

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

**Einfluss von demineralisierter Knochenmatrix (DBM) und
deren Anreicherungen mit BMP-2 oder Gentamicin
auf die Knochenheilung im Schafmodell**

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

vorgelegt von
Elisabeth Huber
Tierärztin
aus München

Berlin 2016

Journal. Nr.: 3889

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches der Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Britt Wildemann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): sheep, animal models, femur, humerus,
metacarpus, metatarsus, bone fractures,
fracture fixation, gentamicin,
bone morphogenetic protein 2 (MeSH),
radiography, histology, histochemistry

Tag der Promotion: 05.07.2016

Widmung

Meiner Familie,
meinem Lebenspartner
und den Schafen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	11
2	STAND DES WISSENS	12
2.1	KNOCHENHEILUNG UND KNOCHENERSATZSTOFFE	12
2.1.1	KNOCHENHEILUNG UND KOMPLIKATIONEN	12
2.1.2	KNOCHENTRANSPLANTATE UND -ERSATZSTOFFE	14
2.2	BONE MORPHOGENETIC PROTEIN	19
2.3	KNOCHENINFEKTIONEN UND ANTIBIOTIKA-EINSATZ	21
2.4	ZIELE UND HYPOTHESEN DER STUDIE	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	VERSUCHSTIERE	25
3.1.1	HALTUNG UND EINGANGSUNTERSUCHUNG.....	25
3.1.2	VERSUCHSAUFBAU UND STUDIENDESIGN.....	26
3.2	MATERIAL	27
3.2.1	DEMINERALISIERTE KNOCHENMATRIX (DBM).....	27
3.2.2	BMP-2	28
3.2.3	GENTAMICIN	28
3.3	OPERATIVES VORGEHEN UND MATERIALEINSATZ	28
3.3.1	MATERIALANMISCHUNG.....	28
3.3.2	VORBEREITUNG UND ANÄSTHESIE	30
3.3.3	OPERATION	33
3.3.4	POSTOPERATIVE PHASE.....	38
3.3.5	EUTHANASIE UND PROBENGEWINNUNG	38
3.4	SERUMGENTAMICINKONZENTRATION	39
3.5	RADIOLOGISCHE MESSUNGEN	39

3.5.1	RÖNTGENAUFNAHMEN	39
3.5.2	MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE	39
3.6	HISTOLOGIE	42
3.6.1	HISTOLOGISCHE PROBENBEARBEITUNG.....	42
3.6.2	KONVENTIONELLE FÄRBUNGEN	44
3.6.3	OSTEOKLASTENANFÄRBUNG	47
3.7	AUSWERTUNG HISTOLOGIE	48
3.7.1	DESKRIPTIVE AUSWERTUNG.....	50
3.7.2	HISTOMORPHOMETRIE	50
3.7.3	PROZENTUALER FLÄCHENBESATZ MIT OSTEOBLASTEN UND OSTEOKLASTEN	51
3.8	STATISTIK.....	52
4	ERGEBNISSE	54
4.1	ANREICHERUNGSVERFAHREN.....	54
4.2	SERUMGENTAMICINKONZENTRATION	54
4.3	OPERATIONSVERLAUF UND HEILUNGSPROZESS	55
4.4	RADIOLOGISCHE ERGEBNISSE.....	57
4.4.1	RÖNTGENAUFNAHMEN	57
4.4.2	MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE	57
4.5	HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE	61
4.5.1	DESKRIPTIVE AUSWERTUNG.....	61
4.5.2	VERGLEICH DER KNOCHENHEILUNG ZWISCHEN PROXIMAL UND DISTAL.....	76
4.5.3	HISTOMORPHOMETRIE SAFRANIN O / VON KOSSA	77
4.5.4	HISTOMORPHOMETRIE MOVAT PENTACHROM	81
4.5.5	FLÄCHENBESATZ MIT OSTEOBLASTEN UND OSTEOKLASTEN	87
5	DISKUSSION	92
5.1	TIERMODELL	92
5.2	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER BOHRLOCHDEFEKTE	95

5.3	EINFLUSS DER MATERIALIEN AUF DIE KNOCHENHEILUNG	102
5.3.1	AUTOLOGE SPONGIOSA	102
5.3.2	DEMINERALISIERTE KNOCHENMATRIX.....	104
5.3.3	DBM ANGEREICHERT MIT BMP-2	108
5.3.4	DBM ANGEREICHERT MIT GENTAMICIN	111
5.4	FAZIT	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	115
7	SUMMARY	116
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	ANHANG	128
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	128
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	130
9.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	132
9.4	DATEN	133
9.5	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	137
9.6	DANKSAGUNG.....	138
9.7	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	139

