert werden.

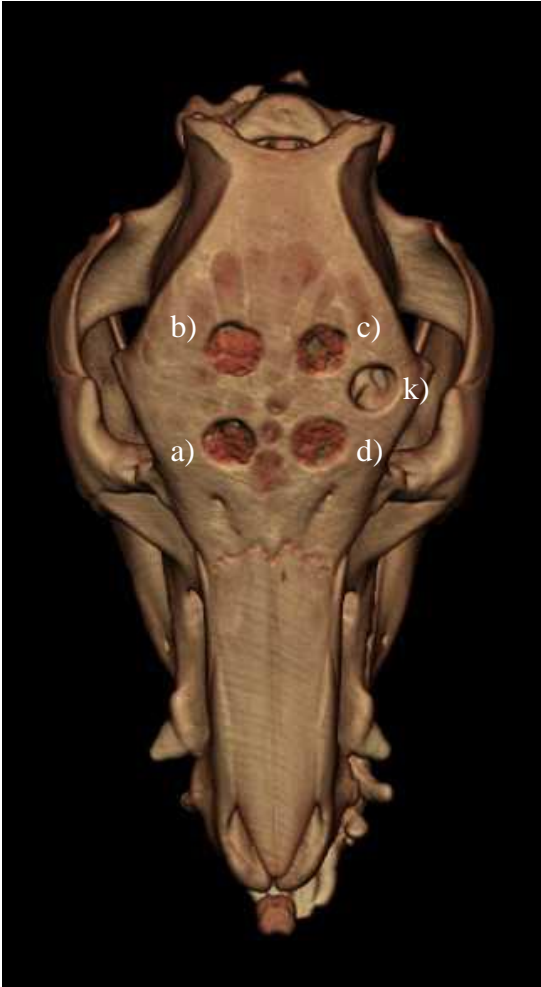


Abb. 3: Computertomographie, 3D rekonstruiertes Bild des Schädels eines Minischweins mit 5 Kraniotomiebohrungen, 1 Woche *post OP*: a)-d) zeigen 4 orthotop gesetzte Calciumphosphatkeramiken; k) Kontrollbohrung, Tier 7

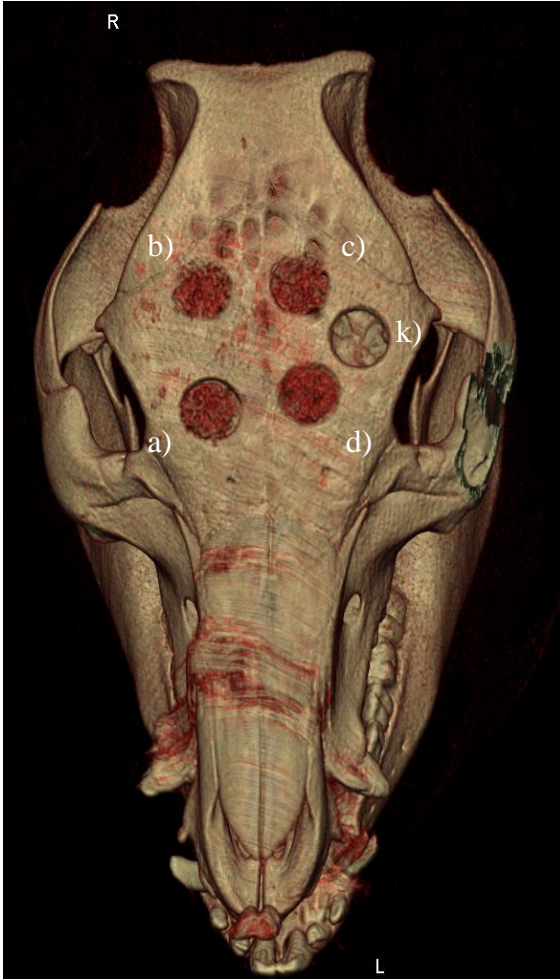


Abb. 4: Computertomographie, 3D rekonstruiertes Bild des Schädels eines Minischweins mit 5 Kraniotomiebohrungen, 1 Woche *post OP*:  
a)-d) zeigen 4 orthotop gesetzte Calciumphosphatkeramiken;  
k) Kontrollbohrung, Tier 7

Des Weiteren wurden zur Verlaufskontrolle je Tier zwei weitere *in vivo* CT-Aufnahmen 10 und 14 Wochen *post operationem* durchgeführt.

Zwei Wochen *postoperativ* wurden bereits Fluorochrome (siehe 2.6.3) zur zeitlichen Markierung der Knochenneubildung *intraperitoneal* eingespritzt (Roldán et al. 2004). Die Versuchsdauer lag bei 14 Wochen, danach wurden die Tiere geopfert.

Die Präparate wurden mittig geteilt und jeweils als unentkalkte Hartschliffe in Methylmethacrylat hergestellt (siehe 2.7.3.1) und entkalkt in Paraffin eingebettet (siehe 2.7.3.2). Die Hartschliffe wurden anschließend histomorphometrisch durch Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) sowie mit dem Confocal Laser Scanning Mikroskop (CLSM) ausgewertet.

Das Interessante an der Studie für die ESEM- und CLSM-Auswertung ist die nicht destruktive Technik. Der gesamte Methylmethacrylatblock wurde lediglich poliert und evaluiert. In der konventionellen Technik (Mikroradiographie) werden Proben auf Objektträger geklebt und diese auf 90 µl abgeschliffen.

Die Fluoreszenzmarkierung wurde nach den Untersuchungen am ESEM und CLSM ebenfalls am Fluoreszenzmikroskop (konventionelle Technik) evaluiert. Histologische Untersuchungen wurden mit Pentachromfärbung nach Movat, TRAP-Färbung (Tartrat – Resistenten – Acid - Phosphatase) und Giemsa-Färbung durchgeführt.

Die Präparate zur Unterscheidung von Hart- und Weichgewebekomponenten können durch die Movat Pentachromfärbung (1955) bzw. durch die modifizierte Pentachromfärbung nach Russell (1972) erzielt werden. Mineralisierte Substanzen wie Knochen werden dabei in leuchtend gelben Farbnuancen und nicht mineralisierter Knorpel dagegen im grünen bis blauen Farbspektrum gezeigt. Bindegewebe stellt sich in Blau-Grüntönen dar. Die eindeutige Differenzierung der unterschiedlichen Gewebe ist auf Grund des Farbenreichtums leicht möglich.

Die Darstellung der Osteoklasten wird mit Hilfe einer TRAP-Färbung (Tartrat-resistenten acid Phosphatase) durchgeführt. Diese Tartrat-resistente saure Phosphatase katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäure-Ester unter sauren Bedingungen und kann auch bis zu einem Wert von pH 8 aktiv sein. Die Giemsa-Färbung dient zur Übersicht und Darstellung

morphologischer und histologischen Strukturen der Präparate. Mit Hilfe dieser Färbungen können entzündliche Reaktionen detektiert werden. Interessant bei der Giemsa-Färbung ist die klare Darstellung des Knochenmarks (zelluläre Anteile).

## 2.2 Auswahl der Versuchstiere und Tierhaltung

Das Göttinger Minischwein (Ellegaard Göttingen Minipigs ApS, Dalmose, Dänemark) wurde als Tiermodell ausgewählt, da es sich in der Knochenforschung auf Grund des zum Menschen ähnlichen Knochenstoffwechsels bewährt hat. Die Knochenregenerationsrate des Minischweins liegt bei  $1,2\mu\text{m/d}$  –  $1,5\mu\text{m/d}$ , welche im Vergleich zur Knochenregenerationsrate des Menschen steht, die bei  $1\mu\text{m/d}$  –  $1,5\mu\text{m/d}$  liegt. (Hönig und Merten 1993). Der Versuch basiert auf dem Modell von Mooren et al. (2007). Er untersuchte Defekte kritischer Größe desselben Ausmaßes (14mm im Durchmesser). Dieses Modell wurde in der vorliegenden Studie übernommen. Die Tiere ( $n=10$ ) hatten ein durchschnittliches Alter von 36 Monaten und wogen zwischen 33 und 41 Kilogramm. Sie wurden in Einzelkäfigen (2 Meter x 3,5 Meter) auf Streuuntergrund im

Tierstall der Universität Regensburg unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Universität gehalten.

Die Tiere konnten sich frei bewegen. Sie erhielten über den gesamten Versuchszeitraum täglich 2 x 250 Gramm Standardtiernahrung (Atromin 9023®, Atromin International GmbH, Heppenheim, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Raumtemperatur betrug 20°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 60 – 70%. Unter Einhaltung eines zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus wurden die Käfige zwei Mal täglich gereinigt.

Der intra-individuelle Vergleich des zu untersuchenden Materials erlaubt mittels multiplen Kraniotomien die Anwendung einer kleinen Tierzahl mit einer geringen Variabilität.

### 2.3 Knochenersatzmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CaP-Keramiken sind im Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien entwickelt worden. Die Studie basiert auf drei Materialzusammensetzungen; reines Hydroxylapatit (HA),

reines  $\beta$ -Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat (BCP) im Verhältnis 60/40 (Gew.-%) die ebenfalls am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien in Einzelanfertigung hergestellt wurden. Sie weisen eine Porosität von 92 Vol.% auf.

#### 2.4 Rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein – 7 (rhBMP-7), auch Osteogenic Protein – 1 (OP-1)

Das rekombinante humane Bone Morphogenetic Protein – 7 (rhBMP-7) wurde als Lyophilisat von der Firma Genera (Krapinske Toplice, Kroatien) in Zusammenarbeit mit Professor Vukicevic (Laboratory of Mineralized Tissues, Center for Translational and Clinical Research, School of Medicine, Zagreb University, Kroatien) zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Narkoseverfahren

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte durch die Injektion von 30 mg Ketamin (Ketavet®, Parke- Davis und Comp, München) und 2 mg Xylazin (Rompun®, Bayer-Leverkusen) in den *musculus glutaesus maximus*. Anschließend wurden Nadelelektroden zur elektrokardiographischen Überwachung in die Extremitäten eingebracht. Nach dem Absaugen von Speichel und Praeoxigenation mit einhundertprozentigem Sauerstoff erfolgte die endotracheale Intubation in Bauchlage mit einem Miller Laryngoskop (Größe 4) und einem blockbaren Standardtubus (Größe 5,5, Portex, Kent, England) mit Hilfe eines Führungsdrahtes und McGill-Zange (Abb. 5, Abb. 6 und Abb. 7). Die Intubationsnarkose wurde mit 66% N<sub>2</sub>O, 32% O<sub>2</sub> und 2% Isofluran (Florene®, Abott GmbH, Wiesbaden) bei einem Atemvolumen von 400ml und einer Atemfrequenz von 20 Atemzügen pro Minute durchgeführt. Die postoperative Schmerztherapie wurde durch die intramuskuläre Injektion (*M. glutaesus maximus*) von 1g Metamizol (Novaminsulfon-Rathiofarm®) vorgenommen.

Die praeoperative antibiotische Abschirmung wurde mit 1g Clemizol-Penicillin (Clemizol-Penicillin i.m. forte®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) durchgeführt.

Zur intraperitonealen Injektion von Fluorochromen im Rahmen der Sequenzmarkierung wurden die Tiere mit 250mg Zolazepam / 250mg Tiletamin i.m. (Tilest®, 500 Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) sediert.



Abb. 5: Endotracheale Intubation beim Minischwein in Bauchlage

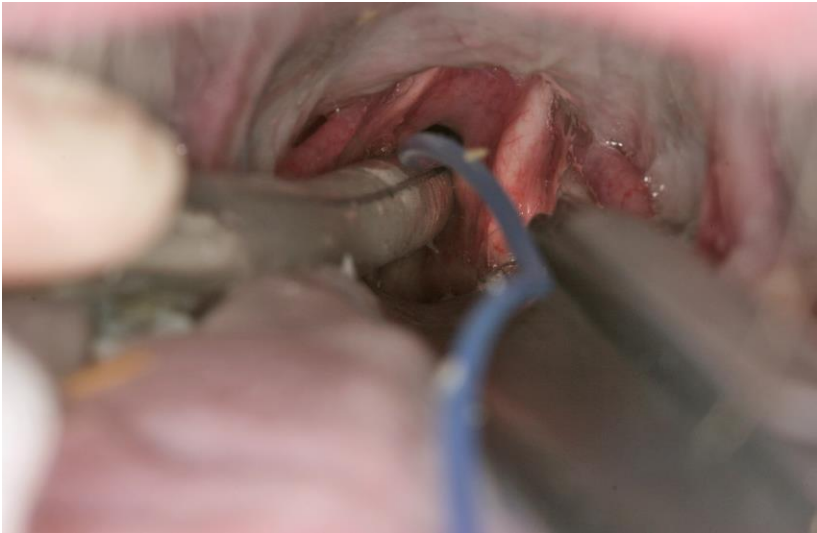


Abb. 6: Endotracheale Intubation beim Minischwein in Bauchlage



Abb. 7: Durchgeführte Intubationsnarkose, Lagerung und Anschlüsse vor regionaler Desinfektion vor dem Eingriff

## 2.6 Versuchsdurchführung / Operation

### 2.6.1 Operationsvorbereitung

Die Tiere wurden in Bauchlage gelagert. Das Operationsgebiet wurde mit einer Schere und einem Einmalrasierer von den Borsten befreit und mit Povidon-Jod-Lösung (Betasisodona®,

Mundipharma) oberflächendesinfiziert. Das Tier wurde mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Die Anzeichnung der Schnittführung erfolgte mit einem herkömmlichen OP – Stift sagittal der Kalotte. Xylocain® 0,5% mit Adrenalinzusatz (Lidocain, Astra, Schweden) wurde vor dem Operationsbeginn eingespritzt.

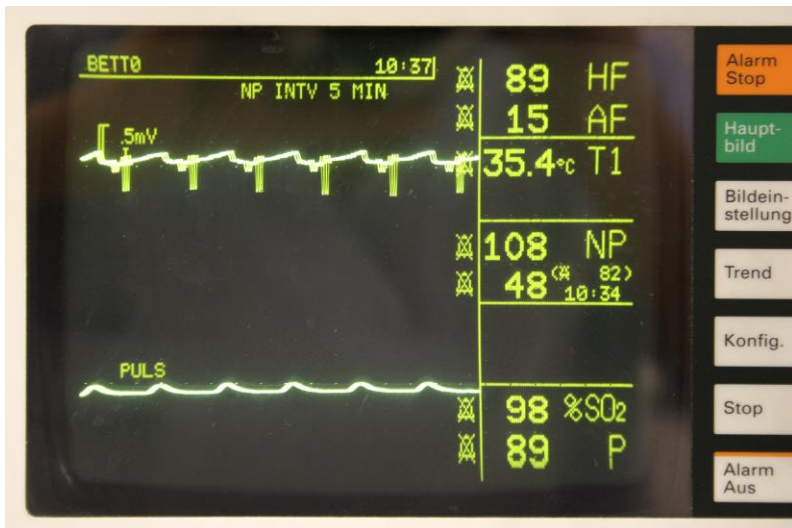


Abb. 8: Intubationsnarkose; intra-operative Überwachung der Vitalparameter eines Göttinger Minischweins

## 2.6.2 Operationsdurchführung

Der 15cm lange Zugang zur Schädelkalotte begann mit einer Schnittführung median in Höhe des *Os occipitale* (Hinterhauptsbein). Zunächst wurde die Schwarte mit einem Skalpell aufgetrennt, weiterhin erfolgte ein Schnitt des subkutanen Gewebes, der Muskelanteile (*M. epicranius*) und schließlich die Schlitzung des Periosts. Es erfolgte die subperiostale Präparation des fazialen Stirnbeins mit Darstellung der *Sutura frontalis*. Die Sutura wurde mit der Castellani-Lösung markiert (Abb. 9). Unter sorgfältiger Kühlung wurden mit einer physiologischen Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und unter Verwendung eines Kraniotoms (Aeskulap 6,4mm, Tuttlingen, Deutschland) die 4 Implantatlager 0,5cm links und rechts der *Sutura frontalis* kraniotomiert. Mit Hilfe einer Kugelfräse wurden die entstandenen Knochenfenster bis zum Sichtbarwerden der Nebenhöhlensepten und der Stirnhöhenschleimhaut abgetragen (Abb. 10 und Abb. 11). Zur Schonung und Erhaltung der Stirnhöhenschleimhaut wurde diese mit dem Elevatorium H. Zepf-Sinus (Altatec®, Wurmberg,

Deutschland) vorsichtig mobilisiert. Die Durchmesser der Knochenfenster wurden so gewählt, dass die CaP-Keramiken ( $d=1\text{cm}$ ) bündig an der Kompakta abgeschlossen haben (Abb. 12). Die Tiefe betrug abweichend von Tier zu Tier 4-5mm. Der interimplantäre Abstand betrug 1cm. Die Kontrolldefekte wurden intermittierend links – rechts gelegt. Die identischen Bohrungen dienten der Platzierung der standardisierten Keramikimplantate (Durchmesser = 1,5cm, Höhe 5mm) (Abb. 12). Alle Bohrungen wurden identisch angelegt. Alle Tiere ( $n=10$ ) à 2 Versuchsgruppen (HA vs. BCP und TCP vs. BCP) wurden mit CaP-Keramiken versorgt. Jeweils eine der beiden Keramiken wurde mit 250  $\mu\text{g}$  BMP-7 in Pufferlösung befüllt (Abb. 12). Die Wunde wurde schichtweise vernäht (Abb. 13 und Abb. 14).

