

Aus dem Lehrstuhl für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Torsten E. Reichert)  
der Fakultät für Medizin  
an der Universität Regensburg

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

Inauguraldissertation  
Zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Tim Klünter  
aus Bergisch-Gladbach

Regensburg 2013



Aus dem Lehrstuhl für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Torsten E. Reichert)  
der Fakultät für Medizin  
an der Universität Regensburg

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

Inauguraldissertation  
Zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Tim Klünter  
aus Bergisch-Gladbach

Regensburg 2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Dr. J. Camilo Roldán

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

## **Inhaltsverzeichnis:**

### 1. Einleitung

- 1.1 Einführung
- 1.2 Wachstumsfaktoren
- 1.3 “Bone morphogenetic protein“ (BMP)
- 1.4 Knochenersatzmaterialien (KEM)
- 1.5 Ektope Knochenbildung
- 1.6 Fragestellung

### 2. Materialien und Methoden

- 2.1 Versuchsaufbau
- 2.2 Auswahl der Versuchstiere und Tierhaltung
- 2.3 Knochenersatzmaterialien
- 2.4 Rekombinantes humanes “Bone Morphogenetic Protein–7“ (rhBMP-7), sogenanntes Osteogenetic Protein–1 (OP-1)
- 2.5 Narkoseverfahren
- 2.6 Versuchsdurchführung / Operation
  - 2.6.1 Operationsvorbereitung
  - 2.6.2 Operationsdurchführung
  - 2.6.4 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung
  - 2.6.4 Intravitale Perfusion
  - 2.6.5 Explantation
- 2.7 Analysemethoden
  - 2.7.1 Computertomographie
  - 2.7.2 Makroradiographie / Kontaktaufnahmen
  - 2.7.3 Herstellung der Präparate
    - 2.7.3.1 Herstellung der unentkalkten Hartschliffpräparate
    - 2.7.3.2 Herstellung der Paraffinpräparate
  - 2.7.4 “Environmental Scanning Electron Microscopy “(ESEM)
  - 2.7.5 Fluoreszenzmikroskopie

- 2.7.6 “Confocal Laser Scanning Microscopy”(CLSM)
- 2.7.7 Pentachrom – Färbung nach Movat
- 2.7.8 TRAP – Färbung (Tartrat-resistente saure Phosphatase)
- 2.8 Statistische Auswertung

### 3. Ergebnisse

- 3.1 Klinische Ergebnisse
- 3.2 Makroradiographie
- 3.3 Computertomographie
- 3.4 “Environmental Scanning Electron Microscopy “(ESEM)
- 3.5 Fluoreszenzmikroskopie
- 3.6 “Confocal Laser Scanning Microscopy“(CLSM)
- 3.7 Histologie
  - 3.7.1 Pentachrom-Färbung
  - 3.7.2 TRAP-Färbung

### 4. Diskussion

- 4.1 Bewertung des Versuchsaufbaus : Bedeutung der verwendeten bildgebenden Verfahren
- 4.2 Abbau der Keramiken
- 4.3 Ektope Knochenbildung
- 4.4 Vergleich der verschiedenen Keramiken

### 5. Zusammenfassung

### 6. Lebenslauf

### 7.Danksagung

### 8.Literaturverzeichnis

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

In der Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie sowie der zahnärztlichen Chirurgie stellt sich die Überbrückung und Wiederherstellung von knöchernen Defekten im Bereich der Alveolarfortsätze als eine der größten Herausforderungen dar. Diese können durch ablative Tumor Chirurgie, Trauma, Infekte oder Fehlbildungen wie z.B. Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten bedingt sein. Des Weiteren können Parodontalerkrankungen oder auch die physiologische Knochenresorption nach Zahnextraktion Ursache für knöcherne Defekte sein (Hirschfeld et al. 1978).

Zur Versorgung und Rekonstruktion solcher Defekte gilt das autologe Knochentransplantat als Goldstandard (Neukam und Buser 1996; Kübler et al. 2002). Barth beschrieb schon 1893 die Grundlagen dieser Therapiemöglichkeit.

Zur Versorgung solcher Defekte kann bei kleineren Ausmaßen der Kieferwinkelbereich oder auch der Kinnbereich als Donorregion zur Gewinnung des Knochentransplantates verwendet werden. Bei größeren Defekten in denen das Knochenangebot in den beschriebenen Regionen nicht ausreichend ist, kann der Beckenkamm als freies Knochentransplantat sowie die Fibula als mikrochirurgisch anastomosiertes Transplantat zur Versorgung dienen.

Bei Rekonstruktionen mit Knochentransplantaten aus körpereigenen Regionen liegen die Vorteile in der fehlenden Antigenität des autologen Transplantates sowie der Sicherheit, keine viralen Infektionen (Hepatitis oder HIV) zu übertragen. Als Nachteil muss allerdings angeführt werden, dass ein zweites Operationsgebiet eröffnet werden muss, in dem es zu Hämatombildungen, Infektionen und postoperativen Beschwerden und Schmerzen kommen kann. Die größte Limitation dieser Therapieform stellen die Schwierigkeit der Formanpassung des gewonnenen Knochentransplantates sowie die begrenzte Verfügbarkeit des autologen Knochen dar (Artico et al. 2003).

Aufgrund der aufgeführten Nachteile werden außerdem verschiedene Knochenersatzmaterialien zur Versorgung knöcherner Defekte verwendet.

Die Knochenersatzmaterialien als Trägermaterial sollen den Anspruch erfüllen eine ostekonduktive Wirkung zu besitzen. Dies ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen an den Knochenersatzmaterialien.

Ostekonduktiv bedeutet, dass das Material eine Leitschiene bildet in welche perivaskuläres Gewebe, Kapillaren und Knochenzellen einwachsen können.

Wachstumsfaktoren wie z.B. BMP sowie das Periost besitzen eine osteoinduktive Wirkung.

Im Gegensatz zur Osteokonduktivität der Knochenersatzmaterialien beschreibt die Osteoinduktivität die Umwandlung mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitorzellen mit anschließender Osteogenese (Wolfe et al. 1994).

PDGF (platelet derived growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor), IGF (insulin growth factor) und die BMP's (bone morphogenetic proteins) sind an Umbauprozessen des Knochens beteiligt (Lane et al. 1999). Diese Wachstumsfaktoren bilden zusammen mit den Osteoblasten und einer Matrix die drei Grundelemente der Knochenbiologie, und auf ihnen beruhen damit die Prinzipien der Regeneration von Knochen.

## 1.2 Wachstumsfaktoren

PDGF und TGF- $\beta$  sind Wachstumsfaktoren welche proliferative Effekte auf Prä- und Osteoblasten bei *in-vitro* und *in-vivo* Studien zeigten (McCarthy et al. 2000). Das bedeutet, dass diese Faktoren ausschließlich einen zellvermehrenden und keinen differenzierenden Effekt besitzen. BMP, welches zur Proteinfamilie TGF- $\beta$  zählt, zeigt im Gegensatz zu diesen einen differenzierenden Effekt. BMP induziert somit die Transformation von undifferenzierten Zellen in Osteoblasten. Die BMP's 2 und 7 weisen in der Gruppe der BMP's den größten Einfluss auf osteogenetische Prozesse, d.h. die größte Osteoinduktivität auf (Küsswetter et al. 1999; Chen et al. 2012). Aufgrund dessen ist es möglich, durch lokale Applikation von BMP in ein Trägermaterial, eine ektopische Knochenbildung zu induzieren.

## 1.3 Bone morphogenetic protein

1965 wurde erstmals der osteoinduktive Effekt des BMP's festgestellt, 1973 wurde BMP erstmals charakterisiert (Wozney et al. 1988; Wang et al. 1988), den Namen bone morphogenetic protein (BMP) prägten allerdings erst 1979 Urist et al. BMP's zählen aufgrund ihrer Aminosäuresequenz zur TGF- $\beta$  Familie (Wozney et al. 1998). Bekannt sind heute ca. 40 Verschiedene (Chen et al. 2012). Die morphogenetische Potenz der BMP's ist dosisabhängig (Noda et al. 1989; Küsswetter et al. 1999). Ein noch nicht gelöstes Problem ist die *in-vivo* Dosierung (Gessink et al. 1999).

Auch in der Embryogenese spielen BMP's, vor allem BMP-7 eine entscheidende Rolle. Hierbei entscheidend bei der Entwicklung der Nieren, des Nervensystems, der Leber, des Herzens und der Augen (Bechtel et al. 2009).

Ebenfalls konnten im Bereich der Dentinogenese (Jepsen et al. 1997) und der Zementogenese (Ripamonti et al. 1996) positive Effekte des BMP-7 festgestellt werden.

Wozney et al. (1988) und Özkaynak et al. (1990) waren in der Lage die BMP's auf rekombinante Art herzustellen, nachdem sie die Struktur der c-DNA und der Aminosäuresequenz identifiziert hatten. Die Entwicklung dieser Technik verhalf zu einer besseren Verfügbarkeit und somit Handhabung der BMP's. Vor der Entwicklung dieses Herstellungsverfahrens war die dissoziative Extraktion aus Knochenmatrix die einzige Möglichkeit BMP zu gewinnen (Sampath et al. 1981).

Seitdem die Möglichkeit besteht an BMP auf rekombinante Art zu gelangen, konnte durch verschiedenen Autoren beschrieben werden, wie sowohl in der kraniofazialen (Toriumi et al. 1991; Sailer et al. 1994; Boyne et al. 1998 Terheyden et al. 1999) als auch in der orthopädischen Chirurgie (Johnson et al. 1992, Cook et al. 1994), sogenannte *''critical size defects''* am Tiermodell sowie beim Menschen versorgt werden konnten.

In verschiedenen weiteren Studien stellte sich heraus, dass der mit BMP-7 induzierte Knochen wesentlich stabilere mechanische Eigenschaften aufwies als das native, autologe Knochentransplantat (Rutherford et al. 1992; Xiang et al. 1993; Cook et al. 1994; Nevins et al. 1996; Kirker-Head et al. 1997; Ong et al. 1999).

Zur Verwendung der BMP's ist ein geeignetes Trägermaterial erforderlich, da es ansonsten zu einer Verteilung im Gewebe und damit einer Auflösung im Wasser kommt, wodurch die Wirkung verfehlt wird (Cook et al. 1994; Zellin et al. 1996). Vorwiegend werden Trägermaterialien aus mineraler oder kollagenartiger Grundsubstanz verwendet.

Knochenersatzmaterialien sind in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus als Trägermaterial gelangt. Aufgrund ihrer osteoinduktiven Effekte bei der Knochenneubildung eignen sie sich sehr gut als Matrix.

Der limitierende Faktor bei der Verwendung der BMP's sind die Knochenersatzmaterialien, da sie noch nicht die gewünschten optimalen Voraussetzungen bezüglich des Resorptions- und Degradationsverhaltens zeigen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es unter anderem das Resorptions- und Degradationsverhalten der Knochenersatzmaterialien und den Einfluss von BMP's auf dieses zu untersuchen.

Hierzu werden verschiedene Knochenersatzmaterialien in An- oder Abwesenheit von BMP untersucht.

#### 1.4 Knochenersatzmaterialien (KEM)

Knochenersatzmaterialien sollen als Leitschienen dienen, welche osteokonduktiv wirken und durch *bone remodeling* Schritt für Schritt durch neuen, vitalen Knochen ersetzt werden. Diese Anforderungen kann bisher kein KEM erfüllen.

Knochenersatzmaterialien lassen sich unterteilen in allogene, xenogene und alloplastische Materialien.

Die idealen Eigenschaften für Knochenersatzmaterialien sind Biokompatibilität, Abbaubarkeit, mechanische Stabilität, fehlendes Infektionsrisiko, Porengeometrie und die daraus folgende Osteokonduktivität sowie ausreichende Verfügbarkeit aus (Jones et al. 2003).

Allogen bezeichnet Knochenersatzmaterial menschlichen Ursprungs. Dieses Material wird aufgrund des Infektionsrisikos sowie der allgemeinen Ablehnung durch den Großteil der Patienten kaum verwendet.

Das xenogene Material stammt aus einer anderen Spezies wie Schweinen oder Rindern. Diese Knochenersatzmaterialien werden speziellen Aufbereitungsmaßnahmen unterzogen um das Infektionsrisiko zu minimieren. Hierzu werden die organischen Anteile eliminiert. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass xenogene Knochenersatzmaterialien eine ausgezeichnete Osteokonduktivität besitzen (Valdre et al. 1995; Berglundh und Lindhe 1997; Açil et al. 2000).

Alloplastische Knochenersatzmaterialien werden im Gegensatz zu den allogenen und xenogenen Materialien synthetisch hergestellt. Hierbei zeigten Materialien auf Calciumphosphat-Keramik Basis, insbesondere aus Hydroxylapatit (HA) aber auch Tricalciumphosphat (TCP) die ausgeprägte Bioverträglichkeit (Osborn 1985). Sie eignen sich dementsprechend als Trägermaterial. HA- und TCP-Keramiken zeigten eine gute Osteokonduktivität (Gosain et al. 2005). In ihrem Resorptionsverhalten unterscheiden sich die beiden Keramiken grundsätzlich voneinander. HA-Keramiken unterliegen einer nur bedingten Resorption, wogegen TCP-Keramiken in sehr kurzer Zeit eine fast vollständige Resorption zeigen. Um das Resorptionsverhalten zu optimieren werden vermehrt Mischungen von HA- und TCP-Keramiken verwendet, die sogenannten biphasischen Calciumphosphate (BCP hier: HA60). So auch in der vorliegenden Arbeit (Zhang et al. 2001; Daculsi et al. 2004; Detsch et al. 2008; Roldán et al. 2010).

Eine entscheidende Rolle der Knochenersatzmaterialien stellt deren Porosität dar. Sie sollte bei ca. 70-80% liegen (Karageorgiou et al. 2005). Die Porosität ist notwendig, damit es zu einer Einsprossung von Osteoblasten und Gefäßen in die Knochenersatzmaterialien und somit zu

einer Knochenneubildung kommen kann (King 2004; Yang et al. 2001). Die Porengröße liegt optimaler Weise zwischen 300 – 600µm. In diesem Bereich ist Knochenneubildung am ausgeprägtesten (Tsuruga et al. 1997; Flautre et al. 2001; Kruyt et al. 2003; Pamula et al. 2008).

Es gibt zurzeit sehr viele verschiedene Knochersatzmaterialien auf dem Markt, wobei es mittlerweile weit mehr alloplastische als allogene und xenogene Materialien gibt. 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. %).

Roldán et al. konnten 2010 osteoinduktive Eigenschaften einer Calciumphosphat-Keramik an einem ektopen Mausmodell nachweisen. In der vorliegenden Studie sollten weiterführende Erkenntnisse zum Resorptions- und Degradationsverhalten sowie der Knochenneubildung an den von Roldán et al. verwendeten Keramiken am Grosstier (Minischwein) evaluiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden 3 verschiedene Knochenersatzmaterialien verwendet. Eine Hydroxylapatit-Keramik, eine Tricalciumphosphat-Keramik sowie eine Biphasische Calciumphosphat-Keramik im Mischungsverhältnis 60:40 (HA:TCP). Diese Materialien wurden am Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien an der Universität Bayreuth entwickelt und produziert.

### 1.5 Ektope Knochenbildung: Versuchsmodell und klinische Relevanz

Ein derzeitiger Forschungsansatz ist es, Gewebe nicht *in-vitro*, sondern *in-vivo* zu züchten, um diese für die Defektversorgung nach entsprechendem Transfer zu verwenden. Dieser Ansatz basiert darauf, dass durch die vermehrte Durchblutung im Muskel die Entwicklung von neuem Knochengewebe, induziert durch BMP, in ein geeignetes Knochenersatzmaterial begünstigt wird. Dieses neu gebildete Gewebe kann im Anschluss als Lappenplastik mikrochirurgisch anastomosiert oder gestielt transplantiert werden.

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. Es konnte auch gezeigt werden, dass Knochersatzmaterialien in Verbindung mit Bone morphogenetic protein 7 eine Knochenneubildung induzierten (Ripamonti et al. 2001, Roldán et al. 2004, Detsch et al. 2008).

Am ektopen Modell soll in der vorliegenden Studie das Degradations- und Resorptionsverhalten sowie die Knochenneubildung mit und ohne BMP-7 weiterführend erforscht werden.