1 EINLEITUNG

Knochengewebe zeigt eine sehr hohe Regenerationskapazität. Es ist in der Lage, anstatt durch die Ausbildung einer Narbe sich nicht nur in seiner Funktion, sondern auch in seiner vollständigen anatomischen Struktur wiederherzustellen. Da hierfür jedoch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Prozesse und Faktoren nötig ist, kommt es trotzdem in 5-10% der Frakturen zu einer verzögerten oder sogar ausbleibenden Heilung (Einhorn et al. 1998).

Muss die Knochenheilung unterstützt werden, zum Beispiel bei Defekten kritischer Größe, kommt es zur Anwendung von Knochenersatzmaterialien (bone grafts) (De Long et al. 2007). Der klinische Goldstandard im Zusammenhang mit Knochenersatzmaterialien ist am Beckenkamm entnommenes, autologes Knochenmaterial. Aber aufgrund der Nachteile, wie einer erhöhten Morbidität an der Entnahmestelle, einer verlängerten Heilungszeit, Schmerzen und eventuellen Komplikationen (Fowler et al. 1995; Maus et al. 2008b; Zheng et al. 2013), ist die Nachfrage nach einer Alternative groß.

Eine Alternative bieten Allografts, also Knochenmaterialien aus humanem Spenderknochen (Nandi et al. 2010). Eine Variante ist die demineralisierte Knochenmatrix (demineralised bone matrix, DBM). Hierbei handelt es sich um ein zugelassenes Medizinprodukt, bei dem angenommen wird, dass durch die Demineralisierung osteoinduktive Proteine demaskiert werden und so die Knochenheilung gefördert werden kann. Zudem bietet es durch die Kombination mit osteoinduktiven Stoffen oder Antibiotika eine Möglichkeit der Knochenheilungsförderung kritischer oder infizierter Knochendefekten (Wu et al. 2006).

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es die intraoperative Anwendbarkeit und den Einfluss eines kommerziell erhältlichen DBM-Produktes und dessen Anreicherungen mit BMP-2 und Gentamicin auf die Knochenheilung zu untersuchen. Die Analyse erfolgte radiologisch und histologisch mit Hilfe eines Bohrlochmodells am Schaf.

2 STAND DES WISSENS

2.1 KNOCHENHEILUNG UND KNOCHENERSATZSTOFFE

2.1.1 KNOCHENHEILUNG UND KOMPLIKATIONEN

Die Knochenheilung ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Prozessen mit dem Ziel der funktionellen und strukturellen Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebes. Es wird zwischen der direkten/primären und der indirekten/sekundären Knochenheilung unterschieden, wobei letztere sich in das Stadium der Inflammation, der intramembranösen und der enchondralen Kallusbildung und der Remodellierung unterteilt (McKibbin 1978; Ai-Aql et al. 2008; MacDonald et al. 2010; Crockett et al. 2011; Rentsch et al. 2014).

Ziel der Heilung ist es den Knochen in seiner ursprünglichen Struktur, also als Geflechtknochen (netzartig orientierte Kollagenfasern Typ I) oder als lamellärem Knochen (Kollagen orientiert in parallelen Schichten oder in konzentrischen Ringen) (Wancket 2015) zu rekonstruieren. Neben lamellärem Knochen und Geflechtknochen gibt es den sogenannten plexiformen Knochen (laminärer oder fibrolamellärer Knochen), der dann im Periosteum gebildet wird, wenn eine gewisse Knochenstärke im Zusammenhang mit einer schnellen Bildung gefordert wird (Pearce et al. 2007). Makroskopisch ist Knochen als kortikaler Knochen, wie zum Beispiel im diaphysären Bereich von langen Röhrenknochen, oder als spongioser Knochen, wie im Inneren des Epi- oder Metaphyse von Knochen, strukturiert.