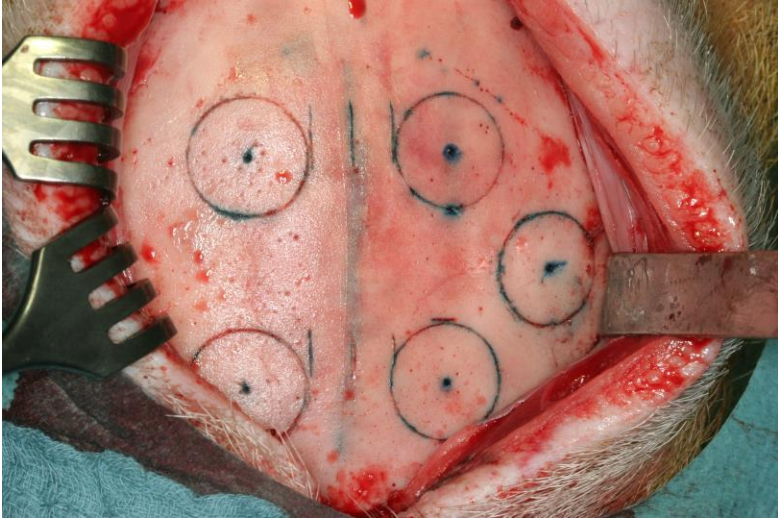


Abb. 9: Darstellung des OP – Situs vor Kraniektomie

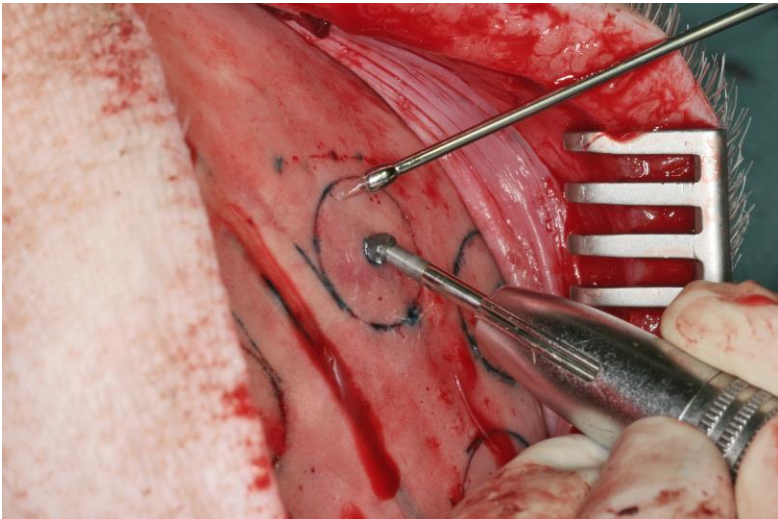


Abb. 10: Anrauen des Areal für die Aufnahme des Kraniotoms unter manueller Wasserkühlung



Abb. 11: Kraniotomie unter manueller Wasserkühlung

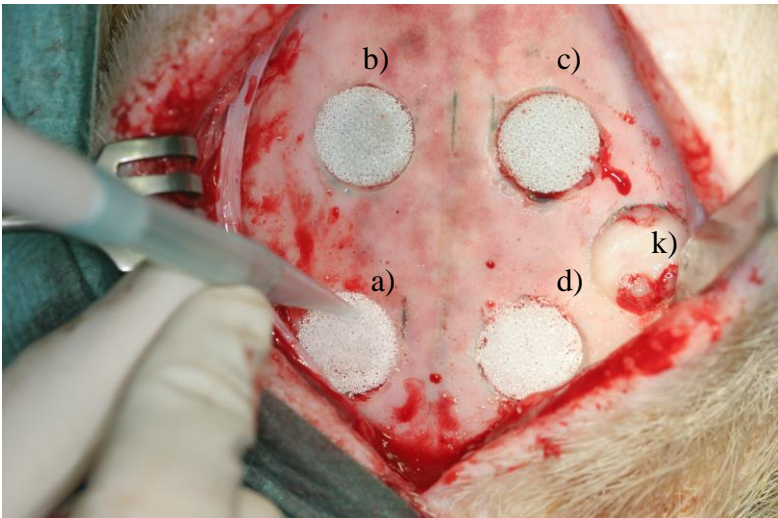


Abb. 12: Darstellung der CaP – Kermiken; a)-b) Beschichtung mit BMP-7 mittels Pipette, c)-d) native CaP – Keramiken, k) Kontrollbohrung



Abb. 13: *Intraoperativer* Verschluss des OP – Bereichs durch Vicrylnaht der Galea, *sub-* und *intrakutaner* Gewebe (hier nicht darstellbar) und kutanen Einzelknopfnähten mit 3/0 Polyamid



Abb. 14: exemplarische Darstellung einer suffizienten Hautnaht eine Woche *postoperativ* ohne Zeichen etwaiger Entzündungen

### 2.6.3 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

Die intraperitoneale Injektion von Fluorochromen markiert die Knochenapposition (Rahn 1976). Die intravitale Fluorochrom-Sequenz-Markierung wurde intraperitoneal in intravenöser Narkose (500mg Ketamin / 2ml Stresnil + Atropinsulfat 0,5mg/ml) durchgeführt. Die Apposition der Marker erfolgten in der 1., 6., 8. und 12 postoperativen Woche wie folgt: (in selbiger Reihenfolge) Xylenolorange 6% (1,5ml/kg KG),

Calcein grün 1% (5ml/kg KG), Alizarinkomplexon (0,8ml/kg KG) und Doxycyclin (1ml/kg KG) (Roldán et al. 2008).

#### 2.6.4 Intravitale Perfusion

Die Tiere wurden 14 Wochen postoperativ durch eine intravitale kardiale Perfusion in Intubationsnarkose geopfert. Eine mediane Thorakotomie wurde mit einer oszillierenden Säge durchgeführt. Unter sorgfältiger Blutstillung wurde das Perikard eröffnet, ohne einen Pneumothorax zu verursachen. Die Aortawurzel wurde vom Perikard präpariert und mit einem Band umschlungen. Der linke Ventrikel wurde anschließend mit einem Skalpell Nr. 11 stichförmig eröffnet. Eine Kanüle, mit einer aus Kunststoff geformten Kugel an der Spitze, wurde dann in dem Ventrikel bis zur Aortenwurzel eingeschoben. Die Kanüle wurde unterhalb der Kugel mit dem eingeschlungenem Band an der Aortenwurzel gegen Zurückgleiten gesichert.

In den linken Ventrikel wurde zunächst zum Hervorrufen eines sofortigen Herzstillstands eine kardioplege Perfusion appliziert (Potassium). Die *Vena cava* und der rechte Vorhof wurden eröffnet. Anschließend begann die intrakardiale Perfusion.

Jedes Tieres wurde mit 10 Litern 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, gefolgt von 500ml Fixierungslösung (Sörensen-Lösung – 2,5% Glutaraldehydlösung, 1,5% Formaldehyd und Sörensenpuffer mit pH 7,4) unter einem konstanten Druck von 120mmHg und einer Temperatur von 37°C. Die Perfusion (siehe Abb. 15) wurde in Kooperation mit der Sektion Kardiotechnik der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg vorgenommen.

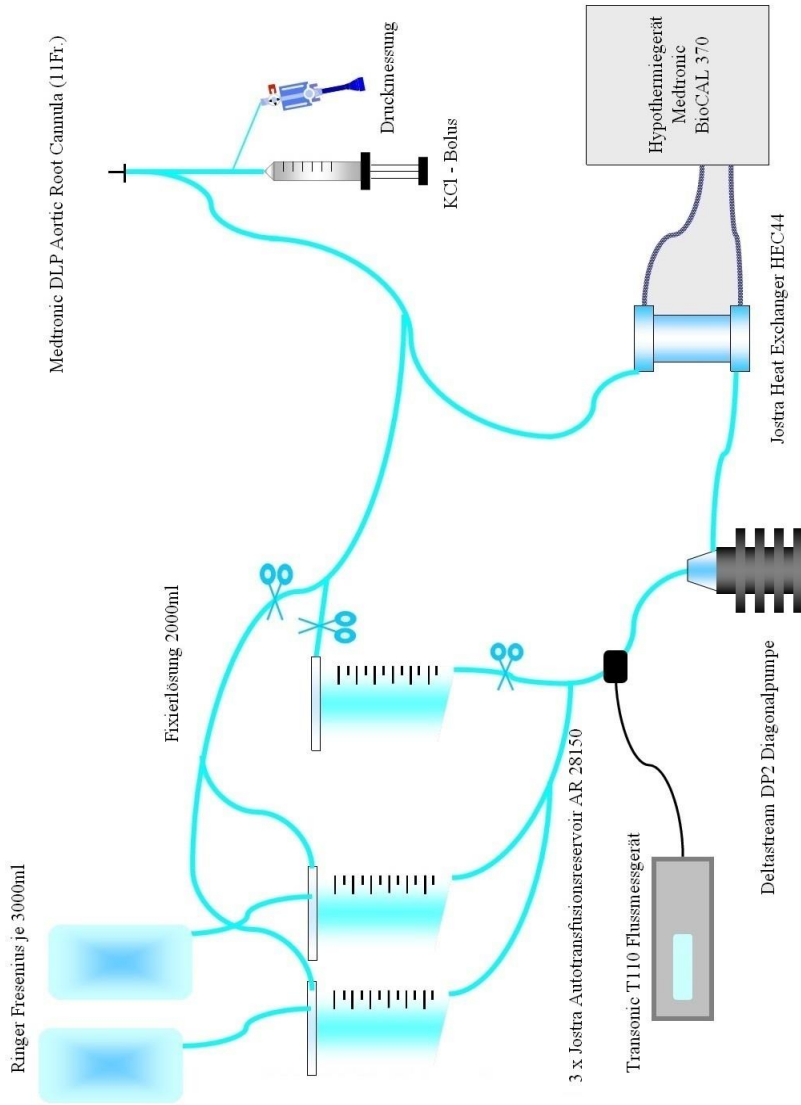


Abb. 15: Perfusionsschema (Quelle: Kardiotechnik HTC Universität Regensburg, mit freundlicher Genehmigung)

### 2.6.5 Explantation

Die Explantationen erfolgten unmittelbar nach durchlaufener Perfusion (Abb. 15). Die Tiere wurden nach dem Durchtrennen der Schwarte, des Subkutangewebes, der muskulären Anteile und dem Freilegen der knöchernen Strukturen mit einer Handsäge kaudal des Occiputs dekapitiert. Die Gewebefixierung der *in situ* befindlichen Präparate erfolgte dann mit 4%iger Formaldehyd-Lösung für 10 Tage. Nach Ablauf der Zeit wurden die Präparate bei  $-18^{\circ}\text{C}$  im Anatomischen Institut der Universität Regensburg eingefroren, da ein zusammenhängendes Bearbeiten des Knochen- und des ihm umgebenden Weichgewebes lediglich im kryogenen Zustand möglich war.

## 2.7 Analysemethoden

### 2.7.1 Computertomographie

Es wurden Computertomographie (CT)- Aufnahmen zur Bestimmung des Volumens, der Höhe und der Röntgendichte (HU) der implantierten Knochenersatzmaterialien in Kooperation mit dem Institut für Röntgendiagnostik des Universitätsklinikums Regensburg mit einem (Siemens Somatom Plus 4/Sensation 16, 120kV, 33mAs, Algorithmus „Ultralight“, 1mm Schichtdicke und Tischvorschub) (Abb. 16) und der Auswertungssoftware / dem Bildbearbeitungsprogramm (syngo 3D Workstation Leonardo) durchgeführt. Die Messungen erfolgten *in vivo* (Abb. 16) in intravenöser Narkose bei spontaner Atmung (500mg Ketamin / 2ml Stresnil + Atropinsulfat 0,5 mg/ml) in der 1., 10. und 14. Woche. Die gesetzten Implantate sind in den CT-Aufnahmen im Schädel deutlich zu erkennen. Etwaige Veränderungen in Bezug auf Lage und Größe in der belüfteten Stirnhöhle konnten vor der Explantation festgestellt werden.



Abb. 16: Vorbereitung einer CT – Aufnahme in *intravenöser* Narkose des Minischweins im Siemens Somatom Plus 4/Sensation 16

## 2.7.2 Makroradiographie / Kontaktröntgenaufnahmen

Für die Vorbereitung der Feinschnittpräparate wurden die gefrorenen Explantate grob zurechtgeschnitten, um diese zusätzlich zu den computertomographischen Aufnahmen für makroskopische Röntgenaufnahmen mit einem Siemens Multigraphen (Abb. 17) vorzubereiten. Die Kontaktaufnahmen wurden *post mortem* zur Lokalisierung der *in situ* befindlichen Präparate angefertigt und dienten zur Orientierung und Navigation der Explantation der noch *in situ* befindlichen Keramiken. Zur Handhabung der korrekten Säge- und Schnittführung und der eindeutigen Lokalisierung der Keramiken wurden bei den Kontaktröntgenaufnahmen ein Lineal, seitliche und basale Markierungshilfen und im Schädelexplantat befindliche 3 Metallpins auf einer Plexiglasscheibe befestigt (Abb. 18).

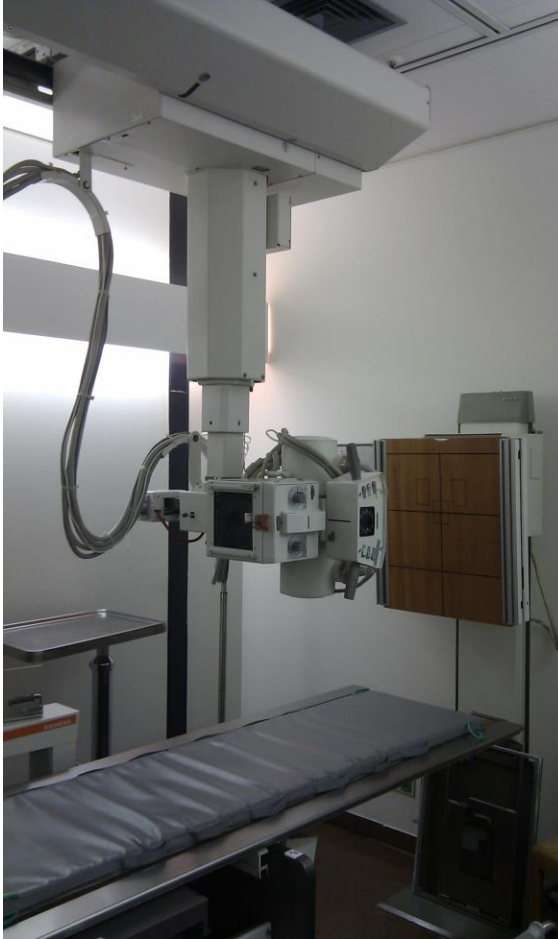


Abb. 17: Siemens Multigraph zur Durchführung der Kontaktaufnahmen (vor dem Feinschnitt zur Lagebestimmung) und Kontrollaufnahmen (nach dem Feinschnitt zur Erfolgskontrolle ggf. zum Zweitschnitt)

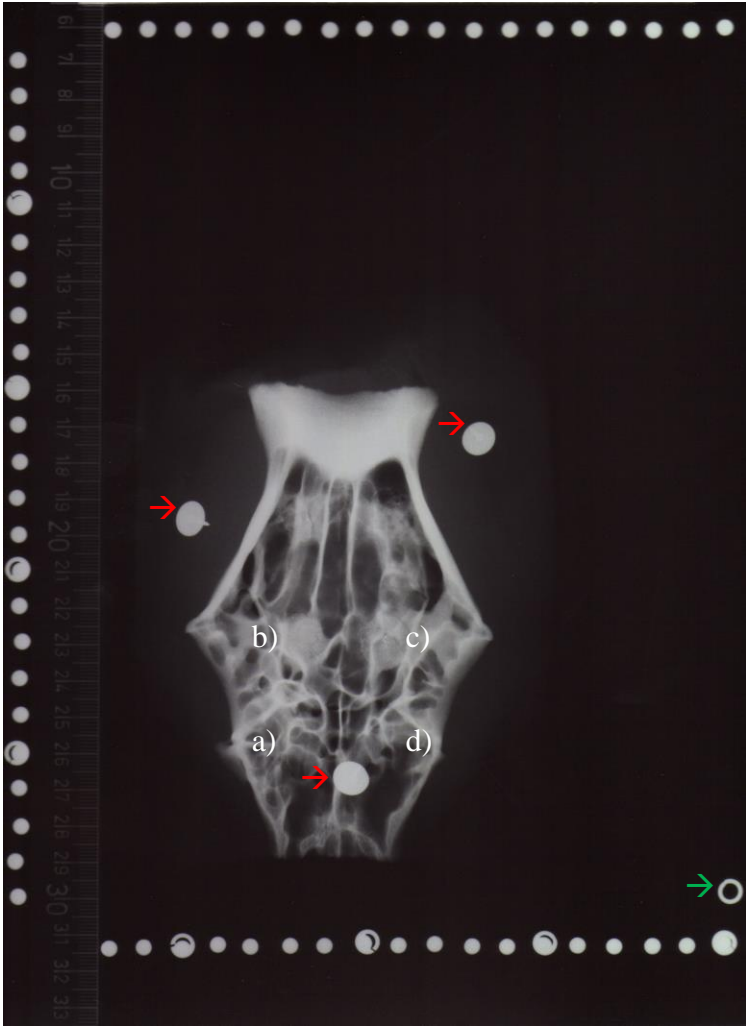


Abb. 18: Kontaktströntgenaufnahme (Siemens Multigraph, 40kV, 2,2 mAs) zur Herstellung einer Übersicht und zur Positionsbestimmung der integrierten CaP – Keramiken; Tier 1, a-d) Positionen der CaP-Keramiken, rote Pfeile Orientierungshilfe (Metallpins), grüner Pfeil Lagebestimmung (links) und gleichzeitig Nummerierung des Versuchstiers

### 2.7.3 Herstellung der Präparate

Im Anatomischen Institut der Universität Regensburg begann die Präparatherstellung mit dem groben Zurechtsägen der tiefgefrorenen Schweineköpfe mit einer Metallbandsäge (Fa. Stahlgruber, München) (Abb. 19) bis die Schädelkalotte mit Subkutangewebe, Schwarte und Septen der Stirnhöhle mit dem Sicherheitsabstandabstand 1,5cm zum KEM übrig blieben.



Abb. 19: Metallbandsäge (Fa. Stahlgruber, München) zum groben Zurechttrimmen der Explantate für die Feinschnittanfertigung

Nach dem Anlegen von Markierungslinien, die die präzise Trennung der einzelnen Areale erheblich erleichterte, wurden die Grobschnitte mit Hilfe von Skalpell, kleinen Hand- und Mikrobandsägen in 5 Teile zerlegt (incl. der Kontrollbohrungen), die den entsprechenden Implantatpositionen respektive Kontrolldefekten entsprachen (Abb. 20 a) und b)).



a)



b)

Abb. 20 a) und b): Herstellung der Feinschitte; a) mit einer Mikrobandsäge (Fa. Stahlgruber, München), b) mit einer herkömmlichen kleinen Handsäge, Skalpell und Pinzette, (roter Pfeil) Metallpin zur Markierung

Jedes der einzelnen Explantate wurde ein weiteres Mal mittig äquatorial durchtrennt, um die eine Hälfte für die Herstellung der nicht entkalkten Hartschliffe und die andere für entkalkte Paraffineinbettung auf- und vorzubereiten (Abb. 21 und Abb. 22).

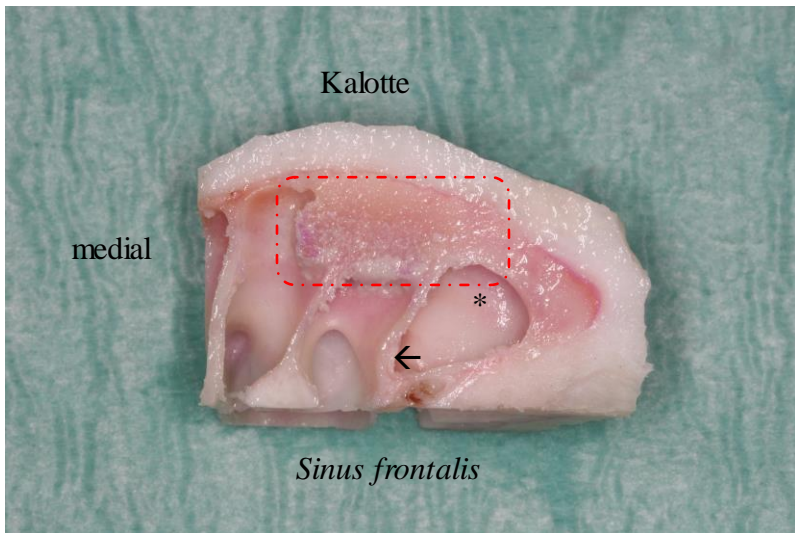


Abb. 21: Darstellung einer äquatorial geschnittenen CaP-Keramik (rote Markierung) im Feinschnittpräparat in koronarer Aufsicht, Integration der Keramik in die Kalotte, gut zu erkennen die von vielen Septen (Pfeile) durchzogene (\*) *Sinus frontalis*, Tier 3 Präparat A1

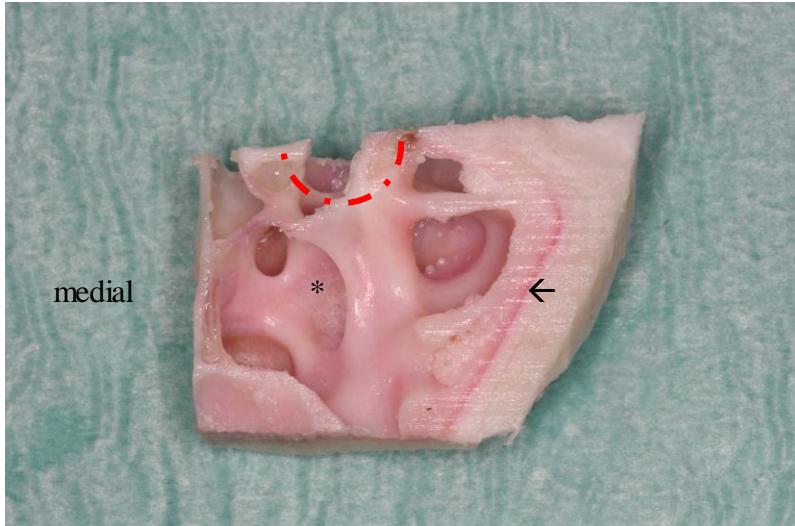


Abb. 22: Darstellung einer äquatorial geschnittenen CaP-Keramik (im Bild schematisch eingezeichnet) im Feinschittepräparat in axialer Aufsicht, korrespondierendes Bild zu Abb. 21. Darstellung des *Sinus frontalis*, Das Präparat liegt auf der Kalotte (Innenseite), Farbablagerungen entlang der unangetasteten äußeren Schädelkalotte zeigen Knochenablagerung oder -umbauprozesse (Pfeil), \* gut erkennbare stark zerklüftete Stirnhöhle ohne Zeichen für Infekt oder abgelaufene Entzündung, Tier 3 Präpart A1

Zur Kontrolle der Lage der KEM in den Präparaten wurden jeweils erneute Kontaktaufnahmen angefertigt (Abb 23).