## 1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll am ausgewachsenen Göttinger Minischwein ektop das Degradations- und Resorptionsverhalten verschiedener synthetischer Keramiken in An- und Abwesenheit von BMP-7 untersucht werden.

Des Weiteren soll die Knochenneubildung in den verschiedenen Calciumphosphat-Keramiken im zeitlichen Ablauf evaluiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchaufbau

Es wurden zwei Gruppen (Gruppe I: HA vs. HA60, Gruppe II:  $\beta$ -TCP vs. HA60) aus jeweils fünf Göttinger Minischweinen (Ellegard Göttingen Minipigs ApS, Dalmose, Dänemark) gebildet.

Die Keramiken (1cm x 1cm x 0,5cm) wurden in den **Musculus latissimus dorsi** (Rückenmuskulatur) rechts- und linksseitig implantiert. Je Seite wurden 2 Implantate gesetzt, wobei je ein Implantat mit 250  $\mu$ g Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) beimpft wurde. Dies wurde mit einer Pipette *in-situ* durchgeführt. Die Implantation der Keramiken erfolgte nach einem Rotationsverfahren. (Abb.1).



Abb.1:

Lokalisation der implantierten Keramiken im *Musculus latissimus dorsi* in An- und Abwesenheit von BMP-7

Die Operation wurde in Intubationsnarkose in Kooperation mit der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Die Operationsdauer betrug durchschnittlich 30 min. und belastete die Tiere kaum. Es gab keine anästhesiologischen oder chirurgischen Komplikationen.

Zur Dokumentation der korrekten Implantatposition und Ausgangsdichte der Implantate wurde bei 6 Tieren (drei Tiere pro Gruppe) nach einer Woche eine Computertomographie in

intravenöser Narkose durchgeführt (500mg Ketamin [Ketavet<sup>®</sup>, Parke-Davis und Comp, München, Deutschland] 2ml Stresnil + Atropinsulfat 0,5 mg/ml [Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien]).

CT-Verlaufskontrollen erfolgten 10-14 Wochen *post operationem* je Tier zwei.

Nach der 1., 6., 8., und 12. postoperativen Woche wurden Fluorochrome zur zeitlichen Markierung der Knochenneubildung eingespritzt (Roldán et al. 2004). Die Versuchsdauer lag bei 14 Wochen, danach wurden die Tiere geopfert.

Zur weiteren Untersuchung wurden die Präparate geteilt und zum einen unentkalkte Hartschliffe in Methylmethacrylat eingebettet. Diese wurden histomorphometrisch durch *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM) sowie mit der *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) ausgewertet. Die Fluoreszenzmarkierung wurde ebenfalls am Fluoreszenzmikroskop evaluiert. Die zweite Hälfte wurde in Paraffin eingebettet und histologisch (TRAP- und Pentachromfärbung) untersucht. Die Pentachrom-Färbung zeigt die Knochenneubildung in den Keramiken und mit Hilfe der TRAP- Färbung konnten Osteoklasten detektiert werden

## 2.2 Auswahl der Versuchstiere und Tierhaltung

Der Tierversuch wurde durch die Regierung der Oberpfalz gemäß des Tierschutzgesetzes – TierSchG- § 8 Abs. 1 genehmigt und durch das *Bundesministerium für Bildung und Forschung* finanziert (BMBF Projektnr.: 3614801). Das Göttinger Minischwein hat sich in der Knochenforschung als Tiermodell bewährt, da es einen im Vergleich zum Menschen sehr ähnlichen Stoffwechsel des Knochens besitzt (Roldán et al. 2004).

Die im Durchschnitt 36 Monate alten 10 Tiere wogen zwischen 33 und 41 kg. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen (2m x 3,5m) auf Strohgrund in denen sie sich frei bewegen konnten. Die Raumtemperatur betrug 20°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 60–70%. Die Tiere wurden 2mal täglich mit 250 g Standardtiernahrung (Atromin 9023<sup>®</sup>, Atromin International GmbH, Heppenheim, Deutschland) gefüttert. Wasser wurde *ad libitum* gegeben. Die Reinigung der Käfige erfolgte 2 mal täglich unter Einhaltung eines zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Durch den intra-individuellen Vergleich und die multilokale Implantation des zu untersuchenden Materials ist die Anwendung von einer kleinen Tierzahl mit einer geringen Variabilität möglich.

### 2.3 Knochenersatzmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Knochenersatzmaterialien wurden am Friedrich-Baur-Institut für Biomaterialien an der Universität Bayreuth durch die sogenannte PU-Replika Technik hergestellt.

Hierbei wurden die auf die vorhergesehene Größe vorbereiteten PU-Schäume mit einem dünnflüssigen CaP-Schlicker (HA; HA60; TCP) tauchbeschichtet. Die PU-Schäume wurden bei 400°C ausgebrannt und anschließend die Keramiken bei 1300°C 1h gesintert. Zur besseren Stabilisierung des porösen Gerüsts wurde dieser Vorgang ein zweites Mal wiederholt.

Die Porosität der entstandenen Keramiken betrug 92% und war von großen Porositäten durchsetzt, welche durch Mikroporositäten verbunden sind.

Zur Gewährleistung einer gleichbleibenden Qualität der Keramiken wurde vom Friedrich-Baur-Institut ein Qualitätssicherungssystem eingeführt und angewandt (Deisinger 2009).

### 2.4 Rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein-7 (rhBMP-7), sogenanntes Osteogenetic Protein-1 (OP-1)

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

### 2.5 Narkoseverfahren

Die Anästhesie wurde durch die Injektion von 30 mg Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Parke- Davis und Comp, München, Deutschland) und 2 mg Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer-Leverkusen, Leverkusen, Deutschland) in den *Musculus gluteus maximus* eingeleitet. Zur elektrokardiographischen Überwachung wurden Nadelelektroden an den Extremitäten verwendet. Die Intubation wurde unter Zuhilfenahme eines Führungsdrahtes und der McGill Zange durchgeführt, nachdem eine Präoxygenierung mit 100% O<sub>2</sub> stattgefunden hatte. Sie erfolgte in Bauchlage mit einem Miller Laryngoskop der Größe 4 sowie einem blockbaren Standardtubus der Größe 5,5 (Portex, Kent, England).

Bei einem Atemvolumen von 400ml und einer Atemfrequenz von 20 Atemzügen pro Minute wurde die Narkose mit 66% N<sub>2</sub>O, 32% O<sub>2</sub> und 2% Isofluran (Florene<sup>®</sup>, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

Zur Schmerzprophylaxe wurde intramuskulär in den *Musculus glutaesus maximus* 1g Metamizol (Novaminsulfon-Rathiofarm<sup>®</sup>, Ulm, Deutschland) gegeben.

Die Tiere wurden präoperativ mit 1g Clemizol-Penicillin (Clemizol-Penicillin i.m. forte<sup>®</sup>, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) antibiotisch abgeschirmt.

Die Sequenzmarkierung mittels der Fluorochrome wurde unter Sedierung mit 250mg Zolazepam / 250mg Tiletamin i.m. (Tilest<sup>®</sup>, 500 Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) durch eine intraperitoneale Injektion durchgeführt.

## 2.6 Versuchsdurchführung / Operation

### 2.6.1 Operationsvorbereitung

Zur Operationsvorbereitung wurden den Tieren in den Operationsgebieten mittels Schere und Einmalrasierer die Borsten entfernt und diese Gebiete im Anschluss mit Povidon-Jod-Lösung (Betaisodona<sup>®</sup>, Mundipharma, Limburg an der Lahn, Deutschland) desinfiziert. Die Tiere wurden auf dem Bauch gelagert und mit sterilen Lochtüchern abgedeckt. Die Schnittführung in den Operationsgebieten wurde mit einem sterilen Stift angezeichnet.

Als Lokalanästhetika wurde vor dem Schnitt Xylocain<sup>®</sup> 0,5% mit Adrenalinzusatz 1: 200.000 (Lidocain, Astra, Schweden) subkutan gespritzt.

### 2.6.2 Operationsdurchführung

Es wurden je 2 Schnitte pro Seite mit dem Skalpell durchgeführt und bis zum *Musculus latissimus dorsi* präpariert. Hier wurden nun die dem Plan entsprechenden Keramiken eingebracht (Abb.2 und 3). Jeweils eine Keramik pro Seite wurde mit 250µg BMP – 7 *in-situ* beimpft. Die Wunden wurden in Schichten vernäht.

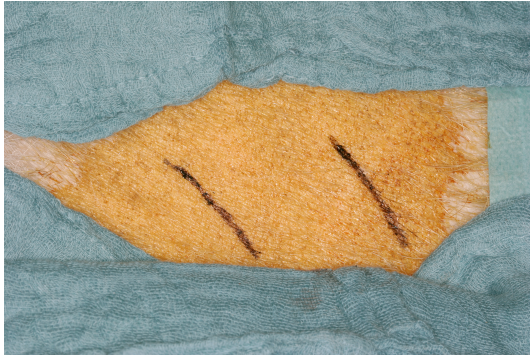


Abb.2: Angezeichnete Schnitfführung im Rücken  
(*Musculus latissimus dorsi*)

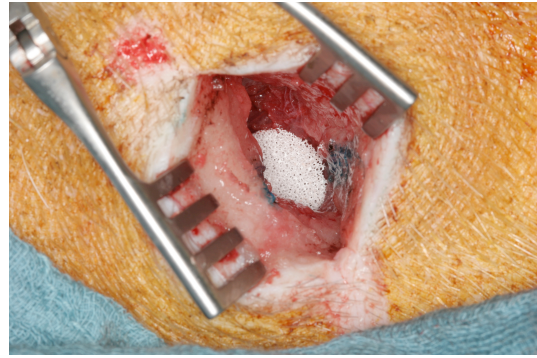


Abb.3: Einbringen einer Calcium-  
phosphat-Keramik

### 2.6.3 Intravitale polychrome Sequenzmarkierung

Zur Markierung der Knochenapposition wurden Fluorochrome intraperitoneal injiziert (Rahn 1976). Die Fluorochrom-Sequenz-Markierung erfolgte intraperitoneal in Narkose (500mg Ketamin [Ketavet<sup>®</sup>, Parke-Davis und Comp, München, Deutschland] 2ml Stresnil + Atropinsulfat 0,5 mg/ml [Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien]). Die Appositionen 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. 2004).

Diese Technik ermöglicht die Nachverfolgung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung in der 1., 6., 8., und 12. postoperativen Woche.

### 2.6.4 Intravitale Perfusion

14 Wochen nach Implantation wurden die Tiere durch eine intravitale kardiale Perfusion, welche in Intubationsnarkose durchgeführt wurde, geopfert. Mit einer oszillierenden Säge wurde zuerst der Thorax in der Medianebene und im Anschluss das Perikard eröffnet. Hierbei konnte ein Pneumothorax vermieden werden. Die Aortenwurzel wurde vorsichtig vom Perikard abpräpariert und mit einem Band umschlungen. Anschließend wurde der linke Ventrikel stichförmig mit einem Skalpell (Nr.11) eröffnet und eine Kanüle, mit einer aus Kunststoff geformten Kugel an der Spitze bis zur Aortenwurzel eingebracht. Die Kugel diente als Wiederlager zur Absicherung eines Zurückgleitens der Kanüle. Hierzu wurde die Kanüle mit eine Band an der Aortenwurzel fixiert.

Zum Auslösen eines sofortigen Herzstillstandes wurde nun eine kardioplege Lösung (Kaliumchlorid) in den Ventrikel injiziert. Anschließend wurde die Die *Vena cava* und der rechte Vorhof eröffnet und die intrakardiale Perfusion begann. Die Tiere wurden mit 3 L Ringer-Lösung und anschließend 500ml Fixierlösung (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 gespült (Roldán et al. 2004).

Die Perfusion wurde in Kooperation mit der Sektion Kardiotechnik der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg vorgenommen.

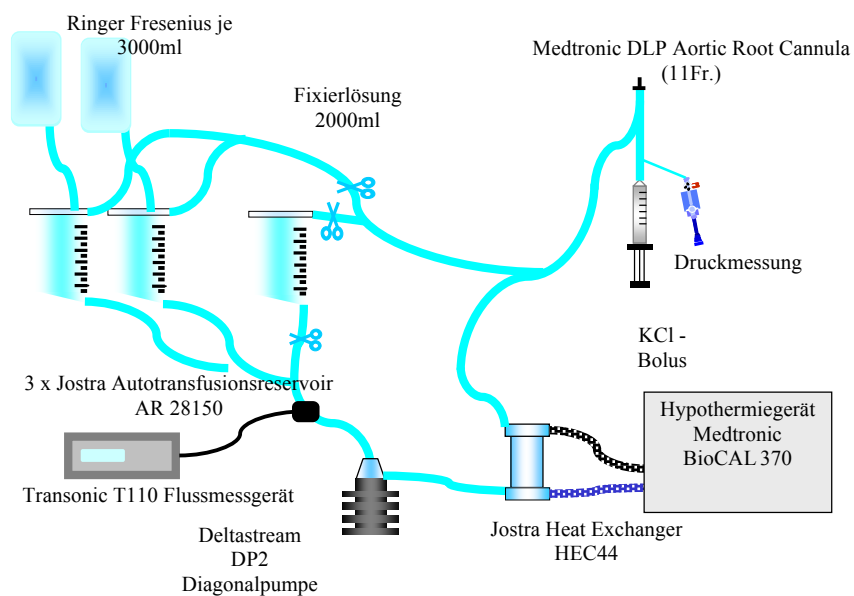


Abb.4: Intravitale Perfusion zur Fixierung des Gewebes. Quelle: Perfusionsschema, Sektion Kardiotechnik der Klinik für Herzchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg.

## 2.6.5 Explantation

Nach Abschluss der Perfusion konnte die Lage der Präparate anhand der Narben ermittelt werden. Diese wurden als 10cm x 10 cm große Stücke explantiert und anschließend mit 4%iger Formaldehyd-Lösung für 10 Tage fixiert. Die Lagerung der explantierten Präparate erfolgte bei 18°C im Anatomischen Institut der Universität Regensburg.

## 2.7 Analysemethoden

### 2.7.1 Computertomographie

Zur Nachverfolgung des Volumens, der Höhe und der Röntgendichte (HU) der implantierten Keramiken erfolgten in der 1., 10. und 14. Woche *in-vivo* Computertomographie (CT)-Aufnahmen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Röntgendiagnostik des Universitätsklinikums Regensburg mit einem Siemens Somatom Plus 4/Sensation 16 (Siemens, München, Deutschland), 120kV, 33mAs, Algorithmus „Ultralight“, 1mm Schichtdicke und Tischvorschub) und der Auswertungssoftware / dem Bildbearbeitungsprogramm (Syngo 3D Workstation Leonardo, Siemens, München, Deutschland). Die CT-Aufnahmen wurden mit intravenöser Narkose bei spontaner Atmung (500mg [Ketamin, Ketavet<sup>®</sup>, Parke-Davis und Comp, München, Deutschland] 2ml Stresnil + Atropinsulfat 0,5 mg/ml [Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien]) durchgeführt.



Abb.5: *in-vivo* CT vor Beendigung der Studie

### 2.7.2 Makroradiographie / Kontaktströntgenaufnahmen

Zur Lagebestimmung des Knochenersatzmaterials in den explantierten Präparaten wurden Kontaktströntgenaufnahmen durchgeführt (Siemens multi 09419446322, München, Deutschland). Zur Orientierung der anschließenden Schnittführung wurden in jedem Präparat 3 Reißzwecken fixiert.

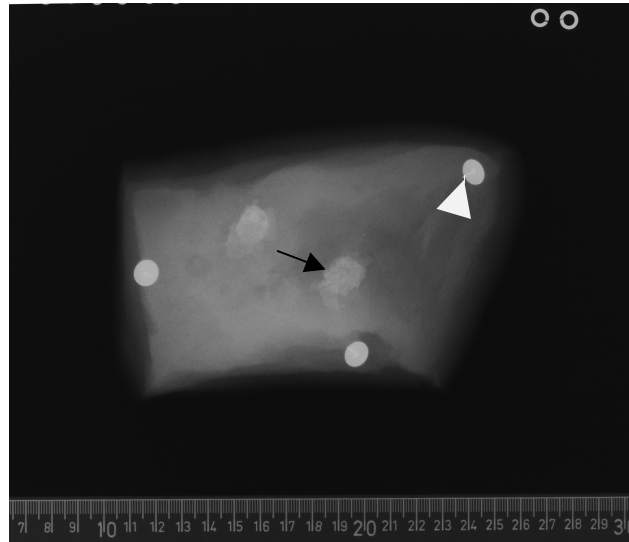


Abb.6: Kontaktströntgenaufnahme zur Lokalisierung des Implantates im Präparat. Schwarzer Pfeil=Implantat; Weißer Pfeil=Reißzwecke.