Bei der Knochenbildung differenzieren sich multipotente Stammzellen über das Stadium der Präosteoblasten in adulte Osteoblasten. Sie sezernieren Osteoid, aus dem durch Mineralisation im Anschluss die neue Knochenmatrix gebildet wird (Abb. 1). Dabei werden Osteoblasten in die neugebildete Knochenmatrix eingebettet und differenzieren zu Osteozyten (Rahman et al. 2015). Neben der Knochenentstehung und -neubildung im Rahmen der Heilung spielt dieser Knochenaufbau bei den kontinuierlichen Remodellierungsprozessen ebenfalls eine wichtige Rolle. Hierbei handelt es sich um kontinuierliche Auf- und Abbauprozesse des Knochens, um sich an veränderte Gegebenheiten anzupassen. Neben den Osteoblasten spielen hier Osteoklasten eine wichtige Rolle. Hierbei handelt es sich um große, multinukleäre, hochmotile Zellen, die sich durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen bilden (Abb. 1). Sie migrieren über die Knochenoberfläche und binden an diese (Crockett et al. 2011). Bindet der aktive Osteoklast an die Knochenoberfläche wird ein zellulärer Bereich gebildet, die sogenannte „ruffled border“ (RB), über die es zu einer Knochenresorption kommt (Mulari et al. 2003). Das Zusammenspiel aus knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten bildet die Grundlage für die Remodellierung und Regeneration des Gewebes (Abb. 1). Ein detaillierter Einblick über die Vorgänge während der Remodellierung wird in der Veröffentlichung von Crockett et al. gegeben (Crockett et al. 2011).

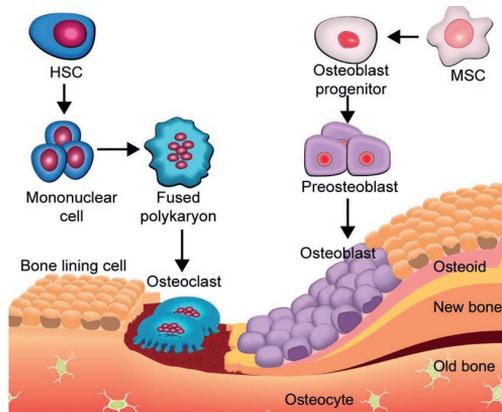


Abb. 1 Bone Remodelling

Aus multipotenten Stammzellen differenzieren sich über die Stufe von Präosteoblasten die Osteoblasten, die Osteoid produzieren, aus dem sich neuer Knochen bildet. Durch die Fusion von mononuclearen Zellen bilden sich Osteoklasten, die durch Resorption für den Abbau des Knochens sorgen. Abbildung modifiziert nach Rahman et al. (Rahman et al. 2015)

In 5 – 10% der Frakturheilungen kommt es zu Komplikationen (Tzioupis et al. 2007). Basierend auf der Anzahl der jährlichen Frakturen bedeutet dies zwischen 400.000 bis 800.000 Knochen- und Frakturheilungsstörungen alleine in den Vereinigten Staaten (Bishop et al. 2007). Zu den häufigsten Komplikationen zählen die infektiöse Entzündung (die Osteomyelitis) oder in circa 2-5% der Fälle, die verzögerte oder sogar ausbleibende Heilung (Schmidmaier et al. 2007). Zu den häufigsten Frakturen der langen Röhrenknochen zählt die Fraktur des Tibiaschafts. Diese Fraktur zeigt außerdem die höchste Nichtheilungsrate mit Ausbildung einer Pseudarthrose, also dem Ausbleiben der Heilung nach sechs Monaten mit Ausbildung eines Fehlgelenkes (Court-Brown et al. 1995; Tzioupis, Giannoudis 2007). Für den betroffenen Patienten bedeuten Frakturheilungsstörungen vor allem Schmerz und einen funktionellen Ausfall (Sanders et al. 2002; Court-Brown et al. 2008).

Als Ursachen einer verzögernden Knochenheilung kommen vom Patienten abhängige und unabhängige Faktoren in Frage. Dazu gehören das steigende Alter, Geschlecht, genetische Erkrankungen, Vorbehandlungen mit Zytostatika oder nichtsteroidalen Antiphlogistika oder Stoffwechselstörungen (Copuroglu et al. 2013; Dimitriou et al. 2013). Ein weitere Rolle spielen immunsupprimierende Krankheiten (Cozen 1972; Loder 1988; Simpson et al. 2015) oder der persönliche Lebensstil (Kwiatkowski et al. 1996; Adams et al. 2001). Vom Patienten unabhängige Faktoren betreffen die Art und die Lokalisation der Fraktur, ob es zu einer Dislokation kam, der Grad an Weichteil- und Knorpelgewebstrauma und das Auftreten einer Infektion (Bishop et al. 2012).