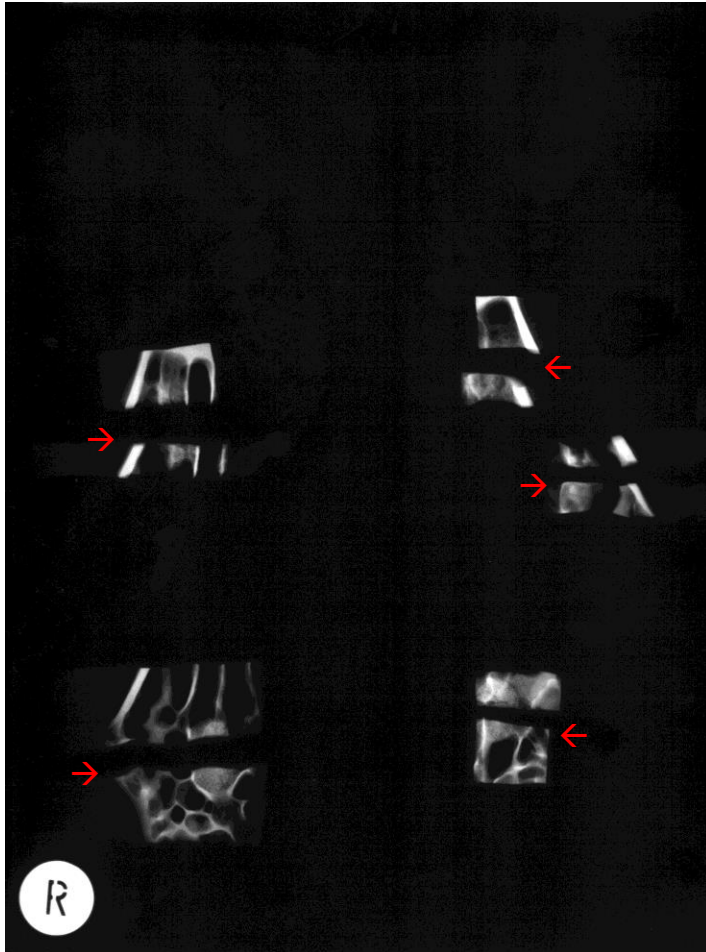


Abb. 23: Kontaktströmgenaufnahme: Prüfung der Feinschnitte vor der Weiterverarbeitung, (rote Pfeile) Schnittfugen, hier am Bsp. von Tier 1

### 2.7.3.1 Herstellung der unentkalkten Hartschliffpräparate

Die Herstellung der unentkalkten, in Methacrylat eingebetteten Hartschliffpräparate, erfolgte nach der Methode von Donath und Breuner (1982).

Die Präparatblöcke wurden für 5 Tage in 4% Formalin, Phosphatpuffer nach Sörensen und 70% Isopropylalkohol zur Fixierung eingelegt. Die Präparate wurden graduell in aufsteigender Alkoholreihe in Behältern dehydriert und für eine Woche in Methylmethacrylat-Monomer [Lösung aus 500mg Methacrylsäuremethylester und 3g Azoisobutyronitril (Fulka Chemie AG, Darmstadt), 100ml Nonylphenolpolyglycolaetheracetat (Walter GmbH, Kiel) und 5ml Phthalsäuredibutylester (Mer AG, Darmstadt)] eingebettet. Die Polymerisation erfolgte über 2 Wochen im Wasserbad bei 38°C. Nach dem Erhärten wurden die Präparate auf einem Mikroschleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland) zurechtgeschliffen, sodass eine einheitliche Präparatoberfläche entstand. Die Hochglanz-Oberflächenpolitur erfolgte mit Silikonkarbidpapier der Körnungen 800, 100, 1200, 2400, 4000 und 8000 µm.

### 2.7.3.2 Herstellung der Paraffinpräparate

Die einzelnen Explantate wurden folgend nach ihrer Formalinfixierung mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Entkalkung der Proben für die Paraffineinbettung erfolgte mit EDTA. Die angesetzte EDTA-Lösung (5%) wurde auf 30 – 35°C erhitzt und mit einem Rührfisch ständig in Bewegung gehalten. Das wöchentliche Ansetzen einer neuen Lösung war obligat. Nach über einem Jahr laufender Entkalkung sind noch Apatit und CaP-Rückstände im Präparat vorhanden.

### 2.7.4 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Um die Integrität der CaP-Keramik zu untersuchen, wurden die unentkalkten Präparate in Methymethacrylat zu Blöcken zugeschnitten und am Environmental Scanning Electron Microscope im ESEM-Labor des Friedrich-Baur-Forschungsinstituts für Biomaterialien in Bayreuth aufgenommen. Es ist bei diesem Verfahren darauf zu achten, dass die Präparate nicht wie bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM – am gleichen Gerät

durchführbar) mit Metall bedampft werden, sondern unter dem Vakuum und mit hoher Spannung abgetastet werden. Das lange fokussierte Verweilen auf einem Abschnitt des im PMMA gebetteten Präparats führt zu einem Aufweichen durch Schmelzen und damit zu einem Verlust von Daten. Eine fachkundige Einstellung des Drucks und der angelegten Spannung ist zwingende Voraussetzung zur Durchführung der Gewinnung der Bilder. Die zentrale Fläche des hochglanzpolierten Präparates wurde unter einem Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM, Quanta 200, FEI, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 15kV und einem Druck von 0,5 – 0,6 mbar untersucht. Die Aufnahmen zur Evaluierung der Knochen- und Keramikanteile wurden standardisiert mit einer 150 fachen Vergrößerung aufgenommen. Übersichtsaufnahmen konnten auf Grund der eingeschränkten Objektivweite bedingt durch die Hardware nur in Schnittbildern angefertigt und im Nachhinein als rekonstruiertes Panoramabild mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop 2.0, San Jose, Kalifornien, USA) angefertigt werden.

Die Aufnahmen der Mineralisierung des Implantates und des Keramikabbaus wurden zur Quantifizierung mit Hilfe einer

Software (analySIS Pro 3.2 Soft Imaging Systems, Münster, Deutschland) ausgewertet.

#### 2.7.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung zeitlicher Knochenneubildung erfolgte durch das Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX16, Hicksville, New York, USA) unter Anwendung eines Universalobjektives zur gleichzeitigen Erkennung unterschiedlicher Farbstoffen mit den unterschiedlichen Wellenlängen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mittels der Analysesoftware Cell P (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland).

#### 2.7.6 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Die qualitative Analyse des Knochenwachstums wurde mit Hilfe des Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 510, Zeiss, Jena, Deutschland) und dem Bearbeitungsprogramm LSM 510 im CLSM-Labor des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg ausgewertet. Die

zeitlich differenzierte Apposition des Osteoids aber auch Remodelingprozesse ließen sich auf Grund der fluorochromen Sequenzmarkierung hiermit nachweisen. Im Vergleich zum einfachen Fluoreszenzmikroskop konnte man die einzelnen Phasen der Mineralisation mit Hilfe der auf die emittierten Wellenlängen abgestimmten Objektive bestimmen. Die Aufnahmen erfolgten in einer Tiefe von 80 µm. Zur multimedialen, exemplarischen Veranschaulichung wurden 3D – Aufnahmen mit einer Schichtdicke von ca. 2mm unterstützend aufgezeichnet.

### 2.7.7 Giemsa-Färbung der Hartschliffe

Die Giemsa-Färbung der Histo-Präparate soll zeigen, ob sich mögliche entzündliche Infiltrate um die Knochenersatzmaterialien und die sich in direkter Nähe befindliche Stirnhöhenschleimhaut etabliert haben.

Sie dient weiterhin der Beurteilung des Knochenmarks und der knochenneubildenden Zellen.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Stata 10.1 (StataCorp. Inc., College Station, TX, USA) und SigmaPlot 11 (SYSTAT Inc, Chicago, IL, USA). Die gemessenen Pixelwerte wurden zunächst graphisch und anschließend formal mit dem Shapiro-Wilk Test auf eine Normalverteilung geprüft. Im Fall von kontinuierlichen, normalverteilten Daten erfolgte der Vergleich mehrerer Gruppen zunächst mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem paarweisem Vergleich mit dem Holm-Sidak Test. Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mit dem Student t-Test. Der Vergleich zwischen mehreren Gruppen von nicht-normalverteilten kontinuierlichen Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, gefolgt von einem paarweisen Vergleich mittels Mann-Whitney Test. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben; nicht-normalverteilte Daten als Median mit Interquartilsbereich. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit SigmaPlot 11 (SYSTAT Inc, Chicago, IL, USA).

Die Mittelwerte der untersuchten Parameter: Der relative Knochenanteil, der relative Keramikanteil, das Knochen-Implantat-Volumen wurden mit einem gepaartem *t*-Test mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  statistisch ausgewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Ergebnisse

Alle Tiere ( $n=10$ ) tolerierten den operativen Eingriff gut. Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 1,5 Stunden und belastete die Tiere kaum. Es gab keine anästhesiologischen oder chirurgischen Komplikationen. Es traten weder Wundinfekte noch Wundheilungsstörungen im Operationsgebiet auf. Jedes der Minischweine nahm ca. 5% an Gewicht zu. Die Euthanasie der Tiere nach 14 Wochen verlief ebenfalls komplikationslos. Die anatomische Beziehung der implantierten Calciumphosphatkeramik zum Schädel ist in der Abbildung 24 nachvollziehbar. Im *Sinus frontalis* sind keine Anzeichen proliferativer Vorgänge oder Fremdkörperreaktionen erkennbar, was für eine exakte OP-Technik und eine gute Bioverträglichkeit spricht.

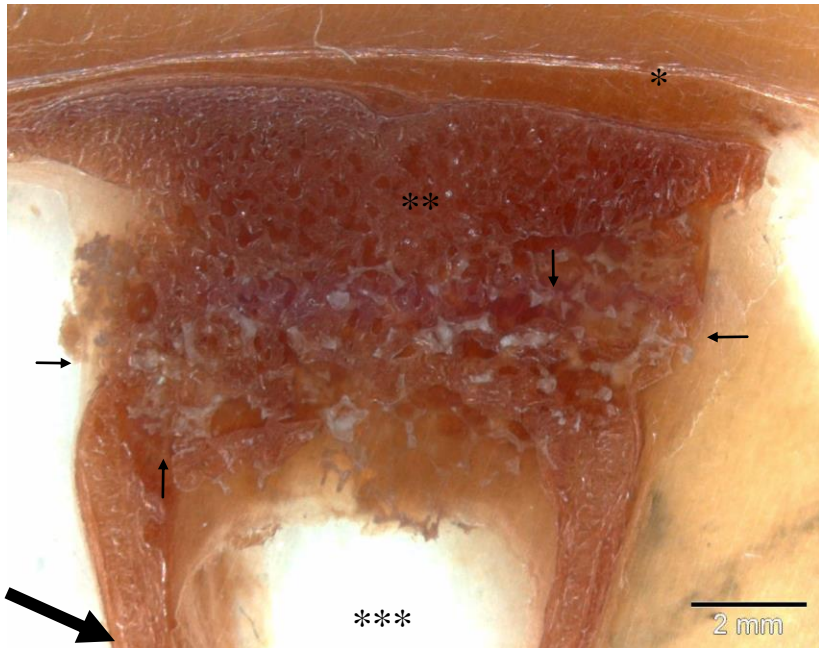


Abb. 24: Schädelpräparat mit implantierter CaP-Keramik in einem koronaren Schnitt eingebettet in Methylmethacrylat (Auflichtmikroskopie): \* Kopfschwarte, sukutanes Gewebe und Muskel (*Musculus frontalis*), \*\* Schädelkalotte mit neu gebildetem Knochen, \*\*\* Sinus frontalis, (kleine Pfeile) vollständig in den Knochen integrierte CaP-Keramik, (große Pfeile) praeformiertes Knochenseptum

### 3.2 Die Computertomographie

In den 3 Untersuchungszeiträumen nach der 1., 10. und 14. Woche wurden weder Anzeichen entzündlicher Reaktionen noch proliferative Prozesse der Stirnhöhenschleimhaut beobachtet. Es können daher Infekte *in vivo* und *ex vivo* ausgeschlossen werden. Die Implantate befanden sich in der Schädelkalotte und teilweise in den Knochensepten. (Abb. 25 und Abb. 26).

Anhand der computertomographischen Analysen am Schädel wurde das Gesamtvolumen der Implantate und des neugebildeten Knochens evaluiert. Auf Grund der sehr hohen Ähnlichkeit der Dichten der Schädelkalotte und der Kalziumphosphatkeramiken konnte eine getrennte Analyse von Knochen und Keramik nicht ermöglicht werden (Abb. 26).

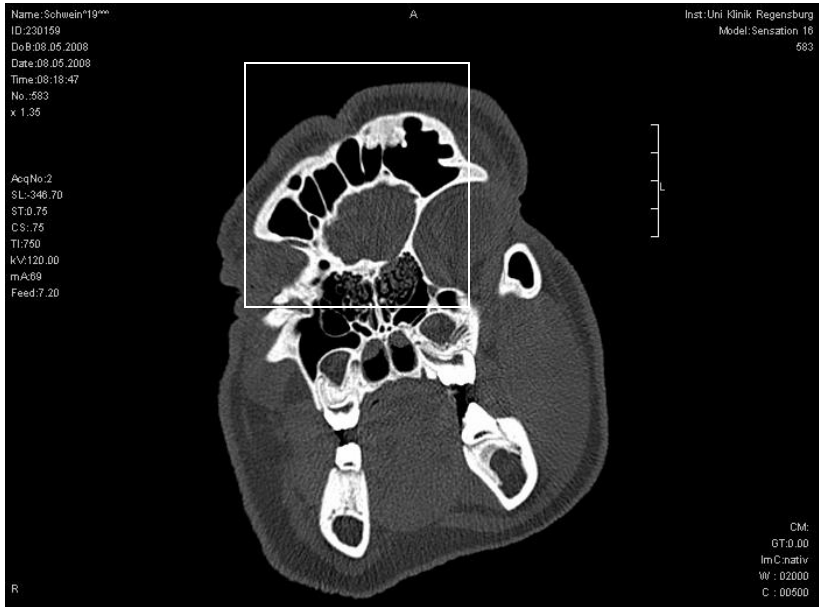


Abb. 25: Computertomographie, koronare Schichtung, Schädel vom Minischwein, Tier 3, 14 Wochen *post OP*: \* ca. 1,5 cm knochendichte Struktur der linken Seite der Kalotte; Ausschnitt (Abb. 26) siehe nächste Seite



Abb. 26: Computertomographie, koronare Schichtung, Schädel vom Minischwein, Tier 3, 14 Wochen *post OP*: Ausschnitt der vorangegangenen Abb. 25, \* CaP-Keramik (HA60 mit BMP-7) basal im Septum und Neugebildeter Knochen apikal in der Kalotte; (Pfeil) CaP-Keramik (HA60) integriert in die Kalotte

Eine Zunahme des Gesamtvolumens konnte in Anwesenheit von BMP-7 im geringen Maße sowohl bei der HA/BMP-7- (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,75\text{ccm}$  auf  $V = 1,05\text{ccm}$  14. Woche *p.o.*) als auch bei der HA60/BMP-7- Gruppe deutlich (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,71\text{ccm}$  auf  $V = 1,14$  14. Woche *p.o.*) festgestellt werden. Eine geringe Verringerung des Gesamtvolumens stellte sich bei der Messung von der HA- (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,76\text{ccm}$  auf  $V = 0,67\text{ccm}$  14. Woche *p.o.*) und der HA60- Gruppe (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,78\text{ccm}$  auf  $V = 0,74\text{ccm}$  14. Woche *p.o.*) heraus. Die Schädelkalotte des Kontrolldefektes (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,45\text{ccm}$  auf  $V = 0,08\text{ccm}$  14. Woche *p.o.*) wuchs nur im unbefriedigender Dicke zusammen (Diag. 1). Das Volumen der TCP - Gruppe reduzierte sich nahezu um die Hälfte (von 1. Woche *p.o.*  $V = 0,73\text{ccm}$  auf  $V = 0,39\text{ccm}$  14. Woche *p.o.*)

Der *Sinus frontalis* breitet sich über den gesamten Schädel aus, da es sich um adulte Minischweine handelte (Abb. 27 und Abb. 28).