### 2.7.3 Herstellung der Präparate

Die Präparatherstellung begann mit dem groben Zurechtsägen der Explantate mit einer Bandsäge im Anatomischen Institut der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg. Die Implantatpositionen wurden mit Hilfe von Markierungslinien, die durch die Kontaktströntgenaufnahmen eingezeichnet werden konnten, bestimmt und mit einer kleineren Stichsäge die einzelnen Präparate voneinander getrennt. Es folgte die mittige Durchtrennung der einzelnen Präparate. Es konnte nun jeweils eine Hälfte für die Herstellung unentkalkter Hartschliffe und die andere für entkalkte Paraffineinbettung verwendet werden.

### 2.7.3.1 Herstellung der unentkalkten Hartschliffpräparate

Die Hartschliffpräparate wurden nach der Methode von Donath et al. (1982) hergestellt.

Die Präparate wurden für 5 Tage in 4% Formalin, Phosphatpuffer nach Sørensen und 70% Isopropylalkohol fixiert und anschließend graduell in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert.

Für eine Woche wurden die Blöcke in Methylmethacrylat-Monomer [Lösung aus 500mg Methacrylsäuremethylester und 3g Azoisobutyronitril (Fulka Chemie AG, Darmstadt, Deutschland), 100ml Nonylphenolpolyglycolaetheracetat (Walter GmbH, Kiel, Deutschland) und 5ml Phthalsäuredibutylester (Mer AG, Darmstadt, Deutschland)] eingebettet und in 2 Wochen bei 38°C auspolymerisiert.

Zur weiteren Auswertung wurden die Präparate nach Abschluss der Polymerisation mit einem Mikroschleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland) bearbeitet und eine Hochglanzoberflächenpolitur mit demselben Gerät erzeugt. Hierzu wurde Silikonkarbidpapier der Körnungen 800, 100, 1200, 2400, 4000 und 8000µm verwendet.

Die Herstellung der unentkalkten, in Methylmethacrylat eingebetteten Hartschliffpräparate, erfolgte nach der Methode von Donath et al. (1982).

### 2.7.3.2 Herstellung der Paraffinpräparate

Zur Herstellung der Paraffinpräparate wurden diese mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in einer EDTA – Lösung entkalkt. Dies geschah unter ständiger Bewegung der Lösung (mittels Rührfisch) bei 30-35°C. Die Lösung wurde jede Woche neu angesetzt und ausgetauscht. Die Entkalkung dauerte ca. 1 Jahr. Im Anschluss daran wurden die Präparate mit dem Shandon HypercenterXP Enclosed Tissue Processor (Ramsey, Minnesota, USA) in Paraffin eingebettet und fixiert.

### 2.7.4 Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Zur Untersuchung der Integrität wurden die in Methylmethacrylat eingebetteten Präparate in für das Gerät geeignete Blöcke zugeschnitten. Die zentrale Fläche des hochglanzpolierten Präparates wurde unter dem *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 nur als rekonstruierte Panoramabilder mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photo Shop 2.0, Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Ireland) angefertigt werden da die eingeschränkte Objektivweite des Gerätes nur die Anfertigung von Schnittbildern zuließ. Mit der Auswertungssoftware analySIS Pro3.2 (Overwatch Sytems, Austin, Texas, USA) konnten die Mineralisierung der Implantate sowie der Keramikabbau quantifiziert werden.

#### 2.7.5 Fluoreszenzmikroskopie

Der zeitliche Ablauf der Knochenneubildung konnte durch das Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX16, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Universalobjektiv und der Analysesoftware Cell P (Olympus, Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet werden.

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

Das *Confocal Laser Scanning Microscope* LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit seinem Bearbeitungsprogramm LSM 510 ermöglichte die qualitative Auswertung des Knochenwachstums. Durch die durchgeführte Sequenzmarkierung ließen sich Remodelingprozesse sowie die zeitlich differenzierte Apposition des Osteoids aufzeigen. Aufgrund der einzelnen, auf die verschiedenen emittierten Wellenlängen abgestimmten, Objektive konnten einzelne Phasen der Mineralisation mit dem CLSM bestimmt werden. Dies erfolgte in einer Tiefe von 80µm. Des Weiteren konnten ca. 2mm dicke 3D-Aufnahmen zur exemplarischen Veranschaulichung erzeugt werden.

#### 2.7.7 Pentachrom-Färbung der Paraffinpräparate (nach Movat 1955)

Die Präparate wurden zunächst entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe bis zu *aqua destillata* gewaschen. Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Alcianblau	10min.
Spülung mit Leitungswasser	5min.
Alkalischer EtOH	1h
Spülung mit Leitungswasser (fließend)	10min.
Eintauchen in <i>aqua destillata</i>	

Weigert's Eisenhämatoxylin	10min.
Spülung mit <i>aqua destillata</i>	
Spülung mit Leitungswasser (fließend)	10min.
Brilant Crocein – Säurefuchsin	15min.
Kurz Spülen mit 0,5% Essigsäure	
5% Phosphorwolframsäure	20min.
Bewegne in 0,5 % Essigsäure	2min.
100% EtOH	3 x 5min.
Saffron du Gatinais	1h
100% EtOH Spülung	3x
100% EtOH	2min.
Xyol	2 x 5min.
Eindeckeln mit Eukitt	

#### 2.7.8 TRAP-Färbung der Paraffinpräparate

Die Präparate werden zunächst entparaffiniert und im Anschluss nach folgendem Protokoll aufbereitet:

Spülung mit <i>aqua destillata</i>	
TRAP – Puffer bei Raumtemp.	10min.
TRAP – Färbelösung bei 37° C	2h
Spülung mit <i>aqua destillata</i>	
Gegenfärbung nach Mayer mit Hämatoxylin	3min.
Bläuen mit Leitungswasser	5min.
Eindeckeln	

#### 2.8 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit den Programmen Stata 10.1 (Stata Corp. Inc, College Station, Texas, USA) und Sigma Plot 11 (SYSTAT Inc, Illinois, USA) statistisch ausgewertet. Der Vergleich zwischen mehreren Gruppen wurde mit dem Friedmann-Test durchgeführt. Die einzelnen Gruppen wurden anhand des Wilcoxon-Test verglichen. Hierbei wurden  $p$ -Werte  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Ergebnisse

Alle Versuchstiere tolerierten den Eingriff. Es kam während dessen zu keinerlei Komplikationen. Es traten keine Wundheilungsstörungen oder Entzündungen auf. Bis zum Ende des Versuches nahmen die Tiere ca. 5% an Gewicht zu. Die Explantation sowie die Tötung der Tiere nach 14 Wochen verlief ebenfalls ohne Zwischenfälle.

#### 3.2 Makroradiographie

In den angefertigten Kontaktaufnahmen der Präparate konnten diese lokalisiert werden.

Es zeigten sich hierbei Abbauerscheinungen an den TCP-Präparaten.

Des weiteren konnte makroradiographisch eine Knochenneubildung bei den mit BMP-7 beimpften Präparaten festgestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass das Knochenwachstum sich nicht auf den Bereich des eingebrachten Implantates beschränkte sondern sehr überschießend wuchs (Abb.7).

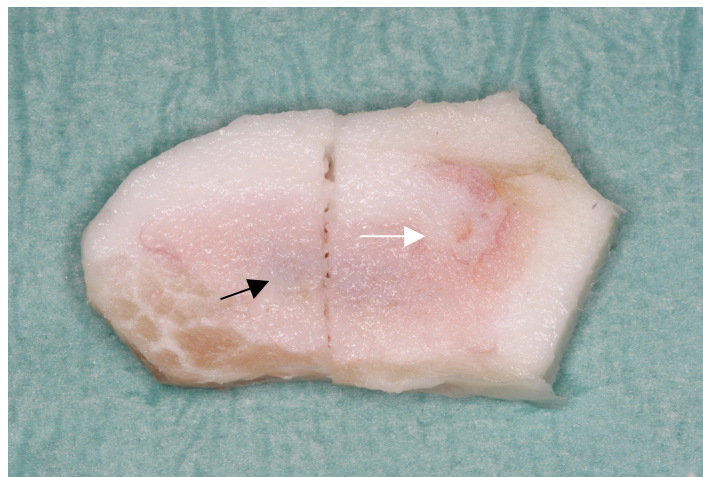


Abb.7: Feinschnitt eines Präparates vor Entkalkung. Schwarzer Pfeil markiert den Rand der bläulich schimmernden Keramik. Weißer Pfeil markiert en Rand des überschießend gewachsenen Knochens.

### 3.3 Computertomographie

Anhand der Computertomographie konnten Aussagen über das Degradations / Resorptionsverhalten der verschiedenen Keramiken getätigt werden. Alle Keramiken unterlagen einem Abbauprozess. Es konnten ausschließlich Aussagen über das Gesamtvolumen getroffen werden, da es keine Möglichkeit der Unterscheidung zwischen Restkeramik und neugebildetem Knochen gab (Abb.9). HA-Keramiken reduzierten ihr Volumen um 48%, Ha 60-Keramiken (HA/TCP) um 53%. Die TCP-Keramiken waren bereits nach 5 Wochen vollständig abgebaut, also nicht mehr nachweisbar. Es konnte mit diesem Verfahren kein Einfluss des BMP-7 auf das Abbauverhalten nachgewiesen werden (Abb.8).

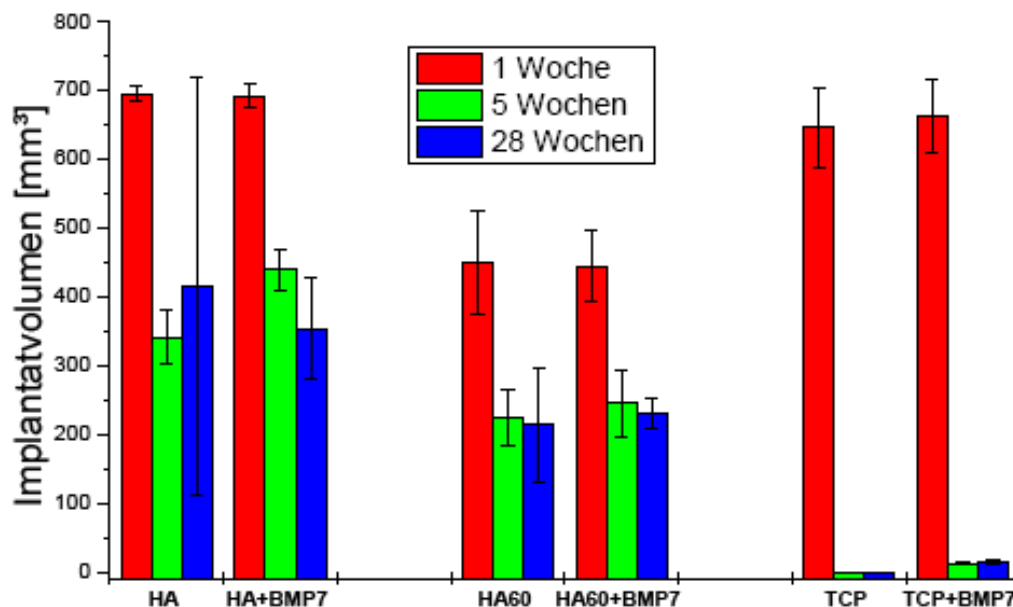


Abb.8: Gesamtvolumen der Rückenimplantate (inklusive des neugebildeten Knochens) mit und ohne BMP-7 anhand der *in-vivo* CT-Daten; nach 1 und nach 5 Wochen wurden je 3 Tiere pro Gruppe ausgewertet, nach 14 Wochen wurden alle 10 Tiere ausgewertet. Man erkennt das trotz überschießendem Knochenwachstum (siehe Ergebnisse: ESEM, Fluoreszenz) das Gesamtvolumen abnimmt → die Knochenneubildung lässt sich anhand der CT-Daten nicht zeigen, da der teilweise noch nicht mineralisierte Knochen im CT nicht detektiert werden kann.

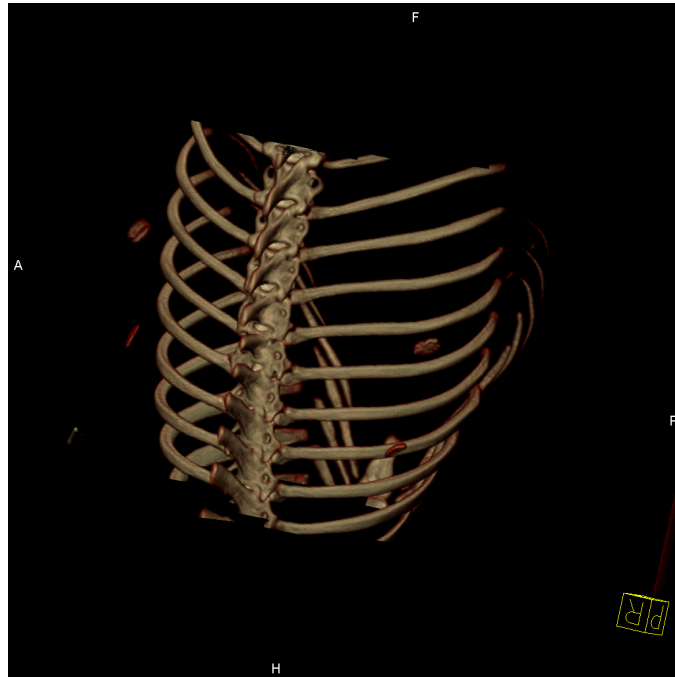


Abb.9: 3-D Rekonstruktion anhand der *in-vivo*-CT Daten nach 5 Wochen, der ektopen Implantate, teilweise mit beginnender Knochenneubildung, teilweise mit bereits beginnender Degradation/Resorption.

### 3.4 Environmental Scanning Electron Microscop (ESEM)

Mit Hilfe der ESEM konnte zum einen die Knochenneubildung sowie die Demineralisation/Resorption der verschiedenen Keramiken untersucht werden.

Die HA-Keramik zeigte nach 3-monatiger Liegedauer den geringsten Volumenverlust. HA-60-Keramik sowie TCP-Keramik zeigten ausgeprägtere Abbauprozesse, wobei die Abbauprozesse der TCP-Keramik deutlich überwogen (Abb.10).

Bei allen Keramiken ließ sich unter Einfluss von BMP-7 ein größerer Abbau der Keramiken zeigen ( $p < 0,001$ ).

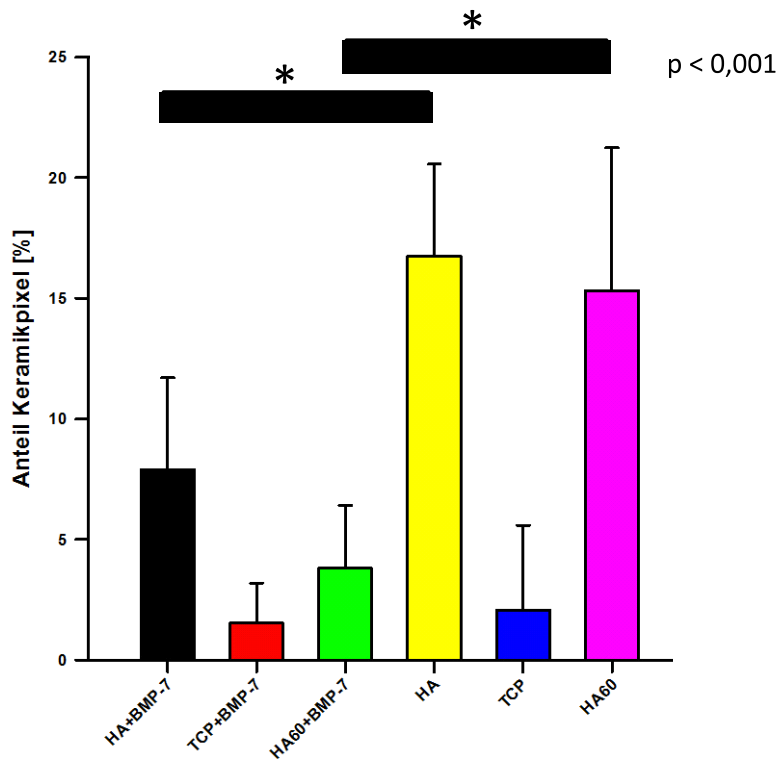


Abb.10: Prozentuale Anteile der verbliebenen Keramiken im Vergleich; ESEM Auswertung der explantierten Präparate. Bei dem Vergleich von HA sowie HA60 in Ab- und Anwesenheit von BMP-7 zeigt sich eine Signifikanz ( $p < 0,001$ )\*. Beim Vergleich von TCP zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Knochenneubildung ließ sich mit dem *Environmental Scanning Electron Microscope* in allen Präparaten, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung darstellen.

