

Aus der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie,
Charité - Campus Virchow Klinikum
der Humboldt-Universität zu Berlin

Eingereicht über die
Poliklinik für kleine Haus- und Heimtiere
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Untersuchungen auf mögliche heterotope Ossifikationen und
Bindegewebsreaktionen im Muskelgewebe nach lokaler Applikation von
Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2)
auf Poly (D,L-Laktid)-beschichteten Implantaten am Schafmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Natalie Palasdi

Tierärztin aus Köln

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3161

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Karl Diedrich Weyrauch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Growth factors, insulin-like growth factor, transforming growth factor, transforming growth factor beta (MesH), bone morphogenetic protein 2 (MesH), Biocompatible Materials (MesH), Foreign-Body Reaction (MesH), Connective tissue (MesH), Ossification, Heterotopic (MesH), sheep, animal models

Tag der Promotion: 30.07.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-455-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2008 Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

gewidmet

Meinen Eltern

Inhalt:

	Seite
1.	Einleitung 9
1.1	Ziel der Dissertation 9
1.2	Hypothese der Dissertation 9
1.3	Hintergrund 9
1.3.1	Frakturheilung und neue Therapiekonzepte 9
1.3.1.1	Wachstumsfaktoren (WF) und ihre Rolle in der Fraktur- und Wundheilung 9
1.3.1.1.1	Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) 11
1.3.1.1.2	Bone morphogenetic protein- 2 (BMP-2) 14
1.3.1.1.3	Insulin-like growth factor-I (IGF-I) 17
1.3.2	Möglichkeiten der Applikation von WFs durch Osteosynthesematerialien 19
1.3.2.1	Anforderungen an Wirkstoffträger für WFs 19
1.3.3	Biodegradierbare Materialien in der Knochenheilung 21
1.3.3.1	Biodegradierbare Polymere als Trägerstoffe für WFs 21
1.3.3.2	Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) 21
1.4	Problemstellung 24
2.	Material und Methode 25
2.1.	Implantat 25
2.1.1	Beschichtung und Wachstumsfaktoren 25
2.1.1.1	Beschichtungssubstanzen 26
2.1.1.2	Material und Geräte 26
2.1.1.3	Durchführung 26
2.2	Tiermodel 26
2.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen 26
2.2.2	Versuchstierbetreuung 27
2.2.3	Implantationsort der Titanplättchen - eine anatomisch-morphologische Darstellung des M. sternocleidomastoideus vom Schaf 27
2.3	Gruppenplan 28
2.4	Operationsdurchführung 28
2.4.1	Operationsvorbereitung 28
2.4.1.1	Material und Medikation (Stall) 28
2.4.1.2	Material, Medikation und Inhalationsnarkose (Vorbereitungsraum) 28
2.4.1.3	Geräte, Einstellungen, Material (Operationsraum) 29
2.4.1.4	Durchführung 30
2.4.2	Operationsbeschreibung 31

2.5	Postoperative Handhabung	33
2.5.1	Material	33
2.5.2	Durchführung	33
2.6	Fluorochrommarkierung	33
2.6.1	Herstellung der Fluorochromsequenzmarker	33
2.6.1.1	Material und Geräte	33
2.6.1.2	Durchführung	33
2.6.1.3	Ziel	33
2.6.2	Applikation der Fluoreszenzmarker	34
2.6.2.1	Material	34
2.6.2.2	Durchführung	34
2.7	Radiologie - In Vivo-Aufnahmen und Postmortale Aufnahmen	35
2.7.1	Material und Geräte	35
2.7.2	Durchführung	35
2.7.3	Ziel	35
2.8	Sektion: Entnahme des histologischen Materials	36
2.8.1	Material	36
2.8.2	Durchführung	36
2.9	Histologie	37
2.9.1	Vorbereitung für die histologische Weiterverarbeitung	37
2.9.2	Fixation der Proben	37
2.9.2.1	Chemikalien	37
2.9.2.2	Zeitdauer der Fixation	37
2.9.3	Entwässerung der Proben	37
2.9.3.1	Material und Geräte	37
2.9.3.2	Durchführung	37
2.9.4	Kunststoffeinbettung	38
2.9.4.1	Material und Geräte	38
2.9.4.2	Durchführung	38
2.9.5	Herstellung der Muskelschliffe	39
2.9.5.1	Vorbereitung der Schliffpräparate	39
2.9.5.1.1	Geräte	39
2.9.5.1.2	Durchführung	39
2.9.5.2	Planparalleles Aufblocken der Kunststoffblöcke	39
2.9.5.2.1	Material und Geräte	39
2.9.5.2.2	Anmerkung	40
2.9.5.2.3	Durchführung	40
2.9.5.3	Anschleifen der Präparate	40
2.9.5.3.1	Material und Geräte	40
2.9.5.3.2	Durchführung	40

2.9.5.4	Sandwichherstellung	40
2.9.5.4.1	Material und Geräte	40
2.9.5.4.2	Durchführung	40
2.9.5.5	Das Sägen der Sandwiche	41
2.9.5.5.1	Material und Geräte	41
2.9.5.5.2	Durchführung	41
2.9.5.6	Abschleifvorgang (Muskelschliffe)	41
2.9.5.6.1	Material und Geräte	41
2.9.5.6.2	Durchführung	42
2.9.5.6.3	Schliffnummerierung	42
2.9.5.6.3.1	Geräte	42
2.9.5.6.3.2	Durchführung	42
2.9.6	Herstellung der Knochenschliffe	42
2.9.6.1	Durchführung	42
2.9.6.2	Abschleifvorgang (Knochenschliffe)	42
2.9.6.2.1	Material	42
2.9.6.2.2	Durchführung	43
2.9.7	Färben der Präparate mit kombinierter Van Kossa/Safranin O'-Färbung	43
2.9.7.1	Material	43
2.9.7.2	Durchführung	43
2.9.7.3	Ziel	43
2.10	Auswertung	44
2.10.1	Radiologie - Methode der Auswertung	44
2.10.2	Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie - Methode der Auswertung	44
2.10.2.1	Material und Geräte	44
2.10.2.2	Ziel der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	44
2.10.2.3	Prinzip der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie	45
2.10.2.4	Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Auswertungsmethode	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Operationstoleranz und Heilungsverlauf	46
3.2	Röntgen	46
3.2.1	Postoperative Röntgenbilder und Verlaufsuntersuchungen	46
3.2.2	Post mortem	47
3.3	Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4	Histomorphologie	50
3.4.1	Unbeschichtet	51
3.4.2	PDLLA	54
3.4.3	TGF- β 1 + IGF-I	56
3.4.4	BMP-2	60

3.4.5	Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse	63
4.	Diskussion	64
4.1	Allgemein	64
4.2	Versuchsmodell	64
4.3	Zeitdauer der Versuche	65
4.4	Radiologie	65
4.5	Fluorochrommarkierung	65
4.6	Histomorphologie	66
4.6.1	Vergleich mit anderen Studien	67
4.7	Dosis	69
4.7.1	Vergleich mit anderen Studien	69
4.8	Applikationsmethode	71
4.8.1	Vergleich mit anderen Studien	71
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	74
5.1	Summary	75
6.	Abkürzungen	76
7.	Literatur	78
8.	Abbildungen	98
9.	Tabellen	100
10.	Danksagung	101
11.	Selbstständigkeitserklärung	102

1. Einleitung

1.1 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertation ist es, den Einfluss lokal applizierter Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2) im Muskelgewebe auf mögliche heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen zu untersuchen. Im besonderen Maße soll dabei das Einwachsverhalten der verschiedenen Wachstumsfaktorenbeschichtungen, die in Vorarbeiten unterschiedliche Eigenschaften gezeigt haben, zum Zeitpunkt von 12 Wochen untersucht werden.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Kontrollstudie für die lokale Applikationsweise der Wachstumsfaktoren (WFs) von PDLA-beschichteten Implantaten mit dem Ziel, mögliche negative Effekte der WFs im Weichteilgewebe unter Berücksichtigung der lokalen Applikationsweise zu untersuchen. Zusätzlich soll der osteoinduktive Charakter durch die lokale Applikation des Wachstumsfaktors BMP-2 von PDLA-beschichteten Implantaten bezogen auf die hier verwendete Dosis untersucht werden.

1.2 Hypothese der Dissertation

Die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2 von Poly (D,L-Laktid)-beschichteten Titanimplantaten rufen durch das Einbringen in eine Muskeltasche keine lokalen Nebenwirkungen im Gewebe hervor.

1.3 Hintergrund

1.3.1 Frakturheilung und neue Therapiekonzepte

Die Versorgung einer Fraktur ist Routine in der unfallchirurgischen und orthopädischen Praxis. Das Ziel der Frakturbehandlung ist es die Kontinuität des Knochens wiederherzustellen, ohne dass eine Funktionseinschränkung bestehen bleibt.

Je nach Frakturart kommen konservative oder operative Therapiemaßnahmen in Frage. Im Rahmen der Knochenbruchheilung sind noch nicht alle Fragen geklärt, da die Frakturheilung ein multifaktorielles Geschehen ist, an dem zahlreiche Zellregulationsmechanismen teilhaben.

Durch das Trauma entstandene Defekte sind bei der Rekonstruktion häufig mit lokalen und auch systemischen Komplikationen verbunden. Die Fähigkeit, die Regulation des Zellverhaltens kontrollieren zu können, würde zur Optimierung der Therapiekonzepte beitragen. Deshalb ist die Frakturheilung immer noch ein beliebter Gegenstand der Forschung.

1.3.1.1 Wachstumsfaktoren und ihre Rolle in der Fraktur- und Wundheilung

Bereits 1938 entdeckte Levander, dass ein Säurealkoholextrakt aus Knochen und Kallusmaterial, in den Muskel von Kaninchen appliziert, zur heterotopen Knorpel- und Knochenbildung führt. Fortan ging man davon aus, dass spezifisch knochenbildende Substanzen in der Lage waren, auf nichtspezifisches Mesenchymgewebe Einfluss zu nehmen, um die Knochenregeneration auszulösen (Levander, 1938).

Moderne Gewinnungsmethoden (Befreiung von der extracellulären Matrix und Reinigung), insbesondere die DNA-Technologie, machten es in den letzten Jahrzehnten möglich, zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie BMP's, IGF-I und II, TGF- β 's, platelet derived growth factors (PDGFs), basic fibroblast growth factors (bFGFs) sowie acidic fibroblast growth factors (aFGFs), zu identifizieren.

Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um Polypeptide. Sie werden in geringen Konzentrationen durch bestimmte Gewebe synthetisiert und agieren als lokale Regulatoren von Zellfunktionen. Die meisten WFs werden als hochmolekulare Vorstufen durch Proteolyse gespalten und produzieren aktive Faktoren mit einem geringen Molekulargewicht (MG).

Die Wirkungsmechanismen der WFs zur Regulation des Zellverhaltens erfolgen durch die Bindung an ein großes, WF-spezifisches, transmembranöses Rezeptormolekül auf der Oberfläche der Zielzellen. Die Bindung des Zellsignalmoleküls (Liganden) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors führt zur Aktivierung der intrazellulären Domäne, die die Proteinkinase in Gang setzt und schließlich zur Proteinsynthese führt. Diese Proteine werden entweder für zelleigene Prozesse genutzt, zu extrazellulären Matrixproduktionen ausgeschleust oder für andere Zellfunktionen eingesetzt (Trippel et al., 1996).

In mehreren Studien konnte für die Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2 eine Wirkung auf Knochenzellen, die Knochen- und Wundheilung, aber auch Einflüsse auf das Muskelgewebe, sowie systemische Effekte gezeigt werden. (Mohan und Baylink, 1991; Sakai et al., 1999; Hock et al., 1988; Fujimoto et al., 1999; Okubo et al., 2000; Singer et al., 1999; Florini und Magri, 1989; Kratz et al., 1994; Liu et al., 2001; Mustoe et al., 1987;).

1.3.1.1.1 TGF- β 1

TGF- β 1 ist Bestandteil der TGF- β -Superfamilie. Diese Superfamilie ist mittlerweile von ursprünglich 4 Familien in 2 großen Unterfamilie zusammengefasst worden und zwar der Unterfamilie der TGF- β 's, Aktivin's, Nodal's und der Unterfamilie der BMP's, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs), Müllerian Hemmsubstanzen (MIS) Unterfamilie. TGF- β -verwandte Proteine wurden in allen Wirbeltierarten, aber auch in der Fruchtfliege *Drosophila* und in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* gefunden (Piek und Roberts, 2001; Kingsley, 1994; Massagué, 1990). Alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie werden als große Protein-vorstufen synthetisiert. Diese Präproteine bestehen aus einem Signalpeptid, einer Vordomäne unterschiedlicher Größe und einer Carboxyterminalregion, die aus 110 bis 140 Aminosäuren gebildet wird. Nach der Abspaltung des Signalpeptids mittels Proteasen erfolgt die Dimerisierung der Präproteine zu Proteindimeren, dessen Monomerketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden werden (Massagué, 1990; Derynck et al., 1985). TGF- β wird von den meisten Zellen als biologisch inaktive Form, sogenannte latent TGF- β 's, gebildet. Der latent TGF- β -Komplex besteht aus dem aktiven TGF- β Dimer, einem latent-assoziierten Peptid (LAP) und dem latenten TGF- β Bindungsprotein. Die latenten TGF- β 's werden entweder in Thrombozyten gelagert oder im Körper sekretiert. Die Aktivierung des latenten TGF- β -Komplexes erfolgt entweder über zellassoziierte Membranrezeptoren, die Bindung an die Extrazellulärmatrix, über unterschiedliche Proteasen oder zahlreiche Enzyme, die an die Extrazellulärmatrixproteine gebunden sind (Clark und Coker, 1998; Sporn und Roberts, 1990; Miyazono et al., 1993). TGF- β kommt mit absteigender Reihenfolge im Organismus vor allem im Knochen, den Thrombozyten (α -Granula) und im Serum vor und zwar überwiegend in nicht aktiver Form (Assoian et al., 1983; Wakefield et al., 1988; Sporn und Roberts, 1988; O'Conner-Mc Court und Wakefield, 1987) Die Carboxyterminalketten der TGF- β -Monomere enthalten 7 charakteristische Cysteine, die in den einzelnen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie verschieden sind (Daopin et al., 1992).

Bei TGF- β 's handelt es sich um ein 25 kDa schweres Homodimer, dessen Aminosäuresequenzen zu 60 - 80 % identisch sind (Solheim, 1998). Bisher wurden 5 Isoformen von TGF- β identifiziert (Massagué, 1990). Dabei kommen die Isoformen TGF- β 1-3 beim Säugetier vor (Bonewald, 1999).

TGF- β ist ein prototypisches, multifunktionelles Zytokin, welches zahlreiche biologische Prozesse im Organismus reguliert. Seine Aktivität beinhaltet die Regulation des Wachstums und der Differenzierung zahlreicher Zelltypen. Vor allem stimuliert TGF- β Zellen mesenchymalen Ursprungs und hemmt Zellen ektodermalen Ursprungs (Lind, 1996). Grundsätzlich ist TGF- β verantwortlich für Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Zellapoptose und des Stoffwechsels der Extrazellulärmatrix (Massagué, 1990; Sporn und Roberts, 1990; Kanaan und Kanaan, 2006).

TGF- β übernimmt die Vermittlerrolle in zahlreichen Regulationsmechanismen der embryonalen und adulten Genese, aber auch bei Entzündungs- und Heilungsprozessen, einschließlich der Angiogenese, der Hämatopoese, der neoplastischen Transformation und der Regulation der Immunantwort. TGF- β zeigt sowohl autokrine als auch parakrine Effekte. Seine biologischen Effekte werden durch Rezeptoren vermittelt (Roberts und Sporn, 1993; Kingsley, 1994; Massagué, 1996; Yang et al., 2003; Lee et al., 2006; Clark und Coker, 1998).

TGF- β kommt in der extracellulären Matrix des Knochens und des Weichteilgewebes vor (Sporn und Roberts, 1990; Centrella et al., 1991).

Dieser WF spielt eine wichtige Rolle als Zellregulator bei der Weichteil- und Knochenregeneration und wird unter anderem durch die Thrombozytendegranulation, aktivierte Makrophagen sowie durch Bindegewebszellen freigesetzt (Assoian et al., 1983; Assoian und Sporn, 1986; Andrew, et al., 1993).

Mustoe et al. (1987) demonstrierten in ihrem Wundheilungsmodell der Ratte, dass durch eine Einzelapplikation von TGF- β entlang der Incision ein Anstieg der maximalen Wundstabilität von 220 % nach fünf Tagen erzielt wurde und dass es drei Tage nach Applikation der Wachstumsfaktoren zur Beschleunigung der Wundheilungsrate gekommen war.

Robert et al. (1986) und Pierce et al. (1989) konnten zeigen, dass die exogene Applikation von TGF- β die Heilung forciert, indem sowohl die Bildung des Granulationsgewebes angeregt als auch die Schnittwunde stabilisiert worden ist.

Anhand von weiteren Untersuchungen der normalen und verzögerten Heilung konnte der stimulierende Effekt von TGF- β auf die kutane Wundheilung immer wieder dargestellt werden (Beck et al., 1990; Beck et al., 1991; Ashcroft et al., 1999).

Allen und Boxhorn (1987) zeigten anhand von Primärkulturen der Ratten-Muskelzelllinien, dass TGF- β auch einen gegenteiligen Effekt auf bestimmte Zelltypen ausüben kann, indem es die Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen nachweislich hemmt. Diese Ergebnisse lassen sich sowohl auf unreife Muskelzellen während der Entwicklung, als auch auf die Muskelzellregeneration übertragen. Auch andere Untersuchungen haben gezeigt, dass TGF- β die Muskelzellbildung hemmt, so dass keine Myotuben gebildet werden, die muskelspezifische Proteinausschüttung gehemmt wird und auch die Kreatinkinase-Rezeptoren sowie die Acetylcholinrezeptoren blockiert werden (Massagué et al., 1986; Olson et al., 1986; Florini et al., 1986; Zhu et al., 2004; Liu und Derynck, 2004).

Hinsichtlich der Frakturheilung haben vor allem TGF- β 1 und TGF- β 2 besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Bei TGF- β handelt es sich um einen pleiotropischen WF, der in erster Linie die Proliferation der undifferenzierten Mesenchymzellen und der Chondrozyten sowie die Produktion der extrazellulären Matrix während der Chondrogenese und endochondralen Knochenformation stimuliert (Tab. 1) (Barnes et al., 1999; Bolander, 1992; Bourque et al., 1993; Joyce, 1990a).

Ebenso ist TGF- β in die normale Knochenformation und -resorption involviert. Da Osteoblasten die größte Anzahl von TGF- β -Rezeptoren besitzen, sind sie in der Lage, TGF- β zu synthetisieren, die anschließend in der Knochenmatrix gespeichert wird. Damit stellt der Knochen das größte TGF- β -Reservoir im Körper dar (Barnes et al., 1999; Lind, 1996; Bonewald und Mundy, 1990). In der Knochenmatrix befindet sich eine signifikante Höhe von latenten TGF- β 's und nur eine geringe Menge biologisch aktiver TGF- β 's (Dallas, et al., 1994).

Tabelle 1: TGF β und seine Rolle in der Frakturheilung

<u>Heilungsstadium</u>		<u>Quelle, Lokalisation und Wirkung</u>
Unmittelbare Verletzungsantwort	TGF- β	Freigabe durch Thrombozyten und Entzündungszellen im Frakturhämatom Stimulation der Mesenchymzellproliferation in der Kambiumschicht des Periosts (Bolander, 1992; Bourque et al., 1993)
Intramembranöse Ossifikation	TGF- β	Lagerung in proliferierenden Mesenchymzellen, Osteoblastenlinien des neu gebildeten Knochens und der Knochenmatrixformation
Chondrogenese	TGF- β	Lagerung in Mesenchymzellen, jungen und reifen Chondrozyten
Endochondrale Ossifikation	TGF- β	Lagerung in der Knochenmatrix rund um die hypertrophe Chondrozyten (Joyce et al., 1990a) Lagerung in den Chondrozyten an den Ecken der Ossifikationsfronten (Bourque, et al., 1993)

In der ersten Phase der Frakturheilung wird TGF- β im harten Kallus immunlokalisiert. Das ist der Ort der periostalen Proliferation und intramembranösen Knochenformation, so dass TGF- β in erster Linie in die Stimulation der Proliferation der Vorosteoblasten involviert ist (Joyce et al., 1990a). Das Auftreten von TGF- β 1 im Periost während der Frühphase der Fraktur konnte an zahlreichen Säugetiermodellen sowie klinischen Studien am Menschen bestätigt werden (Andrew et al., 1993a; Rosier et al., 1998). Anhand von Frakturmodellen konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die Mesenchymzell- und Osteoblastenproliferation erhöht (Beck et al., 1993; Bolander, 1992).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die TGF- β -Expression während der Chondrogenese und der endochondralen Knochenformation hoch ist (Joyce et al., 1990b). Die Stimulation der Knochenheilung durch TGF- β hängt von der orthotopen Applikation (z. B. subperiostale Injektion) ab (Tanaka et al., 1993).

Der klinische Einsatz in der Traumatologie gestaltet sich immer noch schwierig, da es nicht gelang, einheitliche Bedingungen zu schaffen. Bisher waren entweder häufige Dosen (Nielsen et al., 1994; Lind et al., 1993) oder eine einmalige hohe Dosis (Critchlow et al., 1995) notwendig, um eine Wirkung zu induzieren. Dies ist für den klinischen Einsatz nicht praktikabel. Ebenso gilt es für die klinische Anwendung unvorhersehbare Nebeneffekte auszuschließen (Critchlow et al., 1995; Terrell et al., 1993).

1.3.1.1.2 BMP-2

BMP's bilden eine Unterfamilie der TGF- β -Superfamilie. Urist entdeckte 1965, dass demineralisierte Knochenmatrix (DBM) implantiert in eine Muskeltasche bei Ratten zu heterotopen Ossifikationen führt. Die Fähigkeit der demineralisierten Knochenmatrix, die Knochenbildung zu induzieren, schrieb Urist einem niedermolekularen Protein zu, das er als „Bone morphogenetic protein“ (BMP) bezeichnete und immer noch diesen Namen trägt (Urist et al., 1983). Wozney et al. (1988) waren die ersten, die die Aminosäuresequenzen des BMP's entschlüsselten, was die Aufdeckung weiterer Isoformen ermöglichte. Weitere Mitglieder der BMP-Unterfamilie sind die osteogenetic proteins (OPs), die cartilage-derived morphogenetic proteins (CDMPs) und die growth and differentiation factors (GDFs). Bis heute sind mehr als 30 Isoformen der BMP's identifiziert und davon rund 20 charakterisiert worden (Ducy und Karsenty, 2000; Chen et al., 2004).

Die BMP's werden ebenfalls als große Proteinvorstufe synthetisiert, die durch Proteolyse gespalten werden, um schließlich ein aktives Proteindimer aus Carboxyterminalketten zu bilden. Bei der BMP-Proteolyse bleiben in den Monomeren 7 Cysteine erhalten, die für eine korrekte Faltung der Dimermoleküle wichtig sind. Es handelt sich um Homo- oder Heterodimere BMP's (Massagué, 1990; Wozney, 1992; Hogan, 1996; Wozney und Rosen, 1998). Ihre Signaltransduktion entspricht dem Mechanismus der TGF- β -Superfamilie (Barnes et al., 1999; Reddi, 1998).

Mit fortschreitender Forschung der BMP-Unterfamilie seit den 60er Jahren hat sich herausgestellt, dass der Name „bone morphogenetic protein“, initiiert durch seinen Entdecker Urist (1965), doch irreführend sein kann. Bedenkt man, dass die BMP's eine Vielzahl unterschiedlichster Zellprozesse, sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Lebewesen, steuern. Diese Zellprozesse umfasst eine Vielzahl von Zellen, einschließlich der Osteoblasten und Chondrozyten und reichen vom Zellwachstum, der Apoptose, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und schließlich bis zur Morphogenese (Barnes et al., 1999; Wozney, 1998). Bei Wirbeltieren sind die BMP's darüber hinaus an der grundlegenden Entwicklung des Körperbaus beteiligt. Das heißt die BMP's wirken sowohl an der Gewebebildung, der Organogenese (wie z. B. Nervensystem, Lunge, Niere, Gonaden, Gesichtorgane) als auch der Skelettentwicklung mit (Hogan, 1996; Wozney, 1998).

Beim Wirbeltier zählt die Induktion der Knorpel- und Knochenbildung und die Unterstützung des Muskelgewebes zu den Schlüsselfunktionen des BMP's (Kingsley, 1994; Wang et al., 1990). BMP's sind die einzigen Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, ausgehend von Chondrozyten und Osteoblasten, stimulieren können (Urist et al., 1983). Vor allem BMP-2 bis BMP-7 haben sich durch ihre Fähigkeit der Knocheninduktion ausgezeichnet (Reddi und Cunningham, 1993). Bei der Frakturheilung spielen vor allem BMP-2, BMP-3, BMP-4 und BMP-7 eine bedeutende Rolle, während die anderen Mitglieder der BMP-Unterfamilie keine osteoinduktive Wirkung gezeigt haben (Linkhart et al., 1996; Trippel et al., 1996; Barnes et al., 1999). BMP wird sowohl in der Embryonalentwicklung der Knochenbildung als auch während der Frühphase der Frakturheilung ausgeschüttet (Tab. 2) (Bostrom, 1998; Bostrom et al., 1995; Nakase et al., 1994; Bolander, 1992; Joyce et al., 1990a; Ishidou et al., 1995; Spector et al., 2001).

Tabelle 2: BMP und seine Bedeutung in der Frakturheilung

Heilungsphase	WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung
Unmittelbare Verletzungsantwort	BMP-2/-4	In Mesenchymzellen des Hämatoms In der Kambiumschicht des Periosts des Frakturbereichs (Bostrom et al., 1995; Nakase et al., 1994)
	BMP-4	Ihre „messenger ribonucleid acid“ (mRNA) liegt in Knochenvorläuferzellen des proliferierenden Periosts, der Knochenmarkhöhle und den Muskeln nahe der Fraktur (Bolander, 1992; Joyce et al., 1990a)
Intramembranöse Ossifikation	BMP-2/-4 -7	Im Osteoblastensaum 6 Tage nach der Fraktur
Chondrogenese	BMP-2/-4 -7	In chondroiden Vorläuferzellen (intensive Färbung, außer BMP-7 schwach bis fehlend), die sich zu unreifen Chondrozyten entwickeln und proliferierenden Chondrozyten (Bostrom et al., 1995; Ishidou et al., 1995)
Endochondrale Ossifikation	BMP-2/-4	Im Osteoblastensaums (intensive intracelluläre Färbung) der kalzifizierten Knorpelmatrix (Bostrom et al., 1995)

In den letzten Jahren wurde der Einsatz von BMP-2 in zahlreichen vorklinischen Studien am adulten Säugetiermodell getestet, die gezeigt haben das BMP die Knochenheilung positiv beeinflusst (Welch et al., 1998; Wang et al., 1990; Murakami et al., 2003; Sumner et al., 2004; Sachse et al., 2005; Eckardt et al., 2005; Chu et al., 2006; Faria et al., 2007; Milovancev et al., 2007; Chu et al., 2007).

Es wurden auch zahlreiche sogenannte „critical-size“ Defekte am langen Röhrenknochen untersucht, da gerade diese Defekte ohne Überbrückung durch osteoinduktive und osteokonduktive Substanzen nicht vollständig und nur stark verzögert heilen können. Insbesondere Großtierstudien mit langen segmentalen Defekten unterstützten die Aussage, dass BMP-2 die Fähigkeit besitzt, Defekte zu überbrücken (Gerhart et al., 1993; Yasko et al., 1992; Zegzula et al., 1997; Yoneda et al., 2005; Seeherman et al., 2006; Kirker-Head et al., 2007). Ebenso in „critical-size“ Craniumdefektmodellen hat rhBMP-2 seine gute Osteoinduktion unter Beweis stellen können (Sheehan et al., 2003; Hou et al., 2007b)

Undifferenzierte mesenchymale Zellen sind die Vorläuferzellen von Osteoblasten, Chondrozyten, Muskelzellen und Fettzellen (Taylor und Jones, 1979). Mesenchymzellen kommen sowohl im Muskelgewebe als auch Unterhautgewebe vor.

Yamaguchi et al. (1991) stellten fest, dass rhBMP-2 nicht nur in der Lage ist aus Osteoblastenvorläuferzellen reife Knochenzellen zu bilden, sondern auch die Muskelzeldifferenzierung zu hemmen. Katagiri et al. (1994) berichteten, dass BMP-2 in der Lage ist Myoblasten in Osteoblasten umzuwandeln, ohne dass diese Umwandlung vererbbar war. Diese führt zu der Annahme, dass rhBMP-2 die Fähigkeit besitzen muß, Einfluß auf die unreifen mesenchymalen Zellen zu nehmen, so dass diese sich zu Osteoblasten entwickeln. BMP-2 ist somit in der Lage, auf die Differenzierungsrichtung der mesenchymalen Zellen Einfluß zu nehmen, um im Muskel- und Unterhautgewebe eine Osteoinduktion auszulösen.

An zahlreichen ektopten Rattenmodellen im intramuskulären und subkutanen Gewebe konnte dieses osteoinduktive Potential von BMP-2 bestätigt werden (Oda et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Okubo et al., 2000; Nakagawa et al., 2001). Auch eine lokal applizierte perkutane Injektion von rhBMP-2 am Frakturheilungsmodell von Ratten und Hunden beschleunigt die Frakturheilung (Einhorn et al., 2003, Edwards et al., 2004) Die intervertebrale, lumbale Spinalfusion am Kaninchenmodell zeigte ebenso die positive Wirkung von BMP-2 auf das Knochengewebe (Schimandle et al., 1995; Minamide et al., 1999; Ames et al., 2005; Kraiwattana-pong et al., 2005).