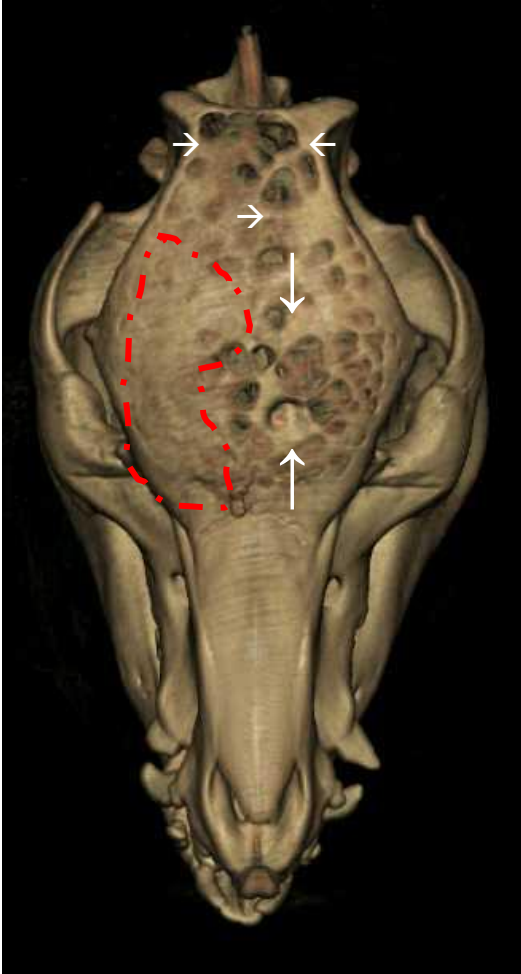
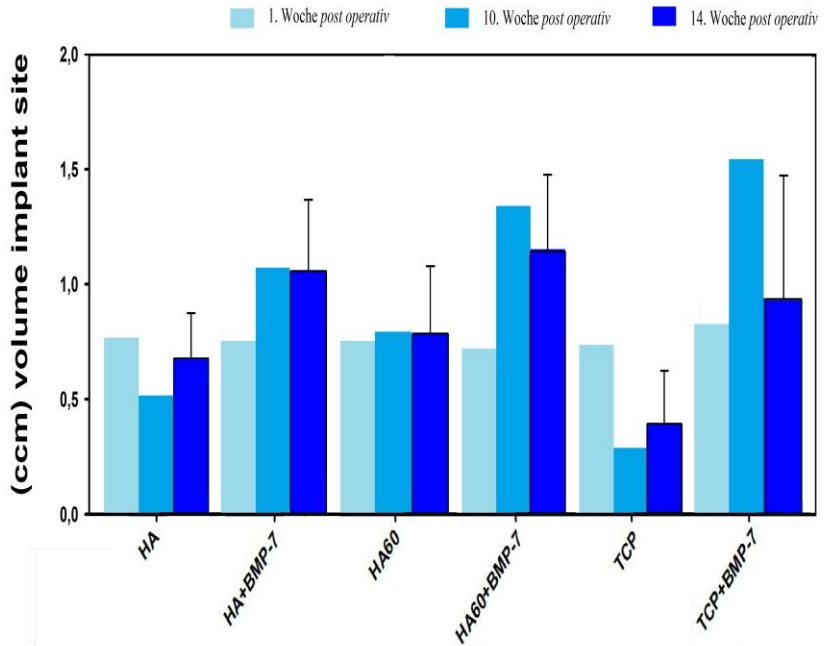


Abb. 27: 3D-Rekonstruktion einer CT-Aufnahme vom Schädel eines Minischweins, 14 Wochen *post operationem*: vollständige Ausheilung der Defekte kritischer Größe, auf Grund der CT-Schichtung von 1mm scheint die Kalotte inhomogen bzw. zerklüftet (Artefakt) (kleine Pfeile), (rotes Areal) röntgenologische Homogenität – Knochendicke von mind. ca. 1mm, Restdefekt (großer Pfeil), Tier 7



Abb. 28: 3D-Rekonstruktion einer CT-Aufnahme vom Schädel (exzentrische Seitenansicht von rechts), 14 Wochen *post operationem*, geschlossene Schädeldecke von der halb-sagittalen Ansicht ist zu erkennen, Tier7



Diag. 1: Implantatvolumen evaluiert mittels CT, 1,10 und 14 Wochen nach dem Eingriff, Keramiken ohne BMP-7 zeigen kleineres Volumen

### 3.3 Kontaktröntgenaufnahmen

Deutlich ist auf diesen Übersichtsaufnahmen die starke Pneumatisierung der Nebenhöhlen, getrennt durch viele Knochensepten, zu erkennen. Die kreisrunden Verschattungen (Keramiken) projizieren sich auf die Septen und den *Sinus* (Abb. 29). Durch den hohen CaP-Gehalt der Knochenersatzmaterialien entsteht die Röntgenopazität.

Im Vergleich der 10 Kontaktröntgenaufnahmen stellen sich auf der rechten Seite (KEM mit BMP-7) röntgendichere runde Areale als auf der linken Seite dar.

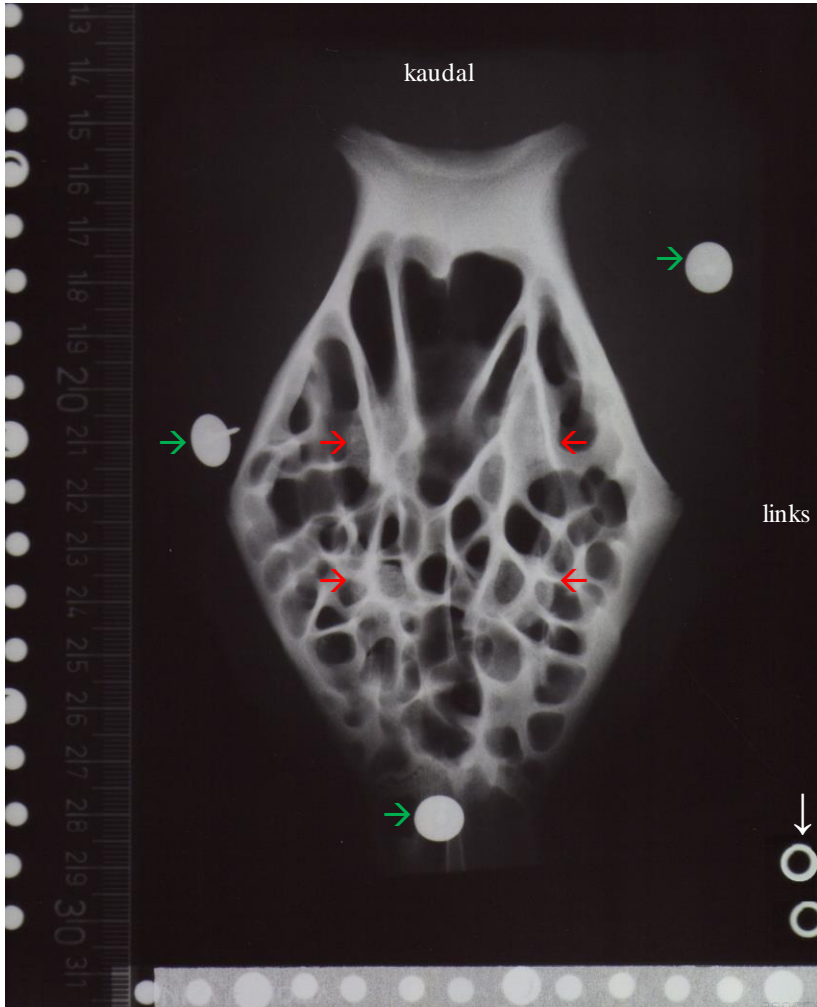


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der vielen Knochensepten der Stirnhöhle, deutliche, runde Verdichtungen der CaP-Keramiken (rote Pfeile), Orientierungshilfen zur Lagebestimmung der Präparate am Explantat (grüne Pfeile), (Kreise rechts) Bezugspunkt im Röntgenbild: links und gleichzeitig Nummerierung des Versuchstiers, Tier 2

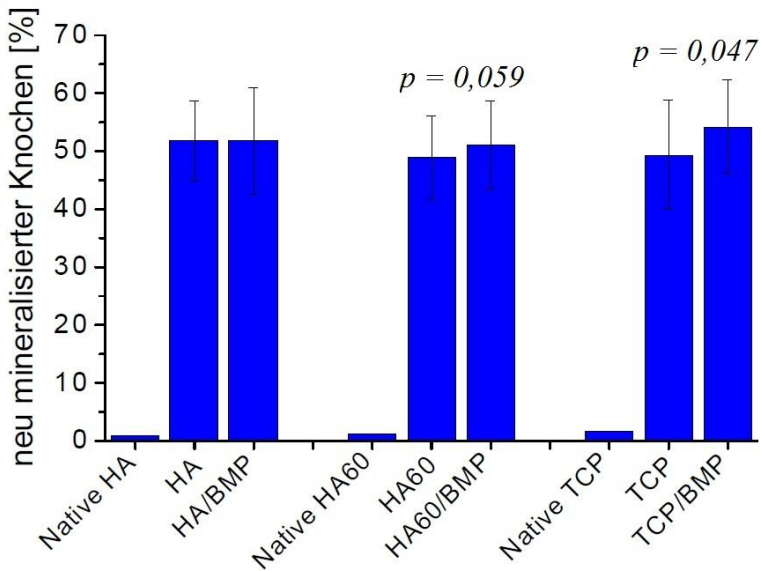
### 3.4 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Die vollständige knöcherne Konsolidierung mit integrierter CaP-Keramik ist in jeder der Gruppen, unabhängig der Applikation von BMP-7, nach 3-monatiger Implantationsdauer festgestellt worden. Eine erhöhte Knochenneubildung wurde histomorphometrisch in den mit BMP-7 beimpften TCP- und HA 60-Keramiken nachgewiesen ( $p=0.047$  und  $p=0.059$ ). In der Fläche des neugebildeten Knochenanteils bei den HA- und HA/BMP-7 Keramiken konnten statistisch keine signifikanten Abweichungen in anderen Präparaten festgestellt werden, wie im Diagramm 2 dargestellt ist.

In der Gruppe mit Verwendung des BMP-7 ist ein teilweise tangential überschießendes Wachstum des neuen Knochens über die Kalotte hinaus zu sehen. Die Verwendung von HA- und HA 60-Keramiken in Abwesenheit von BMP-7 ließen eine Einheilung ohne überschießendes Knochenwachstum erkennen, jedoch sind die Keramiken kollabiert.

Die TCP-Keramiken weisen einen stärkeren Abbau als die HA- und HA 60- Keramiken auf. In der BMP-7 – Gruppe ist außerdem eine verstärkte Resorption der HA 60-Keramik bis zum nahezu vollständigen Abbau der TCP-Keramik zu finden.

Die nativen, nicht implantierten Keramiken zeigen einen falsch positiven Wert an neugebildetem Knochen der ohne signifikante Relevanz ist (Diag. 2). Dies ist durch die poröse Mikrostruktur der Keramikoberfläche und der Graudifferenzierung des ESEM zu erklären.



Diag. 2: Fläche des neugebildeten Knochens (Kraniotomiemodell) in verschiedenen Calciumphosphat-Keramiken mit und ohne Einfluss von BMP-7, die nativen Keramiken zeigen einen falsch positiven Wert

In den unten gezeigten Aufnahmen (Abb. 30 – 35) sind zusammengesetzte ESEM-Bilder der Schädelpräparate von HA, HA 60 und TCP mit und ohne BMP-7 abgebildet. Das BMP-7 führt histomorphometrisch zu einer erhöhten Knochenneubildung in den verschiedenen CaP-Keramiken, es konnte eine abweichende Verteilung der Neubildung von Knochen beobachtet werden. Das Absinken der Keramik am Schädel wurde in allen HA- und TCP- Keramiken (jeweils  $n = 5$ ) ohne BMP-7 festgestellt. In der Gruppe HA 60- Keramik ( $n = 10$ ) zeigten 9 Implantate einen Einbruch. Unter dem Einfluss von BMP-7 wurde in keiner HA-Keramik ( $n = 5$ ), aber in zwei TCP-Keramiken ( $n = 5$ ) und einer HA 60-Keramik ( $n = 10$ ) Einbrüche festgestellt. Ein überschießendes Knochenwachstum (über das Schädelprofil hinaus) wurde lediglich in Keramiken unter der Wirkung von BMP-7 gezeigt [in drei HA-Keramiken ( $n = 5$ ) und ein einer HA 60-Keramik ( $n = 10$ )]. Ein Knochenwachstum über das Schädelprofil hinaus ohne Verbindung zur Schädelkalotte (ektopes Knochenwachstum) fand ebenfalls nur unter der Anwesenheit von BMP-7 [zwei HA ( $n = 5$ ), zwei HA60 ( $n = 10$ )] statt. Ein Absinken des neu gebildeten Knochens intraluminal des Kalottenprofils ist überwiegend in nicht-BMP-7 beimpften

Keramiken [sechs HA60 ( $n = 10$ ), drei TCP ( $n = 5$ ), zwei HA ( $n = 5$ )] sichtbar. Bei einer HA-Keramik ( $n = 5$ ) und drei HA60-Keramiken ( $n = 10$ ) lag in Anwesenheit von BMP-7 der neugebildete Knochen unterhalb des Profils der Schädelkalotte.

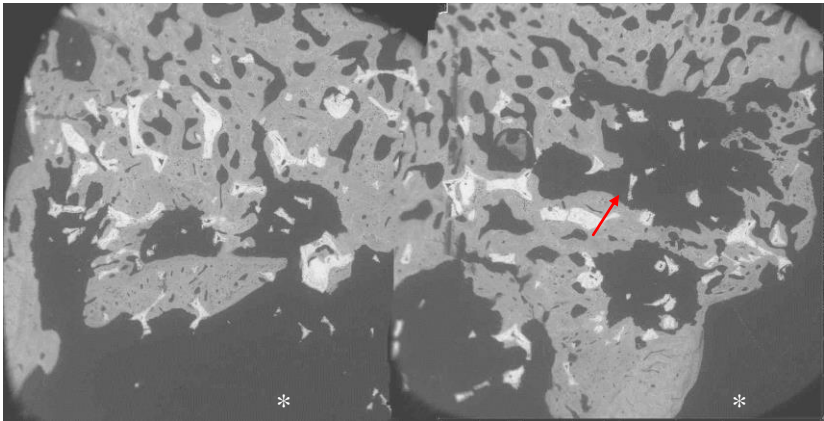


Abb. 30: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit HA und BMP-7 im basalen Bereich: teilweise in die Schädelkalotte integrierte CaP-Keramik, (Pfeil) Kollaps des Keramikimplantats; \* *Sinus frontalis*; Vergrößerung 10x

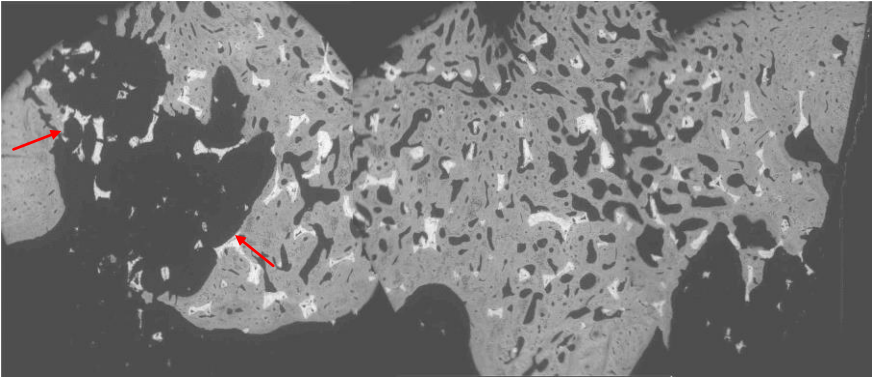


Abb. 31: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit HA: teilweise in den Knochen integrierte CaP-Keramik, signifikanter Einbruch des Implantats (Pfeile); Vergrößerung 10x

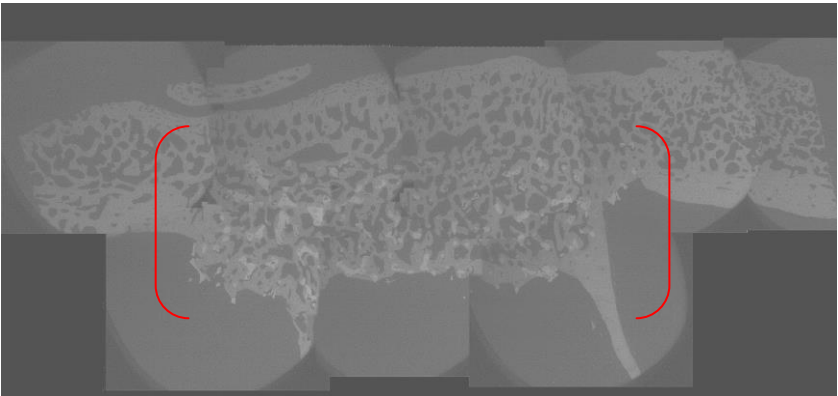


Abb. 32: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit HA60 und BMP-7: vollständig in die Schädelkalotte integrierte CaP-Keramik (Klammern); Vergrößerung 10x

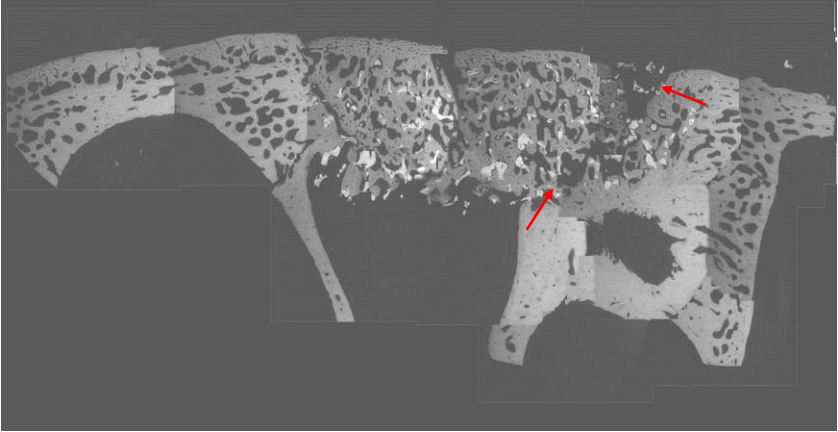


Abb. 33: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit HA60: teilweise in den Knochen integrierte CaP-Keramik, Einbruch des Implantats (Pfeile), leichter Einbruch der CaP-Keramik (Pfeile); Vergrößerung 10x

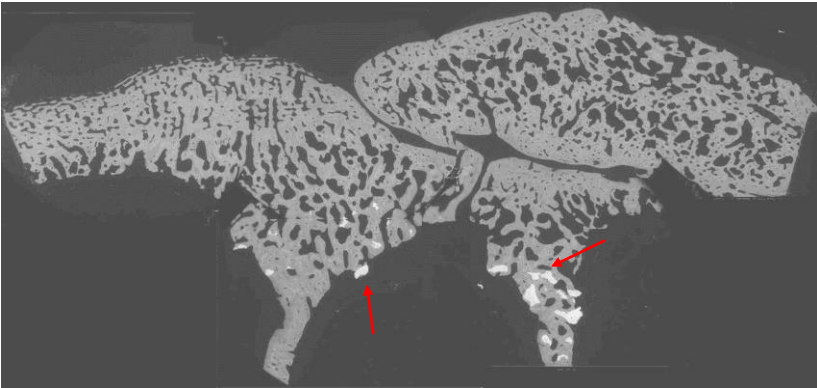


Abb. 34: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit TCP und BMP-7: einige Fragmente der TCP-Keramik werden in der Region der Septen dargestellt (Pfeile); Vergrößerung 10x

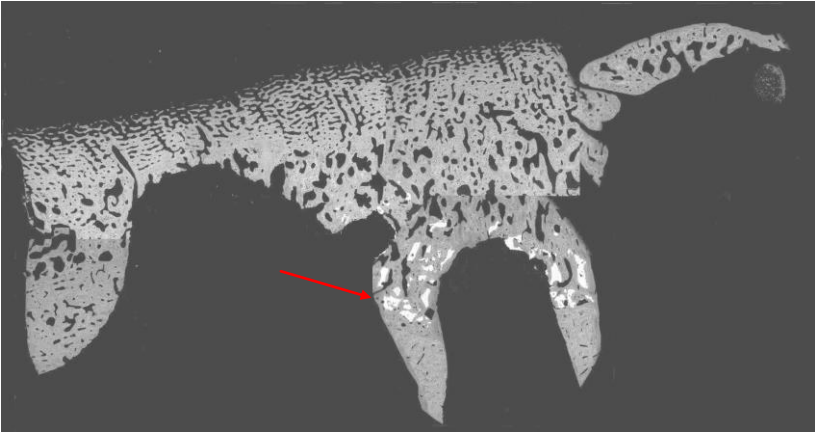
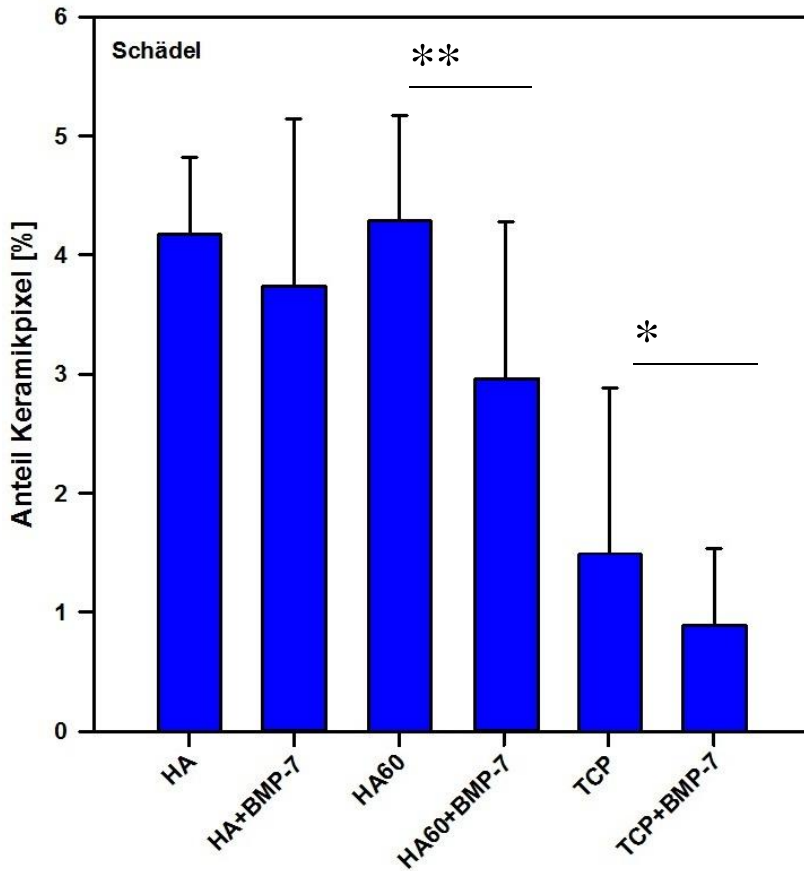


Abb. 35: Rekonstruiertes ESEM-Bild einer Kranioplastik mit TCP: Fragmente der TCP-Keramik werden in der Region der Septen dargestellt (Pfeile); Vergrößerung 10x

Das folgende Diagramm 3 zeigt die ESEM-Ergebnisse zum Abbau der CaP-Keramiken des Schädel-Modells. Die resultierende Fläche der orthotopen HA-Keramiken entsprach nach 3-monatiger Implantationsdauer der der nativen (nicht implantierten Kontrolldefekte = 100%) Probe. Die HA-Keramik wurde demzufolge nicht bzw. nicht statistisch signifikant abgebaut. Der Anteil der verbleibenden HA60 – und TCP – Calciumphosphatkeramiken nahmen in allen Präparaten ab. Unter dem Einfluss von BMP-7 zeigen alle HA60- und TCP- Keramiken eine erhöhte Resorption bzw. Abbau ( $p=0,049$ ).