Es stellte sich ein signifikanter Unterschied bei An – oder Abwesenheit von BMP-7 heraus. In den mit BMP-7 beimpften Präparaten war eine deutlich größere Knochenneubildung zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ) (Vgl.Abb.11).

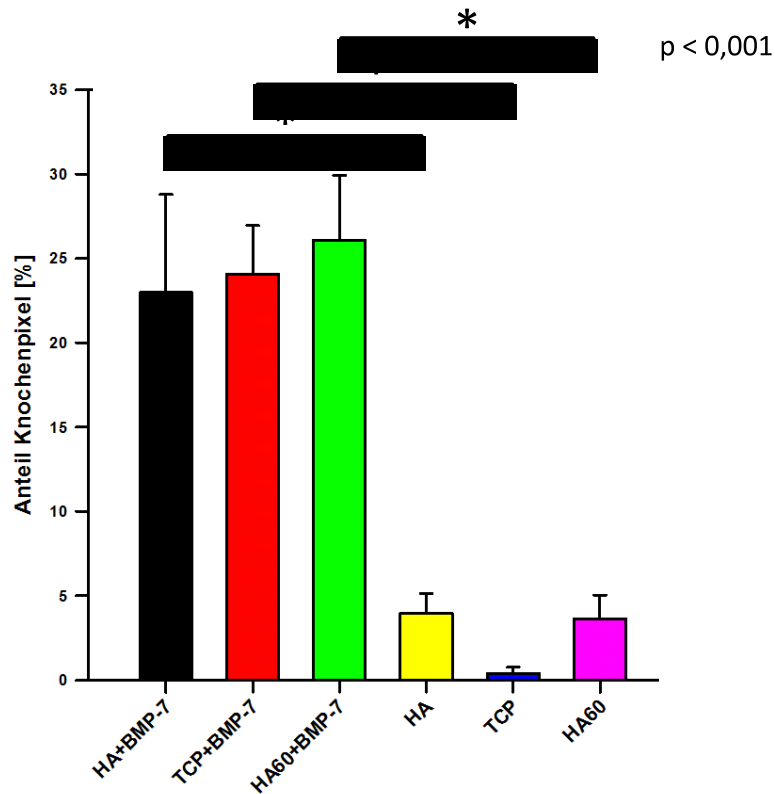
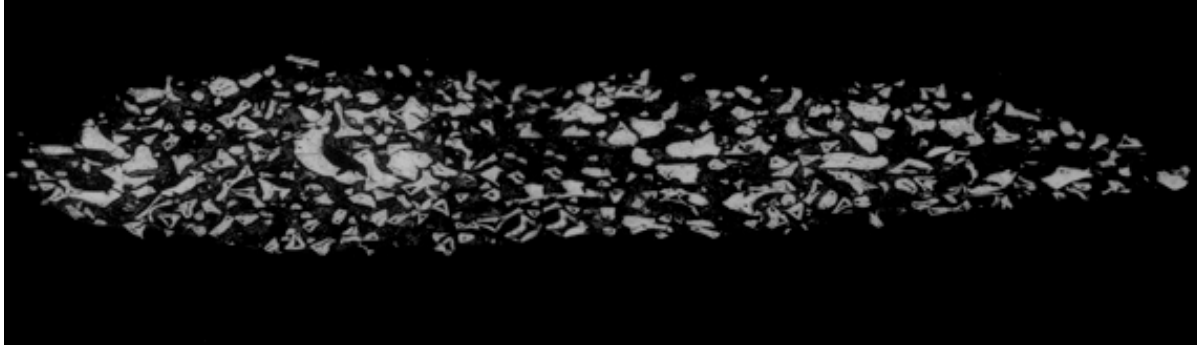
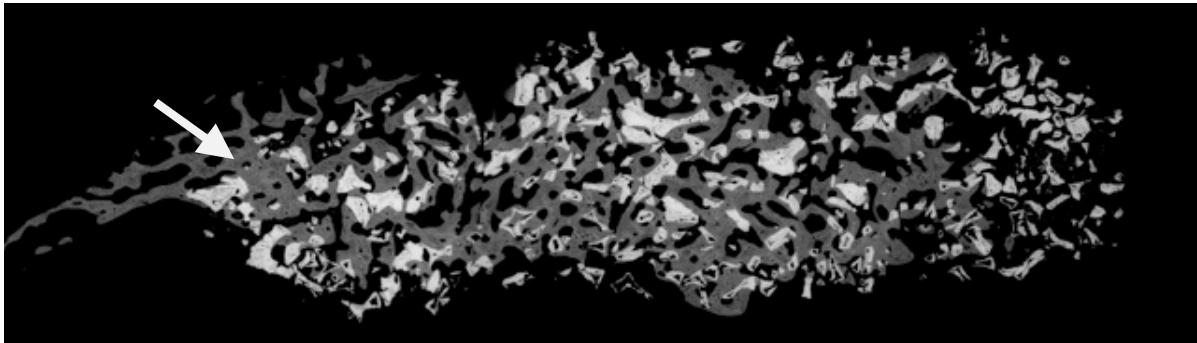


Abb.11: Prozentualer Anteil des neugebildeten Knochens im Vergleich; ESEM Auswertung der explantierten Präparate; in Anwesenheit von BMP-7 zeigt sich eine signifikant höhere Knochenneubildung. Die Knochenneubildung ist statistisch Signifikant höher bei allen Keramiken unter Einfluss von BMP-7 ( $p < 0,001$ )\*.

In den folgenden Übersichtsaufnahmen (Abb.12-14) sind zusammengesetzte ESEM Bilder sowohl der Nativen als auch der mit BMP-7 beimpften Keramiken im Vergleich zu sehen. Hierbei wird vor allem die ausgeprägte Degradation der TCP-Keramiken, sowie die signifikant höhere Knochenneubildung ( $p < 0,001$ ) der mit BMP-7 beimpften Präparate deutlich.

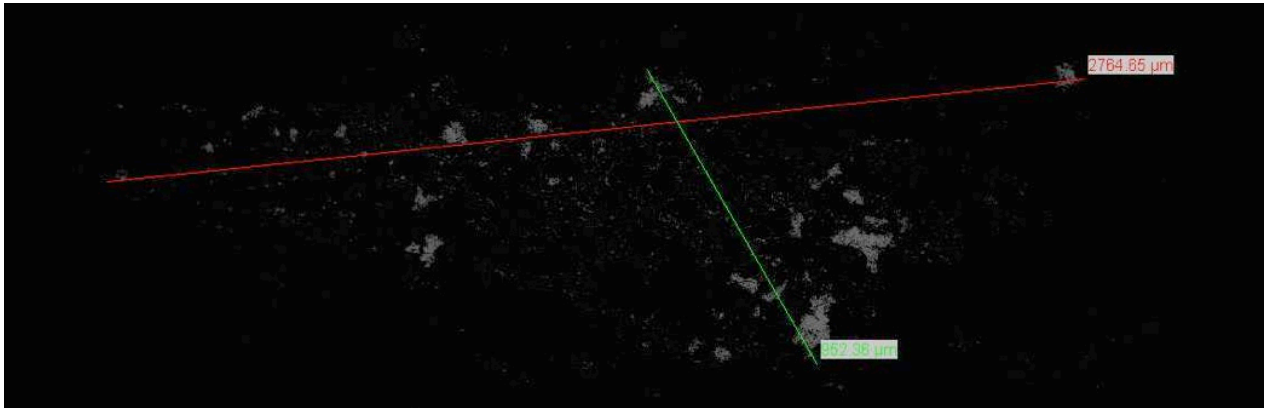


A

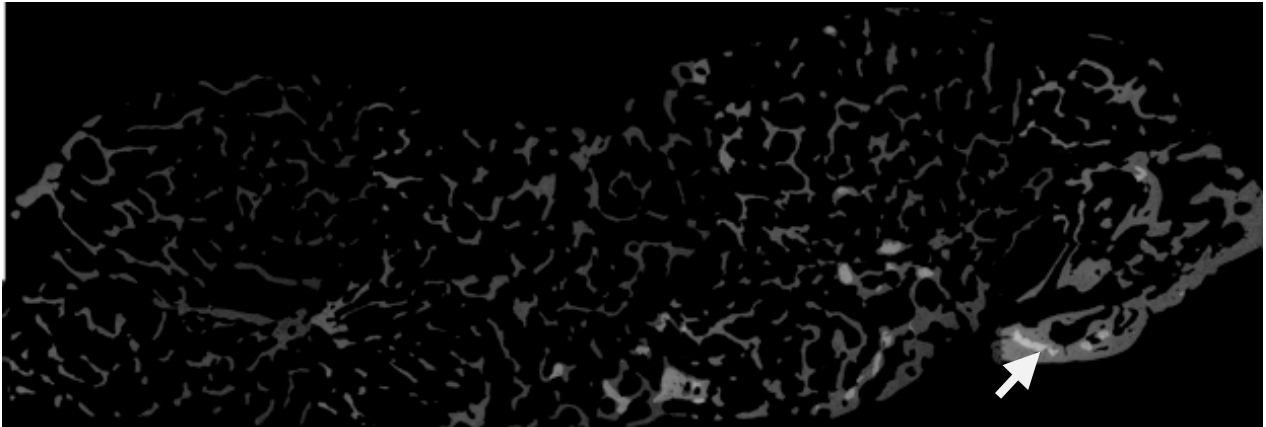


B

Abb. 12 A+B: Rekonstruierte ESEM-Bilder 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 42-fach  
A: Native HA-Keramik, histomorphometrisch lässt sich keine Veränderung erkennen.  
B: HA-Keramik mit BMP-7, deutliche Knochenneubildung zu erkennen (Pfeil), am linken Rand des Präparates überschießendes Wachstum.



A

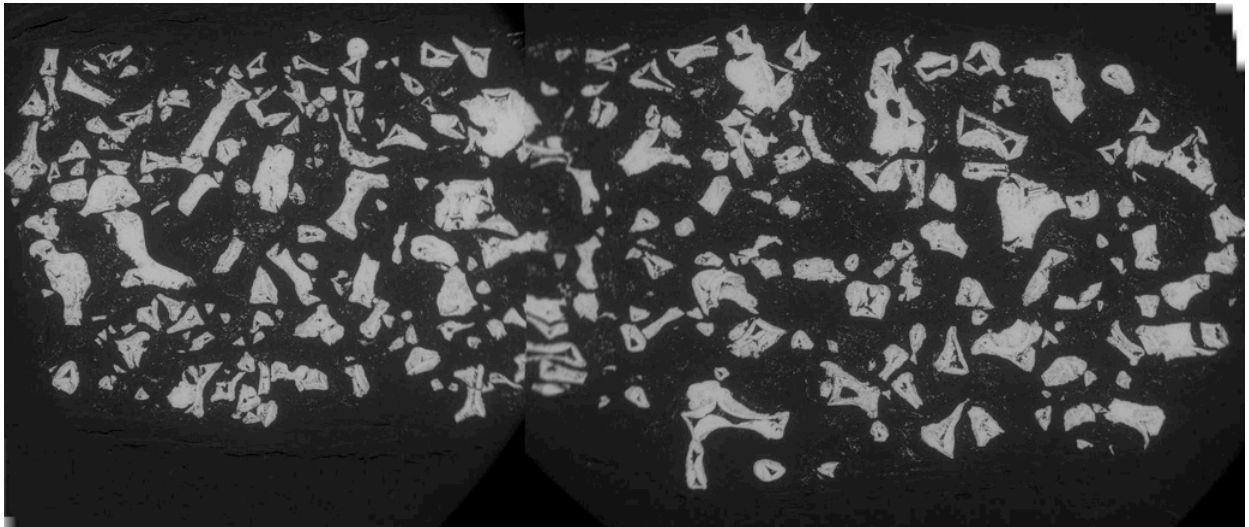


B

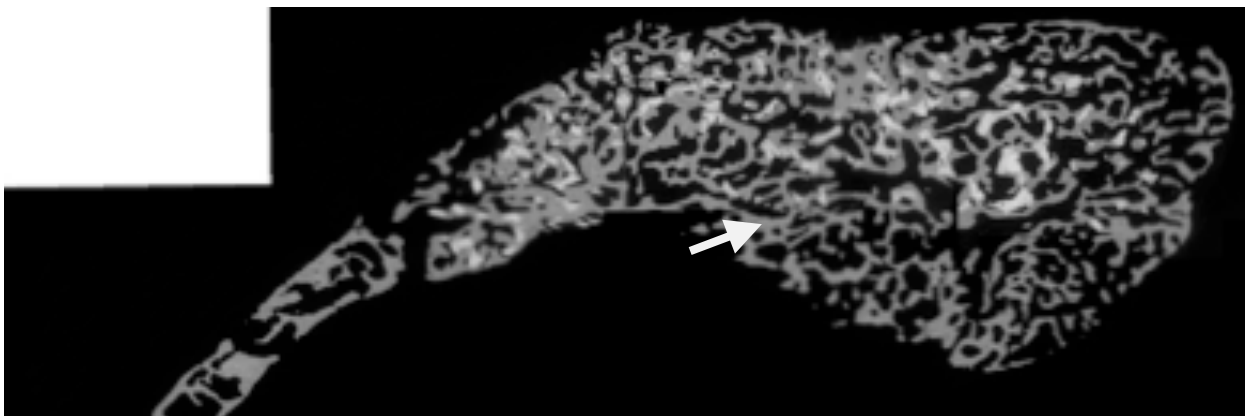
Abb. 13 A+B: Rekonstruierte ESEM-Bilder 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 42-fach

A: Native TCP Keramik, ausgeprägte Degradationserscheinungen

B: TCP-Keramik mit BMP-7, deutliche Knochenneubildung, bei kaum noch vorhandener Restkeramik (Pfeil).



A



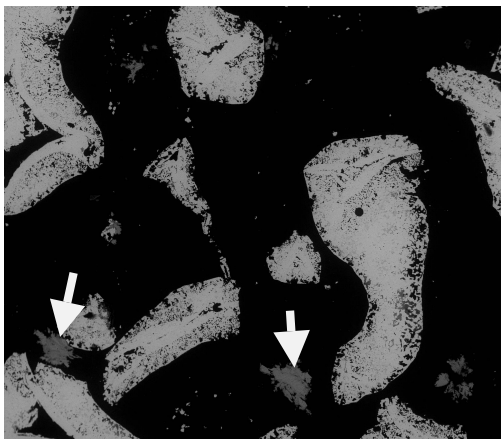
B

Abb.14 A+B: Rekonstruierte ESEM-Bilder 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 42-fach

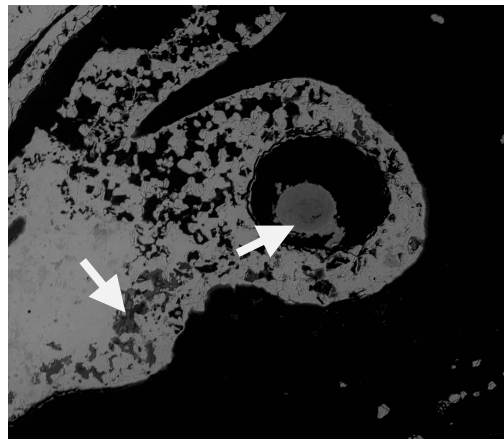
A: Native HA-60-Keramik, histomorphometrisch lässt sich keine Veränderung erkennen.