Der Einsatz von BMP-2 für die Rekonstruktion und Überbrückung maxillofacialer oder periodontaler Defekte konnte am Säugetiermodell ebenfalls erfolgreich erprobt werden (Toriumi et al., 1991; Boyne, 1996; Cochran et al., 1999; Ma et al., 2000; Boyne, 2001; Sykaras et al., 2004; Weyer et al., 2007).

Die osteoinduktiven Fähigkeiten bei den meisten Wirbeltieren, die Knochenbildung zu induzieren, haben dazu geführt, dass BMP als therapeutisches Argens zur Herstellung von neuem Knochenmaterial in der Behandlung von Verletzungen und Erkrankungen des Bewegungsapparates und in der Mundkiefergesichts Chirurgie eingesetzt wird (Wozney und Rosen, 1998). Insbesondere die ausgeprägte osteoinduktive Wirkung von BMP-2 und BMP-7 hat dazu beigetragen, dass diese beiden Wachstumsfaktoren in Europa für ausgewählte Indikationen in der Orthopädie mittlerweile als Arzneimittel zugelassen worden sind (Granjeiro et al., 2005; Terheyden und Becker, 2006)

1.3.1.1.3 IGF-I

Die IGF's, auch Somatomedine genannt, sind strukturhomolog zu Proinsulin und gehören zur Familie der Signalzellmoleküle (= Zytokine), die sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Zellen regulieren. Rinderknecht und Humbel (1978) entdeckten die beiden Polypeptide IGF-I und IGF-II auf der Basis ihrer insulinähnlichen Aktivität, ihrer Growth hormone-(GH)-abhängigen Vermittlungsfähigkeit des Knochenwachstums und ihrer mitogenetischen Eigenschaft. Die insulinähnliche Aktivität führte zunächst zu ihrer Namensgebung „insulin-like factor“ (IF). Allerdings wurden sie in „insulin-like growth factor“ (IGF-I und IGF-II) umbenannt, als sich herausstellte, dass ihre wachstumsfördernden Eigenschaften eine noch größere Rolle spielten (Rinderknecht und Humbel, 1978; Klapper et al., 1983; Daughaday et al., 1987).

Diese Polypeptide IGF-I (Somatomedine-C; 7,7 kDa, 70 AS + 3 Disulfidbrücken) und IGF-II (SGF; 8,7 kDa; 67 AS + 3 Disulfidbrücken) werden durch zahlreiche Gewebezellarten einschließlich dem Knochengewebe synthetisiert. Beide haben die gleichen biologischen Eigenschaften, jedoch IGF-I hat eine 4-7 mal höhere Potenz als IGF-II (McCarthy et al., 1989; Lind, 1996; Mohan und Baylink, 1991; Trippel, 1998).

Die IGF-I-Synthese erfolgt vornehmlich über den endokrinen Steuerungsmechanismus von GH. Wachstumshormone binden an GH-spezifischen transmembranösen Rezeptormolekülen auf der Oberfläche der Zielzellen des Leber-, Knochen- und Knorpelgewebes und setzen die intrazelluläre Kaskade der IGF-I-Produktion in Gang. Parakrine und autokrine Bildungsmechanismen unterschiedlicher Gewebezellarten besitzen ebenso die Fähigkeit zur IGF-Produktion, wobei die Leber die Hauptproduktionsstätte der meisten freizirkulierenden IGF's ausmacht.

Die biologische Aktivität der IGF's wird durch Proteine gesteuert, die spezifisch an IGF's binden. Diese Bindungsproteine haben sowohl die Aufgabe als Trägerprotein zu dienen und somit dessen Halbwertszeit im Organismus zu verlängern, als auch die Interaktion der IGF's mit ihren Rezeptoren zu steuern und dadurch ihre Zellaktivität zu bestimmen, so dass sie aktiv an der Zellregulation beteiligt sind (Jones und Clemmons, 1995; Mohan et al., 1989). Bisher sind 9 verschiedene IGF-Binding-Proteine identifiziert worden, wovon 6 Bindungsproteine reine IGF-abhängige Zellaktivitäten steuern, da sie eine hohe Affinität zu IGF's besitzen (Rajaram et al., 1997; Kim et al., 1997; Wetterau et al., 1999). Davon wirken IGFBP-1, -3 und -5 stimulierend und IGFBP-1 bis -4 und -6 hemmend auf die IGF-Aktivität (Jones und Clemmons, 1995; Kiepe et al., 2002; Kiepe et al., 2005).

Die Bedeutung von IGF-I und II für das Wachstum und die Entwicklung zahlreicher Gewebe in der embryonalen und adulten Genese ist seit Jahren bekannt (Monzavi und Cohen, 2002). IGF übernimmt die Vermittlerrolle bei Reifungs- und Differenzierungsprozessen im Organismus. Es ist zuständig für die Stimulierung der Zellteilung und Matrixsynthese im Knochen, Knorpel, kollagenen Bindegewebe und muskulären Gewebe (Canalis, 1980; Abrahamsson et al., 1991; Ewton et al., 1987), für die Proliferation und Differenzierung von Knorpelzellen, Knochenvorläuferzellen, Knochenzellen, Muskelzellen, sowie für die Stimulation der Kollagen Typ I-Expression (Mohan and Baylink, 1991; Canalis et al., 1993; Bellows et al., 2006; Ciarmatori et al., 2007; Florini und Magri, 1989).

IGF's sind die in der Knochenmatrix am meisten vorkommenden WFs (Linkhart et al., 1996), daher spielen sie eine bedeutende Rolle in der Knochenentwicklung, im Wachstum und in der Frakturheilung, wo es seine Hauptwirkung im Knorpel der Wachstumsplatte des Knochengewebes entfaltet (Andrew et al., 1993b; Lind, 1996; Bourque et al., 1993).

IGF-I's sind an zahlreichen Regenerations- und Reparationskaskaden des Organismus beteiligt, unter anderem an der Regeneration des kollagenen Bindegewebes (Provenzano et al. 2007) des Muskelgewebes (Pierre et al., 1997; Menetrey et al., 2000; Musarò et al., 2004; Philippou et al., 2007; Pelosi et al., 2007)) als auch von Knorpelgewebe (Nixon et al., 2000; Jackson et al., 2001; Gill et al., 2005; Friesbie et al., 2006), der Reepithelisierung von Wunden (IGF-I und in Verbindung mit IGFBP-1) (Kratz et al., 1994) und nicht zuletzt an der Erhöhung des Wundgewebes mit Beschleunigung der Wundheilung (Sommer et al., 1991; Suh et al., 1992; Yang et al., 2007).

Die Absicht der unfallchirurgischen Forschung ist es, regenerative Prozesse gezielt zu beeinflussen und zu beschleunigen, wie das in zahlreichen Studien durch IGF-I gezeigt werden konnte (Isgaard et al., 1986; Hock et al., 1988; Nilsson et al., 1987a; Thaller et al., 1993; Boudignon et al., 2007), um im Rahmen der Wiederherstellung des geschädigten Gewebes eine verbesserte und kontrollierte Heilung zu erzielen. Diese Voraussetzung scheint IGF-I zu erfüllen. Für einen unbedenklichen klinischen Einsatz in der Frakturheilung gilt es jedoch noch die unvorhersehbaren Nebenwirkungen auszuschließen und auch die Frage der Dosis, die den therapeutisch erwünschten Effekt erzielt, zu ermitteln (Wilton, 1992; Nilsson et al., 1987).

1.3.2 Möglichkeiten der Applikation von Wachstumsfaktoren durch Osteosynthesematerialien

Ziel der Frakturbehandlung ist die Wiederherstellung des Knochens. Die dabei oftmals verwendeten Osteosynthesematerialien dienen während des Heilungszeitraums der Stabilisierung der Knochen bis körpereigene Strukturen dies wieder selbst übernehmen können. Während dieses Heilungsprozesses sollen die verwendeten Materialien das natürliche Gewebe möglichst nicht negativ beeinflussen und die Nebenwirkungen durch das eingesetzte Material sollen nur minimal sein. Dazu gehört auch, dass die Entzündungsreaktionen so gering wie möglich gehalten werden sollen. Das Ziel jeder Osteosynthese soll es sein, zu einer komplikationslosen Heilung beizutragen und im bestmöglichen Fall die Heilung zu beschleunigen. Die Wahl der Osteosynthesematerialien spielt eine entscheidende Rolle für die Frakturheilung. Heutzutage werden sowohl Stahl als auch Titanimplantate in der Osteosynthese verwendet.

Während der Heilung kommt es durch die Trägermaterialien zu einer Fremdkörperreaktion in Form einer Fremdkörperkapselbildung. Die beiden Trägermaterialien Stahl und Titan zeigen dabei ein ähnlich reaktionsarmes Einwachsverhalten im Gewebe, indem es lediglich zu einer milden Fremdkörperreaktion kommt, gekennzeichnet durch fibrinöses Bindegewebe und Makrophageninfiltrationen (Voggenreiter et al., 2003). Auch in anderen Studien konnte ein ähnlich gleichwertiges, reaktionsarmes Einwachsverhalten beider Trägermaterialien beobachtet werden (Torgersen, et al., 1995a; Torgersen et al., 1995b; Nazzal et al., 2006)

Die Frakturheilung ist ein multifaktorielles Geschehen an dem zahlreiche Zellregulationsmechanismen teilhaben, die unter anderem durch Wachstumsfaktoren induziert, beeinflusst und gesteuert werden.

An zahlreichen Tiermodellen konnten die osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften von WFs auf die Frakturheilung aufgezeigt werden (Lieberman et al., 2002; Blumenfeld et al., 2002; Srouji et al., 2004; Wong et al., 2003; Boyne et al., 2006).

Diese positiven Eigenschaften der WFs wollte man für die Frakturheilung nutzen und suchte nach einer geeigneten Applikationsform, um sowohl die stabilisierenden Eigenschaften der Osteosynthesematerialien als auch die osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften der WFs miteinander kombinieren zu können. Aus diesem Grund war es notwendig, einen optimalen Wirkstoffträger für WFs zu finden.

1.3.2.1 Anforderungen an Wirkstoffträger für Wachstumsfaktoren

Die Vielzahl der Trägermaterialien in Kombination mit den verschiedenen vorklinischen Modellsystemen und die unterschiedliche Trägeraffinität zu den jeweiligen WFs machten es bisher schwierig, die Trägervorzüge im einzelnen festzulegen (Hollinger und Leong, 1996; Winn et al., 1999).

Um als Wirkstoffträger für Arzneimittel dienen zu können, müssen Carriers bestimmte Kriterien im ausreichenden Maße erfüllen. Es gilt vor allem, negative Effekte auszuschließen, die durch die Trägerstoffe ausgelöst werden können. Die verwendeten Osteosynthesematerialien haben grundsätzlich frei von toxischen und mutagenen Effekten zu sein.

Sie sollen auch keine nachteiligen Entzündungsreaktionen hervorrufen, keine Fremdkörperreaktionen, weder karzinogen noch teratogen sein, keine Allergien verursachen oder Hypersensibilitäten auslösen oder gar das Komplementsystem des Immunsystems aktivieren (Lyman, 1966; Böstman und Pihlajamäki, 2000).

Die Wahl des Wirkstoffträgers spielt eine entscheidende Rolle für die Wirkung der WFs im implantierten Gewebe, da diese die Freisetzungskinetik beeinflussen und somit zur optimalen Wirkstofffreisetzung beitragen können (Winn et al., 1999).

Erst eine kontinuierliche Freigabe des Wachstumsfaktors sorgt für eine gleichmäßige Wirkungsentfaltung im umliegenden Gewebe und reduziert somit lokale Nebeneffekte, wie allergische Reaktionen oder heterotope Ossifikationen, die durch einmalig erhöhte Freigaben ausgelöst werden können. Auch die direkte lokale Applikation von WFs ist mit erheblichen lokalen Nebenwirkungen verbunden, die nicht zu einer komplikationsfreien Heilung beitragen. Critchlow et al. (1995) beschreiben, dass durch die direkte lokale Injektion von TGF- β in das Frakturgebiet großflächige Bindegewebsbildungen und Ödematisierung der Einstichstelle hervorgerufen werden.

Die Verwendung von osmotischen Minipumpen, die über einen Katheter in der Femoralarterie die WFs direkt am gewünschten Einsatzort applizieren, stellt eine Eintrittspforte für Krankheitserreger dar und bedeutet für den Patienten eine zusätzliche Belastung, die nicht notwendig ist (Nilsson et al., 1987). Der Ausschluss chronischer Entzündungsreaktionen durch die Trägermaterialien muss ebenso gewährleistet sein (Pinholt et al., 1992).

Auch die durch manche Kollagene und ihre Derivate hervorgerufenen Immunantworten durch körperfremde Eiweiße und damit verbundene Abstoßungsreaktionen, sowie die Gefahr der Übertragung pathogener Keime, sind für den klinischen Einsatz unbedingt auszuschließen (Takaoka et al., 1991).

Die Bioresorbierbarkeit der Trägermaterialien muss für eine komplikationslose Heilung sorgen (Urist et al., 1987). Trägermaterialien dürfen die Osteoinduktion und Osteokonduktion, die für die Frakturheilung von großer Wichtigkeit sind, nicht hemmen (Solheim et al., 1992). Zu einem optimalen Wirkstoffträger gehört auch eine hohe mechanische Stabilität, um den Einbringungsvorgängen der Implantate in den Knochen zu widerstehen (Schmidmaier et al., 2001b). Eine insgesamt leichte Handhabung des Wirkstoffträgers bezüglich der Herstellung und späteren Anwendung spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle.

In Zukunft wird die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden maßgeblich durch den Kosten-Nutzen-Faktor bestimmt werden. Das Ziel wird es daher auch hierbei sein, für den klinischen Einsatz einen kostengünstigen Träger zu entwickeln, der sowohl in der Herstellung als auch in der Anwendung zukünftig allen Kriterien gerecht wird.

1.3.3 Biodegradierbare Materialien in der Knochenheilung

Osteokonduktive Biomaterialien, wie Kollagenschwämme, demineralisierte Knochenmatrix, Keramiken und synthetische Polymere, zählen zu den ersten Materialien, die auf der Suche nach den optimalen Wirkstoffträgern auf ihre Implantathaftung und Freisetzungskinetik erprobt worden sind (Winn et al., 1999; Hollinger und Leong, 1996; Agrawal et al., 1997).

Als Leitmaterial für die gerichtete Knochenneubildung haben sich resorbierbare Materialien sowohl experimentell wie auch im klinischen Einsatz im Bereich der Zahnheilkunde und Implantologie als gleichwertig zu nicht resorbierbaren Materialien erwiesen (Van der Elst et al., 1995; Pieper et al., 2002).

Diese genannten Vorzüge haben dazu geführt, dass bereits seit Mitte der achtziger Jahre synthetische Polymere für die Stabilisierung von Frakturen in Form von Schrauben und Platten in der Unfallchirurgie und Orthopädie eingesetzt werden (Rokkanen et al., 1985; Leenslag et al., 1987; Kulkarni et al., 1966).

1.3.3.1 Biodegradierbare Polymere als Trägerstoffe für Wachstumsfaktoren

Zu den wichtigsten Polymeren in der Implantatchirurgie zählen die Poly(α -Hydroxysäuren). Das sind hauptsächlich die Polylactide (PLA), die Polyglycolide (PGA), die Copolymere aus L-Laktiden (PLLA), L/DL-Laktiden (PLL/DLLA), DL-Laktide (PDLLA), die Copolymere aus Glycoliden (PLGA), das Polydioxanon (PDS), die Polyhydroxybuttersäure (PHB), die Polyorthoester (POE), die Trimethylencarbonate und die ϵ -Caprolaktone (Claes und Ignatius, 2002; Gogolewski, 2000).

Degradierbare Polymere stellen eine wertvolle Quelle der Biomaterialien dar. Dieses Material erfüllt die hohen Anforderungen in Bezug auf temporäre Stabilität, Gewebekompatibilität und Resorption. Es ermöglicht eine problemlose Osteointegration und Osteokonduktion bei der Knochendefektheilung und besitzen die Fähigkeit im Gegensatz zu manch anderen Biomaterialien, aufbrachte WFs kontinuierlich freisetzen zu können, je nach Trägereigenschaft (Winn et al., 1999).

Schmidmaier et al. (2001b) hatten sich mit der Entwicklung eines biodegradierbaren Poly (D,L-Laktids) beschäftigt, das eine kontinuierliche Freigabe von Wachstumsfaktoren garantiert. Es zeichnet sich durch besonders hohe mechanische Stabilität aus, so dass es sehr gut als Trägerstoff für WFs dienen kann.

1.3.3.2 PDLLA

Bei dem Polymer Poly (D,L-Laktid) handelt es sich um aliphatische Polyester der Poly (α -Hydroxysäure), die im Rahmen der Degradation zu Monomersäuren, CO₂ und Wasser gespalten werden. Diese Degradationsendprodukte werden über die Atemwege und die Niere schließlich ausgeschieden (Gogolewski, 2000). Sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in der klinischen Anwendungen konnte gezeigt werden, dass biodegradierbare Materialien auf der Basis von Poly (D,L-Laktid) eine günstige Biokompatibilität besitzen (Majola et al., 1991; Rokkanen et al., 2000).

Allgemein lässt sich sagen, dass die Biokompatibilität stark vom Degradationsverhalten der synthetischen Polymere abhängig ist. Die Degradationseigenschaften und damit auch die Abbaugeschwindigkeit werden bestimmt durch das Molekulargewicht der Polymere, die Kristallinität des Materials, seine Implantatgeometrie (Größe und Form), seine Implantatbeschaffenheit (Porosität), das Gewebemilieu und schließlich auch durch die Polymerherstellung und -sterilisation (Yamazaki et al., 1996; Böstman und Pihlajamäki, 2000).

Die Gewebsreaktionen ausgelöst durch resorbierbare Polymerimplantate sind abhängig von der chemischen Zusammensetzung des Implantatmaterials, der Degradationsgeschwindigkeit und der Toxizität des verwendeten Polymers. Ebenso spielen physikalischen Faktoren, wie seine Form, seine physikalischen Struktur, sein Gewicht, der Stress auf der Implantationsseite und auch die Mikromotion auf der Implantatoberfläche eine entscheidende Rolle für die Gewebsreaktion (Gogolewski, 2000).

Schnell degradierbare Polymere führen zu einer stärkeren Gewebsreaktion im Weichteilgewebe, indem es zur Bildung einer Fremdkörperkapsel kommt, die gekennzeichnet ist durch mononukleäre Zellen, polynukleäre Leukozyten und Lymphozyten, zufällige Riesenzellen und Fibrozyten. Auf einer späteren Stufe der Degradation finden sich Histozyten, große, multinukleäre Riesenzellen, Makrophagen und Fettzellen vor.

Während die Weichteilreaktionen bei langsam degradierbaren Polymeren, wie den Polylaktiden mild sind. Dessen Fremdkörperkapseln weisen nach subkutaner Implantation im Langzeiteffekt lediglich Fibroblasten, Histozyten, Fremdkörperriesenzellen und Makrophagen ohne lymphozytäre oder plasmazytäre Infiltration auf (Matlaga und Salthouse, 1983; Cutright und Hunsuck, 1971).

Weiler et al. (1996) konnten in PGA-Implantaten auftretende Osteolysen und protahierende Entzündungsreaktionen beobachten, die bei PDLA-Implantaten nicht auftraten. Aufgrund gehäufte negativer Berichte im Zusammenhang mit PGA Implantaten, dessen Fremdkörperreaktion von klinisch stummen osteolytischen Veränderungen bis hin zu intensiven entzündlichen Weichteilveränderungen reichten (Böstman, 1992; Böstman, 1991; Hoffman et al., 1989), wurde besonders außerhalb Deutschlands vermehrt auf den Einsatz von Polylaktid (PLA) übergegangen (Hoffman et al., 1997).

Insbesondere im Bereich des Knochens zeigt PDLA eine ausgezeichnete Osteokonduktivität (Hasegawa et al., 2002; Schmidmaier et al., 2000; Wildemann et al., 2004; Wildemann et al., 2005). Im Fall der Defektfüllung gewährleistet die Abbaukinetik von Poly (D,L-Laktid) eine ausreichende Stabilität für die Zeit der Neubildung körpereigenen Gewebes. Gegenüber den klinisch ebenfalls gebräuchlichen Glycolsäure-Polymeren (PGA) zeichnet es sich durch eine langsamere Abbaukinetik und günstigere und deutlich höhere Biokompatibilität aus. Diese Eigenschaft ist gekoppelt an eine hohe mechanische Festigkeit, was PDLA-Implantate für die Wiederherstellung des Knochens in mechanisch stark belasteten Regionen interessant macht.

In der von Schmidmaier et al. (1997) entwickelten Beschichtung für Osteosynthesematerialien wurden die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 in Kombination und einzeln eingearbeitet, um die Wirkung von biologisch aktiven Implantaten auf die Frakturheilung bei der Ratte zu testen. Diese Implantate wurden den Tieren zur Stabilisierung von Tibiaschaftfrakturen eingebracht und deren Einfluss auf die Heilung anhand biomechanischer und histologischer Untersuchungen nach jeweils 4 und 6 Wochen und immunhistologischer Analysen nach 5, 10 und 15 Tagen ausgewertet.

In der biomechanischen Testung und anhand der histologischen Ergebnisse zeigte sich ein positiver Effekt auf die Frakturheilung durch die bioaktiven Implantate (Schmidmaier et al., 2001a). Dieser positive Effekt konnte auch in weiteren Studien immer wieder bestätigt werden (Schmidmaier et al., 2003; Wildemann et al., 2004b; Schmidmaier et al., 2006)

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurde mit BMP-2 überzogene Titanimplantate eingesetzt, die nicht nur eine Beschleunigung der Frakturheilung hervorriefen, sondern sich auch durch erhöhte osteoinduktive Resultate auszeichneten (Schmidmaier et al., 2002a).

In den letzten Jahren haben sich im klinischen Einsatz langsam degradierbare Polymere, wie PDLLA, durchgesetzt, da sie eine höhere mechanische Steifigkeit aufweisen, so dass sie für mechanisch stark belastete Frakturheilungen verwendet werden können (Al-Sukhun et al., 2006; Landes et al., 2006). Ebenso hat der Einsatz von PDLLA als Wirkstoffträger Einzug in die unfallchirurgische Praxis gehalten und sich hierbei als vorteilhaft erwiesen (Göpferich, 1998; Stahelin et al., 1997).

1.4 Problemstellung

In dieser Studie soll die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2 von Poly (D,L-Laktid)-beschichteten Titanimplantaten durch das Einbringen in eine Muskeltasche auf mögliche heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen untersucht werden. Anhand der Parameter Blutbild, Gewicht und Temperatur, die keine Änderungen aufwiesen, konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die lokale Applikation der WFs (IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2) von Poly (D,L-Laktid)-beschichteten Implantaten keine unerwünschten systemischen Nebenwirkungen unter lokaler WFs-Gabe hervorrufen (Schmidmaier et al., 2000; Schmidmaier et al., 2001a). Basierend auf diesen Ergebnissen war in dieser Studie davon auszugehen, dass aufgrund der lokalen Applikation der WFs und der somit auf den Gesamtorganismus bezogenen sehr geringen Konzentration systemisch auch hier keine unerwünschten Effekte auftreten würden.

Die Anwendung neuer Methoden in der Frakturbehandlung setzt voraus, dass sowohl systemische als auch lokale Nebeneffekte bei der Durchführung von Therapiemaßnahmen mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit auszuschließen sind. Aus diesem Grund stellte die Untersuchung der lokalen Nebenwirkungen im Weichteilgewebe einen wichtigen Sicherheitsaspekt für den klinischen Einsatz dieser Technik dar. In den bisher veröffentlichten Studien wurden bei der Applikation der WFs IGF-I und TGF- β 1 keine Untersuchungen zu gegebenenfalls heterotopen Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen durchgeführt. Über die Auswirkungen der lokalen Applikation von WFs im Weichteilgewebe in dieser Form ist deshalb noch nichts bekannt.

Aus den Studien von Wilton (1992) geht allerdings hervor, dass die systemische Applikation von IGF-I bei Kindern mit Wachstumshormon-Defizit zahlreiche metabolische Reaktionen (Blutparameteranstieg von IGF-I, Kaliumabfall, Hypoglykämie und die positive Beeinflussung des Linearwachstums) hervorruft. Auch die lokale und systemische TGF- β 1 Applikation am Rattenmodell weist Veränderungen in zahlreichen Organen (Leber, Knochen, Niere, Herz, Thymus, Pankreas, Caecum, Skelettmuskel) auf (Terrell et al., 1993). Darüber hinaus ist bekannt, dass BMP bei intra- und intermuskulärer Gabe zu Verknöcherungen im Muskelgewebe führt (Urist, 1965).

Das Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen im Muskelgewebe durch die lokale Applikation der WFs (IGF-I, TGF- β 1, BMP-2) von PDLLA-beschichteten Titanimplantaten am Schafsmodell anhand der Radiologie, Fluorochrommarkierung und Histologie zu analysieren. Im besonderen Maße sollen dabei das Einwachsverhalten der Wachstumsfaktorenbeschichtungen zum Zeitpunkt von 12 Wochen untersucht werden mit Hilfe der radiologischen und histologischen Auswertungsmethoden, die in Vorarbeiten differente Eigenschaften gezeigt haben.

Diese Arbeit stellt eine Kontrollstudie für die lokale Applikationsweise der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten dar und untersucht mögliche negative Effekte der WFs im Weichteilgewebe unter Berücksichtigung der lokalen Applikationsweise. Zusätzlich soll der osteoinduktive Charakter durch die lokale Applikation des Wachstumsfaktors BMP-2 von PDLLA-beschichteten Implantaten bezogen auf die hier verwendete Dosis getestet und ausgewertet werden.

2. Material und Methode

2.1 Implantate

Für diese Versuche wurden speziell angefertigte Titan-Plättchen (Synthes, USA; s. Abb. 1 und 2) mit einem Durchmesser von 0,5 cm und einer Höhe von 0,1 cm verwendet. In der Unfallchirurgie und Orthopädie wird dieses Implantatmaterial routinemäßig seit Jahren eingesetzt.



Abb.1: Unbeschichtete Seite

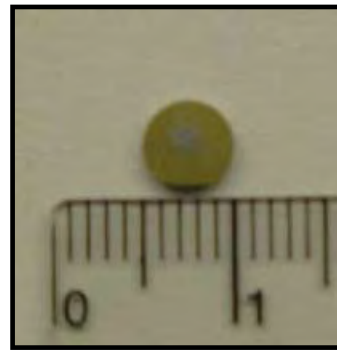


Abb. 2: Beschichtete Seite

Auf der unbeschichteten Seite wurden die Plättchen mit einer Einkerbung versehen. Diese Kennzeichnung stellte sicher, dass immer die unbeschichtete Seite lateralweisend in den Muskel eingebracht werden konnte. Darüber hinaus garantierte diese einfache Methode, dass die beschichtete Seite immer medialweisend in den Muskel implantiert wurde, damit diese in jedem Fall mit einer größeren Kontaktfläche zum Muskelgewebe einwachsen konnte, was einer standardisierten Untersuchung zu gute kam. Diese Orientierungshilfe war auch für die histologische Aufarbeitung der Präparate von großer Wichtigkeit.

2.1.1 Beschichtung und Wachstumsfaktoren

2.1.1.1 Beschichtungssubstanzen

Poly(D,L-Laktid): MG 30.000 Da (Boehringer Ingelheim, Deutschl.)

Rh IGF-I : 5 % w/w PDLLA = 50 μ g /Plättchen

Rh TGF- β 1: 1 % w/w PDLLA = 10 μ g / Plättchen
(R & D- Systems, Deutschland)

Rh BMP-2: 5 % w/w PDLLA = 50 μ g/Plättchen
(Osteogenetics GmbH Würzburg, Deutschland)

CHCl₃: 1,5 ml Trichlormethan = Chloroform (Lösungsmittel)
(Merk, Darmstadt, Deutschland)

2.1.1.2 Material und Geräte

Material

Titan-Implantate	(Synthes, USA)
Eppendorf-Röhrchen	(Eppendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen, gelb	(Eppendorf, Deutschland)
Spritze, 5 ml	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Injektionskanüle 20 G gelb, lang	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Sterilfilter-Minisart (lösungs- mittelstabil, Porengröße: 0,2 μm)	(Sartorius, Deutschland)
Einweghandschuhe, steril	(Semperit Technische Prod.GmbH&Co KG, Österr.)
Einwegverpackung, steril	
Multituch blau, steril	

Geräte

Sicherheitswerkbank Kl. II Typ 4	(Hereus, Deutschland)
Pipettiergerät	(Eppendorf, Deutschland)

2.1.1.3 Durchführung

Es handelte sich hier um eine Kaltüberzugstechnik, die unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Bei diesem Verfahren werden die o. g. Beschichtungsmaterialien durch Chloroform in Lösung gebracht, wobei die Beschichtung anschließend durch das Verdampfen des Chloroforms stabil an der Titanoberfläche haftet.

Zu diesem Zweck wurde PDLLA (100 mg) in Chloroformlösung (1,5 ml) bei Raumtemperatur aufgelöst und anschließend diese Lösung steril filtriert. Sterile lyophilisierte Wachstumsfaktoren wurden der PDLLA/Chloroform-Lösung sodann beigemischt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Die Beschichtung der Implantate erfolgte durch zweimaliges Auftragen mit einer Pipette. Anschließend wurde die Beschichtung etwa 30 Minuten lang getrocknet und im Anschluss steril verpackt. Die Gesamtmenge, die auf ein Titanimplantat pipettiert wurde, betrug 15 μl .