Diag. 3: Anteil der Rest-CaP-Keramiken, 14 Wochen *postoperativ*: Das BMP-7 führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Keramikanteils in den \*TCP- Keramiken ( $p=0,049$ ) und \*\*HA60- ( $p=0,049$ )

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die zeitlich unterschiedliche Apposition von Knochen lässt sich in den Aufnahmen durch unterschiedliche Fluoreszenzen erkennen.

Die Knochenneubildung wird durch die verschiedenen Fluorochrome sichtbar. Der Kontakt neugebildeten Knochens an die CaP-Keramik ist erkennbar. Es sind sowohl orange, grüne und rote Areale direkt an den Rest-Keramik-Fragmenten zu erkennen, was für eine Anlagerung an die CaP-Keramiken nach der 1., 6. und 8. Woche spricht. Braun gefärbte Felder sind auf den zuvor genannten orange-farbenen, grünen und roten Arealen zu erkennen, jedoch nicht an den Keramiken. Dies spricht für eine Integration der CaP-Keramik in das Knochenwachstum bzw. in die Knochenregenerierung in der frühen Einheilungsphase.

Repräsentativ für diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in der Abbildung 36 implantierte Schädelkeramiken dargestellt.

In den unten gezeigten Aufnahmen (Abb. 37 – 42) sind Fluoreszenzbilder der Schädelpräparate von HA, HA 60 und TCP mit und ohne BMP-7 abgebildet.

Zwei Wochen *postoperativ* konnte bei sowohl mit als auch nicht-BMP-7 beimpfte HA60-Keramiken (Xylenol-Orange, gelbe Farbemission) eine Knochenneubildung nachvollzogen werden. Die Verteilung der gelben Emissionsspektren zeigen bei den HA60-Keramiken mit und ohne BMP-7 Ähnlichkeiten.

Sechs Wochen *postoperativ* zeigt die HA60-Keramik mit BMP-7 eine beschleunigte Knochenneubildung, die durch die grüne Emission (Calcein-Grün) erkennbar wird.

Bei allen anderen CaP-Keramiken konnte erst nach der sechsten *postoperativen* Woche eine Knochenneubildung nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigen die TCP- und HA-Keramiken eine deutliche Verzögerung der Knochenneubildung. Die Knochenneubildung startete in der sechsten Woche (grün), jedoch liegt der höchste Anteil des neugebildeten Knochens in der zwölften Woche vor. Sowohl in der 6. als auch in der 12. *postoperativen* Woche war in allen Gruppen eine erhöhte Knochenneubildung im Vergleich zur 8. *postoperativen* Woche zu finden. BMP-7 beimpfte HA60- und

TCP- Keramiken zeigen von der 8. zur 12. Woche eine herabgesetzte Knochenneubildung.

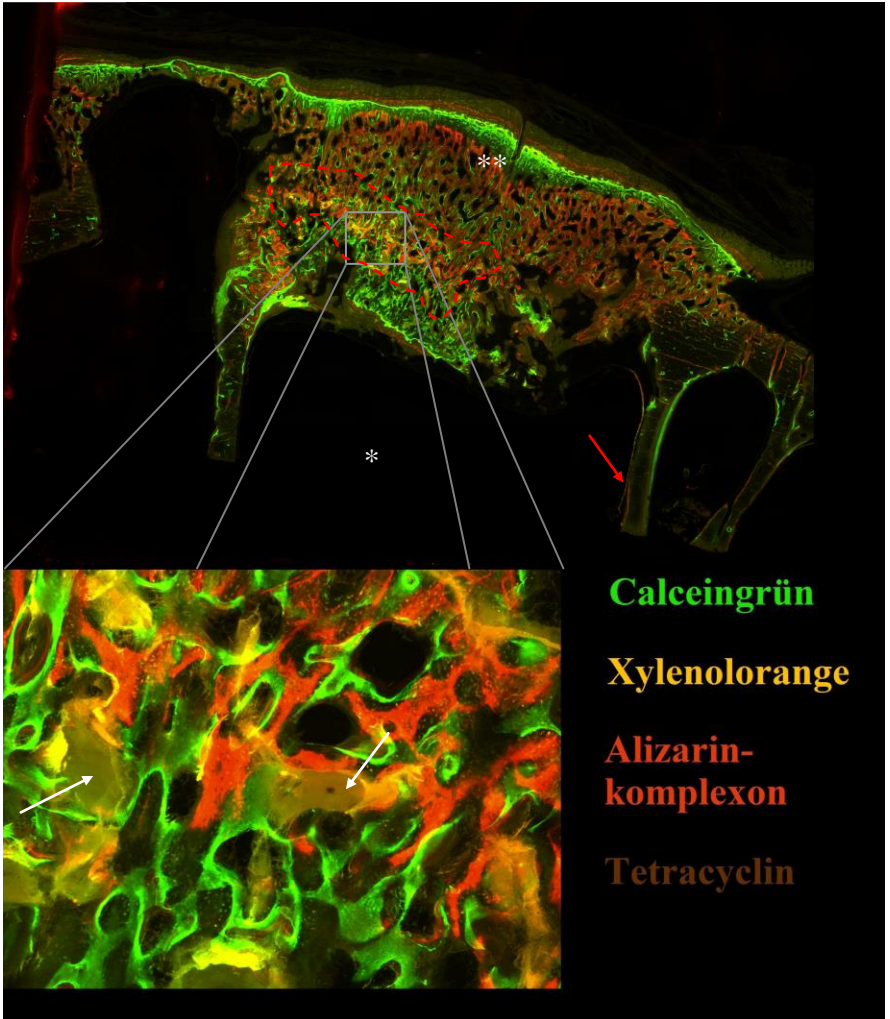


Abb. 36: Fluoreszenzübersichtsaufnahme: a) Keramik mit HA und BMP-7 (rotes Areal): \**Sinus frontalis* mit den Septen (roter Pfeil) \*\*Kalottenoberfläche (neugebildeter Knochen) - Vergrößerung 10x; b) Ausschnitt einer in die Schädelkalotte integrierte HA-Keramik mit BMP-7 (weiße Pfeile); Vergrößerung 30x

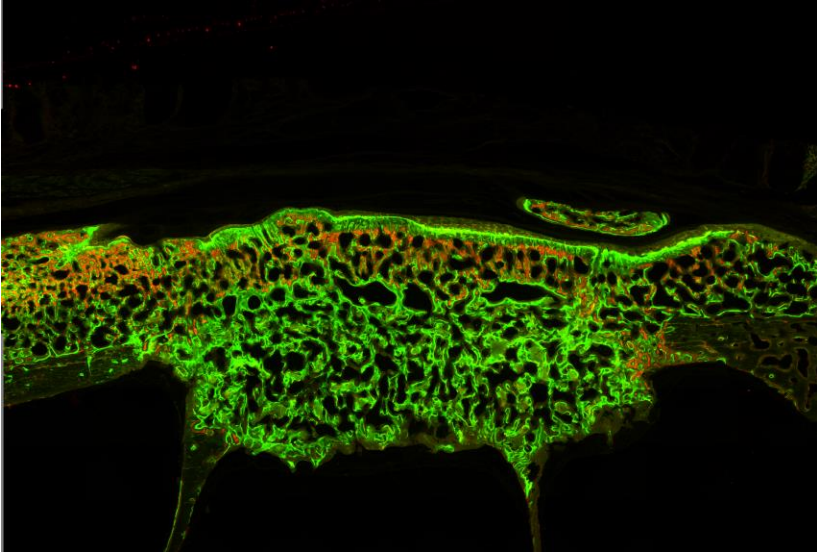


Abb. 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: eine Knochenneubildung in den Keramiken mit HA und BMP-7 wird auch hier gesehen, doch in geringerem Maße als bei den Keramiken mit HA60; Vergrößerung 10x

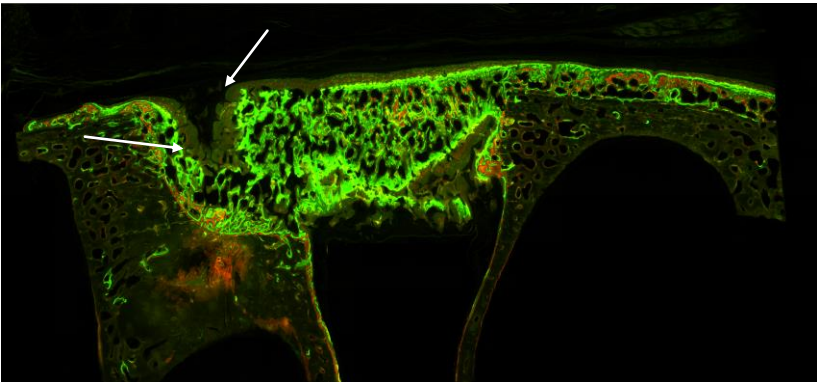


Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: verzögerte Knochenneubildung in den Keramiken mit HA (weiße Pfeile); Vergrößerung 10x

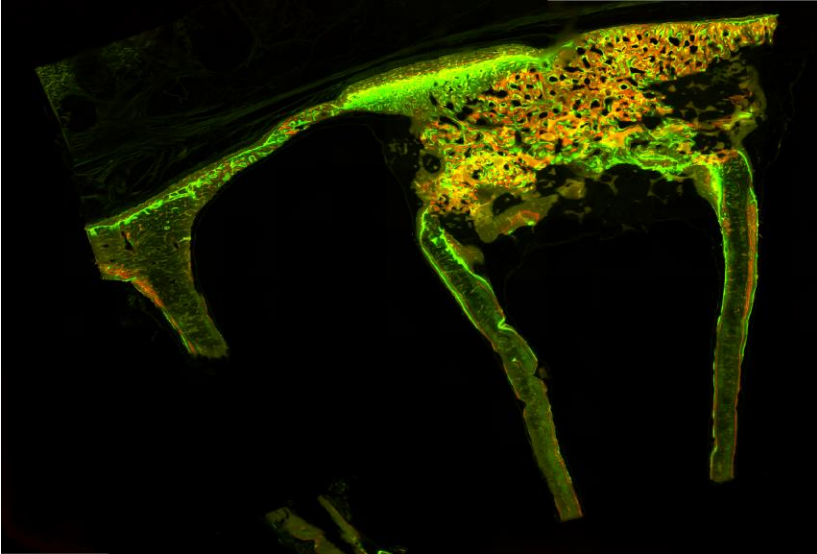


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: beschleunigte Knochenneubildung in den Keramiken mit HA60 und BMP-7; Vergrößerung 10x

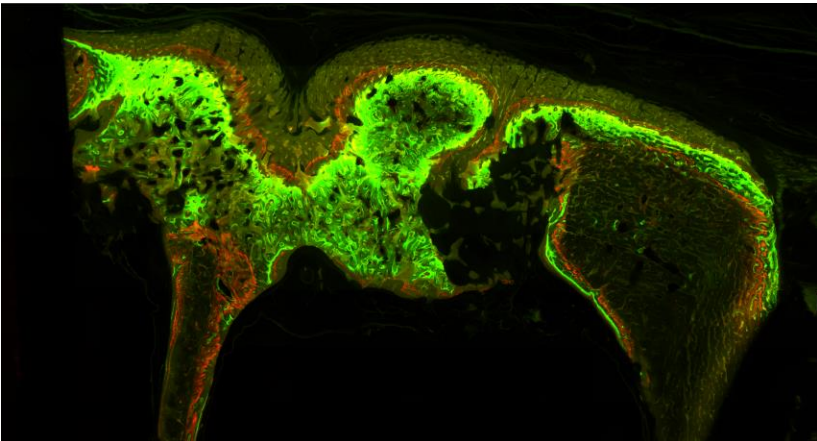


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: verzögerte Knochenneubildung in den Keramiken mit HA60; Vergrößerung 10x

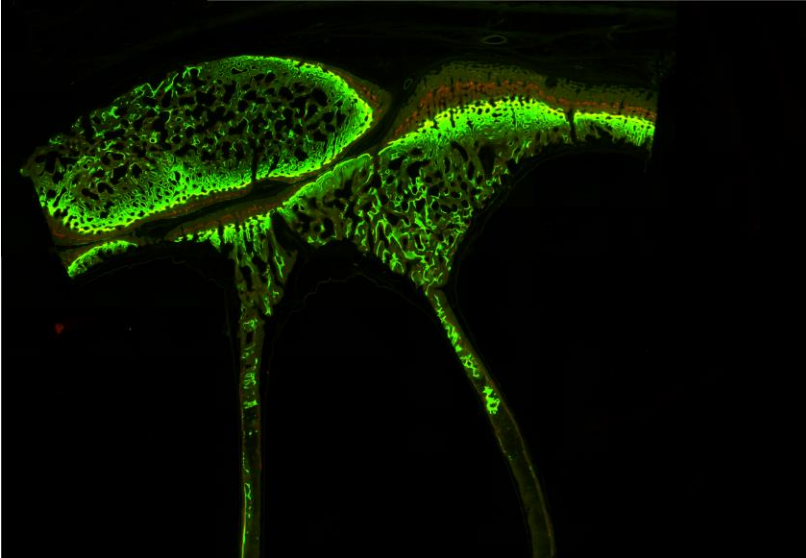


Abb. 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: eine Knochenneubildung in den Keramiken mit TCP und BMP-7 wird hier gesehen, allerdings in geringerem Maße als bei den Keramiken mit HA60; Vergrößerung 10x

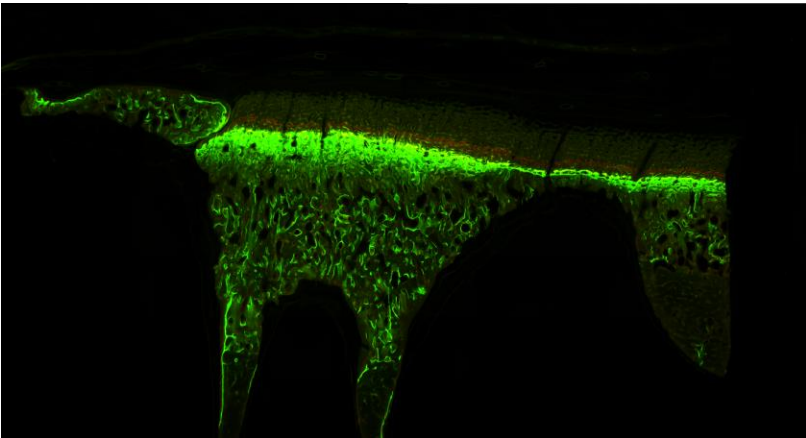
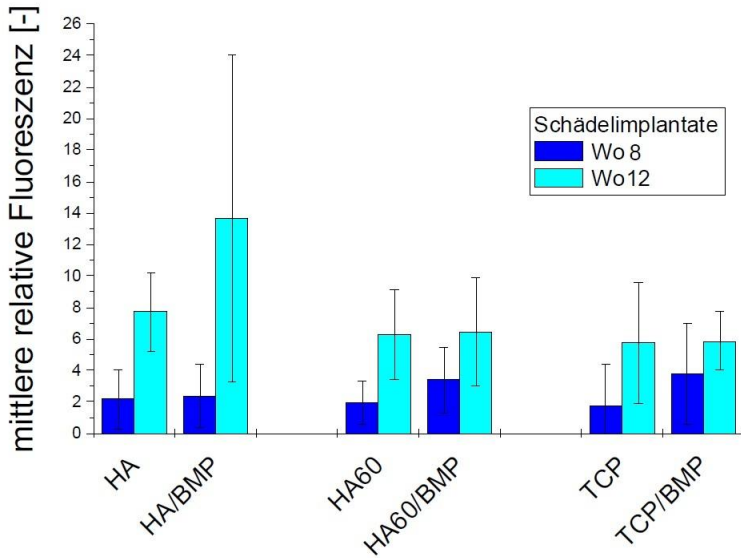


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Schädelimplantate: verzögerte Knochenneubildung in den TCP- Keramiken; Vergrößerung 10x

Die Auswertungen der Fluoreszenzfärbungen der 8. und 12. Woche sind im Diagramm 4 graphisch dargestellt. Eine statistische Untersuchung der Fluoreszenzfärbungen der 1. und 4. Woche war auf Grund des noch nicht mineralisierten Gewebes nicht möglich. Während sich nach acht Wochen vor allem bei HA60- und TCP- Keramiken unter dem Einfluss von BMP-7 Knochen gebildet hat, war nach 12 Wochen die höchste Knochenneubildung unter Einfluss von BMP-7 in der HA-Keramik zu erkennen. Statistische Signifikanzen im Unterschied der einzelnen Keramiken konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.



Diag. 4: Histomorphometrische Analyse der Fluoreszenz der Schädelimplantate mit und ohne BMP-7 nach intravitraler Markierung in der 8. und 12. Woche in den unterschiedlichen Calciumphosphatkeramiken.

### 3.6 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

Mit der CLSM konnte gezeigt werden, dass es sowohl in den mit BMP-7 beimpften als auch in den nativ verwendeten Keramiken zu einer Knochenneubildung kam. Es sind alle Fluorochrome nachweisbar und damit ist eine Neubildung bzw. ein Remodeling des Knochens zu allen Zeitpunkten

dokumentiert. Es lässt sich allerdings mit diesem Verfahren, keine Aussage über die Menge an gebildetem Knochen zu verschiedenen Zeitpunkten treffen oder eine statistische Auswertung vornehmen. Der Vorteil liegt darin, dass die Technik nicht destruktiv ist und durch die 3D Darstellung sehr aussagekräftig ist (Abb. 43), (Abb. 44) und (Abb. 45).