B: HA-60-Keramik mit BMP-7, ausgeprägte die Restkeramik allseits überragende Knochenneubildung (Pfeil).

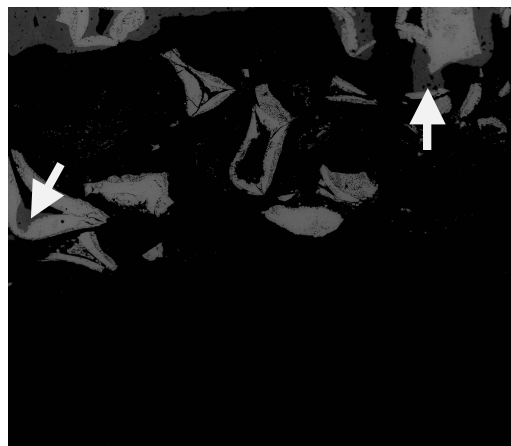
In höheren Vergrößerungsstufen lässt sich auch die Knochenneubildung in den nativen Keramiken (in Abwesenheit von BMP-7) darstellen (Abb.15). Die Knochenneubildung fand sowohl in den Mikroporositäten der Keramiken wie auch an den Oberflächen statt (Abb. 15C und 16).



A



B



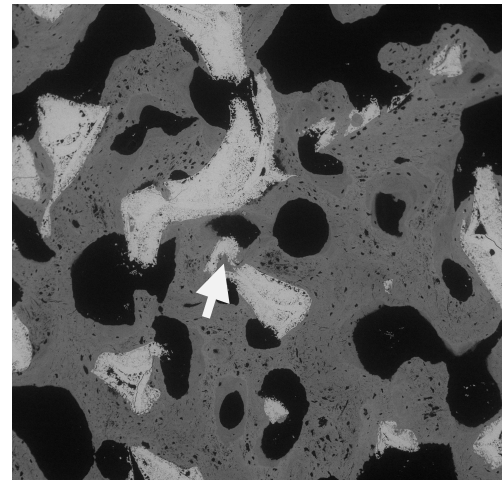
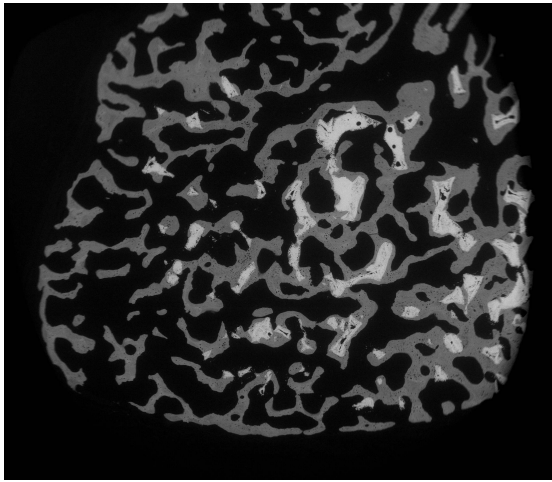
C

Abb.15 A,B,C: ESEM Ausschnitte 14 Wochen post-operativ in Abwesenheit von BMP-7 , Vergrößerung 150-fach

A: Native HA-Keramik mit Knochenneubildung (Pfeile).

B: Native TCP-Keramik mit Knochenneubildung (Pfeile).

C: Native HA-60-Keramik mit Knochenneubildung (Pfeile), sowohl in den Mikroporositäten als auch an den Oberflächen.



A

B

Abb.16 A+B: ESEM-Ausschnitte 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung A:42-fach;  
B:150-fach

A: HA-60-Keramik mit BMP-7, Knochenneubildung sowohl innerhalb der Keramik wie auch an den Oberflächen, Vergrößerung 42-fach.

B: HA-60-Keramik mit BMP-7, Knochenneubildung auch in den Mikroporositäten (Pfeil), Vergrößerung 150-fach.

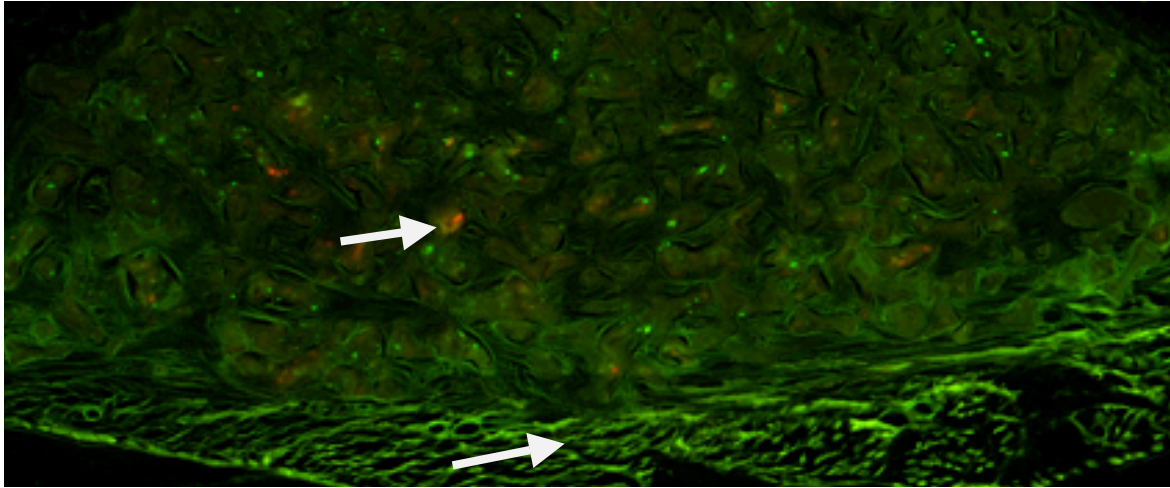
### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte sowohl die Bildung neuen Knochens wie auch der zeitliche Ablauf detektiert werden (Abb.17-19).

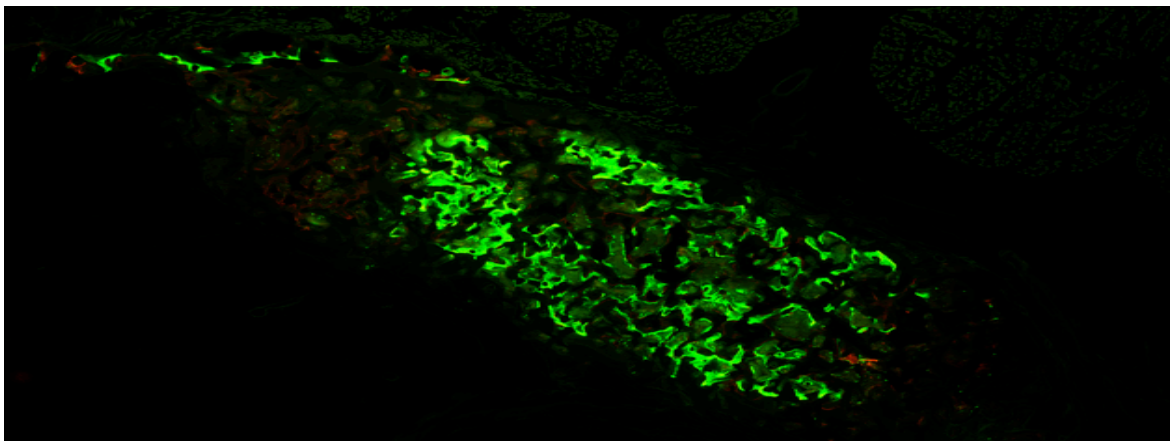
Es konnte bei allen Keramiken in Ab-und Anwesenheit von BMP-7 Knochenneubildung nachgewiesen werden. Bei den nativen Keramiken fiel diese allerdings wesentlich geringer aus als bei den Präparaten mit BMP-7.

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Menge des neugebildeten Knochens zwischen den mit BMP-7 beimpften Keramiken, wohl aber in der zeitlichen Abfolge der Bildung.

Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Menge des neugebildeten Knochens in der 6. Woche im Vergleich zur 8. und 12. Woche ( $p=0,005$ ). Die Knochenneubildung überwog in der 6. Woche. Zwischen der 8. und 12. Woche konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.



A

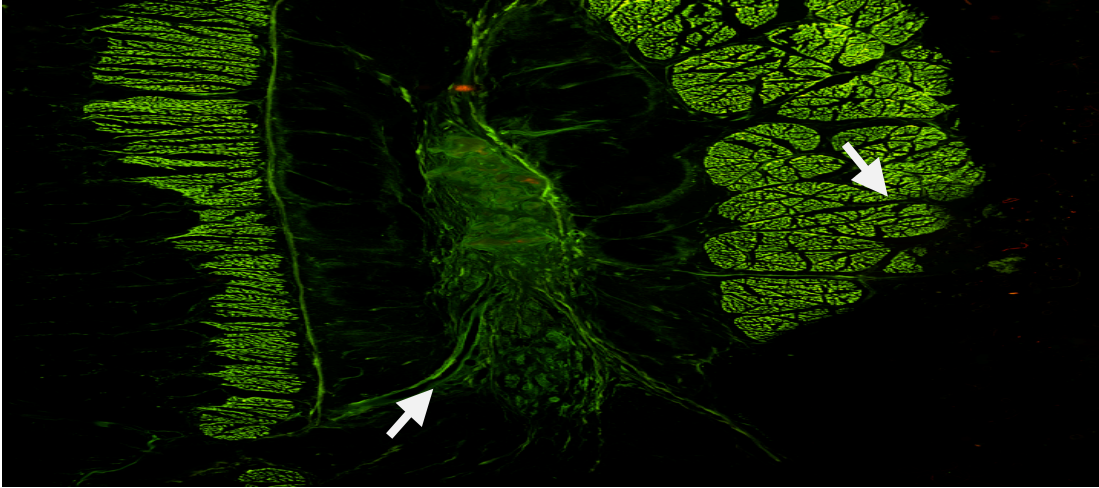


B

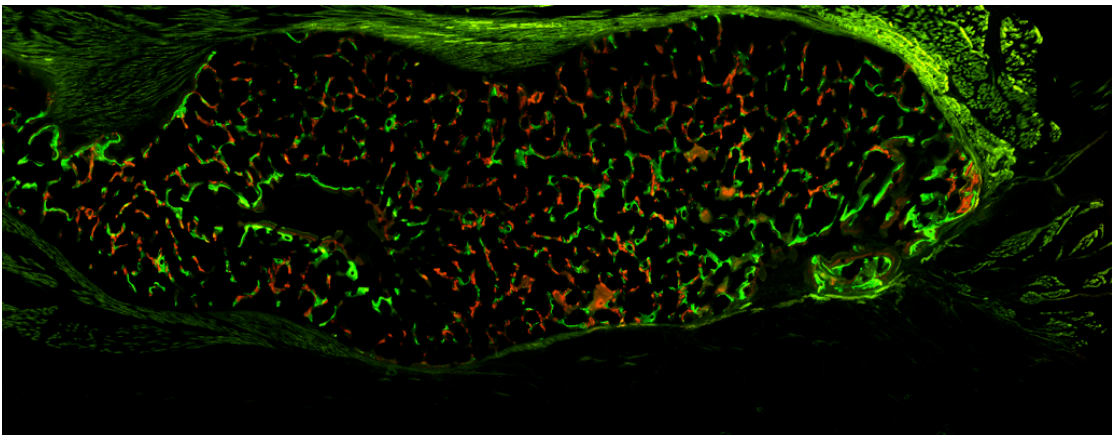
Abb.17 A+B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 10-fach

A: Native HA-Keramik, Eigenfluoreszenz des Gewebes deutlich zu erkennen (unterer Pfeil) sowie die Knochenneubildung in rot, braun und grün (oberer Pfeil), die Knochenneubildung in der nativen Keramik zeigt deren Osteoinduktivität in Abwesenheit von BMP-7.

B: HA-Keramik mit BMP-7, ausgeprägte Knochenneubildung, hierbei überwiegt die 6. Woche (grün), es zeigt sich aber auch Knochenneubildung nach der 8. (rot) und 12. Woche (braun).



A

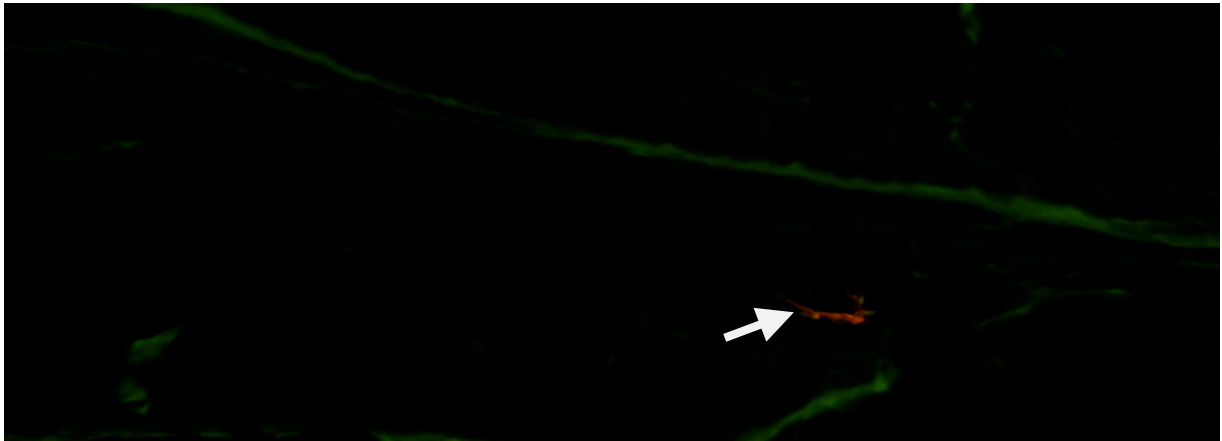


B

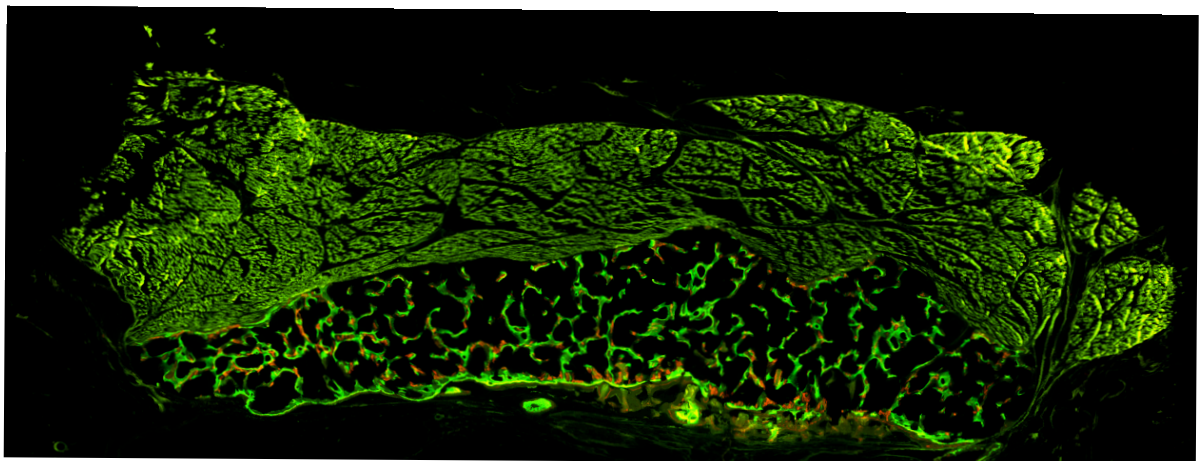
Abb.18 A+B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 10-fach

A: Native TCP-Keramik, deutliche Eigenfluoreszenz des Gewebes (hellgrün), vereinzelt Knochenneubildung zu erkennen (Pfeile), die Knochenneubildung in der nativen Keramik zeigt deren Osteoinduktivität in Abwesenheit von BMP-7.

B: TCP-Keramik mit BMP-7, Eigenfluoreszenz des Gewebes zu erkennen, ausgeprägte Knochenneubildung in grün, rot und braun, es überwiegt die 6. Woche (grün).



A



B

Abb.19 A+B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 14 Wochen post-operativ, Vergrößerung 10-fach

A: Native HA-60-Keramik, Ausschnitt, einzelnes Areal mit Knochenneubildung (Pfeil), die Knochenneubildung in der nativen Keramik zeigt deren Osteoinduktivität in Abwesenheit von BMP-7.