2.2 Tiermodell

2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden 12 weibliche Merino-Mix Schafe (2 Jahre alt, 70 kg LM (Lebendmasse); Züchter: Hans Nesges, Brandenburger Lammhof, Deutschland) verwendet. Aus Quarantäneüberlegungen wurden die Tiere drei Wochen vor Versuchsbeginn in geschlossenen Stallungen der Außenanlagen der Tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikum untergebracht und schließlich für den Eingriff in Stallungen der Tierexperimentellen Einrichtung am Campus vor Ort überführt.

Ihrer Art entsprechend wurden sie in kleinen Gruppen gehalten, auf Stroh aufgestellt und sowohl mit Rau- als auch Grundfutter (Meyer et al., 1993) ad libitum ernährt. Der Flüssigkeitsbedarf war durch elektrische Tränken bzw. durch Trinkwasserbehälter sichergestellt. Sobald die Wundheilung abgeschlossen war, wurden die Tiere in Außenanlagen der Tierexperimentellen Einrichtung, Campus Virchow Klinikum, mit überwiegender Weidehaltung verlegt.

2.2.2 Versuchstierbetreuung

Noch vor der Quarantänemaßnahme wurde bei jedem Tier der Gesundheitszustand überprüft und insbesondere etwaige Infektionskrankheit ausgeschlossen. Die Tiere wurden gewogen und die innere Körpertemperatur gemessen. Um ein gegebenenfalls gravidies Tier zu entdecken, wurden die Schafe zweimal im Abstand von einer Woche sonographiert. Zusätzlich wurde ein luteolytisches Medikament (Pronilen: 0,5 ml i. m.) appliziert, so dass eine übersehene Frucht im ersten Drittel der Trächtigkeit ausgetrieben werden konnte.

Um den Gesundheitsstatus der Tiere zu stabilisieren, wurde jedem Schaf eine Eingangsmedikation mit einem Paraimmuninducer (Baypamun; 2 ml s. c. - Immunabwehrerhöhung) und einem Breitbandanthelminthikum (Ivomec, 2 ml s. c.) appliziert. Während der Dauer der Versuche wurde der Gesundheitsstatus der Tiere regelmäßig untersucht. Die Wundheilung, die Erholungsdauer und das Allgemeinbefinden wurden in Augenschein genommen.

2.2.3 Implantationsort der Titanplättchen - eine anatomisch-morphologische Darstellung des M. sternocleidomastoideus vom Schaf

Den Tieren wurden 4 Implantate mittels stumpfer Incision in den M. sternomastoideus (Anteil des M. sternocleidomastoideus) eingesetzt. Der M. sternocleidomastoideus besteht bei unseren Haussäugetierarten aus 2 selbstständigen Muskeln und zwar dem M. sternocephalicus und dem M. brachiocephalicus. Die kopfseitigen Ansatzstellen variieren tierartlich, wobei die Einzelanteile je nach den Insertionsstellen besonders benannt sind.

Somit besteht beim Schaf der M. sternocephalicus aus dem M. sternomastoideus (a) und der M. brachiocephalicus (Abb. 3: b, b'', c) wird aus dem M. cleidomastoideus (b), dem M. cleidooccipitale (b'') und dem M. cleidobrachialis (c) (Nickel et al., 1992) gebildet.

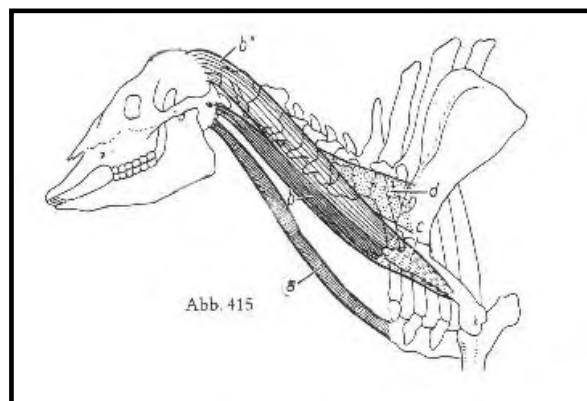


Abb. 3: M. sternocleidomastoideus = a: M. sternomastoideus;
b: M. cleidomastoideus; b'': M. cleidooccipitales ;
c: M. cleidobrachialis (Ellenberger et al., 1943, modifiziert)

Nach einer Standzeit von 12 Wochen wurden die Tiere getötet und der Muskel zur radiologischen und histologischen Aufarbeitung der Präparate entnommen. Die Eingriffe am Tier wurden im Zusammenhang mit dem Versuch G0110/00 (Bio-Cage II) und G0282/00 (Bio-Cage III) von Dr. med. Kandziora, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, durchgeführt und sind unter oben genannter Versuchsnummer vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit Berlin genehmigt worden.

2.3 Gruppenplan

Folgende Gruppen wurden untersucht (s. Tab. 3):

Tabelle 3: Gruppeneinteilung

Gruppe I	Titan-Plättchen (unbeschichtet = leer)	n = 12
Gruppe II	PDLLA-beschichtete Plättchen	n = 12
Gruppe III	PDLLA + IGF-I (5% w/w, 50 µg) und TGF-β1 (1% w/w, 10 µg) beschichtete Plättchen	n = 12
Gruppe IV	PDLLA + BMP-2 (5% w/w, 50 µg)	n = 12

Es wurden jeweils 3 Tiere pro Gruppe mit 4 Implantaten bestückt. So ergab sich eine Gesamtanzahl von 12 Implantaten pro Gruppe. Insgesamt wurden 48 Implantate verwendet. Die Standzeit betrug 12 Wochen.

2.4 Operationsdurchführung

2.4.1 Operationsvorbereitung

2.4.1.1 Material und Medikation (Stall)

Material

1 Braunüle mit Mandrin, Größe 18/ grün	(BD, Spanien)
1 Dreiwegehahn	(Pvb Medizintech., Kirchseeon, D.)
2 Spritzen, 20 ml	(Braun Melsungen AG, Deutschl.)
Klebeband, weiß, Durapore TM	(3M, Deutschland)
1 Infusionsschlauch	
2 Blutröhrchen	
Krankenunterlage, saugfähig	
Tuch, grün, groß	
1 Stauschlauch	
1 fahrbarer Tisch	

Medikation

Braunol	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Thiopental, Trapanal 0,5 g Trockensubstanz	(Byk Gulden, Konstanz, Niederlande)
20 ml Aqua ad injectable	(Braun Melsungen AG, Deutschland)

2.4.1.2 Material, Medikation, Geräte und Inhalationsnarkose (Vorbereitungsraum)

Material

8,5 – 9er Tubus
Führungsschiene für Tubus
Laryngoskop
Mullbinden
Tupfer
Klebeband, weiß
Watteunterlagen

Schermaschine favoritt II (Aesculap AG& Co KG, Tuttlingen, Deutschl.)
 Ambu-Beutel zur manuellen Beatmung
 Spritze, 10ml (Braun Melsungen AG, Deutschland)
 Magensondenschlauch, 2m
 Koagulatorkontaktmatte incl. feuchtem Zellstoff

Medikation

1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran), Forene 250 ml (Abbot GmbH , Wiesbaden, Deutschland)
 Augmentan 2,2 g, i. v. - ganze Flasche - (Glaxo Smith Kline GmbH & Co KG)
 1l Thomaejonin (Na 140 K)
 Dexpanthenol, Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Bibrach/Riss, Deutschland)
 Metamizol-Natrium , Novaminsulfon rationpharm (Ratiopharm, Deutschland)
 (Dosis: 20-50 mg/kg LM)
 Fentanyl, Fentanyl Janssen (Janssen, Deutschland)

Geräte

Narkosegerät-Vorraum - Sulla 800 Typ 84 04 800 (Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland)

Inhalationsnarkose - Einleitungsparameter

Isofluran: 1,8 - 2,0 Vol %
 Stickoxydyl: 4,0 - 4,5 Vol %
 Sauerstoff: 2,0 - 2,5 Vol %

2.4.1.3 Geräte, Einstellungen, Material (Operationsraum)

Geräte

Narkosegerät - Operationsraum Modell Servo 900 D (Siemens AG, München, Deutschland)
 Überwachungssystem Modell 66 S M11668 (Hewlett Packard, Deutschland)
 Sauger

Narkoseeinstellung - Erhaltung

Isofluran: 2,0 - 2,5 Vol %
 Stickoxydyl: 2,0 Vol %
 Sauerstoff: 1,0 Vol %

Für die Dauer der Operation wurde eine „low-Flow“-Narkose durchgeführt, so dass das Stickoxydyl-Sauerstoff-Gemisch auf 1 Vol % zu 0,8 Vol % eingestellt wurde.

Beatmungsparameter - Schaf

Atemminutenvolumen: 10 - 20 ml/kg LM
 Atemzugvolumen: 8 - 10 l (variiert je nach Lebendmasse des Tieres)
 Atemfrequenz pro Minute: 15

Operationsmaterial

4 Abdecktücher (2 x groß / 2 x klein)
Operationshandschuhe, Größe nach Bedarf

Operationsbesteck

2 Skalpelle
3 Klängen (Nr. 11: spitz, Nr. 15: halbrund)
2 Scheren, davon eine nach Metzenbaum (stumpf, spitz)
1 Fadenschere
2 chirurgische Pinzetten
1 anatomische Pinzette
4 Gefäßklemmen
1 Nadelhalter
2 Wundspreizer (4 Haken)
1 Koagulator
2 Tuchklemmen
Fadenmaterial mit Nadel
- 1 Vicryl 2/0 (Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland)
- 1 Vicryl 3/0
- 1 Suturaamid 3/0
Tupfer nach Bedarf

Die Instrumente stammen von der Firma Aesculap, Tuttlingen, Deutschland.

2.4.1.4 Durchführung

Im Stall wurde dem Tier ein Venenzugang gelegt. Dafür wurde die V. cephalica accessorii gestaut, die Einstichstelle mit Alkohol desinfiziert und eine Braunüle gesetzt.

Nach der Blutentnahme wurde das Tier mit Trapanal 0,5 g (Dosis: 15 mg/kg LM i. v.) sediert und mittels eines fahrbaren Tisches in den Operationsvorbereitungsraum verbracht.

Dort wurde das Tier intubiert und die korrekte Lage des Endotrachealtubus wurde durch Druckpalpation auf den Thorax sowie gleichzeitige Luftstromkontrolle am Tubusausgang kontrolliert.

Folgende Basismonitoringparameter wurden verwendet:

- EKG, Gliedmaßen-Ableitung (VG li: gelb; VG re: rot und HG re: grün)
- Pulsoximetriemeßgerät, Ohrclip (Fixierung mit Klebestreifen am Kopf)
- Kapnometrie (direkt zwischen Y-Stück und Tubus)

Zur Tympanieprophylaxe wurde eine Pansensonde in den Vormagen geschoben. Die Gliedmaßen wurden mit Mullbinden abgepolstert, um die Gelenke während der langen Operation zu schonen und die Elektroden der EKG-Ableitung besser zu fixieren. Die Augen wurden mit Augensalbe befeuchtet und mit Tupfern verdeckt, um sie vor Salivationsschleim zu schützen und die Austrocknung der Kornea zu verhindern.

Die linke Halsseite wurde vollständig vom Haarkleid befreit. Danach wurde das Operationsfeld gereinigt und mit Braunol getränkten Tupfern desinfiziert.

Anschließend wurde das Tier für die Operation mittels Styropor-Aufbockung korrekt gelagert, eine Koagulatorkontaktmatte untergeschoben und unter manueller Beatmung in den Operationsraum gefahren.

Im Operationsraum wurde der Tubus an das Narkosegerät und das Tier an die Monitoringgeräte zur Messung der zuvor genannten Parameter angeschlossen. Anschließend wurde die Operationsfläche am Hals mit Braunolflüssigkeit desinfiziert und mit Operationstüchern abgedeckt.

2.4.2 Operationsbeschreibung

Der Zugang erfolgte ventrolateral im mittleren bis unteren Halsdrittel oberhalb der V. jugularis. Zunächst wurde mit einem Skalpell die Haut durchtrennt (s. Abb. 4).

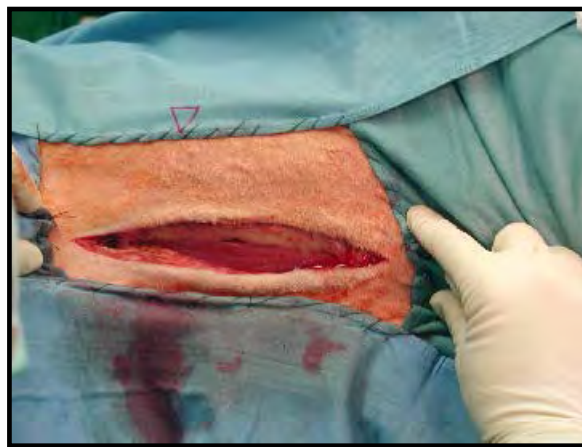


Abb. 4: Incision an der ventro-lateralen Halsseite

Anschließend wurden mit einer Schere Unterhaut und Fettgewebe stumpf präpariert, um den M. sternomastoideus darzustellen.



Abb. 5: M. sternomastoideus (freipräpariert zur Darstellung)

Damit die Plättchen optimal implantiert werden konnten, wurde der M. sternomastoideus auf der gesamten Länge der Implantationsfläche von seiner Umgebung freipräpariert (Abb. 5).

Dies erfolgte unter entsprechender Weichteilschonung (Cave: Vena jugularis; N. vagus-Ästerverletzung). Die durch die Präparation geschädigten kleinen Gefäße wurden elektrokoaguliert.

Die Implantation erfolgte von dorsal mittels Stichincision mit der Schere. Die so gewonnenen Muskeltaschen entsprachen den Größen der Implantate.



Abb. 6: Einsetzen der Titanimplantate

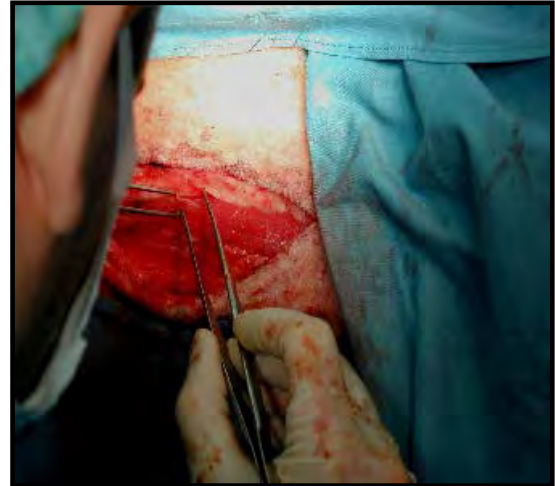


Abb. 7: Einsetzen der Titanimplantate

Die Implantate wurden in die Mitte des Muskelbauches mit der Beschichtungsseite medial implantiert (s. Abb. 6/7). Dabei wurde ein Abstand von mindestens einem Zentimeter gewahrt (s. Abb. 8), so dass 4 Implantate pro Muskel eingepflanzt werden konnten. Die Muskelaschen wurden nicht durch Nähte geschlossen.



Abb. 8: Implantation im Abstand von je 1 cm / Plättchen

Der M. sternomastoideus (Vicryl 2/0) wurde mit einer fortlaufenden Naht wieder in seine Umgebung integriert. Unterhaut-, Fettgewebe (Vicryl 3/0) und Haut (Suturamid 3/0) wurden getrennt mit Einzelnähten verschlossen.

Schon während des Wundverschlusses wurde Novaminsulfon ratiopharm zur postoperativen Schmerzprophylaxe appliziert.

2.5 Postoperative Handhabung

2.5.1 Material

Tupfer
Klebeband

2.5.2 Durchführung

Die frisch operierte Halspartie wurde mit einem Wundverband geschützt. Sobald das Tier wieder selbständig atmete und schluckte, wurde es extubiert. Anschließend wurde das Tier in seine Box im Stall verbracht und so lange tierärztlich beaufsichtigt, bis es sich selbstständig aufrichtete.

2.6 Fluorochrommarkierung

2.6.1 Herstellung der Fluorochromsequenzmarker

2.6.1.1 Material und Geräte

Material

Marker: Xylenol-Orange (Dosis: 90 mg/kg LM) (Acros Organics, New Jersey, USA)
Spritzen 50 ml (Braun Melsungen AG, Deutschland)
Kanülen (Braun Melsungen AG, Deutschland)
Sterilfilter (Porengröße: 0,45 μ m)
Aqua dest. (Braun Melsungen AG, Deutschland)

Geräte

Waage (Musahl Waagenservice, Eberswalde, Deutschland)
pH-Meßgerät (WTW, Wehlheim, Deutschland)

2.6.1.2 Durchführung

Xylenol-Orange (9 g) wurden in Aqua dest. (80 ml) gelöst. Dann wurde der pH-Wert mit einem kalibrierten pH-Messgerät gemessen. Um einen pH-Wert von 7,2 - 7,4 zu erhalten, erfolgte eine Zugabe von 1 M bzw. 2 M NaOH-Lösung. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und im Anschluss steril filtriert, um diese intravenös applizieren zu können. Bis zur Verwendung musste die Lösung unter Lichtverschluss im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.6.1.3 Ziel

Die Fluoreszenzmarkierung dient in der histologischen Untersuchung der Darstellung von Mineralisationen im Gewebe anhand der Fluoreszenzmikroskopie.

Sequenzmarker lagern sich bei Applikation sofort im neumineralisierten Gewebe ab und stellen somit den Zeitpunkt des bis dato mineralisierten Gewebes dar. Aus diesem Grund wurde der Fluoreszenzfarbstoff zwei Tage vor Tötung appliziert, da der Mineralisationszeitpunkt nach 12 Wochen untersucht werden sollte.

2.6.2 Applikation der Fluoreszenzmarker

2.6.2.1 Material

Spritzen 20 ml	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Braunülen, grüne	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Dreivegehähne	(Pvb Medizintechnik GmbH & Co KG, Kirchseeon, Deutschland)
Zuleitungen	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Strauskanülen, rot	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Klebeband, braun	(Leukoplast, Deutschland)
Xylenol-Orange	(s. o.)
Sterile Tupfer	
Desinfektionsspray, Softasept N	(Braun Melsungen AG, Deutschland)
Staugummi	
Krankenunterlage	
Handschuhe	(Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG)
NaCl ₂ Flasche 0,5 l	(Braun Melsungen AG, Deutschland)

2.6.2.2 Durchführung

Der Fluoreszenzmarker wurde den Versuchstieren langsam intravenös appliziert und mit 0,9%iger NaCl₂-Lösung nachgespült, da die Xylenol-Orange-Lösung stark gefäßreizend ist. Die Verabreichung des Monosequenzmarkers führte zur Lilafärbung von Haut, Schleimhäuten und Gefäßen. Die Halbwertszeit betrug nur wenige Stunden. Die Ausscheidung erfolgte über alle Exkrete (Lilafärbung des Harns = gut sichtbar!).

2.7 Radiologie - In Vivo Aufnahmen und Postmortale Aufnahmen

2.7.1 Material und Geräte

Material

Filme (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)
Digital-Kassette (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)
Röntgenzahlen
Styroporblock
Klebeband, weiß

Gerät

Röntgengerät - Mobilett Plus,
Model-Nr. 6215300 X 03-7E (Siemens AG, München, Deutschland)

Tabelle 4: relevante Eckdaten für die radiologischen Untersuchungen

Aufnahmeart	In Vivo-Aufnahmen	Postmortale Aufnahmen
Einstellungen	60 kV, 28 mAs	52 kV, 1,80 mAs
Fokus-Objekt-Abstand	1 m	60 cm
Region	Hals	M. sternomastoideus
Ebene	1 dorso-ventraler 1 latero-lateraler Strahlengang	dorso-ventraler Strahlengang
Zeitpunkt	0, 1, 2, 4, 8 Wochen	12 Wochen

2.7.2 Durchführung

Die postoperativen Röntgenaufnahmen der Halsregion wurden noch während der Narkoseausleitung angefertigt, so dass die Tiere entsprechend leicht für das Röntgengrundbildpaar (Brust-Bauchlage / rechte Seitenlage) positioniert werden konnten.

Für die Verlaufsaufnahmen der o. g. Zeitpunkte erhielten die Tiere mittels intravenöser Thiopental-Applikation (15 mg/kg LM) eine Kurzzeitnarkose, um sie entsprechend für die Aufnahmen in der Halsregion positionieren zu können.

Die postmortalen Röntgenaufnahmen der zuvor entnommenen Muskelproben (s. 2.8) wurden für die radiologischen Untersuchungen mit der medialen Seite an einem Styroporblock fixiert.

2.7.3 Ziel

Mit den postoperativen Röntgenbildern und den Verlaufsaufnahmen sollte die korrekte Lage der Implantate belegt und später bei den Kontrollen der unveränderte Sitz nachgewiesen werden.

Anhand der post mortalen Röntgenaufnahmen ließen sich die Implantate ohne Weichteilüberlagerungen darstellen, so dass etwaige Ossifikationsherde in der beschichteten Implantatregion besser ausgewertet werden konnten und Befunde insgesamt leichter zu erheben waren.

2.8 Sektion - Entnahme histologischen Materials

2.8.1 Material

Skalpell

Kanülen, gelb

(Braun Melsungen AG, Deutschland)

Mullbinde

Gläser mit Metalldeckel

10 % Formaldehyd

(Merk KgaA, Darmstadt, Deutschland)

2.8.2 Durchführung

12 Wochen nach dem Eingriff wurden die Tiere getötet und der M. sternomastoideus mit den Implantaten entnommen (s. Abb. 9). Der Muskel wurde dabei unter Schonung der zu entnehmenden Anteile von überschüssigen Faszien, Bindegewebe und Fettgewebe freipräpariert und anschließend auf den benötigten Muskelanteil reduziert (s. Abb. 10), um diese dann für die radiologischen (s. 2.7) und histologischen (s. 2.9) Auswertungsmethoden weiterzuverwenden.



Abb. 9: Entnommener M. sternomastoideus mit Implantaten



Abb. 10: Benötigter M. sternomastoideus-Anteil mit Implantaten

2.9 Histologie

2.9.1 Vorbereitung für die histologische Weiterverarbeitung

Der aus den Versuchstieren entnommene Muskel mit den Implantaten wurde in 1,5 x 2 cm große Stücke zerlegt und mit Zetteln versehen, um sie später genau den jeweiligen Gruppen und Beschichtungsseiten für die weitere Verarbeitung zuordnen zu können. Die Muskelproben wurden in Mullbinden gewickelt, um diese dann in die Fixierlösung einzulegen (s. 2.9.2). Im Protokoll wurden die Nummern der Ohrmarken, Gruppen und Implantaten katalogisiert.

2.9.2 Fixation der Proben

2.9.2.1 Chemikalien

Formol 36 %	324 ml	(J. T. Baker, Deventer, Niederlande)
Äthylalkohol (od. Methylalkohol 100 %)	540 ml	(J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
Barbital-Natrium-Puffer ph 7,4/0,1 molar	130 ml	(Dr. K.Höllborn&Söhne, Deutschland)
Glukose	6 g	(Merk, Darmstadt, Deutschland)

2.9.2.2 Zeitdauer der Fixation

Die Präparate wurden 4 Tage lang in 10 % neutraler, isotonischer Formaldehydalkohollösung fixiert, um sie für die histologische Weiterverarbeitung haltbar zu machen (Burkhardt, 1966).

2.9.3 Entwässerung der Proben

2.9.3.1 Material und Geräte

Material

99,8% vergälltes Ethanol	(Merk, Darmstadt, Deutschland)
70, 80, 96, 100 % Alkohol	(Herbeta Arzneimittel, Berlin, D.)
Xylol	(J. T. Baker, Deventer, Niederlande)
Aqua dest.	(Delta Pharm GmbH, Pfulling., D.)
Zylinder (1000 ml)	(Brand, Deutschland)
Aluminiumfolie	
Präparatgläser mit Deckel (verschiedene Größen)	

Geräte

Schüttler Modell HS 501 digital	(IKA Labortechnik, Deutschland)
---------------------------------	---------------------------------

2.9.3.2 Durchführung

Die Präparate wurden unter fließendem Wasser 10 Minuten lang vom Formalin frei gewaschen und sodann in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 % je 2 d und 100 % 3 x 3 d) mittels manueller Entwässerung auf dem Schüttler entwässert. Die aufsteigende Alkoholreihe sollte ein Schrumpfen und Zerreißen der Präparate verhindern. Die manuelle Entwässerung auf dem Schüttler ermöglichte eine besser kontrollierbare Entwässerung der Muskelpräparate beim Wechseln der Alkoholbäder, als dies maschinell möglich gewesen wäre. Während der Entwässerung wurden die Behälter mit Alufolie umwickelt, damit die fluorochrommarkierten Präparate nicht verblassten. Zum Abschluss der Entwässerungsreihe wurden die Präparate für 2 - 3 Stunden in Xylol gelegt, um sie auf die Infiltration vorzubereiten.

2.9.4 Kunststoff-Einbettung

2.9.4.1 Material und Geräte

Material

Tabelle 5: Komponentenübersicht und Dosisangaben für Technovit 9100 (Fa. Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim, Deutschland)

	Basis	Pulver	Härter 1	Härter 2	Regler	Lagerung Haltbarkeit
Material-Nr.	1	2	3	4	5	Lösung Temperatur Behälter
Entstabilisierte Basislösung	3 - 4 l					bei 4° C Braunglas, ver- schließbar
Präinfiltration	400 ml		2 g			ca. 1 Woche bei 4° C – 20° C
Infiltration	500 ml	40 g	2 g			ca. 1 Woche bei 4° C – 20° C
Stammlösung A	500 ml	80 g	3 g			ca. 2 Wochen bei 4° C – 20° C
Stammlösung B	50 ml					Braunglas, ver- schließbar
Polymerisation- Gemisch	9 Volumenteile Stammlösung A und 1 Volumenteil Stammlösung B					Sofort verwenden

Geräte

Erlenmeyerkolben (3 x 500 ml)

(Fisherbrand, Deutschland)

Waage Modell LC 62 1S-OCE

(Satorius AG Göttingen, Deutschland)

Elektr. Rührgerät IKA Combimag RET,
Typ Nr. 1065 48

(Janke & Kunkel GmbH&CoKG, Staufen,
Deutschland)

Magnet

Meßpipette 1000 µl

(Eppendorf Reference, Deutschland)

2.9.4.2 Durchführung

Die Kunststoffeinföbung erfolgte mit flüssigem Einföbungsmedium (Technovit 9100; Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim, Deutschland), einem Kunststoff auf Methylmetacrylat-Basis (s. Tab. 5). Dazu wurde eine entstabilisierte Basislösung verwendet, aus der sowohl die Infiltration als auch die Stammlösungen hergestellt worden sind. Die Entstabilisierung der Basislösung erfolgte mittels Chromatographiesäule mit Al₂O₃. Die Herstellung der Präinfiltration, Infiltration und Stammlösungen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (s. Tab. 5). Damit eine vollständige Durchtränkung des Präparats mit diesem Einföbungsmedium sichergestellt werden konnte, wurde zunächst eine 3 - 4-tägige Präinfiltration bei Raumtemperatur und eine anschließende 7-tägige Infiltration im Kühlschrank durchgeführt.

Anschließend wurden die Präparate mit dem flüssigen Einbettungsmedium ausgehärtet. Zu diesem Zweck wurden die Proben mit der unbeschichteten Implantatseite zur Unterseite zeigend im Einbettungsbehälter positioniert, um dann langsam mit dem Polymerisationsgemisch (s. Tab. 5) randvoll übergossen zu werden. Die Einbettformen wurden luftdicht verschlossen und zum Polymerisieren mittels Eiskühlung auf eine Temperatur von 0° C heruntergekühlt. Der Polymerisationsvorgang dauerte etwa 24 Stunden.

Damit der nicht ausgehärtete Kunststoff aus den Präparatsbehältern vollständig entfernt werden konnte, wurde 100 % Alkohol hinzugegeben. Nach einer 1 tägigen Trocknung unter dem Abzug konnte mit der Weiterverarbeitung der Muskelproben begonnen werden.

Die Präparate wurden während des gesamten Weiterverarbeitungsprozess vor Lichteinflüssen geschützt, damit die fluorochrommarkierten Präparate nicht abgeschwächt wurden.

2.9.5 Herstellung der Muskelschliffe

Für die histologische Untersuchung der Implantatregion wurden die Implantate im Muskelgewebe belassen. Es wurden Längsschnitte der Muskelschliffpräparate hergestellt. Damit war es möglich, eine große Kontaktfläche zum Muskelgewebe zu gewinnen. Dadurch konnte auf der gesamten Länge des Implantats mögliche heterotopen Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen besser sichtbar gemacht werden.

2.9.5.1 Vorbereitung der Schliffpräparate

2.9.5.1.1 Geräte

Hammer

Tischschleif- und Poliermaschine (Modell Phoenix 3000, Fa. Jean Wirtz, Deutschland)

Graviergerät (Model GG 12, Fa. Proxxon, Niersbach, Deutschland)

Marker (II–Securline 1451-20-PDC) (Fa. Precision Dynamics Corporation, San Fernando, USA)

2.9.5.1.2 Durchführung

Die Präparate wurden aus den Glasbehältern entnommen und zur späteren Identifizierung der Gruppen mittels Graviergerät beschriftet. Vor der Kunststoffaufblockung war es erforderlich, die Kunststoffblöcke zurecht zu schleifen (1200 U/min = Umdrehung pro Minute) auf ein Format von 1 x 3 cm, das der Größe der maximalen Einspannhöhe der Schleifmaschine entsprach. Erreichte man bei dieser Bearbeitung die Implantate, so wurde die Drehzahl reduziert, um beim Feinschliff die Implantate zu schonen und ein Wegschleifen zu verhindern.