Man unterscheidet zwischen einer verzögerten Knochenheilung, bei der nach vier Monaten noch keine Konsolidierung stattgefunden hat, die Heilung sich aber noch weiter fortsetzt (Einhorn 1998; Ruter et al. 1999) und einer Pseudarthrose. Hierbei kann nach sechs bis acht Monaten keine stabile knöchernen Überbrückung nachgewiesen werden

(Megas 2005). Die Therapieoptionen einer Pseudarthrose richten sich nach der Art und Ursache der jeweiligen Heilungsstörung. Ist die Ursache die mangelnde mechanische Stabilität, so reicht in manchen Fällen der Implantatwechsel aus (Megas 2005). Liegt jedoch eine biologische Störung vor, ist die Auffrischung der Knochenenden die erste Therapiemaßnahme. Diese erfolgt chirurgisch und soll für eine Revitalisierung der beteiligten Knochenenden sorgen. Da diese Maßnahme meist mit einem nochmaligen Knochenverlust verbunden ist, wird oft ein Defekt kritischer Größe geschaffen und eine Knochenheilungsförderung, zum Beispiel mit Hilfe von Knochenersatzmaterialien, notwendig (2.1.2).

2.1.2 KNOCHENTRANSPLANTATE UND -ERSATZSTOFFE

Knochentransplantate und -ersatzstoffe dienen unter anderem dazu eine Leitstruktur zu liefern oder sogar die Knochenheilung zu fördern. Außer bei der Behandlung einer Pseudarthrose spielen sie vor allem eine Rolle in der Behandlung von Frakturen, Osteotomien, Arthrodesen (d.h. der operativen Gelenkversteifung) und Defekten kritischer Größe (Panchbhavi 2010; Hakeos et al. 2011; Kinaci et al. 2014). Häufige Verwendung finden Knochenersatzmaterialien in der Wirbelsäulen Chirurgie, vor allem bei Fusionen der Wirbelsäule (Ludwig et al. 2000; Brydone et al. 2010). Eine Studie durch Kinaci et al. hat die Anwendung von Knochenersatzstoffen innerhalb von 16 Jahren in den Vereinigten Staaten untersucht. Demzufolge wurden zwischen 1992 und 2007 in etwa 2 Millionen Patienten Knochenersatzmaterialien angewandt. Neben der Behandlung von Wirbelsäulenerkrankungen spielte vor allem die Behandlung der Pseudarthrose eine wichtige Rolle (Kinaci et al. 2014)

Knochenersatzmaterialien sind Produkte mit vielfältiger Wirkung auf die Knochenheilung (De Long et al. 2007). Sie bieten osteogene, osteokonduktive oder osteoinduktive Eigenschaften, die wie in Tab. 1 folgt definiert werden (Urist 1980; Giannoudis et al. 2005; Nandi et al. 2010):

Tab. 1 Begriffserklärung Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion

Osteogenese	Einbringen von lebenden Osteoprogenitorzellen zusammen mit dem Knochenersatzmaterial; Möglichkeit der Proliferation der Zellen und Differenzierung in Osteoblasten und eventuell Osteozyten
Osteoinduktion	Stimulation und Aktivierung des umgebenden Gewebes durch zum Beispiel osteoinduktive Proteine zur Differenzierung in knochenbildende Osteoblasten
Osteokonduktion	Struktur zur Förderung und Orientierung von Blutgefäßen und neuem Knochengewebe in das Knochenersatzmaterial

Ein ideales Ersatzmaterial umfasst mindestens eines der folgenden Eigenschaften; es bietet eine osteokonduktive Matrix, beinhaltet osteoinduktive Proteine und verfügt über osteogene Eigenschaften.

Synthetische Implantatvarianten betreffend, definiert Schmidt et al. wiederum ein ideales Biomaterial als einen Stoff mit einer biokompatiblen Zusammensetzung, die unerwünschte Gewebereaktionen vermeidet und eine gute Stabilität in einem physiologischen Milieu aufweist (Schmidt et al. 2001).

Für die Wahl des geeigneten Knochentransplantats oder -ersatzstoffes gibt es unterschiedliche Kriterien. Brydone et al. unterteilt diese wie unten dargestellt (Tab. 2).