B: HA-60-Keramik mit BMP-7, Eigenfluoreszenz des Gewebes, Knochenneubildung in grün, rot und braun zu erkennen, es überwiegt grün (6. Woche).

### 3.6 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)

In den mit BMP-7 beimpften Keramiken konnte zu allen Zeitpunkten eine Neubildung bzw. Umbildung des Knochens mit Hilfe der verwendeten Fluorochrome und des CLSM nachgewiesen werden.

Auch bei diesem Verfahren zeigt sich erneut das überschießende Knochenwachstum bei den mit BMP-7 beimpften Präparaten (Abb.20).

Es lässt sich allerdings mit diesem Verfahren, keine Aussage über die Menge an gebildetem Knochen zu verschiedenen Zeitpunkten treffen oder eine statistische Auswertung vornehmen. In den reinen Hydroxylapatit - Keramiken lässt sich mit der CLSM keine Fluoreszenz und somit keine Knochenbildung nachweisen. Die Darstellung des Weichgewebes lässt sich auf die Eigenfluoreszenz zurückführen (Abb.21).

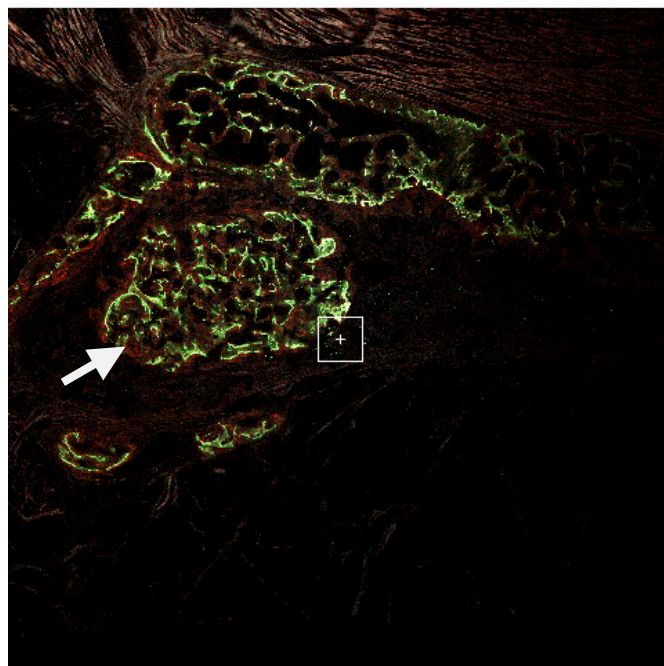


Abb.20: CLSM-Aufnahme, Vergrößerung 10-fach

HA-Keramik mit BMP-7, Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung; grün=6.Woche; rot=8.Woche; braun=12.Woche; Überschießendes Knochenwachstum (Pfeil)

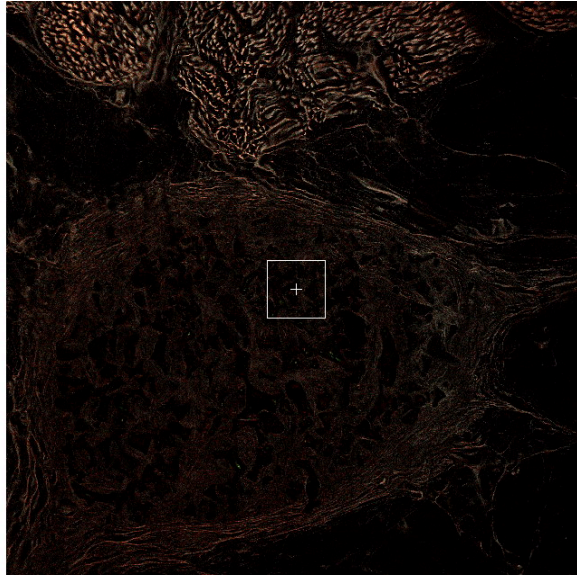


Abb.21: CLSM-Aufnahme, Vergrößerung 10-fach  
Native HA-Keramik, Darstellung der Eigenfluoreszenz des Gewebes

In höheren Vergrößerungsstufen lassen sich Osteozytenlakunen mit Hilfe des CLSM darstellen (Abb.22).

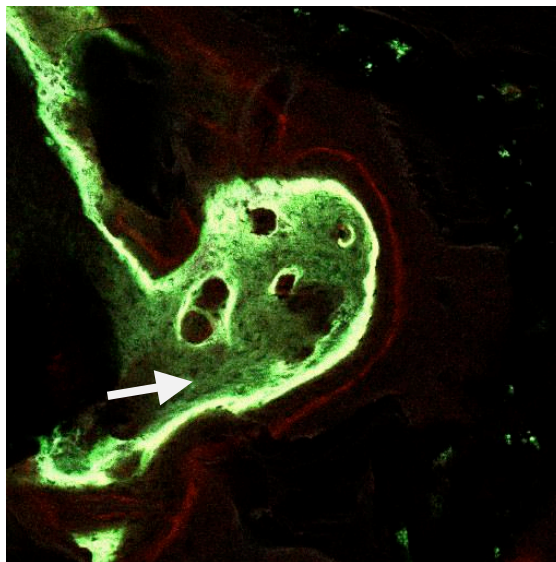


Abb.22 CLSM-Aufnahme, Ausschnitt, Vergrößerung 40-fach  
HA-Keramik mit BMP-7, Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Knochenneubildung,  
Osteozytenlakunen erkennbar (Pfeil)

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit die Präparate *en bloc* zu untersuchen. Hierdurch kann unter anderem eine 3-dimensionale Darstellung von Präparatausschnitten erzeugen (Abb.23).

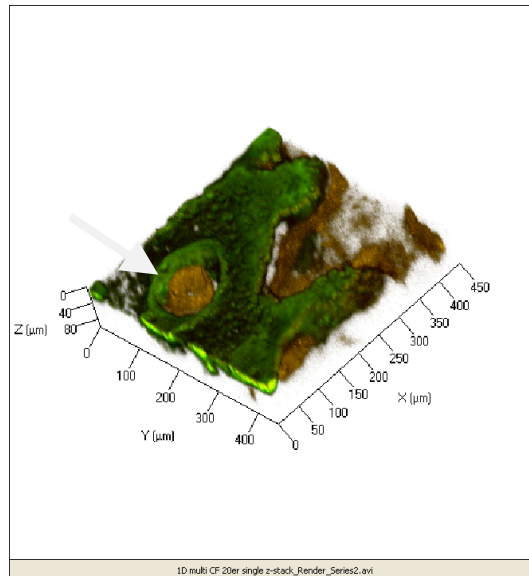


Abb.23: HA-60 Keramik mit BMP-7: 3-dimensionale Darstellung des neugebildeten Knochens (Ausschnitt), Vergrößerung 40-fach. Größe des Ausschnittes in  $\mu\text{m}$  auf x ,y und z-Achse, Haversscher Kanal (Pfeil) ist erkennbar.

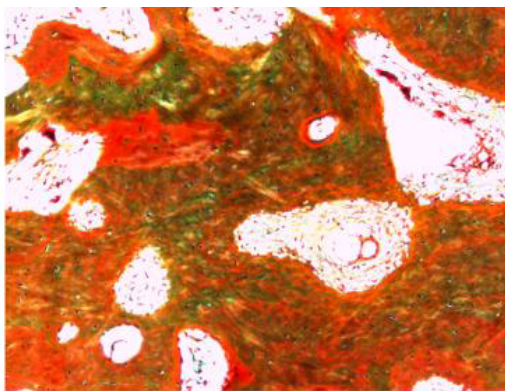
### 3.7 Histologie

#### 3.7.1 Pentachrom – Färbung

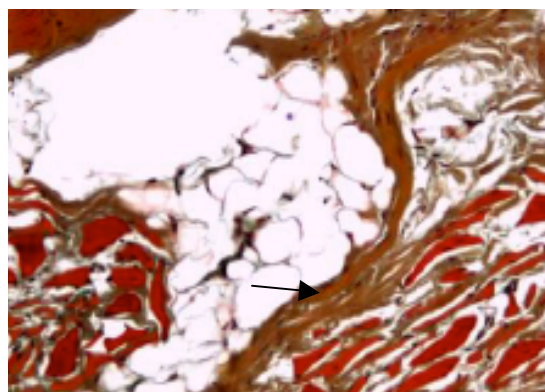
Anhand der Pentachrom – Färbung konnte gezeigt werden, dass in allen Keramiken, sowohl den mit BMP-7 beimpften, als auch den nativen Proben, eine Knochenneubildung stattfand. Desweiteren war es möglich mit dieser Färbung die unterschiedlichen Mineralisationsgrade des neugebildeten Knochens zu zeigen. Die Mineralisationsgrade äußern sich in Farbunterschieden innerhalb des Präparates. Hierbei erscheint das Osteoid → rot; nicht mineralisierter Knochen → grün; und mineralisierter Knochen → gelb.

Die Keramiken zeigten in Anwesenheit von BMP-7 eine deutlich voluminösere Knochenneubildung als bei Abwesenheit des Wachstumsfaktors. Die HA – Keramik zeigte eine vermehrte Knochenmineralisation im Vergleich zur TCP- und HA60-Keramik (Abb. 24 A-F).

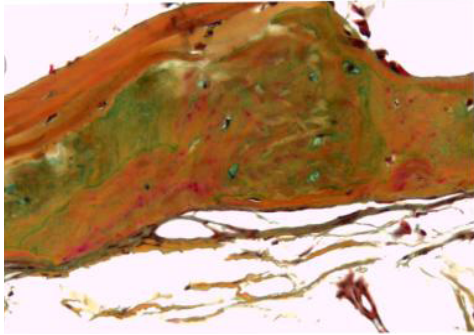
Dieses Ergebnis bestätigt die osteoinduktive Eigenschaft aller untersuchten Keramiken. Desweiteren zeigt sich, dass BMP-7 einen signifikanten Einfluss auf die Knochenneubildung sowie deren Mineralisationsgrad besitzt.



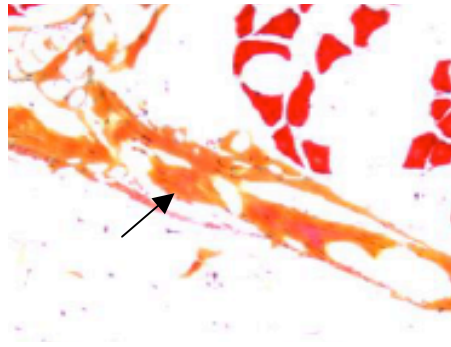
A



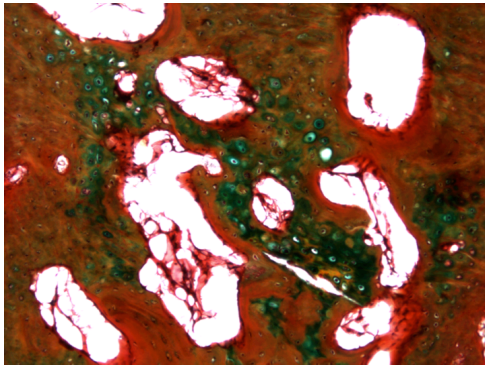
B



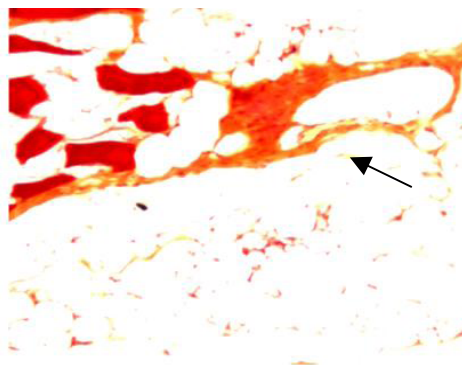
C



D



E



F

Abb.24 A-F: Pentachrom-Färbung

Darstellung der Knochenneubildung sowie der unterschiedlichen Mineralisationsgrade (Osteoid → rot; nicht mineralisierter Knochen → grün; und mineralisierter Knochen → gelb)

A: HA-Keramik mit BMP-7, ausgeprägte Knochenneubildung in allen Mineralisationsgraden, rot, grün und gelb

B: Native HA-Keramik, Knochenneubildung vor allem im Bereich der muskulaturnahen Areale (Pfeil)

C: HA-60-Keramik mit BMP-7, Knochenneubildung in allen Mineralisationsgraden

D: Native HA-60-Keramik, Knochenneubildung vor allem im Bereich der muskulaturnahen Areale (Pfeil)

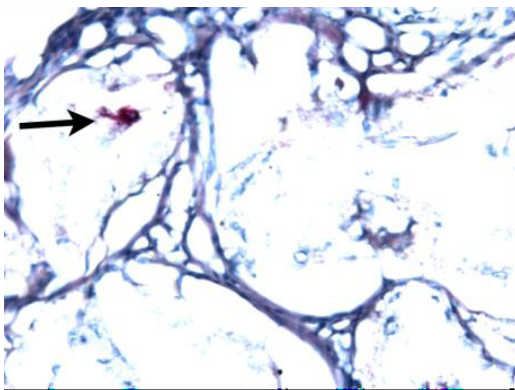
E: TCP-Keramik mit BMP-7, Knochenneubildung in allen Mineralisationsgraden

F: Native TCP-Keramik, Knochenneubildung vor allem im Bereich der muskulaturnahen Areale (Pfeil)

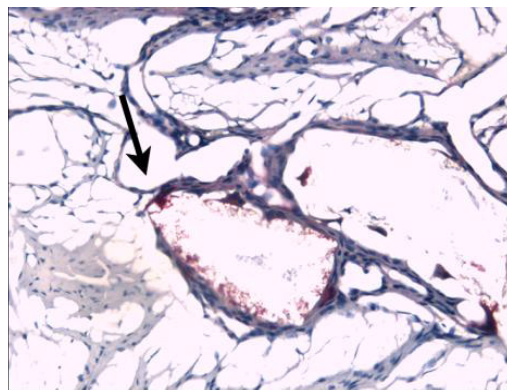
### 3.7.2 TRAP – Färbung

Mit Hilfe der TRAP – Färbung, konnten Osteoklasten an den HA–Keramiken und den HA-60–Keramiken detektiert werden. Bei der HA–Keramik wurden diese allerdings nur bei den mit BMP–7 beimpften Präparaten gefunden. Bei den HA-60–Keramiken, sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit von BMP–7.

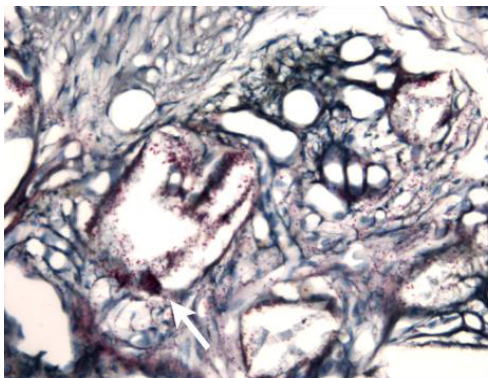
In TCP–Keramiken wurden keine Osteoklasten nachgewiesen (Abb. 25 A-F).