2.9.5.2 Planparalleles Aufblocken der Kunststoffblöcke

2.9.5.2.1 Material und Geräte

Material

Kunststoffobjektträger planparallel - 25 x 75 x 2 mm - (Dia-plus, Oststeinbek, Deutschland)

Schleifmaschine Modell Phoenix 3000 (Jean Wirtz, Deutschland)

Schleifpapier, Körnung 1200 (Hermes, Deutschland)

Technovit 4000, Dreikomponentenkleber (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland)

Medizingläser

Rührspatel

Angeschliffene Präparatkunststoffblöcke

Geräte

Vakuumpresse

(Exakt Apparatebau GmbH,
Norderstedt, Deutschland)

2.9.5.2.2 Anmerkung

Die Kunststoffobjektträger mussten vor jeder Verarbeitung von jeweils einer Seite her angeschliffen werden, um eine bessere Haftung des Klebstoffes zu erzielen. Die Bearbeitung erfolgte unter Sichtkontrolle, so dass bei stumpfer Oberfläche der Schliff abgeschlossen war.

2.9.5.2.3 Durchführung

Die planparallele Aufblockung erfolgte mit einem Dreikomponentenkleber (Technovit 4000), indem die eingebetteten Muskelpräparate auf den angerauten Objektträgern mit der ventralen Muskelschichtseite mittels einer vakuumbetriebenen Schraubpresse befestigt wurden. Dadurch konnte für die spätere Auswertung sowohl die beschichtete als auch die unbeschichtete Seite beurteilt werden. Die Polymerisation des Klebstoffs dauerte ca. 10 Minuten. Danach konnte der Kunststoffblock sofort weiterverarbeitet werden.

2.9.5.3 Anschleifen der Präparate

2.9.5.3.1 Material und Geräte

Material

Schleifpapier P 60

(Hermes, Deutschland)

Schleifpapier P 800-1200

(Hermes, Deutschland)

Aufgeblockte Muskelpräparate

Wasser

Geräte

Mikro-Schleif-System

(Exakt, Norderstedt, Deutschland)

Vakuumpumpe Typ PM 137 17-813 5; Nr. 12 21 297

(Neuberger, Deutschland)

Schleifmaschine

(s. o.)

2.9.5.3.2 Durchführung

Um eine planparallele Ebene für die Sandwichaufblockung zu erhalten, erfolgte nach Bedarf eine Korrektur der Blöcke an der Maschine mit der Schleifpapierstärke 60 und eine Nachbearbeitung der angeschliffenen Blöcke am Mikroschleifsystem mit dem Schleifpapier feinerer Körnung 800, 1000 und 1200. Die Bearbeitung verlief unter Sichtkontrolle. Eine stumpfe Oberfläche bedeutete, dass das Präparat noch nicht angeschliffen war. Eine glänzende Seite deutete dagegen auf eine fertige Präparatebene hin.

2.9.5.4 Sandwichherstellung

2.9.5.4.1 Material und Geräte

Material

Petrolbenzin

(Fa. Merk, Darmstadt, Deutschland)

Präzisionskleber Technovit 7210

(Fa. Heraeus Kulzer GmbH & Co
KG, Wehrheim, Deutschland)

Schleifpapier P 1200

(Fa. Hermes, Deutschland)

aufgeblocktes und angeschliffenes Präparat

Angeschliffener, beschrifteter Kunststoffobjektträger

Geräte

Digitales Mikrometer-Feinmeßgerät

(Mitutoyo American Cooper.,
Aurora, USA)

Präzisionskleberpresse mit Blaulicht

(Exakt, Norderstedt, Deutschland)

Vakuumpumpe Typ NO 22 AN.18

(Neuberger, Deutschland)

2.9.5.4.2 Durchführung

Vor der Sandwichherstellung erfolgte zunächst die Messung, sowohl des aufgeblochten, angeschliffenen Präparats (= 1. Messung), als auch des planparallel, angeschliffenen Objektträgers (= 2. Messung). Dazu wurden diese im Vorfeld mit Petrolbenzin gereinigt.

Das angeschliffene Präparat wurde mit dem Präzisionskleber bestrichen, unter die vakuumbetriebene Präzisionskleberpresse gelegt und unter Verwendung des Blaulichts langsam auf die nicht angeraute Objektträgerseite des unten liegenden Objektträgers angepresst. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Klebevorgang luftblasenfrei verlief. Für die fluoreszenzmarkierten Präparate wurde eine Belichtungszeit von 7 Minuten gewählt, um sie vor dem Verblässen zu schützen. Die Gesamtaushärtung betrug weitere 6 Stunden unter Lichtentzug.

Nun erfolgte die dritte Messung des gesamten Sandwichs.

Anschließend wurde anhand der oben gemessenen Werte die Kleberschichtdicke berechnet, indem eine Summe aus der 1. und 2. Messung gebildet wurde, um diese dann von dem Wert der 3. Messung zu subtrahieren. Diese Werte waren notwendig, um später die abzuschleifende Menge beim Feinschliff exakt berechnen zu können.

2.9.5.5 Das Sägen der Sandwichs

2.9.5.5.1 Material und Geräte

Material

Sandwich

Geräte

Exakt Makro-Trennschleifsystem mit eingebauter Vakuumpumpe und -pumpe, Typ 30 331 CP/N

(Exakt, Norderstedt, Deutschland)

2.9.5.5.2 Durchführung

Mit dem Makro-Trennschleifsystem wurden Muskelschliffpräparate mit einer Dicke von ca. 800 μm hergestellt. Zu diesem Zweck wurde die gekennzeichnete Seite des Sandwichs zum Sägeband hin an der Vakuumpumpe der Trenneinheit angebracht und soweit an das Trennband herangeführt, bis das Trennband die Innenseite des Objektträgers berührte. Schließlich wurde unter Wasserkühlung gesägt.

2.9.5.6 Abschleifvorgang (Muskelschliffe)

2.9.5.6.1 Material und Geräte

Material

Sägeschnitt

Schleifpapier P 1200

Polierpapier P 4000

(Hermes, Deutschland)

Geräte

Mikro-Schleifsystem	(Exakt, Norderstedt, Deutschland)
Vakuumpumpe Typ PM 137 17-813 5; Nr. 12 21 297	(Neuberger, Deutschland)
Digitales Mikrometer-Feinmessgerät	(Mitutoyo American Cooper., Aurora, USA)

2.9.5.6.2 Durchführung

Mit dem Mikroschleifsystem wurden dann unbeschädigte Muskelschliffpräparate von 140 μm gewonnen. Bei jedem Präparat musste der Nullpunkt im Vorfeld neu ermittelt werden, um eine genaue Abschleifstärke zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde das Präparat erneut gemessen. Anschließend wurde die o. g. Abschleifdicke eingestellt, der Schleifvorgang mit einer Drehzahl von 60 U/min und einer Schleifpapierstärke von P 1200 durchgeführt. Die Wahl der Schleifpapierkörnung orientierte sich dabei an der Dicke des Präparats. Zur Erzielung einer glatten Präparatoberfläche wurden diese im Anschluß mit 4000er Polierpapier 6 Minuten lang nachpoliert.

2.9.5.6.3 Schliifnummerierung

2.9.5.6.3.1 Geräte

Graviergerät Model GG 12	(Proxxon, Niersbach, Deutschland)
Stabilo - OHPen - universal schwarz	(Stabilo, Heroldsberg, Deutschland)

2.9.5.6.3.2 Durchführung

Die Kennzeichnung der Objektträger erfolgte gemäß den unten gemachten Angaben:

Oben

- 1 - 4 (arab. Zahl = Implantat-Nr. im Tier)
I - VI (röm. Zahl = Anzahl der Schriffe des jeweiligen Implantates)

Unten

- (19, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 75, 77, 78, 79) (zweistellige arab. Zahl = Tier-Nr.)
I - IV (röm. Zahl = Versuchsgruppen-Nr.)

2.9.6 Herstellung der Knochenschliffe

Es wurden je eine Knochenprobe aus der Halswirbelsäule der 12 Versuchstiere entnommen und daraus Knochenschliffe hergestellt, die als spätere native Schliffe für die Fluoreszenzmikroskopie gedient haben.

2.9.6.1 Durchführung

Die Bearbeitungsschritte der Knochenprobenpräparate entsprechen im wesentlichen der Herstellung der Muskelschliffpräparate.

2.9.6.2 Abschleifvorgang (Knochenschliffe)

2.9.6.2.1 Material

Objektträger	(50 x 100 x 2 mm)
Schleifpapier	(P 500, 1000, 1200)
Polierpapier	(P 4000)

2.9.6.2.2 Durchführung

Die Knochenschliffpräparate wurden zunächst mit 500er, 1000er und 1200er Schleifpapier auf 140 μ m heruntergeschliffen. Bei jedem Wechsel des Schleifpapiers sowie des Präparates musste der Nullpunkt neu ermittelt werden. Zum Schluss wurden die Präparate mit dem 4000er Polierpapier 5 Minuten lang nachpoliert.

2.9.7 Färbung der Präparate mit kombinierte Van Kossa/Safranin O'-Färbung

2.9.7.1 Material

Ameisensäure 1%	(Merk KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Aqua dest.	(Delta pharm, Deutschland)
Silbernitratlösung 3 %	(Merk KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Na-Formaldehydlösung	(Merk, KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Leitungswasser	
Na-Thiosulfat 5 %	(Merk, KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Safranin O	(Merk, KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Alkohol 96 %	(Herbeta, Arzneimittel Berlin, Deutschland)
Alkohol 100 %	
Xylol	(Merk, Darmstadt, Deutschland)
Vitroclud-Kebstoff	(R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
Glasbehälter	(Werkstatt Chemie & Foto, Deutschland)
Deckgläser	(Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland)

2.9.7.2 Durchführung

Die Muskelschliffpräparate wurden zunächst mit Ameisensäure (1,5 min.) angesäuert, dann mit Aqua dest. (2x) gespült, um sie dann mit Silbernitratlösung (40 min.) zu färben. Im weiteren erfolgte eine erneute Spülung mit Aqua dest. (3x), dann eine Reduzierung in Na-Formaldehydlösung (2 min.), ein Wässern in Leitungswasser (10 min.), eine Na-Thiosulfat-Tränkung (5 min.), ein Wässern in Leitungswasser (10 min.), ein Spülen in Aqua dest. (kurz) und schließlich die Färbung in Safranin O' (30 min.). Des weiteren wurde mit Aqua dest. (kurz) gespült, dann eine Entwässerung mit Alkohol (96 %, 100 %, je 2x) durchgeführt und sodann eine kurze Xylol-Tränkung (2x) vorgenommen. Anschließend wurden die Muskelschliffpräparate mit Vitroclud (1 dickflüssiger Tropfen) eingedeckelt. Die absolute Trocknungszeit der gefärbten Präparate betrug 24 h. Der Klebstoffüberstand wurde mit Xylol gesäubert. Bei Blasenbildung unter dem Deckglas wurde das Eindeckeln wiederholt.

2.9.7.3 Ziel

Die Färbung dient dem Kalk- und Knorpelnachweis und ist eine reine Kontrastfärbung. Durch die Farbstoffe stellen sich die einzelnen Gewebe folgendermaßen dar:

Mineralisiertes Knochen- und Knorpelgewebe	schwarz
Mineralisationsfronten	schwarz granuliert
Hyaliner Knorpel	intensiv rot
Nicht mineralisierter Knochen	rot
Muskelgewebe	rot

Durch diese Färbung sollen mögliche heterotope Ossifikationen im Durchlichtmikroskop sichtbar gemacht werden.

2.10 Auswertung

2.10.1 Radiologie - Methode der Auswertung

Radiologische Auswertungsmethode

Zwei unabhängige Gutachter werteten die Röntgenaufnahmen verblindet aus.

Die Implantatregionen wurden detailliert auf Mineralisationsherde hin abgesucht. Alle Veränderungen sind dokumentiert worden.

2.10.2 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie - Methode der Auswertung

2.10.2.1 Material, Geräte und verwendete Vergrößerungen

Material

Gefärbte Muskelschliffe

Native Knochenschliffe (Kontrollgewebe)

Geräte

Mikroskop DM-RB Typ 301-371.010 mit Fluoreszenzlampe	(Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
Digitalvideokamera MC 3254	(Sony, Deutschland)
Monitor 1095 LR	(Kontron Elektronik Ultravision, Deutschland)
Motortisch	
PC	

Verwendete Vergrößerungen

Okular-Vergrößerung 10 x / 25

Objektiv-Vergrößerung

1,6 x / 0,05

2,5 x / 0,07

5 x / 0,12

10 x / 0,30

20 x / 0,50

40 x / 0,70

100 x / 1,30 (Öl)

Digitalisierung der Präparate erfolgte mit Hilfe der AxioVision 4,4-Software.

2.10.2.2 Ziel der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Ziel der Durchlichtmikroskopie

Mittels der Durchlichtmikroskopie sollten mögliche heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen im Schliffpräparat nachgewiesen werden.

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie

Anhand der Fluoreszenzen im neumineralisierten Gewebe sollten mögliche heterotope Ossifikationen im Muskelgewebsschliff nachgewiesen werden. Native Knochenschliffe dienten hier als Kontrollgewebe für die erfolgreiche Einlagerung des Markers im Knochen.

2.10.2.3 Prinzip der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie

Prinzip der Durchlichtmikroskopie:

Bei der Durchlichtmikroskopie wird mittels einer Lichtquelle (12 Volt, 100 Watt) über Reflektoren das Licht zum Stativfuß des Mikroskops geleitet, so dass die zu betrachtenden Schliffpräparate von unter her beleuchtet werden. Die Beleuchtungsintensität kann anhand eines Reglers und durch Zuschalten eines Graufilter (Neutralfilters) gesteuert werden.

Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird ultraviolettes Licht einer Halogenlampe (Wellenlänge 1850 und 2537 Å) bis zum Objekt durch besonders durchlässiges Glas (z. B. Quarz) geleitet, im Objekt durch einen Fluoreszenzfarbstoff teilweise in sichtbares Licht verwandelt und so dann durch ein Mikroskop unter Zwischenschalten eines Sperrfilters betrachtet. Aufgrund der lichtschwachen und bei der UV-Bestrahlung verblassenden Lichterscheinung ist in einem verdunkelten Raum zu arbeiten (Burk, 1986).

2.10.2.4 Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Auswertungsmethode

Die Präparate wurden systematisch auf Mineralisationsherde untersucht, so dass auch Artefakte dabei ausgeschlossen werden konnten. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Durchlichtmikroskopie verwendet. Die Präparate wurden zur Gesamtübersicht zunächst in der o. g. kleinsten Vergrößerung eingestellt und zur Detailanalyse bis auf 100-fach vergrößert. Ab der 20-fachen Vergrößerung wurde nach Bedarf der Kondensator hereingeklappert, um eine bessere Scharfeinstellung zu gewährleisten.

Anschließend erfolgte die Kontrolle mit Fluoreszenzlicht. Dafür wurde der Sequenzmarker Xylenol-Orange mit grünem Fluoreszenzlicht bestrahlt, welches dann schließlich in rotes Licht umgewandelt wurde. Die Veränderungen wurden protokolliert. Die Auswertung erfolgte unter Anonymisierung der Gruppenzugehörigkeit durch zwei unabhängige Gutachter.

3. Ergebnisse

3.1 Operationstoleranz und Heilungsverlauf

Die Tiere erholten sich von der Narkose binnen eines Tages. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde durch den Eingriff nicht gestört. Es konnten keine systemischen Nebeneffekte durch die implantierten Plättchen festgestellt werden. Die Heilung der Operationsincision verlief ohne Komplikationen. Es waren keine Ausfälle der Tiere zu verzeichnen.

3.2 Röntgen

3.2.1 Postoperative Röntgenbilder und Verlaufsuntersuchungen

Die postoperativen Kontrollaufnahmen zeigten den korrekten Sitz der Implantate (s. Abb.11/12: dorso-ventrale Ebene).

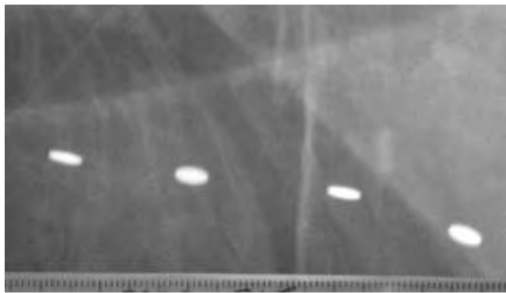


Abb. 11: Nr. 22 - post OP

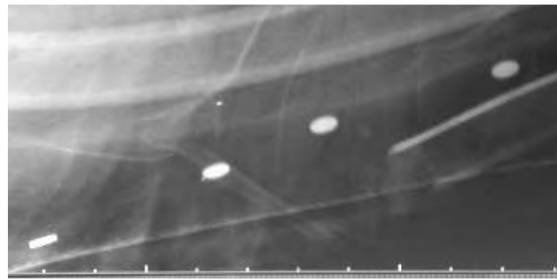


Abb. 12: Nr. 28 - post OP

Die Verlaufsuntersuchungen zeigten keine Positionsveränderung während der Heilung (Abb.13/14: dorso-ventrale Ebene).

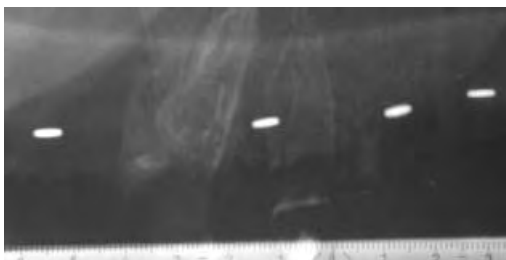


Abb. 13: Nr. 23 - 1 Wo post OP



Abb. 14: Nr. 27 - 2 Wo post OP

3.2.2 Post mortem

Es wurden keine Mineralisationsherde oder heterotope Ossifikationen festgestellt (s. Abb. 15 - 18: dorso-ventrale Ebene).

In Bezug auf das Einwachsverhalten der Implantate in das Muskelgewebe konnten radiologisch keine Unterschiede zwischen den 4 Gruppen nachgewiesen werden.

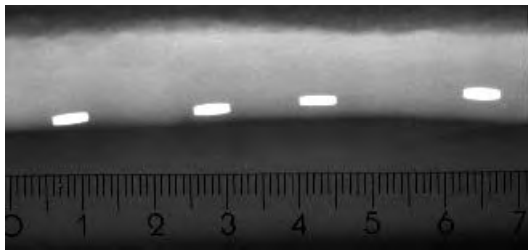


Abb. 15: Nr. 79 - Gruppe I (unbeschichtet)

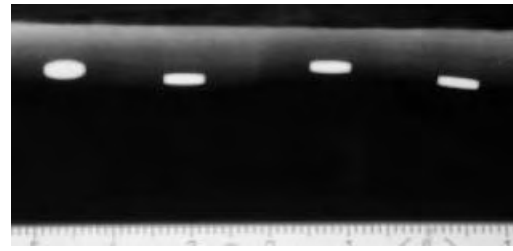


Abb. 16: Nr. 22 - Gruppe II (PDLLA)

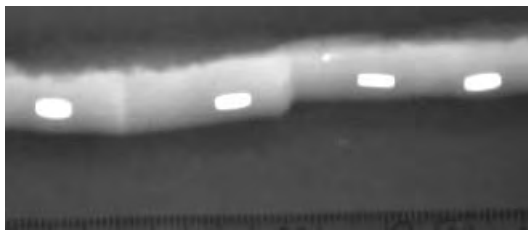


Abb. 17: Nr. 29 - Gruppe III (TGF- β 1 + IGF-I)

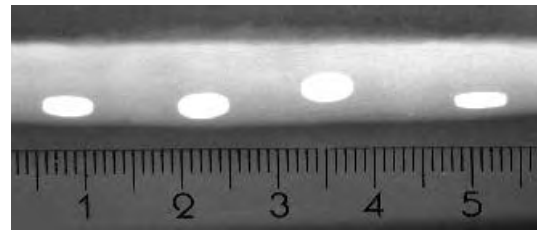


Abb. 18: Nr. 78 - Gruppe IV (BMP-2)

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die erfolgreiche Sequenzmarkierung konnte anhand der nativen Knochenschliffe festgestellt werden, da neu mineralisiertes Gewebe im Knochenschliff fluoreszierte (s. Abb. 19).

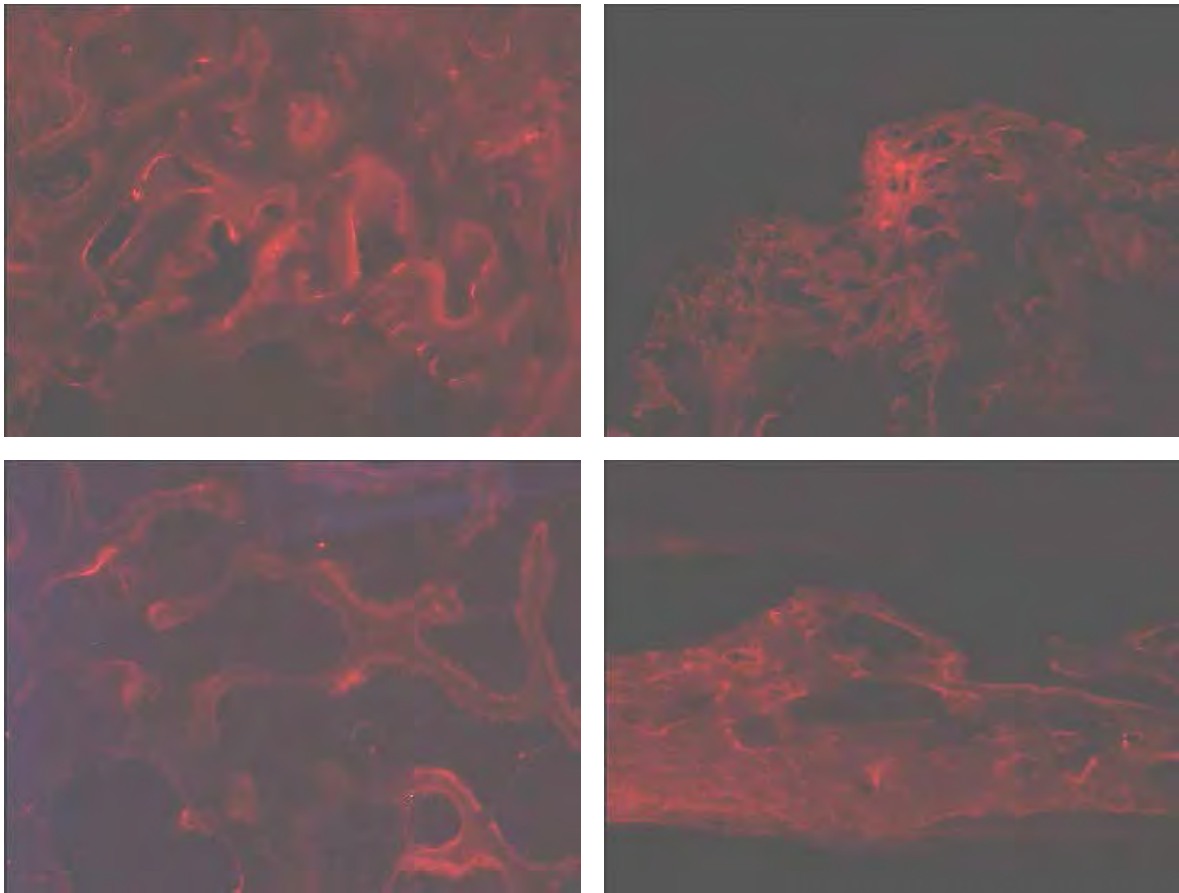


Abb. 19: Native Knochenschliffpräparate der HWS: Unbeschichtet (links oben); PDLLA (rechts oben); TGF- β 1 + IGF-I (links unten); BMP-2 (rechts unten)

In den Muskelschliffpräparaten konnten in allen 4 Gruppen keine Mineralisationsherde gefunden werden (Abb. 20).

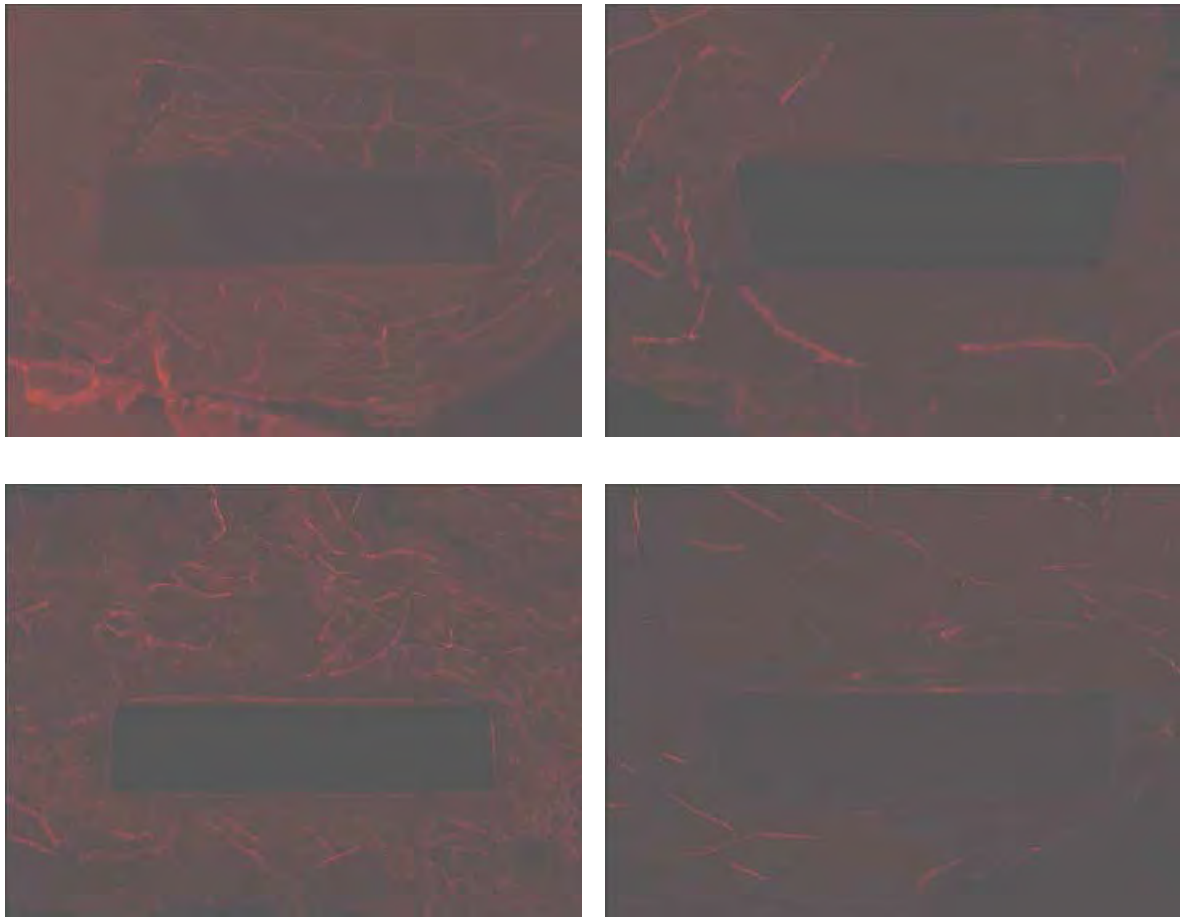


Abb. 20: Gefärbte Muskelschliffpräparate im Fluoreszenzlicht: Unbeschichtet (links oben); PDLLA (rechts oben); TGF- β 1 + IGF-I (links unten); BMP-2 (rechts unten)

3.4 Histomorphologie

Es wurden 11 Muskelschliffpräparate pro Gruppe deskriptiv für die Histomorphologie ausgewertet. Die durchschnittliche Schliffdicke lag bei 140 μm . Damit waren Gewebdifferenzierungen möglich.

Die dargestellten Muskelschliffpräparate sind so digitalisiert und ausgewertet worden, dass die Region oberhalb der Plättchen die Veränderungen des medialen Muskelareals über der beschichtete Implantatregion zeigen und unterhalb der Plättchen die Veränderungen des lateralen Muskelareals unter der unbeschichteten Implantatregion untersucht werden konnten. Analog dazu gilt diese Darstellung auch für die unbeschichtete Kontrollgruppe, so dass oberhalb der Implantate das mediale Muskelareal und unterhalb der Plättchen das laterale Muskelareal dargestellt worden ist. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Beschreibungen von medialer und lateraler Implantatseite gesprochen.

Definitionen, die Gewebsveränderungen auf der linken und rechten Seite um die Implantate darstellen, können unter dem Gesichtspunkt zugeordnet werden wie die Muskelschliffpräparate hergestellt und anschließend ausgewertet und digitalisiert worden sind. Das heißt eine cranio-caudale Zuordnung konnte nach der Herstellung der Präparate nicht mehr gemacht werden, da eine horizontale Drehung der Präparate bei der Verarbeitung zu den histologischen Präparaten stattgefunden hat. Es wurde lediglich auf die medio-laterale Zuordnung geachtet, da diese für die spätere Auswertung von wesentlich größerer Bedeutung war.

Detaillierte Ergebnisse der Gruppen

3.4.1 Unbeschichtet

Die Implantate der Gruppe I waren in den Muskelschliffpräparaten von einer Bindegewebskapsel homogen eingeschlossen (s. Abb. 21).