Tab. 2 Kriterien für die Wahl eines Knochenersatzmaterials (Brydone et al. 2010)

Klinische Indikation	Verfügbarkeit	Nebenwirkungen
Defektgröße	Gewünschte Bioaktivität	Kosten
Biomechanische Gegebenheiten	Resorptionsrate	Ethische Kriterien
Chemische Zusammensetzung	Möglichkeit der Anwendung	

Je nach Ursprung oder Quelle können Knochentransplantate und -ersatzstoffe in Gruppen unterteilt werden. Nandi et al. unterteilt Knochenersatzmaterialien wie folgt (Nandi et al. 2010):

- A) Knochentransplantate und -ersatzstoffe (Autograft wie z.B. Autologe Spongiosa, oder Allografts wie z.B. demineralisierte Knochenmatrix oder Xenografts)
- B) Wachstumsfaktor-basierend (TGF-beta, PDGF oder BMP)
- C) Zell-basierend (Mesenchymale Stromazellen)
- D) Keramik-basierend (Kalzium-Phosphat)
- E) Polymer-basierend
- F) Verschiedenes (Koralle oder Schwämme)

Autograft - Autologe Spongiosa

Kommen Knochenersatzmaterialien zum Einsatz, ist autologes Knochenmaterial der klinische Goldstandard (Giannoudis et al. 2005; De Long et al. 2007; Maus et al. 2008b; Nandi et al. 2010; Rogers et al. 2012; Bormann et al. 2014; Kinaci et al. 2014). Es bietet eine gute Histokompatibilität, eine Minimierung der immunologischen Reaktion und optimale osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften (Cypher et al. 1996; Khan et al. 2005; Samartzis et al. 2005; Hsu et al. 2014). Durch das Vorhandensein von osteogenen Zellen und Knochenmatrixproteine wird das Knochenwachstum gefördert (Bauer et al. 2000).

Man unterscheidet zwischen spongiösem autologen Knochenmaterial und kortikalem Autograft. Spongiöses Autograft ist hierbei stark osteogen wirksam (hohen Zellularität). Es

wird als gutes Füllmaterial von Knochendefekten beschrieben, die Eigenschaft zur strukturellen Unterstützung ist aber gering (Marx et al. 1987). Diese steigt jedoch im Laufe der Heilung, da das eingebrachte spongiöse Knochenmaterial durch schleichenden Ersatz (creeping substitution) direkt in den umgebenden und neueinwachsenden Knochen eingebaut wird (Greenwald et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist ein kortikales Autograft vor allem osteokonduktiv wirksam und bietet eine sofortige strukturelle Unterstützung am Einsatzort. Die osteoinduktiven Eigenschaften sind hierbei gering ausgebildet (Nandi et al. 2010).

Um die Vorteile der autologen Knochenspongiosa im klinischen Gebrauch auch nutzen zu können, müssen bestimmte Anwendungsvoraussetzungen beachtet werden. So muss während des gesamten orthopädischen Eingriffes auf die Knochenviabilität geachtet werden. Toter Knochen verliert seine osteogenen Kapazitäten mit der Folge einer eventuellen Heilungsverzögerung und einem erhöhten Risiko der Resorption und Infektionen (Rogers, Greene 2012).

Gewonnen wird die autologe Knochenspongiosa meist aus dem Beckenkamm. Außerdem ist eine Entnahme aus Rippen oder dem Schädelknochen möglich, wobei die Entnahme aus dem Schädelbereich während Eingriffen im kranio-maxillären Bereich erfolgt (Singh et al. 2011). Diese Entnahme bietet die meisten Vorteile, da hier keine weitere Donorstelle wie bei der Entnahme aus den Rippen oder dem Beckenkamm notwendig ist. Nachteil hier ist, dass nur geringe Mengen gewonnen werden können (Rogers, Greene 2012). Im Zusammenhang mit der Heilung von langen Röhrenknochen findet die autologe Spongiosa vor allem bei der Behandlung von Pseudarthrosen nach Frakturen Anwendung oder bei der Rekonstruktion von Frakturen des lateralen Tibiaplateaus (Johnson et al. 2000; Welch et al. 2003; Marsh 2006).