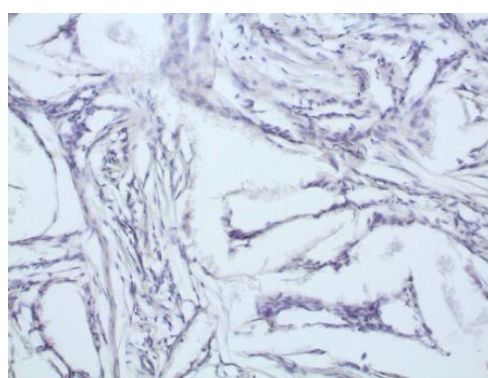
A



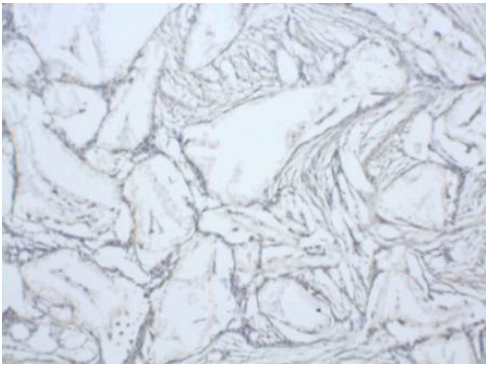
B



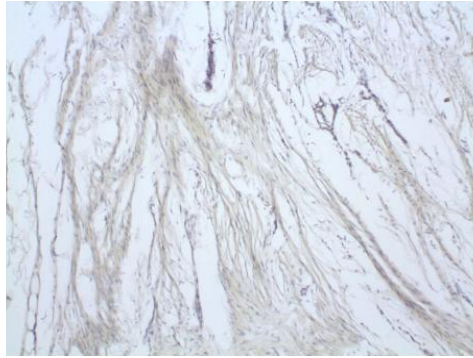
C



D



E



F

Abb.25 A-F: TRAP-Färbung zur Darstellung der Osteoklasten

A: HA-60-Keramik mit BMP-7, Osteoklasten nachweisbar (Pfeil)

B: Native HA-60-Keramik, Osteoklasten nachweisbar (Pfeil)

C: HA-Keramik mit BMP-7, Osteoklasten nachweisbar (Pfeil)

D: Native HA-Keramik, keine Osteoklasten nachweisbar, Darstellung von Bindegewebe

E: TCP-Keramik mit BMP-7, keine Osteoklasten nachweisbar, Darstellung von Bindegewebe

F: Native TCP-Keramik, keine Osteoklasten nachweisbar, Darstellung von Bindegewebe

## 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Abbauverhalten von drei verschiedenen Keramiken (HA; HA60; TCP) sowie die Knochenneubildung in diesen Keramiken in einem ektopten Großtiermodell zu untersuchen. Es sollte verglichen werden wie sich diese Eigenschaften in Ab- und Anwesenheit eines Wachstumsfaktors (BMP-7) verändern.

Dieses Ziel konnte mit dem vorliegenden Versuchsaufbau erreicht werden.

Es konnte sowohl das Abbauverhalten, wie auch die Knochenneubildung in den verschiedenen Präparaten charakterisiert werden.

### 4.1 Bewertung des Versuchsaufbaus : Bedeutung der verwendeten bildgebenden Verfahren

Anhand der multifokalen Implantation der verschiedenen Präparate sowie den Unterschiedlich *in-vivo* durchgeführten Untersuchungen (Fluoreszenzmarkierung; CT) am Göttinger Minischwein konnte die Anzahl der Versuchstiere klein gehalten werden  $n=10$ .

Es wurden pro Tier jeweils 4 Implantate inseriert, welche alterierend rotiert wurden. Die verschiedenen Keramiken wurden jeweils mit und ohne BMP-7 eingebracht.

Die *in-vivo* CT-Aufnahmen ermöglichten eine zeitliche Nachverfolgung der Resorption bzw. Degradation der Keramiken. Dies war insbesondere bei den TCP-Keramiken von großem Vorteil da diese nach 3 Monaten bei Tötung der Tiere vollständig abgebaut waren und nur anhand der *in vivo* CT's der Resorptionsverlauf nachverfolgt werden konnte. Ohne die Verlaufs-CT's wäre keine Aussage möglich gewesen. Nolff et al. zeigten 2009, dass sich anhand von *in-vivo* CT-Aufnahmen die Knochenneubildung sowie der Resorptionsverlauf bei TCP-Keramiken untersuchen lässt. Diese Technik allerdings zur statistischen Auswertung zu ungenau erscheint.

Die *Environmental Scanning Electron Microscopy* stellte eine einfache und hocheffiziente Untersuchungsmethode dar (Gatti et al. 2008). Aufgrund der Möglichkeit die Präparate ohne vorherige Entkalkung *en-bloc* zu untersuchen, ist sie der Mikroradiographie überlegen, da die Anfertigung von Schnitten zur Auswertung der Präparate entfällt.

Durch die hohen Auflösungen des ESEM ist es möglich das Knochenwachstum in den Mikroporositäten der verwendeten Keramiken zu detektieren (Roldán et al. 2008). Detsch et al. konnten 2008 ebenfalls Knochenwachstum in den Mikroporositäten von Keramiken mit Hilfe des ESEM nachweisen. Dies ist auch mit dem Verfahren der Mikroradiographie

möglich, sie beschrieben jedoch desweiteren, dass die *Environmental Scanning Electron Microscopy* im Vergleich eine enorme Verbesserung im Bezug auf die Qualität der Auflösung der generierten Bilder zeigt.

Boyde et al. beschrieben 2012 das die *Environmental Scanning Electron Microscopy* sehr geeignet zur Auswertung unentkalkter Präparate ist.

Wir konnten mit diesem Verfahren statistische Auswertungen sowohl zur Degradation/Resorption der Keramiken als auch zur Knochenneubildung durchführen. Devin et al. untersuchten bereits 1996 mit diesem Verfahren die Degradation bei porösen Keramiken. Ayers et al. konnten 2006 in ihrer Studie zeigen, dass sich dieses Verfahren auch zur statistischen Auswertung und Unterscheidung von Keramiken und in verschiedenen Mineralisationsgraden vorliegendem Knochen eignet. Diese eindeutige Differenzierbarkeit bestätigt sich bei den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen.

Die *Confocal Laser Scanning Microscopy* ermöglichte es wie die *Environmental Scanning Electron Microscopy* die Präparate *en-bloc* zu untersuchen. Die limitierende Komponente ist die Größe des Objektträgers des Gerätes.

Hierbei konnten deskriptive Aussagen zum zeitlichen Verlauf der Knochenneubildung getätigt werden (Grötz et al. 1998). Desweiteren war es möglich aufgrund der hohen Auflösung, Strukturen wie Osteozytenlakunen nachzuweisen. Bozal et al. untersuchten 2012 Osteozytenlakunen ebenfalls mit dem CLSM. Eine Alternativmethode zur Darstellung der Osteozytenlakunen stellt das Mikro-CT dar (Hannah et al. 2010; Carter et al. 2013).

Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellung der Präparate. Diese dreidimensionale Darstellung und Beschreibung ist mit keinem anderen Verfahren möglich. Boyde beschrieb 1985 das *Confocal Laser Scanning Microscop* als geeignet zur 3-D Darstellung. Diese Auswertung ist der mit Schichtbildverfahren wie CT oder MRT angefertigten Auswertung vergleichbar (Grötz et al. 1998), wobei das MRT zur Darstellung von Knochenstrukturen ungeeignet ist.

Statistische Aussagen konnten anhand der CLSM nicht getätigt werden. Dies liegt an den von uns verwendeten fluoreszierenden Flüssigkeiten, bzw. deren Anregungs- sowie Emissions-Spektren. Diese liegen zu nahe beieinander wodurch keine eindeutige Trennung der Kanäle durchführbar ist.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte ebenfalls der zeitliche Verlauf der Knochenneubildung aufgezeigt werden. Geuze et al. konnten 2012 ebenfalls den zeitlichen Verlauf von Knochenneubildung in Ab- und Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (BMP-2 und VEGF) aufzeigen. Gollwitzer et al. gelang es 2013 mit der Technik der

Fluoreszenzmikroskopie herauszustellen zu welchen Zeitpunkten die Knochenneubildung am größten ist. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zur *Confocal Laser Scanning Microscopy* liegt in der Möglichkeit der statistischen Auswertung (Kim et al. 2012).

Für die Fluoreszenzmikroskopie müssen allerdings Präparatschnitte angefertigt werden.

#### 4.2 Abbauverhalten der Keramiken

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Abbauprozesse an allen verwendeten Keramiken nachgewiesen werden. Detsch et al. zeigte 2008 in seiner Arbeit an den gleichen Keramiken *in-vitro* Resorptionslakunen und Abbauprozesse. Hierbei fiel auf, dass die TCP-Keramik einem schnelleren Abbau als die HA-Keramiken unterlagen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die TCP-Keramiken waren nach 3 Monaten vollständig abgebaut und nicht mehr nachweisbar. Das Abbauverhalten der TCP – Keramiken war nur im Verlauf der CT – Auswertung zu beschreiben, da weder über die Fluoreszenzmikroskopie noch über das ESEM Restkeramik zu detektieren war. Dies zeigt wiederum die Wichtigkeit der *in-vivo* durchgeführten CT Untersuchungen anhand der diese Prozesse nachverfolgt werden konnten.

Der vollständige Abbau der TCP - Keramiken lässt sich auf das Prinzip der Degradation zurückführen, da bei diesen, keine Osteoklasten mit der TRAP-Färbung nachgewiesen werden konnten und somit eine Resorption nicht erklärbar ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit verschiedenen Studien die den Osteoklasten eine untergeordnete Rolle beim Abbauprozess von TCP – Keramiken bescheinigten (Tadjoedin et al. 2000; Suba et al. 2006; Knabe et al. 2008).

Die HA und HA-60 Keramik unterlagen unterschiedlich ausgeprägten Abbauprozessen. Diese waren signifikant geringer als die der TCP-Keramiken ( $p < 0,001$ ). Zwischen HA und HA-60 gab es keinen signifikanten Unterschied. Bei den HA- und HA60 Keramiken kann für die Abbauprozesse vom Mechanismus der Resorption ausgegangen werden, da wir mit Hilfe der TRAP-Färbung bei diesen Präparaten Osteoklasten nachweisen konnten. Der Abbau dieser beiden Keramiken verstärkte sich in Anwesenheit von BMP-7, wodurch sich die These der Resorption unterstützen lässt. Jensen et al. beschreiben 2002, dass sich in Anwesenheit eines Wachstumsfaktors, hier *Osteogenic protein-1*, der Abbau der von ihnen verwendeten Keramiken verstärkte. Diese Untersuchungen bestätigen die oben genannten Ergebnisse.

### 4.3 Ektope Knochenbildung

Die ektope Knochenbildung konnte an allen Präparaten nachgewiesen werden. Es fanden sich jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich der einzelnen Präparate in Ab-, oder Anwesenheit von BMP-7 ( $p < 0,001$ ).

Es ließ sich in allen nativen Keramiken Knochenneubildung detektieren, was grundsätzlich den Schluss zulässt, dass die verwendeten Keramiken eine osteoinduktive Wirkung besitzen.

Hierbei war deutlich zu erkennen dass die Knochenneubildung in den muskulaturnahen Arealen überwog. Dies ist mit der besseren Vaskularisation der Muskulatur im Vergleich zum Fettgewebe zu erklären. 2011 beschrieben Correia et al., dass einer ektopen Knochenneubildung eine Vaskularisierung der Keramiken vorausgehen muss.

Es wurden bei den mit Wachstumsfaktoren beimpften Keramiken häufiger Osteoklasten nachgewiesen als bei den Nativen Keramiken, was den verstärkenden Effekt von BMP-7 auf die Osteoinduktion untermauert. Tachi et al. zeigten 2011, dass eine vermehrte Anwesenheit von Osteoklasten mit einer erhöhten Knochenneubildung einhergeht.

Eine osteoinduktive Wirkung fanden auch Habibovic et al. 2008, wobei hierbei auch ein Vergleich der Porositäten der verschiedenen Keramiken untersucht wurde. Die Porositäten der Keramiken bei denen Habibovic et al. 2008 eine osteoinduktive Wirkung fanden, ähneln denen in dieser Arbeit verwendeten Keramiken. In der Studie von Habibovic et al. 2008 konnte kein Knochenwachstum an einer reinen HA – Keramik gezeigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die in dieser Arbeit verwendeten Keramiken optimale Porositäten aufweisen.

Roldán et al. fanden 2010 an den, auch in dieser Arbeit verwendeten Keramiken an der Maus ebenfalls Knochenneubildung in allen Keramiken in Abwesenheit von BMP-7. Auch die weiteren Ergebnisse dieser Studie ergaben Übereinstimmungen mit den Ergebnissen am Großtier. Auch in anderen Studien konnten bei größeren Tieren ektope Knochenformationen bei Kalziumphosphatkeramiken nachgewiesen werden (Yamasaki et al. 1992; Toth et al. 1993; Klein et al. 1994; Nihouannen et al. 2005).

Im Vergleich zeigt sich, dass in der HA60 – Keramik die größte Knochenneubildung stattfand. Der neugebildete Knochen konnte mit Hilfe des ESEM – Verfahrens nachgewiesen werden.

Eine signifikant höhere Knochenneubildung ließ sich bei den mit BMP-7 beimpften Präparaten im Vergleich zu den nativen Präparaten nachweisen ( $p < 0,001$ ). Es konnten allerdings zwischen den verschiedenen Keramiken kein statistisch signifikanter Unterschied in der Menge des neugebildeten Knochens nachgewiesen werden. Mit dem Verfahren der

Fluoreszenzmikroskopie konnten Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Knochenbildung getätigt werden. Hierbei fällt auf, dass zum Zeitpunkt der 6. Woche eine signifikant höhere Neubildung von Knochen zu finden war ( $p=0,001$ ), als in der 8. und 12. Woche. Zwischen diesen Zeitpunkten ließen sich keine Unterschiede feststellen.

Makroskopisch konnte ein überschießendes Knochenwachstum über die Ursprungsausmaße gezeigt werden. Dies zeigt eine Problematik der Knochenbildung: die Formgebung. Diese ergab sich nicht nur in der vorliegenden Arbeit über ektope Knochenbildung, sondern konnte ebenfalls in einer Arbeit am Schädelmodell in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden (Schulz 2013).

Es kann keine zuverlässige Vorhersage zu Menge und Form des gebildeten Knochens getätigt werden, zumindest nicht mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode. Ein Ansatz für eine weiterführende Forschungsarbeit könnte darin liegen zu versuchen, die verwendeten Wachstumsfaktoren kovalent an ein Trägermaterial zu binden und zu untersuchen ob sich anhand dieser Methode Form und Menge des neugebildeten Knochens eher vorhersagen lassen. Diese kovalente Bindung wurden von Schofer et al. 2011; Yang et al. 2011; Hou et al. 2012 weitergehend untersucht. Hierbei wurden allerdings Kollagen-Scaffolds bzw. Polylactid-Scaffolds verwendet, welche nicht vergleichbar mit den verwendeten Kalziumphosphatkeramiken sind. In diesen Arbeiten wurde aber keine Aussagen zur Formgebung und Menge des neugebildeten Knochens getätigt.

#### 4.4 Vergleich der verschiedenen Keramiken

Alle verwendeten Keramiken sind osteoinduktiv. Es lässt sich bei allen Nativen Keramiken Knochenneubildung nachweisen. Hierbei zeigt die HA60-Keramik die größte Knochenbildung.

Auch in Anwesenheit von BMP-7 konnte an allen Keramiken Knochenneubildung detektiert werden ( $p < 0,001$ ). Hierbei lässt sich kein Unterschied in der Menge des neugebildeten Knochens nachweisen. Die ektope Knochenneubildung beginnt an der der Muskulatur zugewandten Seite der implantierten Keramiken aufgrund der besseren Vaskularisation.

Das Abbauverhalten von HA60 liegt zwischen dem von HA und TCP. In Anwesenheit von BMP-7 zeigt sich bei allen Keramiken ein signifikant höherer Knochenabbau als in Abwesenheit ( $p < 0,001$ ).

Es ließen sich bei den HA60 und HA-Keramiken Osteoklasten nachweisen. Der Abbau ist also als osteoklastenabhängige Resorption erklärbar.

Bei den TCP-Präparaten konnten keine Osteoklasten gezeigt werden, wodurch der Abbau ausschließlich durch Degradation zu erklären ist. Diese konnte anhand der angefertigten *in-vivo* CT's nachverfolgt werden.

Die Verwendung der Keramiken mit oder ohne BMP-7 in der medizinischen Versorgung benötigt noch weitergehende Untersuchungen.

Es muss eine Vorhersagbarkeit der Menge des neugebildeten Knochens sowie deren Formgebung optimiert werden. Hierzu könnten möglicherweise auch andere Materialien in Kombination mit den hier verwendeten Keramiken, bei denen eine kovalente Bindung von Wachstumsfaktoren möglich ist, eine weiterführende Perspektive bieten.

Desweiteren sollten Untersuchungen zur Biomechanik der Keramiken und des in ihnen neu gebildeten Knochens durchgeführt werden, um dessen Belastbarkeit und Verwindungsstabilität zu verifizieren.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte das Abbauverhalten der verwendeten Keramiken in An- und Abwesenheit von BMP-7 untersucht werden, sowie die ektope Knochenneubildung.