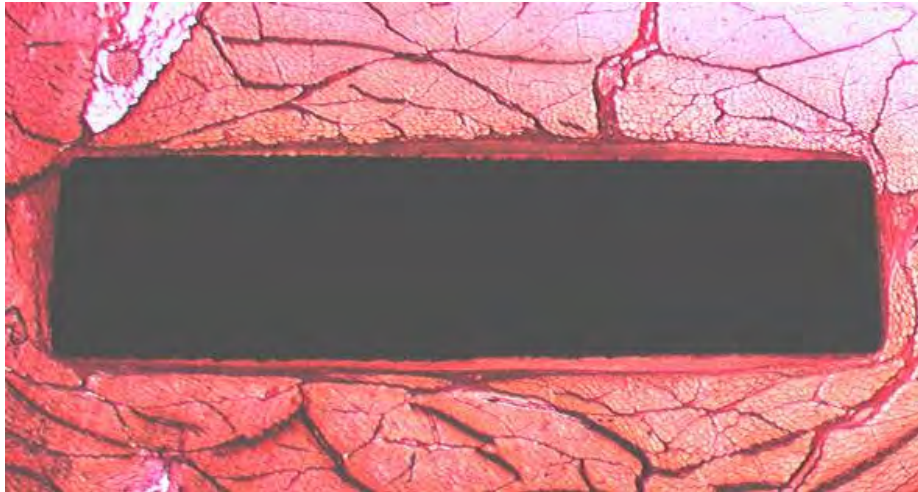


Abb. 21: Unbeschichtet

Die Kapsel aus zellarmem, kollagenem Bindegewebe beinhaltete spindelförmige, parallel verlaufende Zellen mit Anordnung in eine vorherrschende Richtung und je nach Intensität der Anfärbung sichtbare Zellkerne. Allgemein waren die Zellen nur gering angefärbt. Nach außen hin wurden die spindelförmigen Zellen schlanker und Zellkerne waren nicht mehr erkennbar. Außenschichten der Kapsel waren durch sehr feine, schlanke, spindelförmige Faserbildung geprägt. Diese Zellen wiesen eine komprimierte Gewebsstruktur auf, die die Kapsel gegen die Umgebung abgrenzten. Sie waren stärker gefärbt (s. Abb. 22).

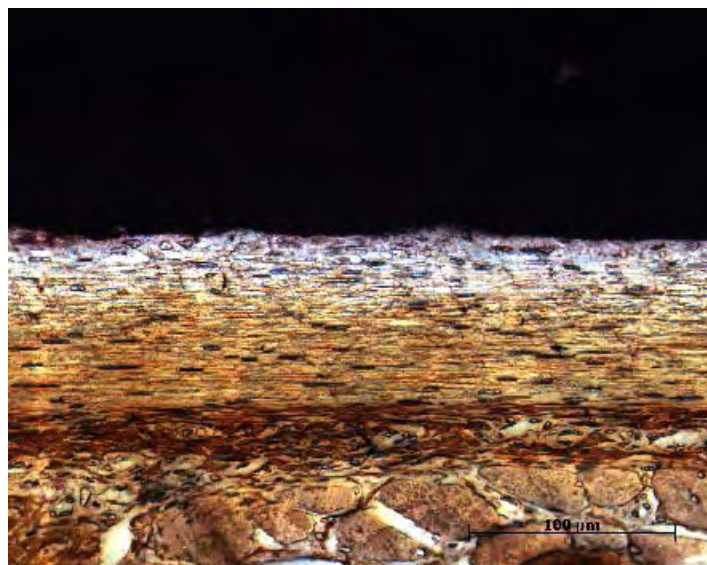


Abb. 22: Unbeschichtet, laterale Seite, Detailaufnahme

Die Faserstrukturen folgten dem Faserverlauf des Endomysiums sowie des Perimysiums und strahlten feinstrukturiert in das umliegende Muskelgewebe aus (s. Abb. 23).

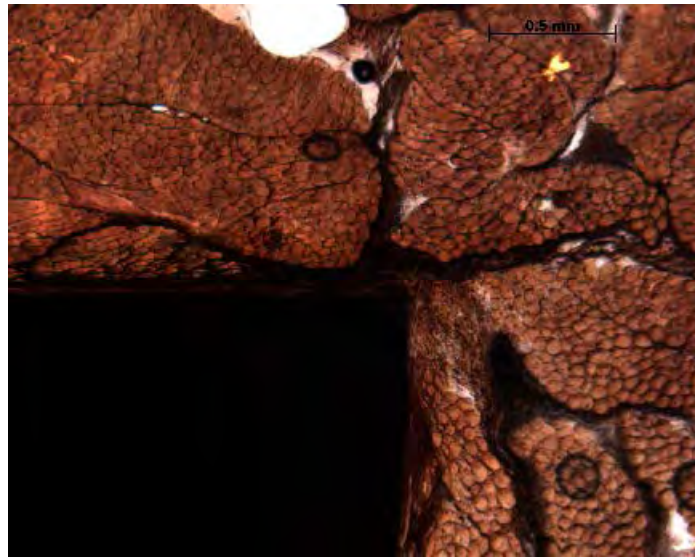


Abb. 23 : Unbeschichtet, Detailaufnahme

Die Kapselseiten waren überwiegend durch einen homogenen Abschluss geprägt. Allerdings wies ein Präparat einen hohen Anteil schlanker, komprimierter spindelförmiger Zelllagen auf, die in das umliegende Muskelgewebe ausstrahlten (s. Abb. 24).

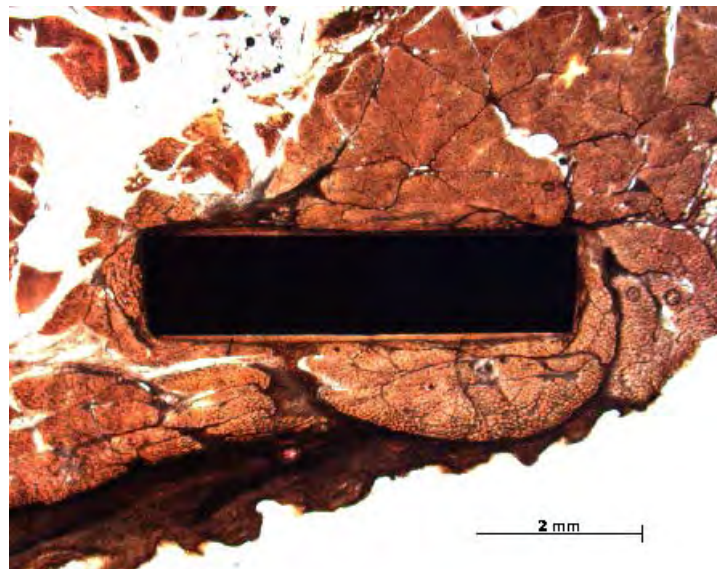


Abb. 24: Unbeschichtet

Die Gruppe I wies auf der medialen Implantatseite in 4 von 11 Präparaten eine schlitzartige Spaltbildung auf. In einem Präparat zeigte sich eine schmale Spaltbildung und in einem weiteren Präparat eine Übergangsform von schlitzartiger zur schmalen Spaltbildung. Auf der lateralen Implantatseite bestand bei 2 von 11 Präparaten eine schlitzartige, bei einem Präparat eine lumenartige Spaltbildung und bei einem eine Übergangsform, die zur rechten Seite hin von der schmalen zur lumenartigen Spaltbildung überging (s. Abb. 25). 4 Präparate wiesen weder auf der einen noch auf der anderen Seite eine Spaltbildung auf.



Abb. 25: Unbeschichtet, lumenartige Spaltbildung

3.4.2 PDLLA

In den Muskelschliffpräparaten der Gruppe II war das Implantat ebenfalls homogen von einer Bindegewebskapsel eingeschlossen (s. Abb. 26). Diese bindegewebige Fremdkörperkapsel war im wesentlichen so aufgebaut wie die der Gruppe I. Die Kapselseiten waren geprägt durch einen homogenen Abschluss.



Abb. 26: PDLLA

Bei einem Präparat war allerdings auf einer Seite eine breitere Gewebeschicht als auf der Gegenseite zu finden (s. Abb. 27).



Abb. 27: PDLLA

Ein weiteres Präparat wies am rechten Seitenrand einen hohen Anteil von schlanken, komprimierten spindelförmigen Zelllagen auf, die in das umliegende Muskelgewebe ausstrahlten (s. Abb. 28).

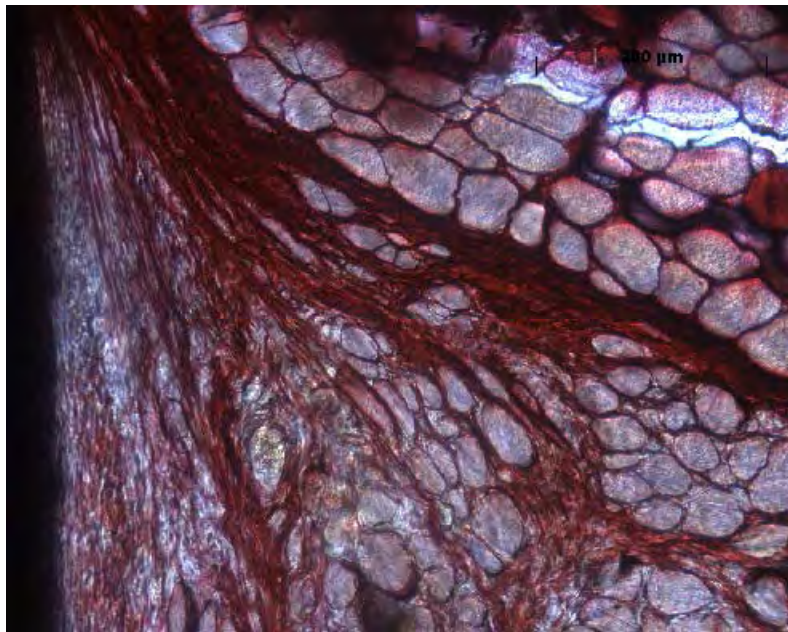


Abb. 28: PDLLA, Detailaufnahme

Auf der beschichteten Seite konnte in 2 von 11 Präparaten eine schmale Spaltbildung festgestellt werden. Bei 5 von 11 Präparaten war eine lumenartige Spaltbildung vorhanden (s. Abb. 29), wobei ein Präparat zusätzlich zur linken Seite hin eine schlitzartige Spaltbildung aufwies und bei einem Präparat eine große Lumenbildung festgestellt wurde. Auf der unbeschichteten Seite zeigte sich bei drei Präparaten eine schlitzartige, bei drei Schlifffen eine schmale und bei einem Präparat eine lumenartige Spaltbildung. 3 Präparate wiesen auf der unbeschichteten Seite keine Spaltbildung auf. Zwei Präparate waren ohne Spaltbildung.

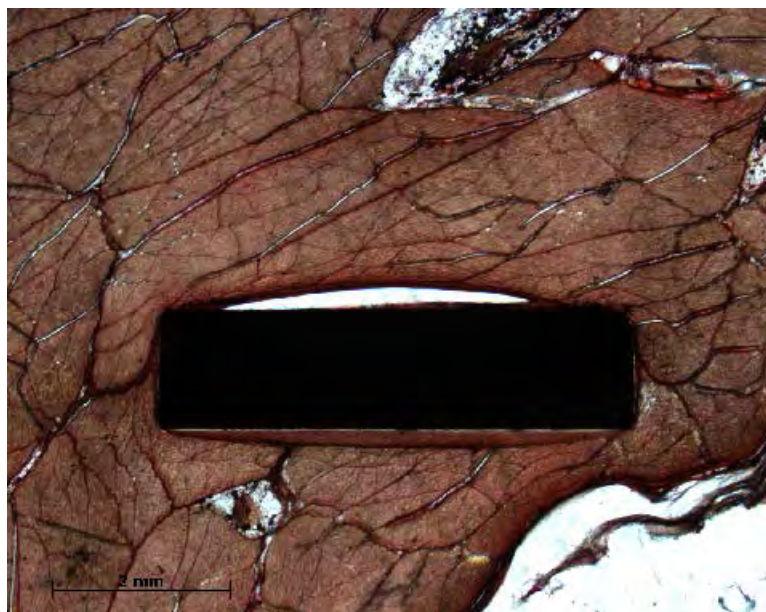


Abb. 29: PDLLA, lumenartige Spaltbildung

3.4.3 TGF- β 1 + IGF-I

In den Muskelschliffpräparaten der Gruppe III waren die Implantate ebenfalls von einer überwiegend homogenen Bindegewebskapsel eingeschlossen (s. Abb.:30).

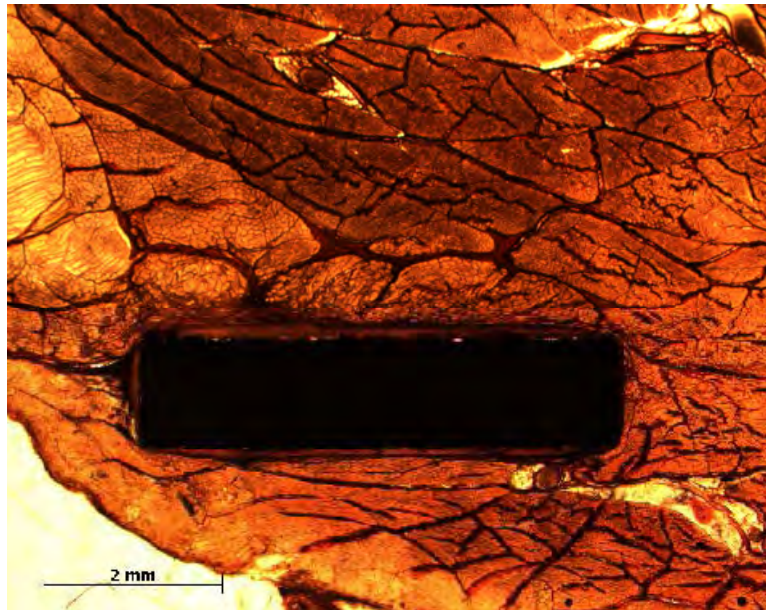


Abb. 30: TGF- β 1 + IGF-I

Sie war von spindelförmigen, parallel zum Implantat verlaufenden Zelllagen gekennzeichnet, die insgesamt eine homogene Schicht darstellten. Nach außen hin wurden sie durch schmale, komprimiert erscheinende Zelllagen, die stärker angefärbt waren, von der Umgebung abgegrenzt (s. Abb. 31).

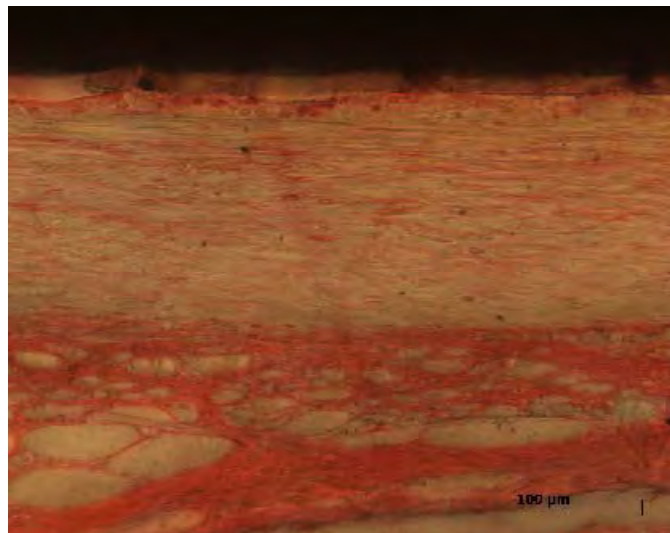


Abb. 31: TGF- β 1 + IGF-I, laterale Seite, Detailaufnahme

Die abschließenden Fasern strahlten feinstrukturiert entlang des Endomysiums und des Perimysiums in das umliegende Muskelgewebe (s. Abb. 32).

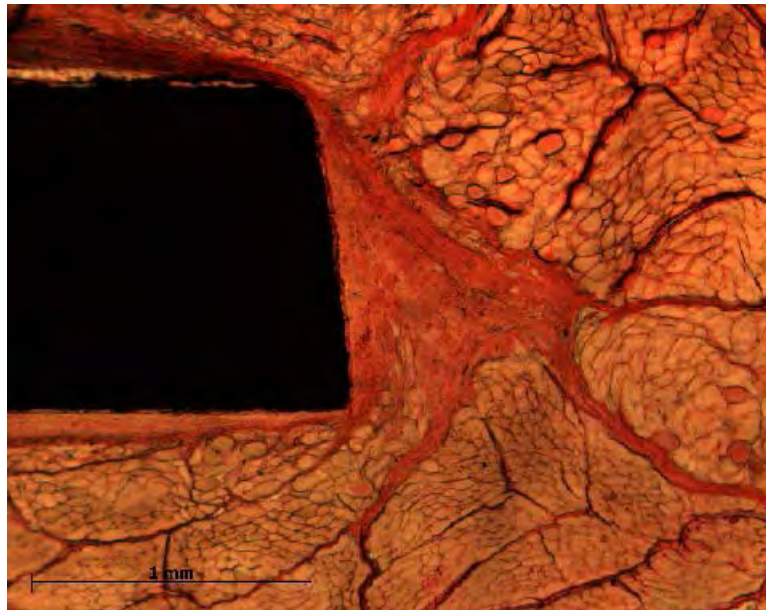


Abb. 32: TGF- β 1 + IGF-I, Detailaufnahme

Bei fünf Präparaten fanden sich auf der beschichteten Seite Besonderheiten der Bindegewebskapsel. In vier Fällen davon verliefen Bindegewebsfasern zu einem abgehenden Bindegewebsbündel zusammen, das vorherrschend in eine Richtung von der Kapsel wegzog, wobei eines davon locker gebündelt war (s. Abb.: 33).

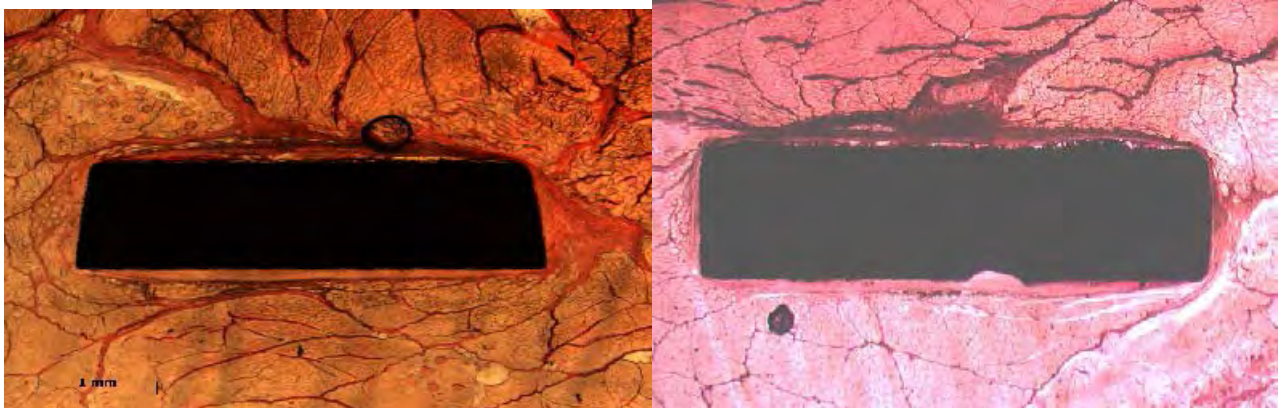


Abb. 33: TGF- β 1 + IGF-I

Ein weiteres Präparat war durch deutlich höhere Bindegewebsanteile geprägt, so dass die beschichtete Seite mehr Bindegewebszelllagen aufwies, die gebündelt in geordnete Richtung um das Implantat herum verliefen und nicht in die Umgebung ausstrahlten. Die Kapselseiten waren in diesen Fällen von einem homogenen Abschluss geprägt (s. Abb. 34).



Abb. 34: TGF- β 1 + IGF-I

Vier Präparate zeichneten sich auf der rechten Seite und bei einem auf der linken Seite durch einen hohen Anteil von schlanken, komprimierten spindelförmigen Zelllagen aus, die in das umliegende Muskelgewebe ausstrahlten (s. Abb. 35).

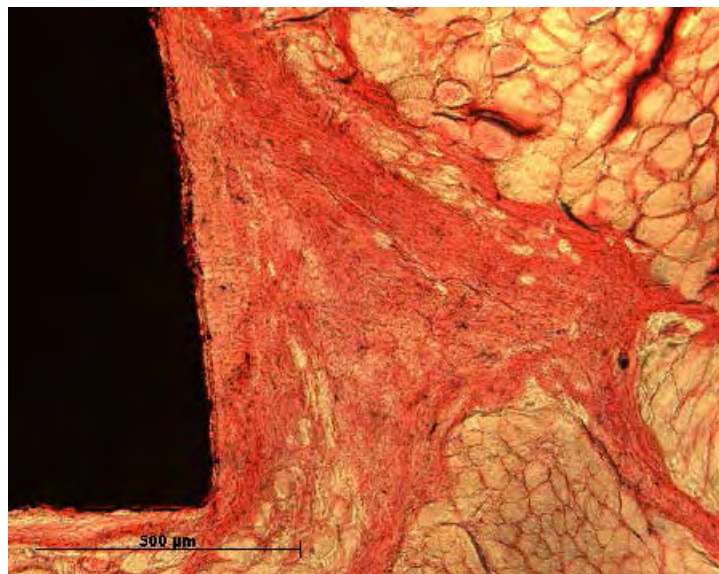


Abb. 35: : TGF- β 1 + IGF-I, Detailaufnahme

Bei vier Präparaten wurde sowohl auf der beschichteten als auch auf der unbeschichteten Seite eine schlitzartige und bei zweien eine schmale Spaltbildung festgestellt. Lumenartig war der Spalt bei zwei Präparaten auf der beschichteten und bei einem auf der unbeschichteten Seite. Bei zwei weiteren war ein großes Lumen ausgebildet, so dass die Bindegewebe kapsel vom Implantat gehoben wurde (s. Abb. 36) Ein Präparat wies keine und drei lediglich auf der unbeschichteten Seite eine Spaltbildung auf.

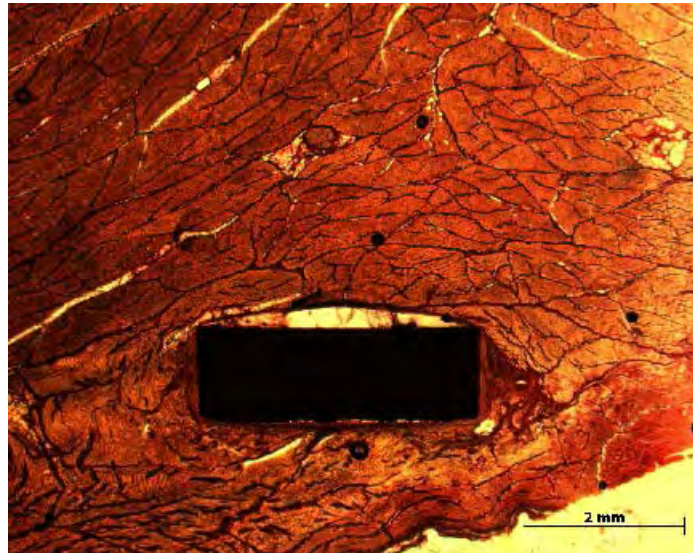


Abb. 36: TGF- β 1 + IGF-I

BMP-2

In den Muskelschliffpräparaten der Gruppe IV waren die Implantate heterogen von einer Bindegewebskapsel eingeschlossen (s. Abb. 37). Die Bindegewebschicht der unbeschichteten Seite entsprach im wesentlichen der homogenen Struktur der Gruppen I - III.



Abb. 37: BMP-2

Die beschichtete Seite zeichnete sich dagegen durch ein hohes Maß an Heterogenität aus. So war eine deutlich breitere Schicht von spindelförmigen Zelllagen festzustellen. Nur zu Beginn ließ sich eine homogene, parallel zum Implantat verlaufende Anordnung entdecken. Im Inneren der Kapselschicht war eine heterogene Anordnung zu verzeichnen (s. Abb. 38).

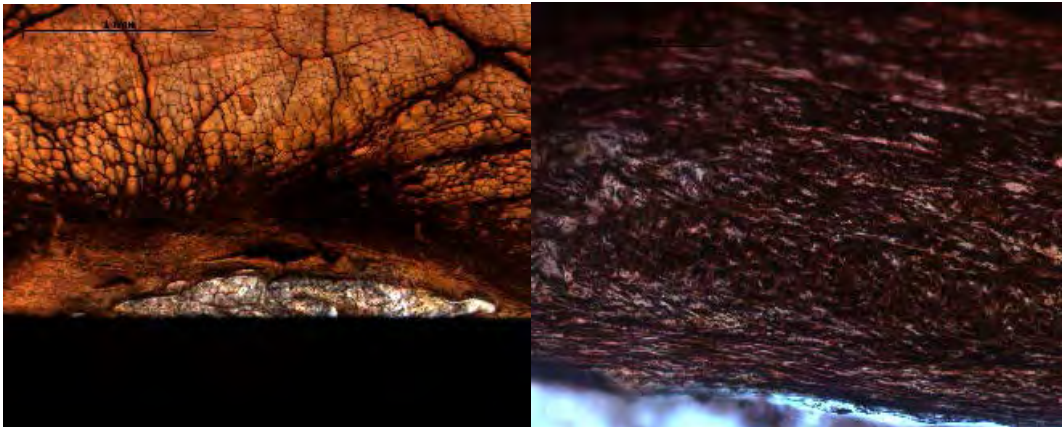


Abb. 38: BMP-2, Detailaufnahme

Darüber hinaus waren in 5 von 11 Präparaten der Gruppe IV blasige Aufwerfungen zu finden (s. Abb. 39). Diese unterschieden sich deutlich von der bereits beschriebenen Spaltbildung. Sie waren nur anteilig auf der unbeschichteten Horizontalen vertreten. Diese Phänomene bildeten eine Wulst, die das heterogene Bild der Präparate prägte. Die spindelförmigen Zelllagen wurden durch stärker komprimierte Zelllagen abgelöst, die sich zu parallel angeordneten Fasern bündelten und radiär entlang des Endomysiums und des Perimysiums in das umliegende Muskelgewebe ausstrahlten.



Abb. 39: BMP-2, Detailaufnahme

Die beschichtete Seite wies somit erhöhte Faseranteile und Faserdichte auf, wie aus der starken Faserverzweigung deutlich wurde. Die Kapselseiten waren auch hier überwiegend durch einen homogenen Abschluss geprägt. Zwei Präparate hatten allerdings auf der rechten Seite eine breitere Gewebeschicht als auf der Gegenseite. Sie war von einem fließenden Übergang zur äußeren Bindegewebshülle des Muskelgewebes gekennzeichnet. In diesen Fällen war das Implantat sehr nahe zur Muskelaußenfläche eingebracht worden (s. Abb. 40).

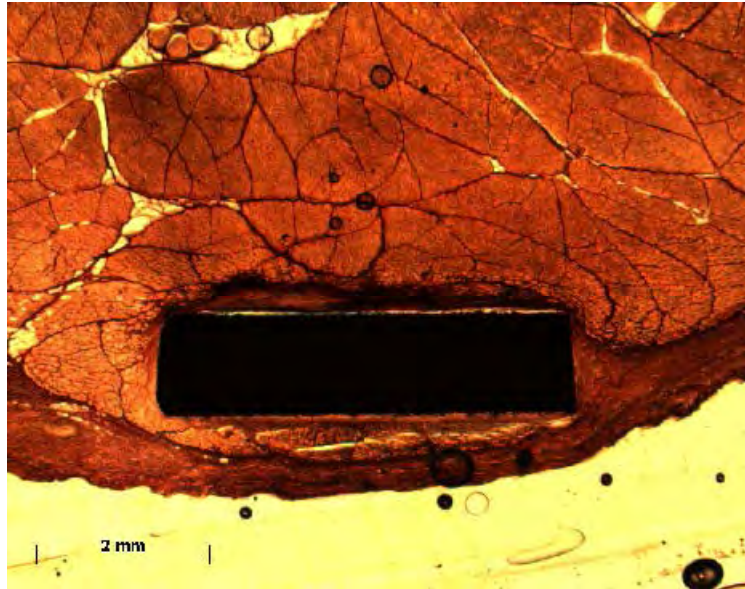


Abb. 40: BMP-2

Auf der beschichteten Seite war bei einem Präparat ein schlitzartiger Spalt und ein schmaler Spalt bei 4 von 11 Präparaten gebildet. Ein weiteres wies ein großes Lumen auf. Während sich auf der unbeschichteten Seite bei 2 von 11 Präparaten ein schlitzartiger Spalt gebildet hatte und bei drei eine lumenartige Spaltbildung zu verzeichnen war, beschränkte sich das Lumen bei einem Präparat lediglich auf die Einkerbung des Schliffes. Die übrigen Präparate zeigten auf der unbeschichteten Seite keine Spaltbildung.

3.4.5 Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse

Zusammengefasst lässt sich mit den Ergebnissen belegen, dass die Muskelschliffpräparate der Gruppen I - IV vollständig von einer Bindegewebskapsel umgeben gewesen sind (s. Abb. 21 - 40). Die Kapsel zeichnete sich durch eine erhöhte Proliferation von Bindegewebszellen aus, die das gesamte Implantat umschlossen. Durch die Implantation wurde ein Fremdkörperreiz gesetzt, das zur Bildung eines Fremdkörpergranuloms führte.

Die Muskelschliffpräparate wiesen zwischen Implantat und Bindegewebskapsel vorwiegend über der beschichteten Seite im unterschiedlichem Ausmaß eine Spaltbildung auf.

Es konnten vier Formen der Spaltbildung unterschieden werden:

- Eine schlitzartige Spaltbildung, die nicht auf der ganzen Länge der Implantatseite zu sehen war, da der Spalt durch den Abrieb verdeckt war.
- Eine schmale Spaltbildung, die auf der ganzen Länge der Implantathorizontalen sichtbar war.
- Eine lumenartige Spaltbildung, die eine deutlich größere Fläche im Schliff einnahm.
- Eine große Lumenbildung, die die größte Fläche des Lumens im Vergleich zu den anderen Spaltformen ergeben hat.

Die Spaltenformen wiesen nur anteilig Zellreste und Abrieb auf.

Bei der eingehenden Untersuchung der Präparate konnte festgestellt werden, dass ein unterschiedliches Ausmaß der Bindegewebskapselbildung und ein deutlicher Unterschied zwischen der beschichteten und der unbeschichteten Implantatseite bestand.

Die Fremdkörperkapseln und ihr Aufbau sind in der unbeschichteten und der PDLLA Gruppe sowohl auf der beschichteten als auch der unbeschichteten Implantatseite etwa gleich und somit homogen strukturiert gewesen.