Die erfassten Daten können jedoch sehr gut zur Veranschaulichung vom Knochenwachstum in der Keramik genutzt werden. Die folgenden Bilder spiegeln dies wider. Die Osteozytenlakunen lassen sich nur mit dieser Methode nachweisen - in der konventionellen Fluoreszenz war das nicht möglich.

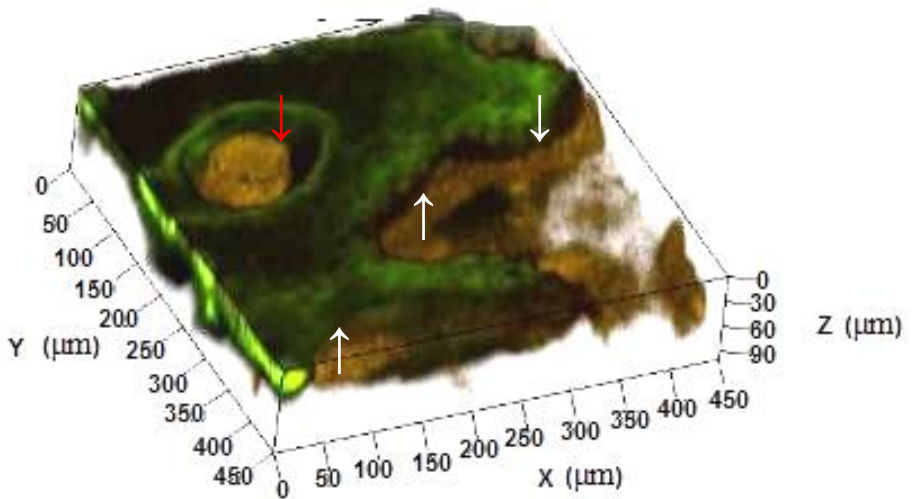


Abb. 43: 3D-Rekonstruktion einer CLSM-Datenerfassung (450µm x 450µm x 90µm): vollständige Integration des Knochen (braun) sowohl in die Poren (roter Pfeil) als auch an die Außenflächen (weiße Pfeile) der CaP-Keramik (grün)

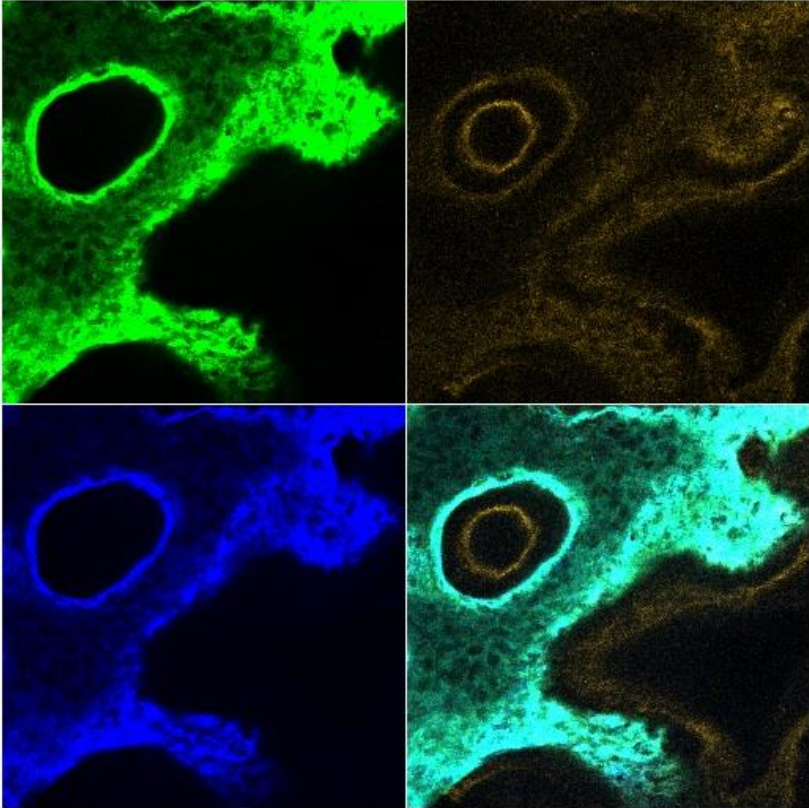


Abb. 44: CLSM-Darstellung: Integration von Knochen in eine CaP-Keramik: dargestellt ist die Trennung der einzelnen Kanäle (split-model)

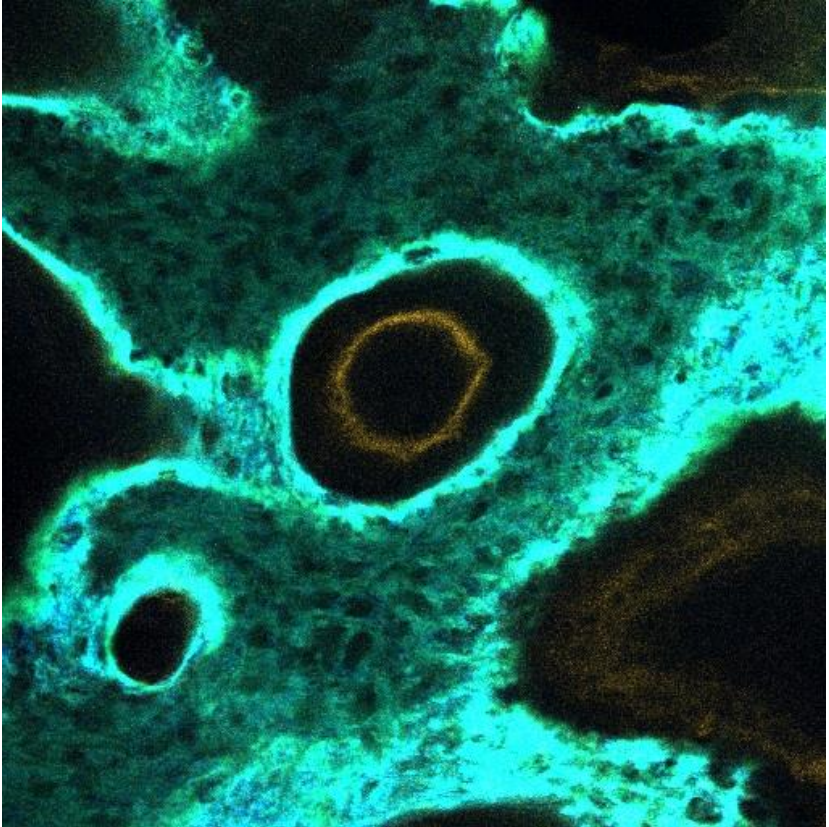
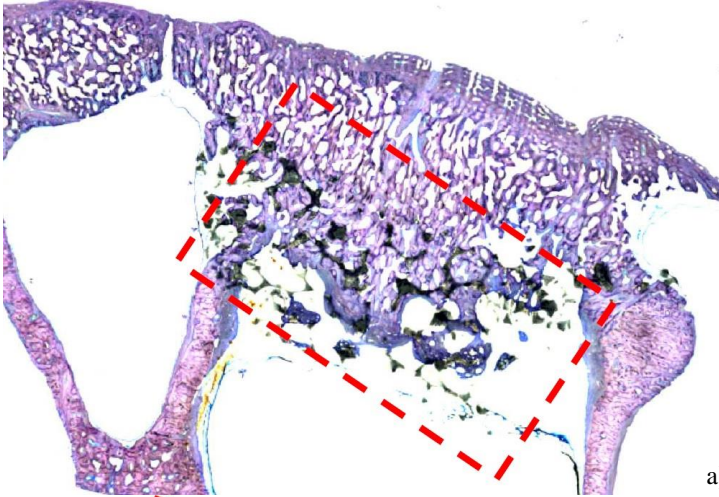


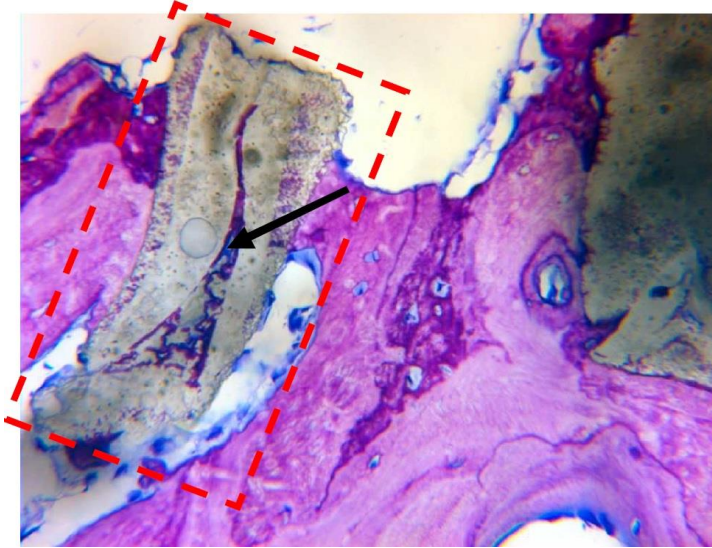
Abb. 45: CLSM-Darstellung: Integration von Knochen in eine CaP-Keramik: dargestellt ist das zusammengesetzte Bild (multi-model)

### 3.7 Giemsa-Färbung

Alle Implantate sind komplikationslos verheilt. In Abbildung 46 oben ist eine Übersichtsfärbung eines repräsentativen Schädelimplantats dargestellt. Die Stirnhöhenschleimhaut war in allen Präparaten erhalten, und es wurden keine Anzeichen für Fremdkörperreaktionen gefunden. Der Rest der CaP-Keramik (graue Struktur) befand sich typischerweise im basalen Bereich des ursprünglichen Defektes (Abb. 46 a)). Die Knochenneubildung wurde in allen Präparaten an der äußeren und in der inneren Struktur der Keramiken festgestellt – *restitutio ad integrum*, wie in Abbildung 46 b) dargestellt ist.



a)



b)

Abb. 46: Giemsa-Färbung, Schädelimplantat unter Einfluss von BMP-7 (3 Monate *postoperativ*): a) basal gut erhaltene Stirnhöhlschleimhaut ohne Zeichen entzündlicher Infiltrate oder Fremdkörperreaktion; Vergrößerung 10x; b) Knochenneubildung (schwarzer Pfeil) im Inneren der Keramik; Vergrößerung 20x

### 3.8 Zusammenfassendes Ergebnis

Die ESEM-Untersuchungen stellten über den Beobachtungszeitraum von 3 Monaten das Abbauverhalten aller Calciumphosphatkeramiken in unterschiedlicher Ausprägung dar. TCP-Keramiken zeigten die höchste Abbaubarkeit. Auf Grund der physiologischen Anwesenheit von Osteoklasten während der Knochenneubildung kann nicht nur auf die alleinige Degradation der TCP-Keramiken zurückgeschlossen werden, ebenso ist auch der zelluläre Abbau-Mechanismus (Resorption) nicht auszuschließen.

HA-Keramiken wiesen den geringsten Abbau auf. Alle CaP-Keramiken zeigten unter Einwirkung von BMP-7 ein höheres Abbauverhalten, was unter anderem durch die komplexen Prozesse des Bone Remodeling zu erklären ist. Die Knochenneubildung war in allen CaP-Keramiken ohne BMP-7 gleichartig. In Anwesenheit von BMP-7 war eine erhöhte Knochenneubildung in TCP- und HA60-Keramiken zu erkennen.

Unterschiede lagen in der Verteilung des neugebildeten Knochens vor. In den CaP-Keramiken ohne BMP-7 war die Integrität des Knochens unvollständig. Vollständige

Desintegration wurde in TCP-Keramiken ohne BMP-7 beobachtet und sogar ein Versatz auf Grund des weitgehenden Keramikabbaus beobachtet.

Die Keramik resorbierte unter dem Einfluss von BMP-7 statistisch mehr als in der nativen Verwendung.

Die Kontrolldefekte zeigten keine vollständige Verknöcherung, daher erfüllt die vorliegende Studie die Kriterien für das Modell eines *critical size defects*.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine zeitlich kontinuierliche Zunahme der Knochenneubildung.

Die *in vivo* Computertomographie lieferte wichtige Ergebnisse zum Verlauf des Abbaus der TCP-Keramiken. Am Ende der Studie sind zum Teil keine Keramikanteile mehr gefunden worden - das CT ist die einzige Evidenz über den zeitlichen Abbau der Keramik.

## 4 Diskussion

### 4.1. Bewertung des Versuchsaufbaus

Der Resorptionsgrad mineralisierter Gewebe ist beim Menschen und beim Göttinger Minischwein vergleichbar (Spurrell 1965 und Mosekilde et al. 1987).

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde die Zahl der Versuchstiere auf  $n=10$  gesetzt. Dromer 1981 und Wissing et al. 1990 stellten in ihren Untersuchungen heraus, dass mit dem Verwenden von Großtieren eine kleinere Anzahl an Versuchstieren in der experimentellen Transplantations- und Knochenchirurgie im Vergleich zu Maus-, Ratten- oder Hasentiermodellen möglich ist. Im Knochenstoffwechsel und in der Osteoneogenese lassen sich eine Nähe zu den Prozessen beim Menschen aufzeigen (Minischwein  $1,2 \mu\text{g/d}$  vs. Mensch  $0,9 \mu\text{g/d}$ ), womit sich die ermittelten Ergebnisse zum Vergleich eignen (Hönig und Merten 1993). Pro Minischwein wurden 4 Implantate (CaP-Keramik) gesetzt, eine zusätzliche Kraniotomiebohrung diente als Kontrolle. Die verschiedenen CaP-Keramiken sind Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit und

eine biphasische Keramik aus 60 Anteilen Hydroxylapatit und 40 Teilen Tricalciumphosphat (folgend mit TCP, HA und HA60 abgekürzt). Jede CaP-Keramik wurde mit und ohne BMP-7 implantiert. Die Keramiken wurden alternierend rotiert. Daraus erschlossen sich 6 Gruppen, die man vergleichen konnte.

Die in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebetteten unentkalkten Präparate konnten mit Analyseverfahren ergebnisbringend genutzt werden. Es war lediglich darauf zu achten, dass das Volumen und die Größe der Oberfläche der Präparate mit den Voraussetzungen der Geräteeigenschaften des Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM), des Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) und des Fluoreszenzmikroskops übereinzubringen waren.

Im Abschnitt der Untersuchungen mit dem CLSM beobachteten wir, dass die Anregungs- und Emissionsspektren von Alizarin-Complexon, Xynelol-Orange und teilweise vom Doxycyclin nahe beieinander lagen. Die Eigenschaften von Fluorochromen die zur intravitalem polychromen Fluoreszenzmarkierung genutzt werden, sind jedoch bekannt. Die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder sowie die mit dem CLSM gewonnenen hochauflösenden 3D-

Rekonstruktionen lassen sich zur deskriptiven Analyse für die Darstellung von Knochenstoffwechselprozessen und zur zerstörungsfreien histomorphographischen Auswertung von Knochengeweben (Grötz et al. 1998) nutzen. Zur dreidimensionalen Beurteilung und non-destruktiven Betrachtungsweise befand Boyde (1985) das Confocale Laser Scanning Mikroskope (CLSM) für geeignet. In dieser Studie wurde erstmalig am Großtier mittels polychromer intravitale Fluoreszenzmarkierung und dem CLSM eine Aussage über das Knochenwachstum evaluiert. Durch den Herstellungsprozess der Proben lassen sich mechanische Artefakte vermeiden, chemische und physikalische Artefakte gut kontrollieren und die dreidimensionale Darstellung erlaubt eine histologische Gewebeinterpretation, die mit makroskopischen Schichtbildverfahren (CT, MRT) vergleichbar sind (Grötz et al. 1998).

Die quantitative Analyse der ermittelten ESEM-Bilder stellt einen erheblichen Teil der gewonnenen Daten zur Verfügung. Die Analyse der Rohdaten geschah mit Hilfe einer dafür geeigneten Software. Diese Software ermöglicht eine Einstufung in verschiedene Piks von Grauwerten (Spitzengrauwerte) die zur Unterscheidung von den

gewonnenen Daten nutzbar sind. Die Keramikbestandteile sind als weiße Pixel und die Knochenanteile als graue Pixel dargestellt, so dass diese sich eindeutig voneinander trennen ließen. Das den Knochen und die Keramik umgebene Weichgewebe wird schwarz dargestellt und konnte damit ebenso eindeutig getrennt und von der Auswertung gebannt werden, Boyde (2012) stellte ebenfalls fest, dass in PMMA oder in anderen Harzen eingebettete Materialien mit dem ESEM gut zu untersuchen sind. Die Hochglanz polierten PMMA Proben verhindern ein elektrisches Aufladen auf dem Objektträgertisch im Mikroskop (Boyde 2012).

Für weitere Untersuchungen reicht es die Oberfläche zu polieren. Der Vorteil vom ESEM ist, dass die innere Struktur der Keramik deutlich zu erkennen ist. Somit lässt sich der neugewachsene Knochen in den Poren und im Inneren des Materials darstellen. Diese Genauigkeit wird nicht mit Mikroradiographien erreicht, wie es Roldán et al. (2008) beschrieben haben.

## 4.2. Bewertung des BMP – 7

Das Bone Morphogenetic Protein – 7 (BMP-7) ist eine Protein aus der Familie der Transforming Growth Factor –  $\beta$ . Es ist ein Protein, welches erstmalig durch Urist et al. beschrieben (1965), benannt (1979) und folgend in vielen Studien eingesetzt wurde. BMP's gelten als eine der wichtigsten lokalen Regulator-Proteine in der Osteogenese (McCarthy et al. 2000); die Knochenneubildung konnte sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* bestätigt werden. Es ist jedoch von verschiedenen Autoren aufgezeigt worden, dass dieses in der Knochenforschung eingesetzte Protein auch einen Einfluss auf Differenzierungsprozesse des Nervensystems und der Nieren hat (Bechtel W. et al. 2009). Der Schwerpunkt in unserer Studie liegt bei der Versorgung von Defekten kritischer Größe (*critical size defects*)

Ripamonti (2005) zeigte, dass die osteokonduktive und osteoinduktive Wirkung durch 250  $\mu$ g BMP-7 angeregt wird und bereits nach 30 Tagen reichlich an neugeformten Knochen in den Defekten des Schädeldaches zu beobachten war, der gipfelnd in einer vollständigen knöchernen Regeneration mündete – *restituito ad integrum*.

In der vorliegenden Studie ist belegbar, dass die CaP – Keramiken in Verbindung mit BMP – 7 nicht kollabieren und besser in die Schädelkalotte integriert werden. Ein beschleunigter Keramikabbau wurde zudem bei der TCP – Keramik und in etwas geringerem Maße bei der HA60 – Keramik festgestellt.

#### 4.3. Resorption und Degradation der Keramiken

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Knochenersatzmaterial wurde im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen von Detsch et al. (2008) untersucht. Eine Ossifikation von Knochenersatzmaterialien in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (Osteoinduktion) konnte in vorherigen und simultan laufenden Studien nachgewiesen werden (Vgl.: Kroese - Deutmann et al. 2005; Lee et al. 2010; Roldán et al. 2010; Azami et al. 2012). Er beschrieb Osteoklasten und Resorptionslakunen auf dem hydroxylhaltigen Material. HA-haltige Materialien zeigten größere und mehr Resorptionslakunen als TCP-Keramiken (Detsch et al. 2008, Monchau et al. 2002). Es gab auch in

dieser Studie deutliche Unterschiede in der Ausprägung des jeweiligen Abbauverhaltens. Während sowohl die HA-Keramik als auch die HA60 – Keramik mehr oder weniger starken Abbau zeigte, waren die TCP – Keramiken nach 3 Monaten nur noch in kleinerem Umfang nachzuweisen. Die hohe Löslichkeit von  $\beta$ -TCP wurde von Bodde et al. 2007, Detsch et al. 2008 und Kato et al. 2012 ebenso benannt. Das Abbauverhalten der TCP-Keramiken in der Kalotte war im Verlauf der CT-Auswertung zu beschreiben, ebenso konnten über das ESEM Teile der Restkeramik detektiert werden. Das Degradationsverhalten ist bei der TCP-Keramik am stärksten ausgeprägt ( $p=0,049$ ). Dies ist eindrucksvoll in der ersten postoperativen Woche zu sehen. Da in der anfänglichen Phase keine Osteoblastenbesiedlung stattfindet, können Osteoklasten beim Abbauprozess der TCP – Keramik keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen (Tadjoedin E.S. et al. 2000; Suba Z. et al. 2006; Knabe C. et al. 2008).