Hierzu wurden in 10 Göttinger Minischweine ekto 3 verschiedene Keramiken (HA; HA60; TCP) implantiert. Nach 3-monatiger Einheilzeit, in deren Verlauf *in-vivo* CT's angefertigt wurden sowie eine Fluoreszenzmarkierung durchgeführt wurde, wurden die Tiere getötet und die Keramiken explantiert. Die angefertigten Präparate wurden histomorphometrisch, fluoreszenzmikroskopisch und histologisch analysiert und ausgewertet.

Die HA und HA60-Keramiken zeigten ein osteoklastenabhängiges Abbauverhalten. Bei den TCP-Keramiken wurden ausschließlich Degradationsprozesse gefunden. Eine statistische Signifikanz fand sich im Vergleich von An- und Abwesenheit von BMP-7. Bei den mit BMP-7 beimpften Keramiken war das Abbauverhalten höher ( $p < 0,001$ )

Alle verwendeten Keramiken zeigten Knochenneubildung, wobei in Anwesenheit von BMP-7 diese statistisch Signifikant höher war als in Abwesenheit ( $p < 0,001$ ). Die HA60 Keramik zeigte die größte Knochenneubildungspotenz.

BMP-7 ist ein bereits lang bekannter und erforschter Wachstumsfaktor. Der positive Effekt auf die Knochenneubildung, welcher in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, konnte auch von vielen anderen Autoren beschrieben werden. Es konnte in dieser Studie desweiteren der beschleunigende Einfluss auf den Abbau der Kalziumphosphatkeramiken nachgewiesen werden.

## 6. Lebenslauf

Geburtsdatum: 22.09.1983  
Geburtsort: Bergisch-Gladbach

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung:

1990-1994            Erich-Kästner Grundschule  
                          Erfstadt- Bliesheim  
1994-2003            St. Ursula Gymnasium Brühl

### Zivildienst:

07.2003-05.2004    Marienhospital Erfstadt-Frauenthal

### Studium:

seit 04.2005            Universität Regensburg  
bis 07.2010            Zahnmedizin

### Beruflicher Werdegang:

seit 09.2010            Weiterbildungsassistent an der  
                          Poliklinik für Chirurgische Zahn-,Mund und Kieferheilkunde der  
                          Universität Bonn  
                          Direktor: Prof. Dr. med. dent. G. Wahl

### Publikationen:

#### *Poster:*

Schulz P., Klünter T., Detsch R. Schlüfter S., Deisinger U., Schreyer A. Reichert T.E., Roldán J.C.

Assessment of in vivo bone formation and replacement of novel calcium phosphate ceramics in presence of BMP-7 by confocal laser scanning microscopy, environmental scanning electron microscopy and computed tomography

XI International Congress for Histomorphometry, Zell, Österreich, 05/2009

*Vorträge als Co-Autor:*

Roldán J.C., Klünter T., Schulz P., Detsch R., Deisinger U., Dietz C., Proff P., Ziegler G., Reichert T.E.

Effect of BMP-7 on degradation and resorption of different calcium phosphate ceramics as well as on bone formation in an ectopic minipig model

20<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Santiago de Chile, Chile, 11/2011

Roldán J.C., Klünter T., Schulz P., Detsch R., Deisinger U., Dietz C., Proff P., Seitz D., Reichert T.E.

Integrity of calcium phosphate implants under the influence of BMP-7 in a minipig craniotomy model

European Society of Craniofacial Surgery (ESCFS), Göteborg, Schweden, 09/2012

*Veröffentlichungen:*

Roldán J.C., Klünter T., Schulz P., Detsch R., Deisinger U., Dietz C., Proff P., Ziegler G., Reichert T.E.

Effect of BMP-7 on degradation and resorption of different calcium phosphate ceramics as well as on bone formation in an ectopic minipig model

Int J Oral Maxillofac Surg, 2011, 40, e15-e16

## 7. 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 die Überlassung der Laboratorien und Unterstützung bei der Präsentation vorläufiger Ergebnisse auf internationalen Kongressen.

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 Überlassung des Themas und besonders für die stetige Bereitschaft mir bei kritischen Fragen Anregungen und Unterstützungen beim erfassen 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 Präparateherstellung.

Prof. Dr. med A. Schreyer, MBA – Leitender Oberarzt des Institutes für Röntgendiagnostik der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die Bereitstellung des Computertomographen und die freundliche Einweisung in die 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 dem Schwerpunkt zellbiologie und Keramikforschung danke ich für die 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 Georg Gebhard – Mitarbeiter am Labor für Knochenforschung der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die Geduld und Bewältigung der Masse der Anfangsdaten.

MTA Antje Böttiger - – Mitarbeiterin am Labor für Knochenforschung der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg danke ich für die Auseinandersetzung und Bewältigung der Tücken mit dem Umgang der mineralisierten Präparate, deren Paraffineinbettungen, dem fotografieren der Fluoreszenzbilder und die Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen.

Dr. med. Thilo Spruss – Tierschutzbeauftragter der Universität Regensburg und Tierpfleger, sowie den Betreuern des Tierstalls danke ich für die liebevolle und kompetente Betreuung der Tiere.

Dr. med. dent. P. Schulz danke ich als Wissenschaftler und Mitglied der Forschergruppe Knochersatzmaterialien an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Regensburg für die kritische und kompetente Auseinandersetzung mit den Themen der Arbeit sowie als Freund für das Bewältigen des Studiums und der Promotion.

Dr. Annemarie Klünter danke ich für die stetige Unterstützung während des Studiums sowie der kritischen Auseinandersetzung und Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich im besonderen für die Geduld und andauernde Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit.

## **8.Literaturverzeichnis :**

### **Açil Y.:**

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 IN., 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

### **Ayers R., Nielsen-Preiss S., Ferguson V., Gotolli G., Moore J.J., Kleebe H-J.:**

Osteoblast-like cell mineralization induced by multiphasic calcium phosphate ceramic  
Mater Sci Eng, 2006, 26, 1333-1337

### **Barth A.:**

Über histologische Befunde nach Knochenimplantation  
Langenbecks Arch Kin Chir, 1893, 46, 409-417

### **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

### **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

**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.:**

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

**Bozal C.B., Sánchez L.M., Ubios A.M.:**

The lacuno-canalicular system (LCS) and osteocyte network of alveolar bone by confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Acta Odontol Lationoam, 2012, 25(1), 123-131

**Carter Y., Thomas C.D., Clement J.G., Peele A.G., Hannah K., Copper D.M.:**

Variation in osteocyte lacunarmorphology and density in the human femur – a synchrotron radiation micro-CT study

Bone, 2013, 52(1), 126-132

**Chen G., Deng C., Li Y-P.:**

TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation  
Int J Biol Sci, 2012, 8(2), 272-288

**Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W., Sampath T.K., Rueger D.C., Whitecloud T.S. 3rd.:**

The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects

J Bone and Joint Surg, 1994, 76, 827-838

**Correia C., Grayson W.L., Park M., Hutton D., Zhou B., Guo X.E., Niklason L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic G.:**

In vitro model of vascularized bone: Synergizing vascular development and osteogenesis  
PLoS One, 2011, 6(12), e28352

**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., Hausherr J., Schlüfter S., Deisinger U., Roldan J.C., Fischer J., Chang E., Ziegler G., Krenkel W.:**

Charakterisierung von Knochenwachstum auf einer Calcium-Phosphat-Mischkeramik:  
Beurteilung einer zerstörungsfreien und 3-dimensionalen Charakterisierungsmethode  
Biomaterials, 2007, 28, 2491-2504

**Detsch R.:**

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

**Deisinger U.:**

Synthetisches Knochenersatzmaterial mit spongiosa – ähnlicher Struktur: Herstellung, materialwissenschaftliche Charakterisierung und biologisches Verhalten von Calciumphosphat – basierten Keramiken

Mbv (Berlin), 2009

**Devin J.E., Attawia M.A., Laurencin C.T.:**

Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair

J Biomater Sci Polym Edn, 1996, 7, 661-669

**Drommer R.:**

Das Göttinger Mini – Pig als Versuchstier in der experimentellen Chirurgie des

Mittelgesichtes

Dtsch Z Mund Kiefer Gesicht Chir, 1981, 5, 358-360

**Feng Y-F., Wang L., Li X., Ma Z-S., Zhang Y., Zhang Z-Y., Lei W.:**

Influence of architecture of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds on biological performance in repairing segmental bone defects

PLoS One, 2012, 7(11), e49955

**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

**Gatti A.M., Kirkpatrick J., Gambarelli A., Capitani F., Hansen T., Eloy R.,**

**Clermont G.:**

ESEM evaluations of muscle/nanoparticles interface in a rat model

J Mater Sci, 2008, 19, 1515-1522

**Gessink 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

**Gollwitzer H., Gloeck T., Roessner M., Langer, R., Horn C., Gerdesmeyer L., Diehl P.:**

Radial extracorporeal shock wave therapy (rESWT) induces new bone formation in vivo: results of an animal study in rabbits

Ultrasound Med Biol, 2013, 1 126-133

**Geuze R.E., Theyse L.F., Kempen D.H., Hazewinkel H.A., Kraak H.Y., Oner F.C., Dhert W.J., Alblas J.:**

A differential effect of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor release timing on osteogenesis at ectopic and orthotopic sites in a large animal-model

Tissue Eng Part A, 2012, 18, 19-20

**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 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, 2005, 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), 141-145

**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, 1363-1370

**Hannah K.M., Thomas C.D., Clement J.G., De Carlo F., Peele A.G.:**

Bimodal distribution of osteocyte lacunar size in the human femoral cortex as revealed by micro-CT

Bone, 2010, 47(5), 866-871

**Hirschfeld L., Wasserman B.:**

A long - term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients

J Periodontol, 1978, 49, 225-237

**Hönig J.F.:**

Das Göttinger Miniaturschwein als Versuchstier in der human – medizinischen osteologischen Grundlagenforschung

Z Zahnärztl Implantol, 1993, 2, 244-254

**Hou J., Wang J., Cao L., Qian X., Xing W., Lu J., Liu C.:**

Segmental bone regeneration using rhBMP-2- loaded collagen/chitosan microspheres composite scaffolds in a rabbit model

Biomed Mater, 2012, 7(3),

**Jensen T.B., Overgaard S., Lind M., Rahbek O., Bünger C., Søballe K.:**

Osteogenic protein-1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants

Acta orthop Scand, 2002, 73(1), 31-39

**Jepsen S.:**

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

**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

**Jones J.:**

Regeneration of trabecular bone using porous ceramics

Current Opinion in Solid State & Mater Sci, 2003, 7, 301-307

**Karageorgiou V., Kaplan D.:**

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis

Biomaterials, 2005, 26, 5474-5491

**Kim B-S., Kim J.S., Chung Y.S., Sin Y-W., Ryu K-H., Lee J., You H-K.:**

Growth and osteogenic differentiation of alveolar human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite fabric

J Biomed Mater Res, 2012, Part A, 1-9

**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 M.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

**Klein C., de Groot K., Chen W., Li Y., Zhang X.:**

Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues

Biomaterials, 1994, 15, 31-34

**Knabe C., Koch C., Rack A., Stiller M.:**

Effect of  $\beta$  – tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans

Biomaterials, 2008, 29, 2249-2258

**Kroese-Deutmann 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

J Biomaterials, 2005, 26, 1131-1138

**Kruyt M., 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

**Kübler N.R.:**

Ein allogenes Modell der Knochen – und Knorpelinduktion

Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir, 1993,17, 254-256

**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.:**

Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten mit BMP – 2

Dtsch Zahnärztl Z, 1998, 53, 871-875

**Küsswetter W.:**

Genetisch induziertes Knochenwachstum

Dtsch Ärztebl, 1999, 96, 1891-1896

**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 Escheria coli

J Biomaterials, 2010, 31, 3512-3519

**Le Nihouannen D., Daculsi G., Saffarzadeh A., Gauthier O., Delplace S., Pilet P.,**

**Layrolle P.:**

Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles

Bone, 2005, 36, 1086-1093

**Lynch S.E.:**

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 Craniomaxillofacial Surg, 2006, 34, 101-109

**McCarthy T.I.:**

Links among growth factors, hormones and nuclear factors with essential role in bone formation

Crit Rev Oral Biol Med, 2000, 11, 409-422

**Movat H.Z.:**

Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrom stains

Arch Pathol, 1955, 60(3), 289-295

**Neukam F.W.:**

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

**Nolff M.C., Kokemüller H., Hauschild G., Fehr M., Bohrmann K-H., Spalthoff S., Rohn K., Rücker M., Gellrich N-C.:**

Comparison of computed tomography and microradiography for graft evaluation after reconstruction of critical size bone defects using  $\beta$ -tricalcium phosphate  
J Craniomaxillofac Surg, 2009, 1-9

**Özkaynak 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 Biomed Mater 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.:** Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik  
Quintessenz (Berlin), 1985

**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

**Ranito C., Oliveira F.A.C., Borges J.P.:**

Hydroxyapatite foams for bone replacement

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

**Ripamonti U. et al.:** bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon

Clin Orthop, 1991, 284-294

**Ripamonti U.:**

Delivery systems for bone morphogenetic proteins. A summary of experimental studies in primate models

Ann Chir Gynaecol, 1993, 207, 13.24

**Ripamonti U., Reddi A.H.:**

Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins

J Periodont Res, 1994, 29, 225-235

**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.:**

Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models

Biomaterials, 1996, 17, 31-35

**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

**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., Açil 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., Waiss 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

**Rutherford B.R., 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. BMP in compromised surgical reconstruction using titanium implants.

J Craniomaxfac Surgery, 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

**Schofer M.D., Roessler P.P., Schaefer J., Theisen C., Schlimme S., Heverhagen J.T., Voelker M., Dersch R., Agarwal S., Fuchs-Winkelmann S., Paletta J.R.:**

Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects

PloS One, 2011, 6(9)

**Schulz P.:**

Resorption und Degradation von Hydroxylapatit- und Tricalciumphosphat-Keramiken am Göttinger Minischwein im Rahmen des BMBF-Projektes zur Entwicklung eines *in-vitro* Tests zur Bestimmung des Abbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien

Dissertation, Fakultät für Medizin, Universität Regensburg, 2013

**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 Impl Res, 2006, 17, 102-108

**Tachi K., Takami M., Sato H., Mochizuki A., Zhao B., Miyamoto Y., Tsukasaki H., Inoue T. Shintani S., Koike T., Honda Y., Suzuki O., Baba K., Kamijo R.**

Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- $\beta$ 1

Tissue Eng Part A, 2011, 597-606

**Tadjoedin E.S., de Lange G.L., Holzmnn 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 Impl Res, 2000, 11, 334-344

**Terheyden H., Jepsen S., Vogeler S., Tucker M., Rueger D.C.:**

Recombinant human osteogenetic protein-1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier  
Mund Kiefer GesichtsChir, 1997, 1, 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 osteogenetic protein-1: a histometric study in miniature pigs  
Clin Oral Impl Res, 1999, 10, 510-521

**Terheyden H., Knak C., Jepsen S., Palmie S., Rueger D.R.:**

Mandibular reconstruction with 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., Warnke P., Dunsche A., Jepsen S., Brenner W., Palmie S., Toth C., Rueger D.R.:**

Mandibular reconstruction with 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

**Valdre 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.:**

Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation

Proc Natl Acad Sci 1990, 87, 2220-2224

**Wissing H.:**

Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen

Springer (Heidelberg), Hefte zur Unfallheilkunde, 212, 479-488

**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., Mitsock 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

**Yamasaki H.:**

Heterotopic bone formation around porous hydroxyapatite ceramics in the subcutis of dog  
J Oral Biol, 1990, 32, 190-192

**Yamasaki H., Sakai H.:**

Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs  
Biomaterials, 1992, 13, 308-312

**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

**Yang H.S., La W.G., Park J., Kim C.S., Im G.I., Kim B.S.:**

Efficient bone regeneration induced by bone-morphogenetic-protein-2 released from apatite-coated collagen scaffolds  
J Biomater Sci Polym Ed, 2011

**Yuan H., van den Doel M., Li S., van Blitterswijk C.A., de Grot K., de Bruijn J.D.:**

A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats  
J Mater Sci: Mater Med, 2002, 13, 1271-1275

**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