Bei der Van Kossa/Safranin O'-Färbung konnten keine mineralisierten Knochen- und Knorpelgewebe, keine Mineralisationsfronten und ebenso keine Ossifikationsherde über der beschichteten Implantatseite nachgewiesen werden.

IGF-I und TGF- β 1 führt zu keiner heterotopen Ossifikation. Die beiden WFs IGF-I und TGF- β 1 fördern lediglich die Bindegewebsfaserbildung auf der beschichteten Seite der Fremdkörperkapsel im Vergleich zur unbeschichteten Seite sowie im PDLLA und unbeschichteten Gruppenvergleich. Jedoch führt die nur etwas erhöhte Kapselgröße der beschichteten Seite nicht zum Verlust des homogenen Charakters der Kapsel.

BMP-2 induziert keine heterotopen Ossifikationen. Allerdings fördert BMP-2 die Bindegewebsfaserbildung auf der beschichteten Seite der Fremdkörperkapsel verglichen mit der gegenüberliegenden Seite und im Gruppenvergleich insgesamt. Dadurch ist nicht nur die Kapselgröße der beschichteten Seite deutlich erhöht, sondern diese Strukturen sind zudem heterogener.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Als Résumé der vorliegenden standardisierten Untersuchung ergibt sich, dass es nach dem Einsatz der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- β 1 und BMP-2 über eine lokale Applikation von PDLLA-beschichteten Titanimplantaten zu keinen heterotopen Ossifikationen kommt. Allerdings kommt es zu einer stärker ausgeprägten Fremdkörperkapselbildung auf der beschichteten Implantatseite. Der lokale Nebeneffekt durch die lokale Applikation der genannten WFs von PDLLA-beschichteten Titanimplantaten beschränkt sich in dieser Untersuchung somit lediglich auf eine erhöhte Fremdkörperreaktion in Form einer vermehrter Bindegewebsbildung auf der beschichteten Implantatseite abhängig vom verwendeten WF in der hier verabreichten Dosis. Weitere lokale Nebeneffekte wurden nicht festgestellt.

4.2 Versuchsmodell

Die Versuche am Schaf vorzunehmen, war eine sinnvolle Abstimmung mit dem Versuch G0110/00 (Bio-Cage II) und G0282/00 (Bio-Cage III) von Dr. med. Kandziora, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie. Dies war unter der obigen Versuchsnummer vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit Berlin genehmigt worden. Beide Versuchseinheiten zu koppeln war möglich, da keine Korrelation zur Weichteilstudie zu befürchten war. Für den Sitz der Implantate der vorliegenden Studie war eine große Kontaktfläche zum Muskelgewebe erforderlich. Es bot sich der M. sternocleidomastoideus an. Dieser Muskel wurde für die Versuche von Dr. med. Kandziora beim Zugang zur Halswirbelsäule für die Bio-Cage-Implantation freigelegt und verfügt über eine ausreichende Kontaktfläche für die Implantate. Entsprechend war keine weitere Incision an anderer Stelle erforderlich und die Tiere wurden nicht zusätzlich belastet.

Aus der Literatur sind überwiegend Rattenmodelle für Weichteilstudien bekannt. Dabei wird mit Gesamtanzahlen von 20, 25, 45, aber auch 56 und 64 Tieren gearbeitet (Yamazaki et al., 1996; Kusumoto et al., 1997; Oda et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Liang et al., 2005; Nagai et al., 1999; Vehof et al., 2001; Sugiyama et al., 2007). Um diese Untersuchungen jedoch am Kleintiermodell vorzunehmen, hätten die Implantate an mehreren Körperregionen platziert und damit mehr Gewebe traumatisiert werden müssen. Das Kleintier wäre in dieser Studie einer wesentlich höheren Belastung ausgesetzt gewesen als ein Großtier. In diesem Fall konnte die Implantate in nur einen Muskel eingesetzt und dieser nach Tötung im ganzen entnommen werden. Das erleichterte die Präparatentnahme zur weiteren Bearbeitung und diente insgesamt der standardisierten Versuchsdurchführung. In jeweils 3 Tiere pro Gruppe wurden 4 Implantate in den Muskel eingesetzt. So ergab sich eine Gesamtanzahl von 12 Implantaten pro Gruppe. Insgesamt wurden 48 Implantate verwendet, so dass für die anschließende Auswertung ausreichend Implantate einer zu untersuchenden Gruppe zur Verfügung standen. Aus diesem Grund waren 12 Schafe für diese Studie völlig ausreichend, um qualitative Schlussfolgerungen zu erzielen.

Diese Versuchsdurchführung basiert insgesamt auf der Rechtsgrundlage des Tierschutzgesetzes (explizit: § 2, §4; §5 - 9a; §18).

4.3 Zeitdauer der Versuche

Um diesen Langzeiteffekt der mit WFs beschichteten PDLLA-Implantate im Weichteilgewebe zu prüfen, wurden sie 12 Wochen im Muskelgewebe belassen.

Es ist davon auszugehen, dass nach 12 Wochen alle Regenerations- und Reparatursprozesse im Weichteilgewebe abgeschlossen sind. Nach Literaturangaben haben lokale Applikationen von WFs zeitabhängig heterotope Ossifikationen im ektopen Rattenmodell induziert (Urist, 1965; Wang et al., 1990; Yamazaki et al., 1996; Kusumoto et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Okubo et al., 2000; Vehof et al., 2001; Kroese-Deutman et al., 2005; Liang et al., 2005; Hou, et al., 2007).

In Vorarbeiten wurde die Wirkung der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten nach 28, 42 und 84 Tagen untersucht. Dabei konnte die positive Wirkung der WFs auf die Frakturheilung festgestellt werden. Basierend auf diesen Erfahrungen, schien es sinnvoll, für die Weichteilstudie den Zeitpunkt nach 84 Tagen zu wählen, um vergleichbare Vorgaben berücksichtigen zu können.

Im Hinblick auf die histologischen Daten war der Zeitraum von 12 Wochen gut gewählt, da die Implantate im Muskelgewebe vollständig verwachsen waren und entsprechend problemlos verarbeitet werden konnten.

4.4 Röntgen

Auf den Röntgenaufnahmen beim dorso-ventralen Strahlengang, war die Halsregion am besten zu befunden. Das Muskelgewebe, das dem Implantat direkt anlag, war übersichtlich dargestellt, so dass etwaige Ossifikationsherde in der beschichteten Implantatregion gut zu entdecken gewesen wären. Dies gelang zwei unabhängig voneinander arbeitenden Radiologen nicht, d. h. ein Mineralisationsherd oder eine heterotope Ossifikation wurde röntgenologisch nicht nachgewiesen.

Im Einwachsverhalten der Implantate in das Muskelgewebe konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Aus radiologischer Sicht kann folglich davon ausgegangen werden, dass die lokale Applikation der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten zu keiner Ossifikation führt, die röntgenologisch nachweisbar ist.

4.5 Fluorochrommarkierung

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde der Sequenzmarker Xylenol-Orange gewählt. Er hat sich zum Nachweis einer Neumineralisierung im Knochengewebe bewährt (Weiler et al., 2002; Pautke et al., 2005; Pautke et al., 2007) und ist speziell für die monochrome Sequenzmarkierung geeignet (Rahn und Perren, 1971). Der Sequenzmarker lagert sich direkt nach der Applikation im neumineralisierten Gewebe ein. Aus diesem Grund wurde der Fluoreszenzfarbstoff in dieser Studie zwei Tage vor der Tötung appliziert, da der Mineralisationszeitpunkt nach 12 Wochen untersucht werden sollte. Mit dieser Methode sollten etwaige heterotope Ossifikationen im Muskelgewebsschliff nachgewiesen werden. Native Knochenschliffe dienten als Kontrollgewebe der erfolgreichen Einlagerung des Markers im Knochen. Die Auswertung der Muskelschliffpräparate erfolgte sowohl über Durchlicht- als auch Fluoreszenzmikroskopie, da die Präparate eine starke Eigenfluoreszenz besaßen. Auf diese Weise konnten Artefakte ausgeschlossen werden. In der Studie wiesen die nativen Knochenschliffpräparate eine erfolgreiche Sequenzmarkierung durch fluoreszierendes, neumineralisiertes Gewebe auf.

In den Muskelschliffpräparaten konnten dagegen in keiner der vier Gruppen Fluoreszenzen gefunden werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass keine Mineralisationsherde und somit keine heterotopen Ossifikationen durch die lokale Applikation der WFs von PDLA-beschichteten Implantaten hervorgerufen werden.

4.6 Histomorphologie

Mineralisationen und Bindegewebsreaktionen im Gewebe um die Implantatregion sollten histomorphologisch aufgedeckt werden. Deswegen war es wichtig, eine möglichst große Kontaktfläche zum Muskelgewebe für die Auswertung zu gewinnen. Dazu wurden die Implantate im Muskelgewebe belassen und im Kunststoffpolymer Technovit 9100 eingebettet. Es wurden Längsschnitte des Muskelschliffpräparates hergestellt. So konnten auf der gesamten Länge des Implantates mögliche heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen deutlicher dargestellt werden und sowohl auf der beschichteten als auch unbeschichteten Implantatseite die Einheilung beurteilt werden. Querschliffe wurden nicht angefertigt, da nur eine geringe Fläche der beschichteten und unbeschichteten Implantatseite zur Beurteilung vorhanden gewesen wäre.

Immunhistologische Färbungen konnten nicht vorgenommen werden. Zu diesem Zweck hätte eine Parafineinbettung erfolgen müssen, was die Entfernung der Implantate aus dem Muskelgewebe erforderlich gemacht hätte. Dabei wäre das Weichteilgewebe zerstört worden. Aus jedem Titanimplantat wurden mehrere Schliffe gewonnen und ein repräsentatives Präparat davon ausgewertet. Die Dicke betrug im Durchschnitt $140\ \mu\text{m}$, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Implantate bei dieser Schliffdicke im Muskelgewebe stabil eingebettet bleiben. In der Literatur ist für Knochenschliffpräparate aufgrund der größeren Stabilität der Präparate lediglich eine Dicke von $80\ \mu\text{m}$ angegeben (Weiler et al., 2002; Schmidmaier et al., 2002b).

In der eigenen Studie konnten wegen der hohen Schliffdicke keine Zelldifferenzierungen vorgenommen werden. Ziel war es jedoch, das Gewebe und die Strukturen zu differenzieren, um gegebenenfalls heterotope Ossifikationen, etwaige Mineralisationen sowie Bindegewebsreaktionen zu untersuchen. Mit der Färbung sollten Mineralisationsfronten festgestellt werden. Die Van Kossa/Safranin O´ Färbung ist eine bewährte Kontrastfärbung. Durch Schwärzung werden Mineralisationen im Gewebe kenntlich. Die Masson-Goldner-Färbung, die ebenfalls zur Darstellung von mineralisiertem Gewebe (lichtgrün) verwendet wird, hatte sich in Vorversuchen bei der Färbung der Kunststoffschliffe nicht bewährt. Die Muskelschliffpräparate zeigten über der beschichteten Seite nach Van Kossa/Safranin O´-Färbung nicht die übliche Schwarzfärbung mineralisierten Knochen- und Knorpelgewebes, so dass Mineralisations- und Ossifikationsherde im Muskelgewebe auszuschließen waren.

Bei der Durchsicht der Präparate fielen in Gruppe I-III Einzelschliffe auf, die an den Randbereichen der Implantate erhöhte Zelllagenanteile aus Bindegewebsfasergewebe aufzeigten und zum Teil in die Umgebung ausstrahlten. Dieses Phänomen wurde beschrieben, aber bei den Auswertungen der Präparate keine Bedeutung beigemessen, da diese vermutlich durch die nicht ganz einfache und dadurch notwendige mehrmalige Platzierung der Implantate am gleichen Ort im M. sternomastoideus entstanden waren und beim Heilungsprozess zu verstärkter Bindegewebsfaserbildung geführt haben.

Bei der histomorphologischen Betrachtung wurden auch 4 Formen der Spaltbildung festgestellt. Diese Beobachtungen wurden in den Ergebnissen mitaufgeführt. Allerdings wurde diese nicht bewertet, da diese mit größter Wahrscheinlichkeit auf den histologischen Aufarbeitungsprozess zurückzuführen sind.

Bei der Auswertung im Durchlichtmikroskop stellte sich ebenfalls heraus, dass die Muskelschliffpräparate als Folge des Sägevorgangs von einem starken Abrieb geprägt waren, wie aus der Schwärzung im Schliff zu erkennen war. Dieses Phänomen wurde histologisch als Artefakte befundet und nicht bewertet.

In der Studie war es in jeder der vier Gruppen zu einer Fremdkörperreaktion in Form einer Fremdkörperkapselbildung gekommen, deren Ausmaß von der Beschichtung der Implantate bestimmt wurde. Die Fremdkörperkapselausbildung der PDLLA-beschichteten Titanimplantate war auf beiden Seiten gleichgroß und gleichmäßig ausgeprägt. Ihre Ausdehnung entsprach dem Ausmaß der reinen Titanimplantate, so dass bei beiden Gruppen von einer homogenen Fremdkörperkapselbildung gesprochen werden kann. Die mit TGF- β 1 + IGF-I-beschichteten Titanimplantate wiesen dagegen auf der beschichteten Seite bei fünf Präparaten einen erhöhten Anteil von Bindegewebsfasern auf, ohne dass sie die homogene Struktur der Bindegewebskapsel verloren. Die BMP-2-beschichteten Implantate waren jedoch durch ein heterogenes Bild der Kapsel geprägt. Das Ausmaß der Bindegewebskapsel differierte dabei zur unbeschichteten Gegenseite und zu den Gruppen I-III.

4.6.1 Vergleich mit anderen Studien

Die Implantation von Trägermaterial wie Stahl, Titan und auch biodegradierbaren Materialien, wie PDLLA als synthetisches Polymer, rufen im Organismus eine Fremdkörperreaktion hervor. Das Ausmaß dieser Reaktion ist abhängig von den Materialeigenschaften. Dazu zählt die Fähigkeit der Verstoffwechslung, die Degradationsweise sowie auch seine Resorbierbarkeit im Organismus. In zahlreichen Studien haben sich sowohl Titan- als auch PDLLA-Implantate als gleichwertig in der Gewebsreaktion erwiesen. Sie zeigen insgesamt ein inertes Einwachsverhalten entweder in Form einer milden Bindegewebskapselbildung und nur niedrigen Zellinfiltrationen oder so gut wie keine bzw. völlig fehlende Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen (Torgersen et al., 1995a; Nazzal et al., 2006; Kontio et al., 2005; Rasse et al., 2007). In dieser Studie konnte ebenfalls deutlich gemacht werden, dass sich PDLLA-beschichtete Titanimplantate gleichwertig zu reinen Titanimplantaten erweisen, indem beide Implantate ein reaktionsarmes Einwachsverhalten im Muskel aufgewiesen haben, das sich lediglich durch eine auf beiden Seite gleichgroße und homogene Bindegewebskapselbildung um das Implantat darstellten.

Ziel der Forschung in der orthopädischen Chirurgie ist es, diese Fremdkörperreaktionen durch biodegradierbare Implantate so gering wie möglich zu halten bzw. möglichst zu vermeiden (Hoffmann et al., 1997; Weiler et al., 1996). Diese Untersuchung konnte darstellen, dass es sich bei PDLLA-Beschichtungen um einen reaktionsarmen Wirkstoffträger handelt, der lediglich zu milden Fremdkörperreaktionen führt.

Bekannt ist, dass BMP-2 eine heterotope Ossifikation in verschiedenen Geweben auslösen kann (Pajamäki et al., 1993; Okihana und Yang, 1997; Yamamoto et al., 1998; Kato et al., 2006). Okubo et al. (2000), Wang et al. (1990) und Yoshida et al. (1998) fanden heraus, dass BMP-2 vor allem in Muskeln ein besonders hohes osteoinduktives Potential aufweist, weil günstige Bedingungen wie Gefäßreichtum, hoher O₂-Partialdruck, sowie eine Differen-

zierungsneigung der Mesenchymzellen vorherrschen. Aus der Literatur ist bisher nicht bekannt, ob eine heterotope Ossifikation durch die Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und IGF-I induziert werden kann.

In dieser Studie konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch die lokale Applikation der WFs TGF- β 1 und IGF-I keine heterotopen Ossifikationen im Weichteilgewebe ausgelöst werden. Zahlreiche in vivo Studien haben jedoch gezeigt, dass TGF- β 1 + IGF-I in der Lage sind, das Muskelzellgewebe zu beeinflussen sowie die Muskelregeneration zu stimulieren (Florini et al., 1991; Johnson und Allen, 1990; Liu und Derynck, 2004; Menetrey et al., 2000; Pelosi et al., 2007). Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie kann angenommen werden, dass WFs von einem PDLA-beschichteten Implantat freigesetzt die Bindegewebsfaserbildung anregt. Gestützt wird dies auch durch Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die WFs bei der Wundheilung mitentscheidend sind (Mustoe et al., 1987; Kratz et al., 1994; Sommer, et al., 1991; Pierre et al., 1997; Suh et al., 1992; Ashcroft et al., 1999; Yang et al., 2007). Entsprechend kann angenommen werden, dass durch die lokale Applikation der WFs von einem Wirkstoffträger in die physiologische Regenerations- und Reparationskaskade des Organismus eingegriffen wird und dies zur vermehrten Bindegewebsfaserbildung führen kann abhängig vom eingesetzten WF.

Die eigenen Ergebnisse zeigen aber auch, dass BMP-2 im Vergleich zur TGF- β 1 und IGF-I Gruppe sowie zur PDLA und unbeschichteten Gruppe eine intensivere Bindegewebsbildung im Muskelgewebe im Rahmen der Fremdkörpergranulombildung auslöst. Die Fremdkörperreaktion durch die 3 übrigen Gruppen fallen somit eindeutig milder aus. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass BMP-2 zahlreiche Gewebe beeinflusst (Wang et al., 1990; Yamaguchi et al., 1991) und in der Lage ist, die Differenzierungsrichtung der mesenchymalen Zellen zu bestimmen (Katagiri et al., 1994). In dieser Studie konnte das osteoinduktive Potential von BMP-2 im intramuskulären Gewebe nicht bestätigt werden, da keine heterotopen Ossifikationen ausgelöst worden sind. In diesem In vivo Modell hat BMP-2 auch nicht die Differenzierungsrichtung der mesenchymalen Zellen der Muskelzellen zur Osteoblastendifferenzierung stimuliert. Es ist lediglich zu einer erhöhten Bindegewebsfaserbildung und damit zu einer stärker ausgeprägten Bindegewebskapselbildung auf der beschichteten Implantatseite gekommen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass heterotope Ossifikationen durch die Verwendung von derartig BMP-2 beschichteten Implantaten ausgeschlossen werden können. Allerdings bedarf es weiterer Studien, um eine absolut nebeneffektfreie Anwendung dieser Implantatbeschichtungen in der unfallchirurgischen Praxis sicherstellen zu können.

4.7 Dosis

In dieser Arbeit wurden die Wachstumsfaktoren rhIGF-I und rhBMP- 2 in einer Dosis von 50 μg {5% w/w} und für rhTGF- β 1 von 10 μg {1% w/w} appliziert. Dies basiert auf vorhergehenden Studien am Tiermodell der Ratte. Dabei konnte die Frakturheilung beschleunigt werden und durch BMP-2 zusätzlich die biomechanische Steifigkeit erhöht werden (Schmidmaier et al., 2001a; Schmidmaier et al., 2002a).

In dieser Studie sollten mögliche, negative Effekte auf das Weichteilgewebe in Verbindung zur o. g. Dosis untersucht werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass diese verwendete Dosis der WFs bei der Applikation von Poly (D,L-Laktid)-beschichteten Titanimplantaten keine heterotope Ossifikation im Weichteilgewebe induziert. Die Dosis reicht lediglich dazu aus eine vermehrte Bindegewebsfaserbildung auszulösen.

4.7.1 Vergleich mit anderen Studien

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass die WFs die Fraktur- und Knorpeldefektheilung positiv beeinflussen. (Welch et al., 1998; Toriumi et al., 1991; Sellers et al., 1997; Gerhart et al., 1993; Meinel et al., 2001; Blumenfeld et al., 2002; Friesbie et al., 2006; Chu et al., 2007). Die o. g. WFs insgesamt effizient in der chirurgischen und orthopädischen Praxis einzusetzen, ist jedoch bis heute noch schwierig, da sowohl bei der Dosis als auch im Tiermodell noch keine einheitlichen Bedingungen geschaffen sind. Allerdings kann aus verschiedenen Arbeiten eine klare dosisabhängige Wirkung der WFs bezogen auf die Frakturheilung angenommen werden.

Noda et al. (1989) beschreiben, dass die tägliche TGF- β 1 Applikation über einen Zeitraum von 12 Tagen mit den Dosen 1000, 200 und 50 ng in die rechte Seite des parietalen Knochens zu signifikanten Dickenunterschieden bei der größten und mittleren Dosis im Vergleich zur unbehandelten Seite führt. Die tägliche Applikation von IGF-I über einen Zeitraum von 14 Tagen in einer Dosis von 2 mg per subkutaner osmotischer Infusionspumpe ergab ebenfalls eine Beschleunigung der intramembranösen Knochendefekteheilung bei sogenannten „critical size“- Defekten an der Schädelkalotte bei adulten weiblichen Sprague-Dawley Ratten (Thaller et al., 1993). Zegzula et al. (1997) zeigten an der radialen Diaphyse von New Zealand White Kaninchen anhand von unilateralen „critical size“ Segmentaldefekten zum Zeitpunkt von 4 und 8 Wochen radiologisch eine signifikant höhere Knochenbildung bei einer Dosis von 35 und 70 μg im Vergleich zu 17 μg und zur unbehandelten Gruppe. Auch Schimadle et al. (1995) erzielten sowohl radiologisch als auch histologisch bei der höher dosierten BMP-Gruppe eine erhöhte Knochenfusion mit größeren Anteilen trabekulärer Knochenstrukturen. Diese dosisabhängige Wirkung der WFs für die Frakturheilung hat sich auch in zahlreichen anderen Studien immer wieder deutlich gezeigt (Miura et al., 2002; Sumner et al., 2003; Broderick et al., 2005; Fukumoto et al., 2003; Kandziora et al., 2003; Tatakis et al., 2002; Sumner et al., 2004; Faria et al., 2007).

Aus der Literatur geht hervor, dass verschiedene Dosen von BMP-2 am Rattenmodell zu heterotopen Ossifikationen führen und das bereits in relativ niedrigen Dosen von 0,5 μg , 5 μg und auch 50 μg , stets in Abhängigkeit zum verwendeten Carrier (Wang et al., 1990; Okubo et al., 2000; Yoshida et al., 1998; Nakagawa et al., 2001; Oda et al., 1997). Über heterotope Ossifikationen, ausgelöst durch die WFs TGF- β 1 und IGF-I, gibt es keine Informationen. In dieser Arbeit hat die lokale Applikation der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten zu keiner heterotopen Ossifikation geführt. Allerdings ist es bei den mit WFs beschichteten Implantaten auf der Beschichtungsseite zu einer verstärkten Fremdkörperreaktion in Form einer vermehrten Bindegewebsbildung gekommen.

Die im Tiermodell erzielten Ergebnisse lassen auch hier eine klinische Übertragbarkeit hinsichtlich der dosisabhängigen Wirkung der mit WFs beschichteten Implantate im Muskelgewebe vermuten. Diese Untersuchung lässt den Schluss zu, dass die hier verwendete Dosis dieser WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten nicht ausreicht, eine Ossifikation im Muskelgewebe hervorzurufen. Jedoch war eine Wirkung im Weichteilgewebe durch die erhöhte Bindegewebskapselbildung festzustellen. Es ist daher anzunehmen, dass durch die lokale Applikation der WFs von einem Wirkstoffträger diese Dosis ausreicht die Bindegewebsfaserbildung anzuregen, um so eine verstärkte Fremdkörperkapselbildung im Muskelgewebe auszulösen. Diese Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass die hier eingesetzten WF ihre osteoinduktive Wirkung direkt am frakturierten Knochen entfalten, aber keine heterotopen Ossifikationen als Nebeneffekte im Weichteilgewebe zu erwarten sind. Die Verwendung derart mit WFs-beschichteten Implantate in der unfallchirurgischen Praxis würde einen gezielten Einsatz der WFs für die Frakturheilung ermöglichen, ohne dass es zu Ossifikationen im Weichteilgewebe kommt. Die positive Wirkung der WFs auf die Frakturheilung wird bereits ansatzweise in der unfallchirurgischen Praxis genutzt, jedoch ist es bisher noch nicht gelungen, die positive Wirkung am gewünschten Ort vollständig von den unerwünschten Nebeneffekten zu entkoppeln. Die in dieser Untersuchung ermittelten Ergebnisse sollten dazu genutzt werden weitere Studien anzuregen, um dem Ziel der nebeneffektfreien Anwendung derartiger Trägermaterialien näherzukommen. Damit zukünftig die exakte Dosis ermittelt werden kann, die nur den erwünschten Effekt hervorruft.

4.8 Applikationsmethode

In dieser Studie erfolgte die Applikation mittels einer Poly (D,L-Laktid)-Beschichtung von Titanimplantaten. Hierbei wurden 50 μg (5% {w/w}) von BMP-2 und IGF-I sowie 10 μg (1% {w/w}) von TGF- β 1 mit der von Schmidmaier entwickelten Kaltüberzugstechnik mit PDLA (100 mg/1,5 ml Chloroform) verbunden und auf die Plättchen aufgetragen.

Ein Kriterium für die Auswahl der Applikationsmethode der WFs von PDLA-beschichteten Titanimplantaten war vor allem, die Ergebnisse mit denen im Vorfeld durchgeführten Studien vergleichen zu können (Schmidmaier et al., 2001a; Schmidmaier et al., 2002a).

Ein weiteres Kriterium für diese Art der Applikationsmethode war die Tatsache, dass die Herstellung und Einarbeitung der WFs zum Zeitpunkt der Versuche (August - Dezember 2001) noch überwiegend zu Forschungszwecken erfolgte und der Einsatz der WFs mit enormen Kosten verbunden war. Deshalb musste man sich auf die Einarbeitung der WFs in die Titanimplantate beschränken, ohne zusätzliche intramuskuläre WFs-Applikationen in eine Muskeltasche in die Versuchsreihe miteinbringen zu können, um diese ebenso auf heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen zu untersuchen.

Diese Arbeit ist eine Kontrollstudie für die lokale Applikationsweise von Wachstumsfaktoren auf PDLA-beschichteten Implantaten, um mögliche negative Effekte der WFs unter Berücksichtigung der lokalen Applikationsweise zu untersuchen.

4.8.1 Vergleich mit anderen Studien

Einen Trägerstoff auszuwählen, der für Wachstumsfaktoren dienen könnte, ist von seiner Biokompatibilität, Freisetzungskinetik, mechanischen Stabilität sowie Implantathaftung abhängig. In zahlreichen Säugetiermodellen sind bereits verschiedene Materialtypen wie Kollagenschwämme, demineralisierte Knochenmatrix, Keramiken und synthetische Polymere als Wirkstoffträger für Wachstumsfaktoren getestet worden (Winn et al., 1999a; Hollinger und Leong, 1996; Agrawal et al., 1997).

Es ist hinreichend bekannt, dass der Einfluss der WFs entscheidend vom verwendeten Wirkstoffträger abhängt. Winn et al. (1999) geben die Freisetzung des Wachstumsfaktors BMP-2 von einer demineralisierten Knochenmatrix mit einem vollständigen Schub an, auf die eine sich anschließende irreversible Bindung folgt.

Bei Kollagenschwämmen wurde von einer schnellen aber nicht kontinuierlichen Freisetzung der Substanzen berichtet (Bouxsein et al., 2001; Sorensen et al., 1990).

Schmidmaier (1997) hat sich mit der Entwicklung eines biodegradierbaren Poly (D,L-Laktids) beschäftigt, das eine kontinuierliche Freigabe von WFs garantierte. Es zeichnete sich durch eine besonders hohe mechanische Stabilität aus und konnte dadurch sehr gut als Trägerstoff für WFs dienen. In weiteren Studien wurden die Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und IGF-I in Kombination sowie BMP-2 einzeln eingearbeitet und die Wirkung von biologisch aktiven Implantaten auf die Frakturheilung bei der Ratte untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer PDLA-Beschichtung einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung ausübt und keinerlei Hinweise auf systemische oder lokale Nebeneffekte hindeuten (Schmidmaier et al., 2001a; Schmidmaier et al., 2002a). Auch in andern Studien konnte die PDLA-Beschichtung ihren positiven Effekt auf die Frakturheilung unter Beweis stellen, mit entweder nur milden Nebeneffekten oder ohne Nebeneffekte auszulösen (Kontio et al., 2005; Al-Sukhun et al., 2006; Rasse et al., 2007)

Das PDLLA-Beschichtung sowie eine mit WFs beschichtete PDLLA-Beschichtung einer reinen Titanoberfläche überlegen ist, konnte bereits in den Vorarbeiten bewiesen werden (Schmidmaier et al., 2000; Schmidmaier et al., 2001b). Auch anderen Studien haben diese Überlegenheit darstellen können (Wildemann, et al., 2004a; Wildemann, 2005; Lamberg et al., 2006).

Es hat sich gezeigt, dass heterotope Ossifikationen und Fremdkörperreaktionen in Form von Bindegewebskapselbildung carrierabhängig sind. In zahlreichen ektopen Rattenmodellen im Unterhaut- und Muskelgewebe konnten heterotope Ossifikationen durch verschiedene Wirkstoffträger mit BMP-2 kombiniert ausgelöst werden (Sasano et al., 1993; Vehof et al., 2001; Lui et al., 2005; Kato et al., 2006).