Das Abbauverhalten von HA60 liegt zwischen dem von TCP und HA, was sich aus dem biphasischen Aufbau erklären lässt (Detsch et al. 2008). Unter Verwendung von BMP-7 gab es eine vermehrte Knochenneubildung, die diese Einbrüche stark reduziert haben (0/5 HA, 1/10 HA60, 2/5 TCP). Trotzdem gab

es einen erhöhten Keramikabbau. Damit ist zu sehen, dass die TCP-Keramik in der anfänglichen Phase sehr schnell degradiert und sich den Stoffwechselprozessen größtenteils entzieht.

Im Gegensatz hierzu kann der Mechanismus der Resorption bei HA- und HA60-Keramiken nicht ausgeschlossen werden (Roldán et al. 2010). In einer ektopen Studie unserer Arbeitsgruppe beschreibt T. Klünter (Dissertation in Vorbereitung) in seiner Dissertation den Nachweis von Osteoklasten. Der zelluläre Abbau dieser beiden Keramiken verstärkte sich in Anwesenheit von BMP – 7, wodurch sich die These der Resorption weiterhin unterstützen lässt. Es wurden bei den mit Wachstumsfaktoren befüllten CaP-Keramiken häufiger Osteoklasten nachgewiesen als bei den nativ verwendeten.

Jedes der mit BMP – 7 verwendeten Keramiken ist einer vollständigen knöchernen Integration unterzogen worden.

Die höchste Volumenabnahme der Keramik ist in der Gruppe vom TCP mit und ohne BMP-7 zu sehen gewesen. Die vier anderen Gruppen unterschieden sich in der Volumenabnahme der Keramik nur in geringem Maße.

Die in diesem Versuch verwendeten CaP-Keramiken sind osteoinduktiv und weisen eine geeignete Porengröße auf. Das bestätigen Untersuchungen von Habibovic et al. (2008) und Roldán et al. (2010). Dort ließen sich in allen Keramiken mit der von uns genutzten Porengröße Knochenneubildung detektieren.

Keines der Verwendeten CaP – Keramiken ist von fibrösen Einkapselungen umgeben. Dies schließt somit Fremdkörperreaktionen aus.

#### 4.4. Orthotope Knochenbildung

In der orthotopen Anwendung der Implantate konnten Knochenneubildung bei der Verwendung der nativen Keramiken beobachten werden. Deutlicher war die Osteoneogenese bei der Verwendung von BMP-7.

Die nativ verwendeten Implantate sind nahezu alle eingebrochen (5/5 HA, 9/10 HA60, 5/5 TCP).

Statistisch signifikantes Knochenwachstum konnte in Keramiken unter Verwendung von BMP – 7 im Vergleich zur

nativ verwendeten CaP – Keramik bei TCP ( $p=0,047$ ) und bei HA60 ( $p=0,059$ ) beobachtet werden.

Ein überschießendes Knochenwachstum ist bei HA+BMP-7 am Häufigsten (3/5) zu sehen, womit HA60+BMP-7 mit 1/10 beobachteten überschießendem Knochenwachstum wieder mittig liegt. Beim TCP+BMP-7 ist überschießendes Knochenwachstum in keinem Fall zu ermitteln.

Bei keiner der Gruppen, die nativ verwendet wurden, sind Knochenneubildung im umgebenden Weichgewebe zu detektieren gewesen.

Jedes der mit BMP – 7 verwendeten Keramiken ist einer vollständigen knöchernen Integration unterzogen worden.

Das niedrigste Knochenvolumen ist in der Gruppe vom TCP mit und ohne BMP-7 zu sehen gewesen. Die vier anderen Gruppen unterschieden sich im Knochenvolumen der Keramik nur in geringem Maße.

Keines der verwendeten CaP-Keramiken ist von fibrösen Einkapselungen umgeben. Dies schließt somit ebenfalls Fremdkörperreaktionen aus.

Die Verknüpfung von TCP und BMP-7 fördert die knöcherne Einheilung im *critical size defect* besser als die alleinige

Verwendung von TCP (Urist, 1966). Das Zusammenwirken trägt in osteokonduktiven Grundlagen bei. Die Integration von noch vorhandenem TCP, HA60 und HA konnten wir ebenfalls bestätigen. Hydroxylapatit ruft keine inflammatorischen Effekte an der Stirnhöhlschleimhaut hervor, ist biologisch aktiv und besitzt die Fähigkeit zur knöchernen Integration. Rupprecht et al. (2003) beschreibt dies ebenfalls am *critical size defect* im Minischwein. Auf eine lange Dauer, von deutlich mehr als 3 Monaten, wird Hydroxylapatit zu großen Teilen resorbiert (Rupprecht et al., 2003).

#### 4.5. Vergleich der verschiedenen Kalziumphosphatkeramiken

Roldán et al. (2010) beschrieb mit seiner Studie am Mausmodell, dass die dort verwendeten Keramiken ( $\beta$ -TCP, HA60 und HA) osteoinduktive Effekte aufzeigten. Es handelte sich dort um die gleichen Keramiken wie in der vorliegenden Studie, hergestellt durch das Friedrich – Baur – Forschungsinstitut für Biomaterialien an der Universität Bayreuth (Deutschland). In der Studie von Habibovic et al. (2008) am Ziegenmodell wurde dort eine osteoinduktive

Wirkung dargestellt, wobei hierbei ein Vergleich der Porositäten der verschiedenen Keramiken untersucht wurde. Die Porengrößen der Keramiken bei denen sich eine osteoinduktive Wirkung fand, ähneln denen in unserer Arbeit verwendeten Keramiken.

Die nativ verwendete biphasische Keramik (HA60) wies die höchste Besiedlung mit Osteoblasten und die höchste Knochenneubildung auf. Die bei Mai et al. (2006) und Habibovic et al. (2008) verwendeten CaP-Keramiken wurden in artfremder Umgebung (ektop) implantiert und konnten auf Grund des geringeren Knochenvolumens auf Osteoblasten und Osteoklasten (Osteoinduktion) untersucht werden.

Bei *in-vitro* Untersuchungen wurden auf allen Keramiken Osteoklasten mittels TRAP-Färbung nachgewiesen (Detsch et al., 2006)

Die biphasische Keramik hat sich als das Knochenersatzmaterial der Wahl herausgestellt. Die in der vorliegenden Studie verwendeten HA-Keramiken führten zu einer verstärkten und erwünschten orthotopen Knochenneubildung. Die TCP-Keramik erleidet in zu vielen Fällen einen zu schnellen Einbruch bevor es zu einer osteoid-verstärkten Ausformung des Defektes kommt. Die HA60 –

Keramik weist unter dem Fluoreszenzmikroskop eine höhere anfängliche Knochenneubildung vor allem in den ersten 6-8 Wochen auf, und es zeigt sich eine Verringerung der Anlagerung neuen Knochens in der 12. Woche gerade im Vergleich zur HA – Keramik, wo sich deutlich noch vermehrt Knochen anhäuft.

Es bleibt dabei, ein Material zu finden, welches als ideale Therapie für große Knochendefekte, verursacht durch Fehlbildungen, nach Trauma, chirurgischen Eingriffen nach einer Tumorerkrankung oder in der Implantologie, dient. Ein Knochenersatzmaterial sollte sich in den Stoffwechselprozess des Knochens einfügen. Nach dem Abbau sollte der Knochen mechanisch stabil sein und die Form nach dem Abbau unverändert bleiben.

Es bleibt zu hinterfragen, ob Calciumphosphat-Keramiken auf die Dauer das alleinige Mittel der Wahl sind, oder ob sie in Kombination mit anderen biologisch aktiven Molekülen kombiniert werden sollten.

Die vorliegenden Daten sind Bestandteil einer Studie an Tieren und lassen sich daher nicht in gleicher Weise auf die humane Spezies und seine Stoffwechselprozesse übertragen. Sie können

richtungweisend und denk-anstoßend verwendet werden und sollen womöglich Bestandteil der Grundsatzforschung für Knochenerkrankungen dienen. Zu den einzelnen Komponenten gibt es verschiedene abweichende Studien, die sowohl Knochenwachstumsfaktoren als auch Trägersubstanzen verschiedener Materialgruppen untersuchen und beschreiben. So Urist et al. (1979), Rupprecht et al. (2003), Mooren et al.(2007), Ozkaynak E. et al. (1990), Ohgushi H. et al. (1990).

## 5 Zusammenfassung

Calciumphosphat-Keramiken als Knochersatzmaterial stehen im Fokus vieler Knochenforscher. Es gibt bisher nur wenige mineralisierte KEM auf dem Markt, dennoch ist das Interesse der medizinischen Anwendung an diesen Materialien hoch.

Die höchste Abbau- und Knocheneinheilungstendenz lassen sich bei den HA60-Keramiken ( $n=10$ ) mit Verwendung von BMP-7 erkennen ( $p=0,049$ ). 9 von 10 Keramiken sind komplikationslos in die Schädelkalotte integriert worden. Wohingegen 2 von 5 TCP-Keramiken ( $n=5$ ) eingebrochen sind. Die HA-Keramiken ( $n=5$ ) sind ebenfalls gut in den Knochen integriert worden.

Die Verwendung aller CaP-Keramiken ohne BMP-7 führte zu einer verzögerten Knochenneubildung, lediglich eine HA60-Keramik ist vollständig integriert worden und ist nicht eingebrochen.

Zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Restkeramik ( $p=0,049$ ) führte die Verwendung von BMP-7 bei den HA60-Keramiken und den TCP-Keramiken. BMP-7 aktiviert die Knochenneubildung und beschleunigt den Keramikabbau im

Sinne eines *bone remodeling*. Die HA-Keramik blieb hingegen dimensionsgetreu.

Im Vergleich des neu gebildeten Knochens in den verschiedenen Calciumphosphat-Keramiken mit und ohne Einfluss von BMP-7 ist bei der TCP-Keramik ( $p=0,047$ ) und bei der HA60-Keramik ( $p=0,059$ ) eine Signifikanz zu erkennen. Ein Unterschied in der Knochenneubildung bei der HA-Keramik ist nicht erkennbar gewesen.

Das BMP-7 ist ein bereits lange bekannter Wachstumsfaktor und daher häufig verwendet worden. Es beschleunigt in der vorliegenden Arbeit den Keramikabbau und verhindert einen Kollaps der CaP-Keramik. Der positive Effekt auf die Knochenheilung ist experimentell belegt. Dies ist die erste Studie, die den Abbau einer Kalziumphosphatkeramik unter Einwirkung von BMP-7 dokumentiert.

## 6 Literaturverzeichnis

**Açil Y., Schilde K., Terheyden T., Jepsen S.:** Biokompatibilität von sechs verschiedenen Knochenersatzmaterialien in der Osteoblastenzellkultur  
Osteologie, 1999, 8, 89-90

**Açil Y., Terheyden H., Dunsche A., Fleiner B., Jepsen S.:** Three dimensional cultivation of human osteoblast – like cells on highly porous natural bone mineral  
J Biomed Mater Res, 2000, 51, 701-703

**Açil Y., Springer I.N., Broek V., Terheyden H., Jepsen S.:** Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials  
J cell Biochem, 2002, 86, 90-98

**Abdul Razak N. H., Al-Salihi, K. A., Samsudin, A. R.:** An in vivo study of a locally-manufactured hydroxyapatite-based material as bone replacement material  
Med J Malaysia, 2004, 59(B), 119-20

**Alam S., Ueki K., Marukawa K., Ohara, T., Hase, T., Takazakura D., Nakagawa K.:** Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles  
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 103(1), 16-26

**Albee, F. H.:** Fundamentals in bone transplantation: experience in three thousand bone graft operations  
JAMA, 1923, 81, 1429-32

**Albrektsson, T., Johansson, C.:** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration  
Eur Spine J, 2001, 10(2), 96-101

**Aldini N. N., Fini M., Giavaresi G., Torricelli P., Martini L., Giardino R., Ravaglioli A., Krajewski A., Mazzocchi M., Dubini B., Ponzi-Bossi M. G., Rustichelli F., Stanic V.:** Improvement in zirconia osseointegration by means of a biological glass coating: An in vitro and in vivo investigation  
J Biomed Mater Res, 2002, 61(2), 282-9

**Al Ruhaimi, K. A.:** Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials  
Int J Oral Maxillofac Implants, 2001, 16(1), 105-14

**Azami M., Moosavifar M.J., Baheiraei N., Moztafzadeh F., Ai J.:** Preparation of a biomimetic nanocomposite scaffold for bone tissue engineering via mineralization of gelatin hydrogel and study of mineral transformation in simulated body fluid  
J Biomed Mater Res A, 2012, 100, 1347-55

**Barth A.:** Über histologische Befund nach Knochenimplantation  
Langenbecks Arch Kin Cir, 1893, 46, 409-417

**Bayne, S. C.:** Dental biomaterials: where are we and where are we going?  
J Dent Educ, 2005, 69(5), 571-85

**Bechtel W., Zeisberg M.:** Bone morphogenetic protein – 7 (BMP7) and the kidneys. Insights into the future management of chronic kidney diseases

Dtsch Med Wochenschr, 2009, 134, 1688-1691

**Behrens E., Kreusch Th., Jonas S., Silbernagel E.:** Komplikationen bei und nach Knochenentnahme aus dem Beckenkamm

Dtsch Zahnärztl Z, 2001, 56, 66-68

**Berglundh T., Lindhe J.:** Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-oss. An experimental study in the dog

Clin Oral Impl Res, 1997, 8,117-124

**Bodde E.W., Wolke J.G., Kowalski R.S., Jansen J.A.:** Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep

J Biomed Mater Res A, 2007, 1, 82(3), 711-22

**Boyde A.:** Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy

Science, 1985, 230, 1270-1272

**Boyde A.:** Scanning electron microscopy of bone

Methods Mol Biol, 2012, 816, 365-400

**Boyne P.J., Sands N.R.:** Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts

J Oral Surg, 1972, 30, 87-93

**Boyne P.J., James R.A.:** Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone  
J Oral Surg, 1980, 30, 613-616

**Boyne P.J. et al.:** Long term study of autologous bone grafted bilateral alveolar clefts in craniofacial abnormalities and clefts of the lip, alveolous and palate: Interdisciplinary teamwork. Principles of treatment, long term results  
4. Hamburg International Symposium, 1991, 3-12

**Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W., Sampath T.K., Rueger D.C., Whitecloud TS 3<sup>rd</sup>.**: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects  
J Bone and Joint Surg, 1994, 76, 827-838

**Cricchio G., Lundgren S.:** Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting  
Clin Implant Dent Relat Res, 2003, 5(3), 161-9

**Daculsi G., Laboux O., Malard O., Weiss P.:** Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics  
J Mater Sci – Mater Med, 2003, 14, 195-200

**Detsch R., Mayr H., Seitz D., Ziegler G.:** Is hydroxyapatite ceramic include in the bone remodelling process? An in vitro study of resorption and formation processes  
Key Eng Mater, 2008, 361-363, 1123-1126

**Detsch R., Mayr H., Ziegler G.:** Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics  
Acta Biomaterialia 4, 2008, 139-148

**Deisinger U.:** Synthetisches Knochenersatzmaterial mit spongiosa – ähnlicher Struktur: Herstellung, materialwissenschaftliche Charakterisierung und biologisches Verhalten von Calciumphosphat – basierten Keramiken  
Mbv Berlin, 2009

**Donath K., Breuner G.:** A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique  
J Oral Pathol. 1982, 11(4), 318-26

**Feifel H.:** Osteoinduktion und Osteokonduktion – Therapie des Knochendefektes mit Proteinen und xenogenem Knochen  
Dtsch Zahnärztl Z, 1996, 51, 144-155

**Fialkov J.A., Holy C.E., Shoichet M.S., Davies J.E.:** In vivo bone engineering in a rabbit femur  
J Craniofac Surg 2003 May, 14(3), 324-32

**Flautre B., Descamps M., Delecourt C., Blary M.C., Hardouin P.:** Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pore interconnections – experimental study in the rabbit  
J Mater Sci – Mater Med, 2001,12, 679-682

**Geesink R.G., Hoefnagels N.H., Bulstra S.K.:** Osteogenic activity of OP – 1 bone morphogenetic protein – 1 (BMP – 7) in a human fibular defect  
J Bone Joint Surg, 1999, 81, 710-718

**Gosain A.K., Song L., Riordan P., Amarante M.T., Nagy P.G., Wilson C.R., Toth J.M., Ricci J.L.:** A one – year study of hydroxyapatite – derived biomaterials in an adult sheep model: part I

Plast Reconstr Surg, 2002, 109, 619-630

**Gosain A.K., Riordan P.A., Song L., Amarante M.T., Kalantarian B., Nagy P.G., Wilson C.R., Toth J.M., McIntyre B.L.:** A one – year study of hydroxyapatite – derived biomaterials in an adult sheep model: part II bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects

Plast Reconstr Surg, 2004, 114, 1164-1165

**Gosain A.K., Riordan P.A., Song L., Amarante M.T., Kalantarian B., Nagy P.G., Wilson C.R., Toth J.M., McIntyre B.L.:** A one – year study of hydroxyapatite – derived biomaterials in an adult sheep model: part III comparison with autogenous bone graft for facial augmentation

Plast Reconstr Surg, 2005, 116, 1044-1052

**Grötz K.A., Piepkorn B., Bittinger F., Reichert T.E., Duschner H., de Aguiar E.G., Kann P., Wagner W.:**

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) for validation of non-destructive histotomography of healthy bone tissue

Mund Kiefer Gesichtschir, 1998, 2(3), 141-5

**Habibovic P., Kruyt M.C., Juhl M.V., Clyens S., Martinetti R., Dolcini L., Theilgaard N., van Blitterswijk C.A.:** Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes

J Orthop Res, 2008, 26(10), 1363-70

**Hernández-Alfaro F., Pages C. M., García E., Corchero G., Arranz C.:** Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site

Int J Oral Maxillofac Implants, 2005, 20(5), 777-83

**Hönig J.F., Merten H.A.:** Subperiosteal versus epiperiosteal forehead augmentation with hydroxylapatite for aesthetic facial contouring: experimental animal investigation and clinical application

Aesthetic Plast Surg, 1993, 17(2), 93-8

**Hofmann H., Thieme V., Abendroth K., Schimke E., Zieger M., Berger G.:** Use of bioglass ceramic for alloplastic bone replacements in the maxillofacial region. 1. Studies on clinically oriented animal models

Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl, 1984, 72(6), 531-40

**Holland A. J.:** Laboratory animal anaesthesia

Can Anaesth Soc J, 1973, 20(5), 693-705

**Hollinger J. O., Kleinschmidt, J. C.:** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials

J Craniofac Surg, 1990, 1(1), 60-8

**Hollinger J. O., Winn, S. R.:** Tissue engineering of bone in the craniofacial complex

Ann N Y Acad Sci, 1999, 875, 379-85

**Hollister S. J., Lin C. Y.; Saito E., Lin, C. Y., Schek R. D., Taboas J. M., Williams J. M., Partee B., Flanagan C. Holy C. E., Fialkov J. A., Davies J. E., Shoichet M. S.:** Use of a biomimetic strategy to engineer bone