In dieser Untersuchung durch die lokale Applikation von BMP-2 auf PDLLA-beschichteten Titanimplantaten im Muskelgewebe konnte dieses Phänomän nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass PDLLA im Muskelgewebe keine heterotopen Ossifikationen in Kombination mit BMP-2 forciert, jedoch auf der Frakturseite die Knochenheilung beschleunigt. Die Kopplung von BMP-2 und PDLLA-beschichteten Implantaten reicht lediglich dazu aus eine erhöhte Fremdkörperreaktion in Form von Bindegewebskapselbildungen auszulösen. Weitere lokale Nebeneffekte sind nicht aufgetreten.

In der Studie konnte jedoch deutlich gemacht werden, dass die Wirkung der WFs nicht nur vom Wirkstoffträger abhängig ist, sondern dass auch eine Abhängigkeit zum Applikationsort besteht, was sich in den Ergebnissen dieser Studie widerspiegelt. Der Einfluss der WFs auf das Muskelgewebe ist hinreichend bekannt. Ebenso weiß man, dass in den Muskel eingebrachte Kollagenschwämme und demineralisierte Knochen mit BMP-2 verbunden heterotope Ossifikationen verursachen (Winn et al., 1999). In diesem Fall blieben die heterotopen Verknochungen aus. Der einzige Nebeneffekt beim Einsatz derartig beschichtete Implantate beschränkt sich lediglich auf eine überschießende Fremdkörperreaktion je nach eingesetztem WF.

Für die unfallchirurgischen Praxis ergeben sich daher folgende Überlegungen aus diesen Ergebnissen. Zur Minimierung von Nebeneffekten sollten derartig beschichtete Implantate im zukünftigen, klinischen Einsatz möglichst genau positioniert werden und direkt dem Knochengewebe aufliegen können, so dass die WFs ihre Wirkung lediglich am gewünschten Zielgewebe, dem Knochengewebe, entfalten können und so die positive Wirkung der WFs auf die Frakturheilung nutzbar gemacht werden kann.

In jedem Fall sollten diese Ergebnisse dazu verwendet werden weitere Studien anzuregen, damit Trägerstoff dahingehend verbessert werden, dass eine nebeneffektfreie Verwendung zukünftig möglich sein wird.

PDLLA-Beschichtungen als Wirkstoffträger für WFs stellen in diesem Zusammenhang eine gute Anwendungsalternativ zu anderen Trägermaterialien dar, weil diese einen fast nebeneffektfreien Einsatz ermöglichen gekoppelt mit den positiven Effekten für die Frakturheilung.

Weitere Vorteile für den Einsatz in der unfallchirurgischen Praxis liegen in der schnellen und einfachen Herstellung der zu beschichteten Implantate durch die von Schmidmaier entwickelte Kaltüberzugstechnik.

Der Einsatz der Applikationsmethode in der Frakturbehandlung bedarf keines zusätzlichen Aufwandes, so dass diese Methode einfach verwendet werden kann.

Die Beschichtung zeichnet sich durch ihre gute Bioverfügbarkeit und höhere Biokompatibilität im Vergleich zu anderen synthetischen Polymeren aus, folglich liegt eine gute Gewebeverträglichkeit vor. Die lokale Applikation der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten entfaltet ihre Wirkung direkt am Freisetzungsort, ohne eine heterotope Ossifikation im Weichteilgewebe hervorzurufen, so dass eine gezielte Anwendung lediglich am gewünschten Einsatzort, dem frakturierten Knochen, möglich ist, um die Heilung positiv zu beeinflussen.

Für die Wahl der lokalen Applikationsmethode sprechen gleichfalls wirtschaftliche Gründe, da geringe WFs-Dosisbereiche ausreichen, um sowohl eine positive Wirkung zu erzielen als auch mit dem Trägerstoff PDLLA verbunden zu werden. Die einfache Herstellung verursacht keine hohen Produktionskosten. Beim klinischen Einsatz entstehen ebenfalls keine weiteren Kosten. Abschließend lässt sich sagen, dass die lokale Applikationsweise der WFs von PDLLA-beschichteten Implantaten die Anforderungen eines optimalen Wirkstoffträgers erfüllen und somit für den klinischen Einsatz durchaus geeignet sind.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel meiner Studie war es zu prüfen, ob gegebenenfalls heterotope Ossifikationen und Bindegewebsreaktionen im Muskelgewebe durch die lokale Applikation der WFs (IGF-I, TGF- β 1, BMP-2) von PDLA-beschichteten Titanimplantaten am Schafsmodell induziert werden. Zum Nachweis wurden Röntgen, Fluorochrommarkierung und Histologie eingesetzt. Im besonderen Maße sollte dabei das Einwachsverhalten der verschiedenen Wachstumsfaktorenbeschichtungen nach 12 Wochen untersucht werden, die in Vorarbeiten unterschiedliche Eigenschaften gezeigt haben.

Bei den Auswertungen haben sich im besonderen überschüssige Bindegewebsreaktionen gezeigt, sowohl bei der TGF- β 1 und IGF-I gekoppelten Gruppe, als auch bei den BMP-2 beschichteten Präparaten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verwendeten Wachstumsfaktoren die Bindegewebsfaserbildung beeinflussen und anregen. BMP-2 nimmt bei gleicher Applikationsweise und anteilig gleicher Dosis jedoch einen größeren Einfluss auf die Regenerations- und Reparationskaskade des Organismus. Im Vergleich löst es eine erhöhte und intensivere Bindegewebskapselbildung aus.

Diese Studie lässt den Schluss zu, dass die verwendete Dosis der eingesetzten Wachstumsfaktoren nicht ausreicht, eine Ossifikation im Weichteilgewebe auszulösen. Allerdings genügt die verabreichte Dosis dazu Bindegewebsreaktionen hervorzurufen.

Ebenso hat sich gezeigt, dass heterotope Ossifikationen und Fremdkörperreaktionen in Form von Bindegewebskapselbildung carrierabhängig sind.

Die Verwendung des Trägermaterials PDLA führt in Kombination mit den WFs TGF- β 1, IGF-I oder BMP-2 nicht zu heterotopen Ossifikationen im Muskelgewebe, jedoch wird eine erhöhte Fremdkörperreaktion abhängig vom verwendeten WF forciert.

Darüber hinaus wurde ebenfalls deutlich gemacht, dass die Wirkung der WFs vom Applikationsort abhängig ist. Die derartige lokale Applikation der WFs im Muskelgewebe löst keine heterotope Ossifikation aus, so dass beim gezielten Einsatz dieser Applikationsform die WFs ihre positive Wirkung direkt am gewünschten Gewebe, dem frakturierten Knochen, entfalten können, ohne zusätzlich zu heterotopen Ossifikationen im Weichteilgewebe zu führen.

Allerdings verursacht diese Applikationsweise im Muskelgewebe eine erhöhte Bindegewebsbildung in Abhängigkeit vom verwendeten WF.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Untersuchung dargestellt werden konnte, dass die lokale Applikation der WFs von PDLA beschichteten Titanimplantaten im Muskelgewebe keine heterotopen Ossifikationen auslösen, jedoch je nach verwendeten Wachstumsfaktorenbeschichtungen unterschiedlich starke Fremdkörperreaktionen in Form einer erhöhten Bindegewebskapselbildung ausgelöst werden. Die lokalen Nebeneffekte dieser Applikationsweise bleiben somit auf die erhöhte Fremdkörperreaktion in Form einer Bindegewebskapselbildung beschränkt. Weitere lokale Nebeneffekte wurden nicht festgestellt.

Insgesamt lässt sich aus dieser Untersuchung schließen, dass die lokale Applikationsweise der Wachstumsfaktoren von PDLA-beschichteten Implantaten die Anforderungen eines optimalen Wirkstoffträgers zu erfüllen scheinen und somit für den klinischen Einsatz eine vielversprechende Anwendungsmöglichkeit darstellt.

5.1 Summary

Examination of ectopic bone formation and connective tissue reaction in muscle tissue after local application of growth factors (IGF-I, TGF- β 1 and BMP-2) from poly (D,L-lactide) coated implants in sheep.

Natalie Palasdi

The growth factors IGF-I, TGF- β 1 and BMP-2 showed a stimulating effect on fracture healing and their cellregulation mechanism in several experimental studies before. The effects of the application of growth factors on soft tissue have not been completely discovered, yet. The aim of the present study was to investigate ectopic bone formation and connective tissue reaction after local application of growth factors (IGF-I, TGF- β 1 and BMP-2) from PDLA coated titanium implants in sheep.

Titanium discs were implanted in the Musculus sternomastoideus (part of M. sternocleidomastoideus) of 12 female Merino-mixed sheep. Sheep were sacrificed for X-ray and histological examination after 12 weeks. For histomorphological evaluation 140 μ m sections were obtained, stained according to Van Kossa/Safranin O' and examined using fluorescence microscopy and light microscopy.

Radiological results showed neither local mineralisation nor ectopic ossification or differences in ingrowth behaviour of the implants in muscle tissue. Fluorescence microscopic evaluations didn't yield any local mineralisation in any of the four groups. Histomorphological results showed no bone or cartilage tissue mineralisation. No local mineralisation and also no local ossifications over the coated implants were seen. In all specimen connective tissue capsule formation around implants had been build up. Severity of capsule formation depended on the type of growth factor used.

The results support the hypothesis that growth factors (IGF-I, TGF- β 1 and BMP-2) stimulated connective tissue formation. The applied amount did not stimulate heterotopic ossification in soft tissue. PDLA coating of implants seems to meet the requirements of a local drug deliver system. Its use in a clinical setting as a drug carrier seems to be a promising treatment option.

6. Abkürzungen

A	Amper
Abb.	Abbildung
aFGF	acidic fibroblast growth factor
Al ₂ O ₃	Aluminiumtrioxid
AS	Aminosäuren
Aqua dest.	Aqua destillata
BAN	biomaterial and nail
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP-2	bone morphogenetic growth factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
° C	Grad Celcium
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DBM	demineralisierte Knochenmatrix
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid
et al.	et alii
EKG	Elektrokardiogramm
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
GDFs	growth and differentiation factors
GH	growth hormone
HWS	Halswirbelsäule
HG re	Hintergliedmasse rechts
h	hour
IGF-I	insulin-like growth factor
i. v.	intravenös
K	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
LM	Lebendmasse
mRNA	messenger ribonucleic acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mAs	Milliamperesekunden
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min.	Minute
M	molar
MG	Molekulargewicht
ng	Nanogramm
Na	Natrium
NaCl ₂	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

Nr.	Nummer
o. g.	oben genannten
OP	Operation
PDGF	platelet derived growth factor
PDLLA	Poly (D,L-Laktid)
PGA	polyglycolic acid
rhBMP-2	rekombinates humanes bone morphogenetic growth factor two
rhTGF- β	rekombinates humanes transforming growth factor beta
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SGF	somatomedin growth factor
s. c.	subkutan
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor beta
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol %	Volumenprozent
VG li; re	Vordergliedmasse links; rechts
WF	Wachstumsfaktor
WFs	Wachstumsfaktoren
w/w	weight to weight
Wo	Woche

7. Literatur

- Abrahamsson, S. O., Lundborg, G., Lohmander, L. S. (1991). Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res*, **9(4)**: 495 - 502.
- Agrawal, C. M., Pennick, A., Wang, X., Schenck, R. C. (1997). Porous-coated titanium implant impregnated with a biodegradable protein delivery system. *J Biomed Mater Res*, **36**: 516 - 521.
- Allen, R. E., und Boxhorn, L. K. (1987). Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol*, **133(3)**: 567 - 572.
- Ames, C. P., Smith, J. S., Preul, M. C., Crawford, N. R., Kim, G. E., Nottmeier, E., Chamberlain, R., Speiser, B., Sonntag, V. K., Dickman, C. A. (2005). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in an experimental model of spinal fusion in a radiated area. *Spine*, **30(23)**: 2585 - 2592.
- Al-Sukhun, J. Törnwall, J., Lindqvist, C., Kontio, R. (2006). Bioresorbable poly-L/DL-lactide (P[L/DL]LA 70/30) plates are reliable for repairing large inferior orbital wall bony defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*, **64(1)**: 47 - 55.
- Andrew, J., Hoyland, J., Andrew, S. M., Freemont, A. J., Marsh, D. (1993a). Demonstration of TGF-beta 1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. *Calcif Tissue Int*, **52**: 74 - 78.
- Andrew, J. G., Hoyland, J., Freemont, A. J., Marsh, D. (1993b). Insulin-like growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int*, **53**: 97 - 102.
- Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. J., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C., Roberts A. B. (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*, **1**: 260 - 266.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., Sporn, M. B. (1983). Transforming growth factor- β in human platelets. *J Biol Chem*, **258(11)**: 7155 - 7160.
- Assoian, R. K., und Sporn, M. B. (1986). Type- β transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*, **102**: 1217 - 1223.
- Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A. (1999). Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, **14(11)**: 1805 - 1815.
- Beck, L. S., Chen, T. L., Hirabayashi, S. E., Deguzman, L., Lee, W. P., Mc Fatridge, L. L., Xu, Y., Bates, R. L., Ammann, A. J. (1990). Accelerated healing on ulcer wounds in the rabbit ear by recombinant human transforming growth factor β -1. *Growth Factors*, **2(4)**: 273 - 282.

- Beck, L. S., Deguzman, L., Lee, W. P., Xu, Y., Mc Fatridge, L. A., Amento, E. P. (1991). TGF- β 1 accelerates wound healing: Reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. *Growth Factors*, **5**: 295 - 304.
- Beck, L., Edward, P., Amento, E., Xu, Y., Deguzman, L., Lee, W. P., Nguyen, T., Gillet, N. A. (1993). TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: Temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res*, **8(6)**: 753 - 761.
- Bellows, C. G., Jia, D., Jia, Y., Hassanloo, A., Heersche, J. N. (2006). Different effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on osteoprogenitors and adipocyte progenitors in fetal rat bone cell populations. *Calcif Tissue Int*, **79(1)**: 57 - 65.
- Blumenfeld, I., Srouji, S. Lanir, Y., Laufer, D., Livne, E. (2002). Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF- β and IGF-I. *Exp Gerontol*, **37**: 553 - 565.
- Böstman, O. (1991). Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *J Bone Joint Surg Br*: **73**: 679 - 682.
- Böstman, O. (1992). Intense granulomatous inflammatory lesions associated with absorbable internal fixation devices made of polyglycolide in ankle fractures. *Clin Orthop Relat Res*, **278**: 193 - 198.
- Böstman, O., und Pihlajamäki, H. (2000). Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, **21**: 2615 – 2621.
- Bolander, M. E. (1992). Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, **200**: 165 - 170.
- Bonewald, L. F. (1999). Regulation and regulatory activities of transforming growth factor β . *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **9(1)**: 33 - 44.
- Bonewald, L. F., und Mudy, G. R. (1990). Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*, **250**: 261 - 276.
- Bostrom, M. P. G. (1998). Expression of bone morphogenetic protein in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, **355**: 116 - 123.
- Bostrom, M. P., Lana, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D., Rosen, V. M. (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res*, **13(3)**: 357 - 367.
- Boudignon, B. M., Bikle, D. D., Kurimoto, P., Elalieh, H., Nishida, S., Wang, Y., Burghardt, A., Majumdar, S., Orwoll, B. E., Rosen, C., Halloran, B. P. (2007). Insulin-like growth factor-I stimulates recovery of bone lost after a period of skeletal unloading. *J Appl Physiol*, **103 (1)**: 125 - 131.

- Bourque, W. T., Gross, M., Hall, B. K. (1993). Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol*, **37**: 573 - 579.
- Bouxsein, M. L., Turek, T. J., Blake, C. A., D'Augusta, D., Li, X., Stevens, M., Seeherman, H. J., Wozney, J. M. (2001). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am*, **83-A(8)**: 1219 -1230.
- Boyne, P. J. (1996). Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone*, **19(1), (Suppl)**: 83 - 92.
- Boyne, P. J. (2001). Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am*, **83-A (Suppl 1), (Pt 2)**: 146 - 150.
- Boyne, P. J. Salina, S., Nakamura, A., Audia, F., Shabahang, S (2006). Bone regeneration using rhBMP-2 induction in hemimandibulectomy type defects of elderly sub-human primates. *Cell Tissue Bank*, **7(1)**: 1 - 10.
- Broderick, E., Infanger, S., Turner, T. M., Sumner, D. R. (2005). Depressed bone mineralization following high dose TGF-beta 1 application in an orthopedic implant model. *Calcif Tissue Int*, **76(5)**: 379 - 384.
- Burk, H. C. (1986). Fluorochromierung. In: Burk, H. C. (eds) *Histologische Technik - Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*. 6. Aufl., 164 - 166, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Burkhardt, R. (1966). Präparatorische Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. 2. Ein neues Verfahren zur histologischen Präparation von Biopsien aus Knochenmark. *Blut*, **14**: 30 - 40.
- Canalis, E. (1980). Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest*, **66**: 709 - 719.
- Canalis, E., Pash, J., Varghese, S. (1993). Skeletal growth factors. *Cri Rev Eukaryot Gene Expr*, **3(3)**: 155 - 166.
- Centrella, M., Mc Carthy, T. L., Canalis, E. (1991). Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am*, **73-A(9)**: 1418 - 1428.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G. R., (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, **22 (4)**: 233 - 241.
- Chu, T. M., Sargent, P., Warden, S. J., Turner, C. H., Stewart, R. L. (2006). Preliminary evaluation of a load-bearing BMP-2 carrier for segmental defect regeneration. *Biomed Sci Instrum*, **42**: 42 - 47.
- Chu, T. M., Warden, S. J., Turner, C. H., Stewart, R. L. (2007). Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*, **28(3)**: 459 - 467.

- Ciarmatori, S., Kiepe, D., Haarmann, A., Huegel, U., Tönshoff, B. (2007). Signaling-mechanisms leading to regulation of proliferation and differentiation of the mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18 in response to IGF-I. *J Mol Endocrinol*, **38(4)**: 493 - 508.
- Claes, L., und Ignatius, A. (2002). Development of new, biodegradable implants. *Chirurg*, **73**: 990 - 996.
- Clarke, D. A., und Coker, R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol*, **30**: 293 - 298.
- Cochran, D. L., Schenk, R., Buser, D., Wozney, J. M., Jones, A. A. (1999). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol*, **70(2)**: 139 - 150.
- Critchlow, M. A., Bland, Y. S., Ashhurst, D. E. (1995). The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, **16(5)**: 521 - 527.
- Cutright D. E., und Hunsuck, E. E. (1971). Tissue reaction to the biodegradable polylactid acid suture. *J Oral Surg*, **31**: 134 - 139.
- Dallas, S. L, Park-Snyker, S., Miyazono, K., Twardzik, D., Mundy, G. R., Bonewald, L. F. (1994). Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J Biol Chem* **269(9)**: 6815 - 6822.
- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y., Davies, D. R., (1992). Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, **257 (5068)**: 369 - 373
- Daughaday, W. H., Hall, K., Salmon, Jr. W. D., Van den Brande, J. L., Van Wyk, J. J. (1987). On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *Endocrinology*, **121**: 1911 - 1912.
- Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R., K., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Goeddel, D. V. (1985). Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, **316 (6030)**: 701 - 705.
- Ducy, P., und Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic protein. *Kidney Int*, **57**: 2207 - 2214.
- Eckardt, H., Christensen, K. S., Lind, M., Hansen E. S., Hall, D. W., Hvid, I. (2005). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*, **36(4)**: 489 - 494.

Edwards, R. B., Seeherman, H. J., Bogdanske, J. J., Devitt, J., Vanderby, R., Markel, M. D. (2004). Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy. *J Bone Joint Surg Am*. **86-A(7)**: 1425 - 1438.

Ellenberger, W., Baum, H., Zietzschmann, O. (1943). Vergleichende Darstellung des M. sternocleidomastoideus, schematisch. In: Ellenberger, W. (eds) *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*. 18. Auflage, Abb. 415, Springer Verlag, Berlin

Einhorn, T., Majeska, R. J., Mohaideen, A., Kagel, E. M., Boussein, M. L., Turek, T. J., Wozney, J. M. (2003). A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*, **85-A**: 1425 - 1435.

Ewton, D. Z., Falen, S. L., Florini, J. R. (1987). The type II IGF receptor has low affinity for IGF-I analogs: pleiotropic actions of IGFs on myoblasts are apparently mediated by the type I receptor. *Endocrinology*, **120**: 115 - 124.

Faria, M. L., Lu, Y., Heaney, K., Uthamanthil, R. K., Muir, P., Markel, M. D. (2007). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in absorbable collagen sponge enhances bone healing of tibial osteotomies in dogs. *Vet Surg*, **36(2)**: 122 - 131.

Florini, J. R., Ewton, D. Z., Roof, S. L. (1991). Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol*, **5**: 718 - 724.

Florini, J. R., und Magri, K. A. (1989). Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am J Physiol*, **256(4 Pt 1)**: C701 - C711.

Florini, J. R., Roberts, A. B., Ewton, D. Z., Falen, S. L., Flanders, K. C., Sporn, M. B. (1986). Transforming growth factor- β . A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by Buffalo rat liver cells. *J Biol Chem*, **261(35)**: 16509 - 16513.

Frisbie, D. D., Morisset, S., Ho, C. P., Rodkey, W. G., Steadman, J. R., Mc Ilwraith, C. W. (2006). Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med*, **34(11)**: 1824 - 1831.

Fujimoto, R., Tanizawa, T., Nishida, S., Yamamoto, N., Soshi, S., Endo, N., Takahashi, H. E. (1999). Local effects of transforming growth factor-beta 1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab*, **17**: 11 - 17.

Fukumoto, T. Sperling, J. W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J. S., Reinholz, G. G., Conover, C. A., O'Driscoll, S. W. (2003). Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, **11(1)**: 55 - 64.

- Gerhart, T. N., Kirker-Head, C. A., Kriz, M. J. Holtrop, M. E., Henning, G. E., Hipp, J., Schelling, S. H., Wang, E. (1993). Healing segmental femoral defect in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*, **293**: 317 - 326.
- Gill, T. J., Mc Culloch, P. C., Glasson, S. S., Blanchet, T., Morris, E. A. (2005). Chondral defect repair after the microfracture procedure: a nonhuman primate model. *Am J Sports Med*, **33(5)**: 680 - 685.
- Göpferich, A. (1998). Bioresorbable polymers as drug delivery systems. In: Walenkamp, G., (eds) *Biomaterials in Surgery*. 121 - 127, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Gogolewski, S. (2000). Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*, **31(Suppl 4)**: 28 - 32.
- Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C., Taga, R. (2005). Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res*, **38**: 1463 - 1473.
- Hasegawa, Y., Sakano, S., Iwase, T., Warashina, H. (2002). The long-term behavior of Poly(L-lactide) screws in a minipig fracture model: Preliminary report. *J Biomed Mater Res*, **63**: 679 - 685.
- Hock, J. M., Centrella, M., Canalis, E. (1988). Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, **122**: 254 - 260.
- Hoffmann, R., Krettek, C., Haas, N., Tschernhe H. (1989). Die distale Radiusfraktur. Frakturstabilisierung mit biodegradablen Osteosynthesestiften. (Biofix). *Unfallchirurg*, **92**: 430 - 434 .
- Hoffmann, R., Weiler, A., Helling, H.-J., Krettek, C., Rehm, K. (1997). Lokale Fremdkörperreaktion auf biodegradierbare Implantate - Eine Klassifikation. *Unfallchirurg*, **100**: 658 - 666.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, **10**: 1580 - 1594.
- Hollinger, J. O.n und Leong, K. (1996). Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenic proteins. *Biomaterials*, **17**: 187 - 194.
- Hou, R., Chen, F., Yang, Y., Cheng, X., Gao, Z., Yang, H. O., Wu, W., Mao, T. (2007b). Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model. *J Biomed Mater Res*, **80(1)**: 85 - 93.
- Hou, L. T., Lui, C. M., Liu, B. Y., Chang, P. C., Chen, M. H., Ho, M. H., Jehng, S. M., Liu, H. C. (2007). Tissue engineering bone formation in novel recombinant human bone morphogenic protein 2-atelocollagen composite scaffolds. *J Periodontol*, **78(2)**: 335 - 343.

- Isgaard, J., Nilsson, A., Lindahl, A., Jansson, J.-O., Isaksson, O. G. P. (1986). Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol*, **250**: 367 - 372.
- Ishidou, Y., Kitajima, I., Obama, H., Maruyama, I., Murata, F., Imamura, T., Yamada, N., Dijke, P. T., Miyazono, K., Sakou, T. (1995). Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res*, **10(11)**: 1651 - 1659.
- Jackson, D. W., Lalor, P. A., Aberman, H. M., Simon, T. M. (2001). Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*, **83-A(1)**: 53 - 64.
- Johnson, S.E., und Allen, R. E. (1990). The effects of bFGF, IGF-I and TGF-beta on RMo skeletal muscle cell proliferation and differentiation. *Exp Cell Res*, **187**: 250 -254.
- Jones, J. I. und Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions [Review]. *Endocr Rev*, **16(1)**: 3 - 34.
- Joyce, M. E., Jingushi, S., Bolander, M. E. (1990a). Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am*, **21(1)**: 199 - 209.
- Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Bolander, M. E. (1990b). Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol*, **110**: 2195 - 2207.
- Kanaan, R. A., und Kanaan, L. A. (2006). Transforming growth factor β 1, bone connection. *Med Sci Monit*, **12(8)**: RA164 - 169.
- Kandziora, F., Pflugmacher, R. Scholz, M., Schäfer, J., Schollmeier, G. Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M. Haas, N. P. (2003). Dose-dependent effects of combined IGF-I and TGF-beta 1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J*, **12(5)**: 364 - 373.
- Katagiri, K., Yamaguchi, A., Komaki, M., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisava-Sehra, A., Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into osteoblast lineage. *J Cell Biol*, **127(6 Pt 1)**: 1755 - 1766.
- Kato, M., Namikawa, T., Terai, H., Hoshino, M., Miyamoto, S., Takaoka, K. (2006). Ectopic bone formation in mice associated with a lactic acid/dioxanone/ethylene glycol copolymer-tricalcium phosphate composite with added recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*, **27(21)**: 3927 - 3933.
- Kiepe, D., Ciarmatori, S., Hoefflich, A., Wolf, E., Tönshoff, B. (2005). Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology*, **146(7)**: 3096 - 3104.

- Kiepe, D., Ulinski, T., Powell, D. R., Durham, S. K., Mehls, O. Tönshoff, B. (2002). Differential effects of insulin-like growth factor binding proteins-1, -2, -3 and -6 on cultured growth plate chondrocytes. *Kidney Int*, **62**: 1591 - 1600.
- Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T., Rosenfeld, R. G. (1997). Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding protein (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 12981 - 12986.
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF- β -superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, **8**: 133 - 146.
- Kirker-Head, C., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Betz, O., Merkle, H. P., Hilbe, M., von Rechenberg, B., Mc Cool, J., Abrahamsen, L., Nazarian, A., Cory, E., Curtis, M., Kaplan, D., Meinel, L. (2007). BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone*, **41** (2): 247 – 255.
- Klapper, D. G., Svoboda, M. E., Van Wyk, J. J. (1983). Sequence analysis of somatomedin-C. Confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **112**(6): 2215 - 2217.
- Kontio, R., Ruuttila, P., Lindroos, L., Suuronen, R., Salo, A., Lindqvist, C., Virtanen, I., Konttinen Y. T. (2005). Biodegradable polydioxanone and poly(l/d) lactide implant: an experimental study on peri-implant tissue response. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **34**(7): 766 - 776.
- Kraiwattanapong, C., Boden, S. D., Louis-Ugbo, J., Attallah, E., Barnes, B., Hutton, W. C. (2005). Comparison of healos/bone marrow to INFUSE(rhBMP-2/ACS) with a collagen-ceramic sponge bulking agent as graft substitutes for lumbar spine fusion. *Spine*, **30**(9): 1001 - 1007.
- Kratz, G., Lake, M., Gidlund, M. (1994). Insulin-like growth factor-I and -II and their role in the re-epithelisation of wounds; Interactions with insulin-like growth factor binding protein Typ I. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.*, **28**: 107 - 112.
- Kroese-Deutman, H. C., Ruhé, P. Q., Spauwen, P. H. Jansen, J. A. (2005). Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials*, **26**(10): 1131 - 1138.
- Kulkarni, R. K., Pani, K. C., Neuman, C., Leonard, F. (1966). Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg*, **93**: 839 - 843.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y. (1997). Self-regenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, ateleopeptide Type I collagen and porous hydroxyapatite. *J Craniomaxillofac Surg*, **24**: 360 - 365.
- Lamberg, A., Schmidmaier, G., Soballe, K., Elmengaard, B. (2006). Locally delivered TGF-beta 1 and IGF-I enhance the fixation of titanium implants: a study in dogs. *Acta Orthop*, **77**(5): 799 - 805.

- Landes, C. A., Ballon, A., Roth, C. (2006). Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P (L/DL)LA implants: a 5-year in patient biocompatibility and degradation experience. *Plast Reconstr Surg*, **117(7)**: 2347 - 2360.
- Lee, C. G., Kang, H.-R., Homer, R. J., Chupp, G., Elias, J. A. (2006). Transgenic modeling of transforming growth factor- β 1. Role of apoptosis in fibrosis and alveolar remodeling. *Proc Am Thorac Soc*, **3**: 418 - 423.
- Leenslag, J. W., Pennings, A. J., Bos, R. R. M., Rozima, F. R., Boering, G. (1987). Resorbable materials of Poly(L-lactide). VI. Plates and screws for internal fracture fixation. *Biomaterials*, **8**: 70 - 73.
- Levander, G. (1938). A study of bone regeneration. *Surg Gynecol Obstet*, **67**: 705 - 714.
- Liang, G., Yang, Y., Oh, S., Ong, J. L., Zheng, C., Ran, J., Yin, G., Zhou, D. (2005). Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials*, **26(20)**: 4265 - 4271.
- Lieberman, J. R., Daluiski, A., Einhorn, T. A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg*, **84-A(6)**, 1032 - 1044.
- Lind, M. (1996). Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand*, **67(4)**: 407 - 417.
- Lind, M., Schumacker, B., Soballe, K., Keller, J., Melsen, F., Bunger, C. (1993). Transforming growth factor- β enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*, **64(5)**: 553 - 556.
- Linkhart, T. A., Mohan, S., Baylink, D. J. (1996). Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF-beta and BMP. *Bone*, **19(1)**, (Suppl): 1 - 12.
- Liu, D., Black, B. L., Derynck, R. (2001). TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev*, **15**: 2950 - 2966.
- Liu, Y., De Groot, K., Hunziker, E. B. (2005). BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone*, **36(5)**: 745 - 757.
- Liu, D., Kang, J. S., Derynck, R. (2004). TGF- β -activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J*, **23**: 1557 - 1566.
- Lyman, D. J. (1966). Biomedical Polymers. *Rev Macromol Chem*, **1**: 355 - 391.
- Ma, Q., Mao, T., Liu, B., Zhao, J., Chen, F., Wang, H., Zhao, M. (2000) Vascular osteo-muscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **38(5)**: 561 - 564.

Majola A., Vainionpää, S., Vihtonen, K., Mero, M., Vasenius, J., Törmälä, P., Rokkanen, P. (1991). Absorption, biocompatibility, and fixation properties of polylactic acid in bone tissue: An experimental study in rats. *Clin Orthop Relat Res*, **268**: 260 - 269.

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

Massagué, J. (1996). TGF-beta signaling: receptors, transducers, and Mad protein. *Cell*, **85(7)**: 947 - 950.

Massagué, J., Cheifetz, S., Endo, T., Nadal-Ginard, N. B. (1986). Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**: 8206 - 8210.

Matlaga, B. F. und Salthouse, T. N. (1983). Ultrastructural observations of cells at the interface of a biodegradable polymer: Polyglactin 910. *J Biomed Mater Res*, **17(1)**: 185 - 197.

McCarthy, T. L., Centrella, M., Canalis, E. (1989). Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res*, **20(1-4)**: 277 - 282.

Meinel, L., Illi, O. E., Zapf, J., Malfanti, M., Merkle, H. P., Gander, B. (2001). Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release*, **70**: 193 - 202.

Menetrey, H., Kasemkijwattana, C., Day, C. S., Bosch, P. Vogt, M., Fu, F. H., Moreland, M. S. Growth factors improve muscle healing in vivo. (2000). *J Bone Joint Surg Br*, **82(1)**: 131 - 137.

Meyer, H., Bronsch, K., Leibetseder, J., Drochner, W., Kamphues, J., Männer, K., Rohr, K., Schneider, D. (1993). Ernährung verschiedener Spezies - Schafe. In: Meyer, H. (eds) *Supplemente - zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*. 8. Aufl., 153 - 159, Verlag M. & H. Schaper, Alfeld-Hannover.

Milovancev, M., Muir, P., Manley, P. A., Seeherman, H. J., Schaefer, S. (2007). Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet Surg*, **36(2)**: 132 - 140.

Minamide, A., Tamaki, T., Kawakami, M., Hashizume, H., Yoshida, M., Sakata, R. (1999). Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine*, **24(18)**: 1863 - 1870.

Miura, Y., Parvizi, J., Fitzsimmons, J. S., O'Driscoll S. W. (2002). Brief exposure to high-dose transforming growth factor-beta 1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, **84-A(5)**: 793 - 799.

Miyazono, H., Ichijo, H., Heldin, C. H. (1993). Transforming growth factor- β : latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*, **8(1)**: 11 - 22.

- Mohan, S., Bautista, C. M., Wergedal, J., Baylink, D. J. (1989). Isolation of an inhibitory IGFBP from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86(21)**: 8338 - 8342.
- Mohan, S., und Baylink, D. J. (1991). Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*, **263**: 30 - 48.
- Monzavi, R., und Cohen, P. (2002). IGFs and IGFbps: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **16(3)**: 433 - 447.
- Murakami, N., Saito, N., Takahashi, J., Ota, H., Horiuchi, H., Nawata, M., Okada, T., Nozaki, K., Takaoka, K. (2003). Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials* **24(13)**: 2153 - 2159.
- Musarò, A., Glacinti, C., Borsellino, G., Dobrowolny, G., Pelosi, L., Cairns, L., Ottolenghi, S., Cossu, G., Bernardi, G., Battistini, L., Molinaro, M., Rosenthal, N. (2004). Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101(5)**: 1206 - 1210.
- Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B., Deuel, T. F. (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*, **237(4820)**: 1333 - 1336.
- Nagai, N. Qin, C.-L., Nagatsuka, H., Inoue, M., Ishiwari, Y. (1999). Age effects on ectopic bone formation induced by purified bone morphogenetic protein. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **28**: 143 - 150.
- Nakagawa, T., Sugiyama, T., Kamei, T., Murata, T., Tagawa, T. (2001). An immunolight-and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Arch Oral Biol*, **46**: 403 - 411.
- Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K., Takaoka, K. (1994). Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.*, **9(5)**: 651 - 659.
- Nazzal, A., Lozano-Calderón, S., Jupiter, J. B., Rosenzweig J. S., Randolph, M. A. Lee, S. G. (2006). A histologic analysis of the effects of stainless steel and titanium implants adjacent to tendons: an experimental rabbit study. *J Hand Surg [Am]*, **31(7)**: 1123 - 1130.
- Nickel, R., Schummer, A. und Seiferl, E., Frewein, J., Wille, K.-H. (1992). Muskeln der Schultergliedmaßen. In: Nickel, R. (eds) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 1. Band (6. Auflage), 415 - 435, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.
- Nielsen, H. M., Andreassen, T. T., Ledet, T., Oxlund, H. (1994). Local injection of TGF- β increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand*, **65(1)**: 37 -41.

Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Peterson, L., Isaksson, O. (1987). Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calif Tissue Int*, **40**: 91 - 96.

Nixon, A. J., Brower-Toland, B. D., Bent, S. J., Syxer, R. A., Wilke, M. J., Robbins, P. D., Evans, C. H. (2000). Insulin-like growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, **379 (Suppl)**: 201 - 213.

Noda, M., und Camilliere, J. J. (1989). In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*, **124(6)**: 2991 - 2994.

O'Connor-Mc Court, M. D. und Wakefield, L. M. (1987). Latent transforming growth factor β in serum: a specific complex with alpha2 macroglobulin. *J Biol Chem*, **262 (29)**: 14090 - 14099.

Oda, S., Kinoshita, A., Hinguchi, T., Shizuya, T., Ishikawa, I. (1997). Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Med Dent Sci*, **44**: 53 - 62.

Okihana, H. und Yang, Z.-Q. (1997). Assessment of an ectopic bone formation system with implantation of pelleted rat primary growth cartilage cells. *Bone*, **20(4)**: 341 - 345.

Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, Y., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Iizuka, T. (2000). Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **29**: 62 - 66.

Olson, E. N., Sternberg, E., Hu, J. S., Spizz, G., Wilcox, C. (1986). Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J Cell Biol*, **103**: 1799 - 1805.

Pajamäki, K. J. J., Andersson, Ö. H., Lindholm, T. S., Karsson, K. H. (1993). Effect of bovine bone morphogenetic protein and bioactive glass on demineralized bone matrix grafts in the rat muscular pouch. *Ann Chir Gynaecol*, **82**: 155 - 161.

Pautke, C., Tischer, T., Vogt, S., Haczek C., Deppe, H. Neff, A., Horch, H. H., Schieker, M., Kolk, A. (2007). New advances in fluorochrome sequential labelling of teeth using seven different fluorochromes and spectral image analysis. *J Anat*, **210(1)**: 117 - 121.

Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H. Milz, S., Schieker, M., Kolk, A. (2005). Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone*, **37(4)**: 441 - 445.

Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzato, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N. Molinaro, M. Musarò, A. (2007). Local expression of IGF-I accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J*, **21(7)**: 1393 - 1402.

- Philippou, A., Maridaki, M., Halapas, A., Koutsilieris, M. (2007). The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-I) in skeletal muscle physiology. *In Vivo*, **21(1)**: 45 - 54.
- Piek, E., und Roberts, A. B. (2001). Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signalling pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, **83**: 1 - 54.
- Pieper, J. S., Hafmans, T., Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J., Brouwer, L. A., Veerkamp, J. H., Van Kuppevelt, T. H. (2002). Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *J Biomed Mater Res*, **62(2)**: 185 - 194.
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Gramates, P., Deuel, T. F. (1989). Transforming growth factor- β reverses the glucocorticoid-induced wound healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci, USA*, **86**: 2229 - 2233.
- Pierre, E. J., Perez-Polo, J. R., Mitchell, A. T., Matin, S., Foyt, H. L., Herndon, D. N. (1997). Insulin-like growth factor-I liposomal gene transfer and systemic growth hormone stimulate wound healing. *J Burn Care Rehabil*, **18(14)**: 287 - 291.
- Pinholt, E. M., Solheim, E., Bang, G., Sudman, E. (1992). Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats: a comparative study of fibrin-collagen paste, fibrin sealant, and polyorthoester with gentamicin. *J Oral Maxillofac Surg*, **50(12)**: 1300 - 1304.
- Provenzano, P. P., Alejandro-Osorio, A. L., Grorud, K. W., Martinez, D. A., Vailas, A. C., Grindeland R. E., Vanderby Jr, R. (2007). Systemic administration of IGF-I enhances healing in collagenous extracellular matrices: evaluation of loaded and unloaded ligaments. *BMC Physiol*, **7(2)**: 1 - 17.
- Rahn, B. A., und Perren, S. M. (1971). Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol.*, **46(3)**: 125 - 129.
- Rajaram, S., Baylink, D. J., Mohan, S. (1997). Insulin-like growth factor binding protein in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*, **18(6)**: 801 - 831.
- Rasse, M., Moser, D., Zahl, C., Gerlach, K. L., Eckelt, U., Loukota, R. (2007). Resorbable poly (D, L)lactide plates and screws for osteosynthesis of condylar neck fractures in sheep. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **45(1)**: 35 - 40
- Reddi, A. H. (1998). Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*, **355**: 66 - 72.
- Reddi, A. H., und Cunningham, N. S. (1993). Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res*, **8 (Suppl 2)**: 499 - 502

- Rinderknecht, E., und Humbel, R. E. (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, **253**: 2769 - 2776.
- Roberts, A. B., Sporn, M. B. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*, **8(1)**: 1 - 9.
- Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H., Fauci, A. S. (1986). Transforming growth factor- β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**: 4167 - 4171.
- Rokkanen, P. U., Böstman, O., Hirvensalo, E., Mäkelä E. A., Partio E. K., Päätiälä, H., Vainionpää S. I., Vihtonen, K., Törmälä, P. (2000). Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*, **21(24)**:2607 - 13.
- Rokkanen, P., Bostman, O., Vainionpaa, S., Vihtonen, K., Tormala P., Laiho J., Kilpikari, J., Tamminmaki, M. (1985). Biodegradable implants in fracture fixation: early results of treatment of fractures on the ankle. *Lancet*, **1(8443)**:1422 - 1424.
- Rosier, R. N. O'Keefe, R. J., Hicks, D. G. (1998). The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, **355(Suppl)**: 294 - 300.
- Sachse, A., Wagner, A., Keller, M. Wagner, O., Wetzel, W. D., Layher, F., Venbrocks, R. A., Hortschansky, P., Pietraszczyk, M., Wiederanders, B., Hempel, H. J., Bossert, J., Horn, J., Schmuck, K., Mollenhauer, J. (2005). Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*, **37(5)**: 699 - 710.
- Sakai, R., Miwa, K., Eto, Y. (1999). Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone*, **25(2)**: 191 - 196.
- Sasano, Y. Ohtani, E. Narita, K., Kagayama, M., Murata, M., Saito, T., Shigenobu, K., Takita, H., Mizuno, M., Kuboki, Y. (1993). BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification in vivo. *Anat Rec*, **236**: 373 - 380.
- Schimandle, J. H., Boden, S. D., Hutton, W. C. (1995). Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine*, **20(12)**: 1326 - 1337.
- Schmidmaier, G. (1997). Biodegradierbare Beschichtung für Biomaterialien. München, Technische Universität, Fachbereich Humanmedizin, Diss.
- Schmidmaier, G., Lucke, M., Schwabe, P., Raschke, M., Haas, N. P., Wildemann, B. (2006). Collective review: bioactive implants coated with poly (D, L- lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta 1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants*, **16(1)**: 61 - 69.

- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N. P., Raschke, M. (2001a). Local application of growth factors (IGF-1 and TGF- β 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*, **28(4)**: 341 - 350.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Raschke, M. (2000). Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing. *Chirurg*, **71**: 1016 -1022.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Cromme, F., Kandziora, F., Haas, N. P., Raschke, M. (2002a). Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*, **30(6)**: 618 - 622.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Gäbelein, T., Heeger, J., Kandziora, F., Haas, N. P., Raschke, M. (2003). Synergistic effect of IGF-I and TGF- β 1 on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, **74(5)**: 604 - 610.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Schwabe, T., Stange, R., Hoffmann, J., Südkamp, N. P., Haas, N. P., Raschke, M. (2002b). A new electrochemically graded hydroxyapatite coating for osteosynthetic implants promotes implant osteointegration in a rat model. *J Biomed Mater Res*, **63**: 168 - 172.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N. P., Raschke, M. (2001b). Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*, **58**: 449 - 455.
- Seeherman, H. J., Azari, K., Bidic, S., Rogers, L, Li, X. J., Hollinger, J. O., Wozney, J. M. (2006). RhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Bone Joint Surg Am*, **88(7)**: 1553 - 1565.
- Sellers, R. S., Peluso, D., Morris, E. A. (1997). The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular-cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, **79(10)**: 1452 - 1463.
- Sheehan, J. P., Sheehan, J. M., Seeherman, H., Quigg, M., Helm G. A. (2003). The safety and utility of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cranial procedures in a nonhuman primate model. *J Neurosurg*, **98(1)**:125 - 130.
- Singer, A. J., und Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous wound healing. *New Engl J Med*, **341(10)**: 738 - 746.
- Solheim, E. (1998). Growth factors in bone. *Int Orthop*, **22**: 410 - 416.
- Solheim, E., Pinholt, E. M., Bang, G., Sudmann, E. (1992). Inhibition of heterotopic osteogenesis in rats by a new bioerodible system for local delivery of indomethacin. *J Bone Joint Surg Am*, **74(5)**: 705 - 712.

- Sommer, A., Maack, C. A., Spratt, S. K., Mascarenhas, D., Tressel, T. J., Rhodes, E. T., Lee, R., Roumas, M., Tatsuno, G. P., Flynn, J. A., Gerber, N., Taylor, J. (1991). Molecular genetics and actions of rhIGFBP-3. In: Spencher, E. M. (eds) *Modern Concepts of IGF*. 715 - 728, Elsevier Verlag, New York.
- Sorensen, T. S., Sorensen, A. I., Merser, S. (1990). Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand*, **61**: 353 - 356.
- Spector, J. A., Luche, J. S. Mehrara, B. J., Greenwald, J. A., Smith, L. P., Longaker, M. T. (2001). Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr. Surg*, **107(1)**: 124 - 134.
- Sporn, M. B. und Roberts, A. B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature (Lond)*, **332**: 217 - 219.
- Sporn, M. B., und Roberts, A. B. (1990). The Transforming growth factor- β . In: Sporn, M. B., und Roberts, A. B. (eds) *Peptide Growth Factors and their Receptors I*, 419 - 472. Springer Verlag, Berlin.
- Srouji, S., Blumenfeld, I., A. Rachmiel, A., Livne, E. (2004). Bone defect repair in rat tibia by TGF- β 1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. *Cell Tissue Bank*, **5(4)**: 223 - 230.
- Stahelin, A. C., Weiler, A., Rufenacht, H., Hoffmann R., Geissman A., Feinstein R., (1997). Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: a report of six cases. *Arthroscopy*, **13**:238 - 244.
- Sugiyama, T. Nakagawa, T., Sato, C., Fujii, T. Mine, K., Shimizu, K., Murata, T., Tagawa, T. (2007). Subcutaneous administration of lactone form of simvastatin stimulates ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Oral Dis*, **13(2)**: 228 - 233.
- Suh, D.Y., Hunt, T. K., Spencer, E. M. (1992). Insulin-like-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. *Endocrinology*, **131(5)**: 2399 - 2403.
- Sumner, D. R., Turner, T. M., Cohen, M., Losavio, P., Urban, R. M., Nichols, E. H., McPherson, J. M. (2003). Aging does not lessen the effectiveness of TGF- β 2-enhanced bone regeneration. *J Bone Miner Res*, **18(4)**: 730 - 736.
- Sumner, D. R., Turner, T. M., Urban, R. M., Turek, T. Seeherman, H. Wozney, J. M. (2004). Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orthop Res*, **22(1)**: 58 - 65.
- Sykaras, N., Iacopino, A. M., Triplett, R. G., Marker, V. A. (2004). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osseointegration of dental implants: a biomechanics study. *Clin Oral Investig*, **8(4)**: 196 - 205.

- Takaoka, K., Koezuka, M., Nakahara, H. (1991). Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res*, **9(6)**: 902 - 907.
- Tanaka, T., Taniguchi, Y., Gotoh, K., Satoh, R., Inazu, M., Ozara, H. (1993). Morphological study of rhTGF-beta 1 induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone*, **14**:117 - 123.
- Tatakis, D. N., Koh, A., Jin, L., Wozney, J. M., Rohrer, M. D., Wikesjö, U. M. (2002). Peri-implant bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a canine model: a dose-response study. *J Periodontal Res*, **37(2)**: 93 - 100.
- Taylor, S. M. und Jones, P. S. (1979). Multiple new phenotypes induces in 10 T ½ and 3 T 3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, **17(4)**: 771 - 779.
- Terheyden, H. und Becker, J. (2006). Osteoinduktive Substanzen und Faktoren in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Gemeinsame Stellungnahme der DGZMK, der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGle.V.) und der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie innerhalb der DGZMK. 1 - 7.
- Terrell, T. G., Working, P. K., Chow, C. P., Green, J. D. (1993). Pathology of recombinant human transforming growth factor-β 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol*, **34**: 43 - 67.
- Thaller, S. R., Dart, A., Tesluk, H. (1993). The effects of insulin-like growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg*, **31**: 429 - 433.
- Torgersen, S. Gjerdet, N. R., Erichsen, E. S., Bang, G. (1995a). Metal particles and tissue changes adjacent to miniplates. A retrieval study. *Acta Odontol Scand*, **53(2)**: 65 - 71.
- Torgersen, S., Moe, G., Jonsson, R. (1995b). Immunocompetent cells adjacent to stainless steel and titanium miniplates and screws. *Eur J Oral Sci*, **103(1)**: 46 - 54.
- Toriumi, D.M., Kotler, H. S., Luxmberg, D. P., Holtrop, M. E., Wang, E. M. (1991). Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **117**: 1101 - 1112.
- Trippel, S. B. (1998). Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, **355 (Suppl)**: 301 - 313.
- Trippel, S., Coutts, R., Einhorn, T., Mundy, R., Rosenfeld, R. (1996). Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg*, **78-A**: 1272 - 1286.
- Urist, M. R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*, **150(698)**: 893 - 899.
- Urist, M. R., De Lange, R. J., Finerman, G. A. M. (1983). Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, **220**: 680 - 686.

- Urist M.R., Nilsson, O., Rasmussen, J., Hirota, W., Lovell, T., Schmalzrei, T., Finerman, G. A. (1987). Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop Relat Res*, **214**: 295 - 304.
- Van der Elst, M., Dijkema, A. R. A., Klein, C. P. A. T., Patka P., Haarman, H. J. Th. M. (1995). Tissue reaction on PLLA versus stainless steel interlocking nails for fracture fixation: an animal study. *Biomaterials*, **16**: 103 - 106.
- Vehof, J. W., Mahmood, J., Takita, H., Van 't Hof, M. A., Kuboki, Y., Spauwen, P. H., Jansen, J. A. (2001). Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with bone morphogenetic protein and coated with calcium phosphate. *Plast Reconstr Surg*, **108(2)**: 434 - 443.
- Voggenreiter, G., Leiting, S., Brauer, H., Leiting, P., Majetschak, M., Bardenheuer, M., Obertacke, U. (2003). Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones. *Biomaterials*, **24**: 247 - 254.
- Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C., Sporn, M. B. (1988). Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem*. **263(16)**: 7646 - 7654.
- Wang, E. A., Rosen, V., D' Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., La Pan, P., Luxenberg, D. P., Mc Quaid, D., Moutsatsos, I. K., Nove, J., Wozney, J. M. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87(6)**: 2220 - 2224.
- Weiler, A., Helling, H. J., Kirch, U., Zirbes, T. K., Rehm, K. E. (1996). Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation - experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br*, **78-B**: 369 - 376.
- Weiler, A., Hoffmann, R. F. G., Bail, H. J., Rehm, O., Südkamp, N. P. (2002). Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy*, **18(2)**: 124 - 135.
- Welch, R. D., Jones, A. L., Bucholz, R. W., Reinert, C. M., Tjia, J. S., Pierce, W. A., Wozney, J. M., Li X. J. (1998). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res*, **13(9)**: 1483 - 1490.
- Wetterau, L. A., Moore, M. G., Lee, K., Shim, M. L., Cohen, P. (1999). Novel aspects of insulin-like growth binding proteins. *Mol Genet Metabol*, **68(2)**: 161 - 181.
- Weyer, N., Gutwald, R., Schön, R., Kuschnierz, J., Seto, I., Enomoto, S., Schmelzeisen, R. (2007). Einfluss von rhBMP-2 auf die Knochenheilung nach Osteosynthesen im Schafunterkiefer. *Int Poster J Dent Oral Med*, **9(1)**, Poster 351.

- Wildemann, B., Bamdad, P., Holmer, Ch., Haas, N. P., Raschke, M., Schmidmaier, G. (2004a). Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone*, **34(5)**: 862 - 868.
- Wildemann, B., Sander, A., Schwabe, P., Lucke, M., Stöckle, U. Raschke, M., Haas, N. P., Schmidmaier, G. (2005). Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly (D, L-lactide) growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials*, **26(18)**: 4035 - 4040.
- Wildemann, B., Schmidmaier, G., Brenner, N., Hüning, M., Stange, R., Haas, N. P., Raschke, M. (2004b). Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta 1 during growth factor stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int* **74(4)**: 388 - 397.
- Wilton, P. (1992). Treatment with recombinant human insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome). *Acta Paediatr Suppl.*, **383**: 137 - 142.
- Winn, S. R., Uludag, H., Hollinger, J. O. (1999). Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*, **367**: 95 - 106.
- Wong, W. C., Yu, Y., Wallace, A. L., Gianoutsos, M. P., Sonnabend, D., Walsh, W. R. (2003). Use of a polymeric device to deliver growth factors to a healing fracture. *ANZ J Surg*, **73(12)**: 1022 - 1027.
- Wozney, J. M. (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev*, **32(2)**: 160 - 167.
- Wozney, J. M.. (1998). The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* **106 (Suppl 1)**: 160 - 166.
- Wozney, J. M., und Rosen, V. (1998). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*, **346**: 26 - 37.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **242(4885)**: 1528 - 1534.
- Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J. M. Rosen, V., Wang, E. A., Kahn, A. J., Suda, T., Yoshiki, S. (1991). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, **113(3)**: 681 - 687.
- Yamamoto, M., Tabata, Y., Ikada, Y. (1998). Ectopic bone formation induced by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein. *J Biomater Sci Polym Ed*, **9(5)**: 439 - 358.
- Yamazaki, Y., Oida, S., Ishihara, K., Nakabayashi, N. (1996). Ectopic induction of cartilage and bone by bovine bone morphogenetic protein using a biodegradable polymeric reservoir. *J Biomed Mater Res*, **30**: 1 - 4.

- Yang, L., Gao, J. H., Wang, J. H. (2007). Experimental study of gene transfer of insulin-like growth factor I on wound healing of scald rats. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, **23(1)**: 55 - 58.
- Yang, Y.-C., Piek, E. Zavadil, J., Liang, E., Xie, D., Heyer, J., Pavlidis, P., Kucherlapati, R., Roberts, A. B., Bottinger, E. P. (2003). Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor β . *J Cell Biol*, **100(18)**: 10269 - 10274.
- Yasko, A.W., Lane, J. M., Fellingner, E. J., Rosen, V., Wozney, J. M., Wang, E. A. (1992). The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J. Bone Joint Surg Am*, **74(5)**: 659 - 670.
- Yoneda, M., Terai, H., Imai, Y., Okada, T., Nozaki, K. Inoue, H., Miyamoto, S., Takaoaka, K. (2005). Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *Biomaterials*, **26(25)**: 5145 - 5152.
- Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T. (1998). Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg*, **26**: 112 -115.
- Zegzula, H.D., Buck, D. C., Brekke, J., Wozney, J. M., Hollinger, J. O. (1997). Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J. Bone Joint Surg Am*, **79-A(12)**: 1778 - 1790.
- Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., Dong, C. (2004). Transforming growth factor- β -induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ Res*, **94**: 616 - 625.

8.	Abbildungen	Seite
Abb.1/2:	Titanimplantate unbeschichtet/beschichtete Seite	24
Abb. 3:	M. sternocleidomastoideus, Schaf	26
Abb. 4	Incision an der ventro-lateralen Halsseite	30
Abb. 5	M. sternomastoideus (freipräpariert zur Darstellung)	30
Abb. 6/7	Einsetzen der Titanimplantate	31
Abb. 8	Implantation im Abstand von je 1 cm/ Plättchen	31
Abb. 9:	Entnommener M. sternomastoideus mit Implantaten	35
Abb. 10:	Benötigter M. sternomastoideus-Anteil mit Implantaten	35
Abb. 11/12:	post operative Röntgenaufnahmen, dorso-ventralen Strahlengang	45
Abb. 13/14:	Röntgenaufnahmen im Verlauf, dorso-ventraler Strahlengang	45
Abb. 15:	Post mortale Aufnahme der unbeschichteten Gruppe, dorso-ventraler Strahlengang	46
Abb. 16:	Post mortale Aufnahme der PDLLA Gruppe, dorso-ventraler Strahlengang	46
Abb. 17:	Post mortale Aufnahme der TGF- β 1 + IGF-I Gruppe, dorso-ventraler Strahlengang	46
Abb. 18:	Post mortale Aufnahme der BMP-2 Gruppe, dorso-ventraler Strahlengang	46
Abb. 19:	Fluoreszenzmikroskop. Aufnahme: Native Knochenschliffpräparate der Halswirbelsäule	47
Abb. 20:	Fluoreszenzmikroskop. Aufnahme: Muskelschliffpräparate mit Implantaten	48
Abb. 21:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit unbeschichtetem Implantat	50
Abb. 22:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit unbeschichtetem Implantat der lateralen Seite, Detailaufnahme	50
Abb. 23:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit unbeschichtetem Implantat, Detailaufnahme	51
Abb. 24:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit unbeschichtetem Implantat	51
Abb. 25:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit unbeschichtetem Implantat, mit einer lumenartigen Spaltbildung	52

Abb. 26:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit PDLLA beschichtetem Implantat	53
Abb. 27:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit PDLLA beschichtetem Implantat	53
Abb. 28:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit PDLLA beschichtetem Implantat, Detailaufnahme	54
Abb. 29:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit PDLLA beschichtetem Implantat mit einer lumenartigen Spaltbildung	54
Abb. 30:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat	55
Abb. 31:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat der lateralen Seite, Detailaufnahme	55
Abb. 32:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat, Detailaufnahme	56
Abb. 33:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat	56
Abb. 34:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat	57
Abb. 35:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat, Detailaufnahme	57
Abb. 36:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit TGF- β 1 + IGF-I beschichtetem Implantat	58
Abb. 37:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit BMP-2 beschichtetem Implantat	59
Abb. 38:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit BMP-2 beschichtetem Implantat, Detailaufnahme	59
Abb. 39:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit BMP-2 beschichtetem Implantat, Detailaufnahme	60
Abb. 40:	Lichtmikroskop. Muskelschliffpräparat mit BMP-2 beschichtetem Implantat,	61

9.	Tabellen	Seite
Tab. 1:	TGF- β und seine Rolle in der Frakturheilung	12
Tab. 2:	BMP und seine Bedeutung in der Frakturheilung	14
Tab. 3:	Gruppeneinteilung	27
Tab. 4:	Relevante Eckdaten für die radiologischen Untersuchungen	34
Tab. 5:	Komponentenübersicht und Dosisangaben für Technovit 9100	37

10. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Haas, dass ich an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Campus Virchow Klinikum meine Arbeiten durchführen konnte.

Aufrichtiger Dank gilt der Arbeitsgruppe „BAN“, insbesondere den Herren Prof. Dr. M. Raschke und PD Dr. G. Schmidmaier, dass sie mir das Thema zur Verfügung stellten und mich bei der Arbeit unterstützt haben. Dies gilt auch für die engagierte Betreuung von Frau Dr. B. Wildemann, bei der ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Vielen Dank auch der Arbeitsgruppe von Herr Dr. F. Kandziora, insbesondere Herrn Dr. R. Pflugmacher, Christian Krall und Kollegen, die die Implantation der Plättchen vornahmen. Auch der Tierärztin Tanja Eindorf möchte ich für Ihre Unterstützung danken.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Forschungshauses der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Campus Virchow Klinikums, insbesondere Gaby Hardung, Magena Prinz und Camilla Bergmann für die Einführung und Begleitung bei den histologischen Arbeiten. Herr Dipl.-Ing. Jan Hoffmann und Dr. G. Krummrey haben mich bei Computerfragen unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Leo Brunnberg und Herrn Prof. Dr. Michael Raschke danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur erstellt habe.

Berlin, den 30.07.2008

Gezeichnet

Natalie Palasdiés
-Tierärztin-