J Biomed Mater Res A, 2003, 65(4), 447-53

**Holy C.E., Fialkov J.A., Davies J.E., Shoichet M.S.:** Use of a biomimetic strategy to engineer bone  
J Biomed Mater Res A, 2003, 65(4), 447-53

**Jepsen S., Lüttges J.E., Albers H-K., Fleiner B., Rueger D.:** Reparationsvorgänge der Pulpa nach Implantation von rekombinatem humanen Bone morphogenetic protein  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir, 1995, 19, 150-152

**Jepsen S., Albers H-K., Fleiner B., Tucker M., Rueger D.:** Recombinant human osteogenetic protein-1 induces dentin formation: An experimental study in miniature swine  
J Endodont, 1997, 23, 378-382

**Jepsen S., Terheyden H.:** Perspektiven für die Geweberegeneration durch biologische Faktoren  
ZM, 2001, 91, 38-46

**Johnson E.E., Urist M.R., Finerman G.A.:** Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed antigen extracted allogenic (AA) bone  
Clin Orthop, 1992, 277, 229-237

**Jerosch J., Bader A., Uhr G.:** Knochen  
Curasan Taschenatlas Thieme, 2002

**Joshi A., Kostakis G.C.:** An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting  
Br Dent J, 2004, 14, 196(3), 167-71, discussion 155

**Karageorgiou V., Kaplan D.:** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis  
Biomaterials, 2005, 26, 5474-5491

**Kato E., Lemler J., Sakurai K., Yamada M.:** Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model  
Clin Implant Dent Relat Res, 2012, 18, 1708-8208

**Kim H.W., Lee S.Y., Bae C.J., Noh Y.J., Kim H.E., Kim H.M., Ko J.S.:** Porous ZrO<sub>2</sub> bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer  
Biomaterials, 2003, 24, 3277-3284

**King H.:** Bone repair in the twenty - first – century: biology, chemistry or engineering  
Phil Trans R Soc Lond, 2004, 362, 2821-2850

**Kirker-Head C.A., Nevins M., Palmer R., Nevins M.L., Schelling S.H.:** A new animal model for maxillary sinus floor augmentation: evaluation parameters  
Int J Oral Maxillofac Implants, 1997, 12, 403-411

**Klünter T.:** Vergleich des Abbauverhaltens von drei verschiedenen Knochenersatzmaterialien (TCP, HA und HA60), sowie deren knochenbildender Eigenschaften in Ab- und Anwesenheit von BMP-7 ektop am Göttinger Minischwein  
Dissertation in Vorbereitung

**Knabe C., Houshmand A., Berger G., Ducheyne P., Gildenhaar R., Kranz I., Stiller M.:** Effect of rapidly resorbable bone substitute materials on the temporal expression of the osteoblastic phenotype in vitro  
J Biomed Mater Res A, 2008, 15, 84(4), 856-68

**Kroese-Deutman H.C., Ruhé P.Q., Spauwen P.H., Jansen J.A.:** Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits  
Biomaterials, 2005, 26(10), 1131-8

**Kruyt M.C., de Bruijn J.D., Wilson C.E., Oner F.C., van Blitterswijk C.A., Verbout A.J., Dhert W.J.:** Viable osteogenic cells are obligatory for tissue engineered ectopic bone formation in goats  
Tissue Engineering, 2003, 9, 327-336

**Kubies D., Rypáček F., Kovárová J., Lednický F.:** Microdomain structure in polylactide-block-poly (ethylene oxide) copolymer films  
Biomaterials, 2000, 21, 529-536

**Kübler N.R.:** Osteoinduktion und –reparation  
Mund Kiefer Gesichtschir, 1997, 1, 2-25

**Kübler N.R.:** Knochenregeneration durch Osteoinduktion  
Dtsch Zahnärztl Z, 1998, 53, 834-843

**Kübler N. R., Würzler K., Biebl S., Käding K., Faller G., Kirchner T., Sebald W., Reuther J. F.:** Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten mit BMP – 2  
Dtsch Zahnärztl Z, 1998, 53, 871-875

**Kübler N. R., Würzler K. K.:** Bone morphogenic proteins  
Implantologie, 2002, 6, 177-192

**Küsswetter W., Teschner M.:** Genetisch induziertes Knochenwachstum  
Dtsch Ärztebl, 1999, 96, 1891-1896

**Lane J.M., Tomin E., Bostrom M.P.:** Biosynthetic bone grafting  
Clin Orthop Relat Res, 1999, 367 Suppl, 107-17

**Lee J.H., Kim C.S., Choi K.H., Jung U.W., Yun J.H., Choi S.H., Cho K.S.:** The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*  
Biomaterials, 2010, 31(13), 3512-9

**Lynch S.E., Genco R., Marx R.:** Tissue engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics  
Quintessence, 1999, 11-18

**Mai R., Hagedorn M.G., Gelinsky M., Werner C., Turhani D., Späth H., Gedrange T., Lauer G.:** Ectopic bone formation in nude rats using human osteoblasts seeded poly(3)hydroxybutyrate embroidery and hydroxyapatite-collagen tapes constructs  
J Craniomaxillofac Surg, 2006, 34, 101-109

**Mayer H., Scutt A.M., Ankenbauer T.:** Subtle differences in the mitogenic effects of recombinant human bone morphogenetic proteins -2 to -7 on DNA synthesis on primary bone-forming cells and identification of BMP-2/4 receptor  
Calcif Tissue Int, 1996, 58(4), 249-55

**Marques J.M., Viegas C., Dias M.I., Zagalo C., Gomes P.:** Modified Model of Sub-Critical Size Cranial Defect in the Rabbit Modelo Modificado de Defecto Craneal de Tamaño Subcrítico de Conejo  
Intl J of Morph, 2010, 28, 525-528

**McCarthy T.L., Ji C., Centrella M.:** Links among growth factors, hormones and nuclear factors with essential role in bone formation  
Crit Rev Oral Biol Med, 2000, 11, 409-422

**Monchau F., Lefe`vre A., Descamps M., Laffargue P., Myrdycz-Belquin A., Hildebrand H.F.:** In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate.  
Biomol Eng, 2002, 19, 143-52.

**Mooren R.E., Merckx M.A., Bronkhorst E.M., Jansen J.A., Stoeltinga P.J.:** The Effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats  
Int J Oral Maxillfac Surg, 2007, 36, 626-631

**Mosekilde L., Kragstrup J., Richards A.:** Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs  
Calcif Tissue Int, 1987, 40, 318-322

**Movat H. Z.:** Demonstration of connective tissue elements in a single section  
Arch Path, 1955, 60, 289–295

**Nevins M., Kirker-Head C., Nevins M., Wozney J.A., Palmer R., Graham D.:** Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2  
Int J Periodontics Restorative Dent, 1996, 16, 1, 8-19

**Neukam F.W., Buser D.:** Implantate bei unzureichendem Knochenangebot.  
PDZ, 1996, 13, 179-211

**Noda M., Camilliere J.J.:** In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor –  $\beta$   
Endocrinology, 1989, 124, 2991-2994

**Ozkaynak E., Rueger D.C., Drier E.A., Corbett C., Ridge R.J., Sampath T.K., Oppermann H.:** OP-1 DNA encodes an osteogenic protein in TGF- $\beta$  family  
EMBO J, 1990, 9, 2085-2093

**Ohgushi H., Okumura M., Tamai S., Shors E.C., Caplan A.I.:** Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: A comparative histomorphometric study of ectopic bone formation  
J Biomedical Mat Res, 1990, 24, 1563-1570

**Ong J.L., Bess E.G., Bessho K.:** Osteoblast progenitor cell response to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein – atelopeptide type I collagen in vitro

J Oral Implantol, 1999, 2, 95-100

**Osborn J.F., Böker D.K., Schultheiss R.:** Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik: Indikation und Technik der Rekonstruktion frontaler und facialer Knochendefekte durch Festkörperimplantate aus Hydroxylapatitkeramik

Quintessenz-Verlag, 1985, 196-202

**Pamula E., Bacakova L., Filova E., Buczynska J., Dobrzynski P., Noskova L., Grausova L.:** The influence of pore size on colonization of poly(L – lactide - glycolide) scaffolds with human osteoblast – like MG63 cells in vitro

J Mater Sci – Mater Med, 2008, 19, 425-435

**Rahn B.A.:** Biomechanical aspects of implantation in bone  
SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. 1976, 86(9), 946-53

**Ranito, C.M.S., Oliveira, F.A.C. and Borges, J.P.:** Hydroxyapatite foams for bone replacement

Key Eng Mater, 2005, 284-286, 341-344

**Ripamonti U., Heliotis M., Rueger D.C., Sampath T.K.:** Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein- 1 in the Baboon (papio ursinus)

Arch Oral Biol, 1996, 41, 121-126

**Ripamonti U., Duneas N., Van Den Heever B., Bosch C., Crooks J.:** Recombinant transforming growth factor- $\beta$ 1 induces endochondral bone in baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein) to initiate rapid bone formation  
J Bone Miner Res, 1997, 12, 1584-1595

**Ripamonti U., Duneas N.:** Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins  
Plast Reconstr Surg, 1998, 101, 227-239

**Ripamonti U., Crooks J., Rueger D.C.:** Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates  
Plast Reconstr Surg, 2001, 107, 4, 977-88

**Ripamonti U.:** Bone induction by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, BMP-7) in the primate *Papio ursinus* with expression of mRNA of gene products of the TGF-beta superfamily  
J Cell Mol Med, 2005, 9, 4, 911-28

**Roldán J.C., Jepsen S., Miller J., Freitag S., Rueger D.C., Açil Y., Terheyden H.:** Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein7  
Bone, 2004, 34, 80-90

**Roldán J.C., Jepsen S., Schmidt C., Knüppel H., Rueger D.C., Açıl Y., Terheyden H.:** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein  
Clin Oral Impl Res, 2004, 15, 716-723

**Roldán J.C., Detsch R., Schaefer S., Chang E., Kelantan M., Weiss W., Reichert T.E., Gurtner G.C., Deisinger U.:** Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model  
J Craniomaxillofac Surg, 2010, 38, 423-430

**Roldán J.C., Chang E., Kelantan M., Jazayeri L., Deisinger U., Detsch R., Reichert T.E., Gurtner G.C.:** Quantifying migration and polarization of murine mesenchymal stem cells on different bone substitutes by confocal laser scanning microscopy  
J Craniomaxillofac Surg, 2010, 38, 580-588

**Rupprecht S., Merten H.A., Kessler P., Wiltfang J.:** Hydroxyapatite cement (Bone Source) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study  
J Craniomaxillofac Surg, 2003, 31-3, 149-53.

**Russell H. K., Jr.:** A modification of Movat's pentachrome stain  
Arch Path, 1972, 94, 187-191

**Rutherford R.B., Sampath T.K., Rueger D.C., Taylor T.D.:** Use of bovine osteogenetic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants  
Int J Oral Maxillofac Surg, 1992, 7, 297-301

**Sailer H.F., Kolb E.:** Application of purified bone morphogenetic protein (BMP) in craniomaxillo – facial surgery  
J Craniomaxfac Surg, 1994, 22, 2-11

**Sampath T.K., Reddi A.H.:** Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation  
Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78, 7599-7603

**Schmitz J.P., Hollinger J.O.:** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions  
Clin Orthop Relat Res, 1986, 205,299-308

**Spurrell, F. A.:** Osteon development in swine Swine biomedical research, 1965, 173-192

**Stevens M.M., Marini R.P., Schaefer D., Aronson J., Langer R., Shastri V.P.:** In vivo engineering of organs: the bone bioreactor  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102, 32, 11450-5

**Suba Z, Takács D., Matusovits D., Barabás J., Fazekas A., Szabó G.:** Maxillary sinus floor grafting with beta-tricalcium phosphate in humans: density and microarchitecture of the newly formed bone  
Clin Oral Implants Res, 2006, 17(1), 102-8

**Tadjoedin E.S., de Lange G.L., Holzmann P.J., Kulper L., Burger E.H.:** Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range

Clin Oral Implants Res, 2000, 11(4), 334-44

**Terheyden H., Jepsen S., Vogler S., Tucker M.M., Rueger D.C.:** Recombinant human osteogenic protein-1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier

Mund Kiefer Gesichtschir, 1997, 1, 272-275

**Terheyden H., Jepsen S., Möller B., Tucker M.M., Rueger D.C.:** Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenograft and recombinant human osteogenic protein-1: a histometric study in miniature pigs

Clin Oral Impl Res, 1999, 10, 510-521

**Terheyden H., Knak Ch., Jepsen S., Palmie S., Rueger D.:** Prefabrication of vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1. Part- 1 prefabrication

Int J Oral Maxillofac Surgery, 2001a, 30, 373-379

**Terheyden H., Warncke P., Jepsen S., Dunsche A., Brenner W., Toth C., Rueger D.:** Prefabrication of vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1. Part- 2 transplantation

Int J Oral Maxillofac Surgery, 2001b, 30, 373-379

**Toriumi D.M., Kotler H.S., Luxenberg D.P., Holtrop M.E., Wang E.A.:** mandibular reconstruction with a recombinant bone – inducing factor

Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1991, 117, 1101-1112

**Tsuruga E., Takita H., Itoh H., Wakisaka Y., Kuboki Y.:** Pore size of porous hydroxyapatite as the cell – substratum controls MBP – induced osteogenesis

J Biochem, 1997, 12, 317-324

**Urist M.R.:** Bone formation by autoinduction

Science, 1965, 150, 893-899

**Urist M.R., Mikulski A., Lietze A.:** Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein

Proc Natl Acad Sci, 1979, 76, 1828-1832

**Valdrè G., Mongiorgi R., Ferrieri P., Corvo G., Cattaneo V., Tartaro G.P.:** Scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis (EDS) applied to the study of biomaterials for dental use

Minerva Stomatol, 1995, 44, 55-68

**Wang E.A., Rosen V., Cordes P., Hewick R.M., Kriz M.J., Luxenberg D.P., Sibley B.S., Wozney J.M.:** Purification and characterization of other distinct bone inducing factors

Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85, 9484-9488

**Wang E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., Israel D.I., Hewick R.M., Kerns K.M., LaPan P., et al.:** Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation  
Proc Natl Acad Sci 1990, 87, 2220-2224

**Wiltfang J., Schultze-Mosgau S., Nkenke E., Thorwart M., Neukam F.W., Schlegel K.A.:** Onlay augmentation versus sinuslift procedure in the treatment of the severely resorbed maxilla: a 5-year comparative longitudinal study  
Int J Oral Maxillofac Surg, 2005, 34(8), 885-9

**Wolfe M.W., Cook S.D.:** Use of osteoinductive implants in treatment of bone defects  
Med Prog Technol, 1994, 20, 155-168

**Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitscock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A.:** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities  
Science, 1988, 242, 1528-1533

**Wozney J.M., Rosen V.:** Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic family in bone formation and repair  
Clin Orthop, 1998, 346, 26-37

**Xiang W., Baolin L., Yan J., Yang X.:** The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants  
J Oral Maxillofac Surg, 1993, 51, 647-651

**Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K.:** The design of scaffolds for use in tissue engineering: Part 1 traditional factors  
Tissue Engineering, 2001, 7, 679-689

**Zellin G., Hedner E., Linde A.:** Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review

Connect Tissue Res, 1996, 35, 279-284

**Zhang C., Wang J., Feng H., Lu B., Song Z., Zhang X.:** Replacement of segmental bone defects using porous bioceramic cylinders: A biomechanical and X – ray diffraction study

J Biomed Mater Res, 2001, 54, 407-411

## 7 Anhang

### Schädel-CT 1 Woche post OP

	HA	HA/BMP	HA60	HA60/BMP	Kontrolle	TCP	TCP/BMP
Volumen (ccm)	0,76	0,75	0,74	0,71	0,45	0,73	0,82

### Schädel-CT 10 Wochen post OP

	HA	HA/BMP	HA60	HA60/BMP	Kontrolle	TCP	TCP/BMP
Volumen (ccm)	0,51	1,06	0,78	1,33	0,29	0,28	1,53

### Schädel-CT 14 Wochen post OP

	HA	HA/BMP	HA60	HA60/BMP	Kontrolle	TCP	TCP/BMP
Volumen (ccm)	0,67	1,05	0,78	1,14	0,08	0,39	0,93

Tab. 1: Computertomographische 3D-Auswertung einer HA und HA60-Keramik mit und ohne BMP-7 nach der 1., 10. und 14. Woche nach Kranioplastik am Göttinger Minischwein

## 8 Danksagung

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. **T. E. Reichert** – Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für Überlassung der Laboratorien und Unterstützung bei der Präsentation vorläufiger Ergebnisse auf internationalen Kongressen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. **J. C. Roldán**, Oberarzt an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg, Leiter des Kapitels „*in vivo* Studie“ im Rahmen des Hauptprojektes „Entwicklung eines *in vitro* – Testsystems zur Bestimmung des Abbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien.“ – gefördert durch das BMBF, danke ich für die Vergabe des Themas und besonders für die stetige Bereitschaft mir bei kritischen Fragen Anregungen und Unterstützung beim Verfassen der Arbeit zur Seite gestanden zu haben.

Prof. Dr. med. **E. Tamm** – Lehrstuhlinhaber für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg danke ich für die Bereitstellung der Gefrierräume und Arbeitsmittel zur Präparatherstellung

Prof. Dr. ing. **G. Ziegler** – Direktor des Friedrich-Baur-Forschungsinstituts für Biomaterialien danke ich für die Bereitstellung des REM/ESEM, die freundliche Betreuung und den kompetenten Umgang.

Prof. Dr. med. **A. Schreyer**, MBA – Leitender Oberarzt des Instituts für Röntgendiagnostik der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die Bereitstellung des Computertomographen und die freundliche Einweisung in diese komplexen bildgebenden Verfahren.

Priv.-Doz. Dr. med. **C. Diez** – Oberarzt aus der Klinik für Herzchirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die Unterstützung in der statistischen Auswertung.

Dr. ing. **R. Detsch**, Msc. und Dr. ing. **U. Deisinger** – Mitarbeiter des Friedrich-Baur-Forschungsinstituts für Biomaterialien mit den Schwerpunkten Zellbiologie und Keramikforschung danke ich für Betrachtung aus materialtechnischer Seite und den hilfreichen Hinweisen.

Dr. med. **C. Schellenberg** – Fachärztin für Anästhesie aus der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die fachgerechte Betreuung und Narkose der Minischweine.

LTA **G. Gebhard** – Mitarbeiter am Labor für Knochenforschung der Klinik und für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich vielmals für die Geduld und Bewältigung der Masse an Anfangsdaten

MTA **A. Böttiger** – Mitarbeiterin am Labor für Knochenforschung der Klinik und für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die kompetente Auseinandersetzung und Bewältigung der Tücken mit dem Umgang mineralisierter Präparate, deren Paraffineinbettungen, dem fotografieren der Fluoreszenzbilder und die Anfertigung der Giemsa-Färbungen.

Dr. med. vet. **T. Spruss**, Tierschutzbeauftragter der Universität Regensburg und Tierpfleger, und die Betreuer des Tierstalls danke ich für die liebevolle Betreuung der Tiere.

ZA **T. Klünter** danke ich als Freund, Wissenschaftler und Mitglied der Forschergruppe Knochenersatzmaterialien an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg für die kritischen aber formstabilen Auseinandersetzungen mit den Themen der Arbeit und die stets geduldigen Abende und Nächte an CT, ESEM und CLSM.