Trotz der guten osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften des autologen Knochenmaterials wird dessen Anwendung kontrovers diskutiert. Kinaci et al. sahen in einer umfangreichen retrospektiven Studie in den Vereinigten Staaten einen Rückgang der Verwendung von Knochenersatzstoffen in Verbindung mit einem Umschwung von autologem Knochenmaterial zu anderen Knochenersatzstoffen (Kinaci et al. 2014). Freeland und Rehm zeigten, dass 39% der Patienten nach der Gewinnung von autologer Spongiosa zumindest eine leichte Komplikation aufwiesen (Freeland et al. 2004). Die Inzidenz von schweren Komplikationen liegt bei circa 10% der Patienten (Arrington et al. 1996; Morgan et al. 2006; Sen et al. 2007). Die Nachteile sind mit dem zusätzlichen Eingriff verbundene längere Operations- und Narkosezeiten, ein erhöhter Blutverlust und eine mögliche Frakturierung der Entnahmestelle. Hinzu kommt ein gesteigertes Risiko für Wundheilungsstörungen und Infektionen (Arrington et al. 1996; Giannoudis et al. 2005; Dimitriou et al. 2011). Vor allem die hohe Entnahmemorbidität macht die Frage nach Alternativmöglichkeiten groß (Chau et al. 2012), kommt es doch bei Eingriffen am Beckenkamm zu einer Morbidität zwischen 25-30% (Banwart et al. 1995; De Long et al. 2007).

Allografts und demineralisierte Knochenmatrix

Eine weitere Möglichkeit an sogenannten Knochentransplantaten und -ersatzmaterialien sind Allografts. Hierbei handelt es sich entweder um Transplantate gewonnen aus Spenderknochen oder, je nach Veränderung durch die weitere Prozessierung, um Knochenersatzmaterialien. Der Übergang von Knochentransplantat zu -ersatzstoff in der Gruppe der Allografts ist fließend und nicht eindeutig definiert. Allografts haben sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften. Da es sich um weiterverarbeitetes Spendermaterial handelt und somit lebende Zellen fehlen, sind sie nicht osteogen (Habibovic et al. 2007). Auf dem Markt sind verschiedene Formen der Allografts: Pasten aus demineralisierter Knochenmatrix (DBM), zerkleinerter spongiöser Knochen oder sogenannte Chips aus spongiösem Knochen, sowie kortikale oder kortiko-spongiöse Transplantate und osteochondrale Zylinder.

Demineralisierte Knochenmatrix kann den sogenannten „Allo-Implantaten“ zugeordnet werden (Gruskin et al. 2012) und wird in dieser Doktorarbeit aufgrund der starken Veränderung durch die Prozessierung als Knochenersatzmaterial eingeordnet. Schon 1965 zeigte Urist die lokale Knochenbildung *de novo* nach Implantation von demineralisiertem Knochen in den Muskel von Nagetieren (Urist 1965). Heute werden in 20% der Eingriffe mit Anwendung von Knochenersatzmaterialien DBM Produkte verwendet. Das bedeutet eine Anwendung in etwa 108.000 Eingriffen pro Jahr alleine in den USA (Gruskin et al. 2012).

Durch den Prozess der Demineralisierung werden extrazelluläre osteoinduktive Faktoren, wie Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) demaskiert und können so vom umgebenden Gewebe zur Heilung genutzt werden (Dinopoulos et al. 2006; Horvathy et al. 2015). Zusätzlich bietet das beinhaltete Kollagen eine osteokonduktive Wirkung (Kirk et al. 2013). Durch die Prozessierung des DBM kommt es zur Zerstörung antigenwirkender Strukturen (Tuli et al. 1978; Glowacki et al. 1985; Peterson et al. 2004). Somit soll DBM keine Fremdkörperreaktionen hervorrufen, was in verschiedenen Studien aber kontrovers diskutiert wird (5.2 - Leukozytenansammlungen).

DBM besteht aus einer Zusammensetzung von Kollagenen (vor allem Typ I und zum Teil Typ IV und X), nicht-kollagenen Proteinen und Wachstumsfaktoren wie BMPs, Growth Differentiation Factors (GDF) und Transforming Growth Faktor-beta 1, 2 und 3 (TGF- β 1, 2 und 3), sowie einem schwankenden geringen Anteil (1-6%) an Restmineralien (De Long et al. 2007; Gruskin et al. 2012).

Vor der Herstellung werden die möglichen Spender durch die medizinische Historie und eine klinische Untersuchung vorausgewählt. Es folgt eine Serie an Tests, wobei mögliche Infektionen mit HIV Virus Typ 1 und 2, Hepatitis B- und C-Virus und die Infektion mit *Treponema pallidum* (Syphilis) ausgeschlossen wird (De Long et al. 2007). Der Herstellungsprozess beginnt mit einer Reinigung des Knochens von umliegendem Gewebe, sowie Blut und Fettgewebe. Zumeist folgt eine antibiotische Behandlung um den Sterilisationsprozess einzuleiten. Nach der Zerkleinerung in die gewünschte Produktkörnigkeit folgt die saure Demineralisierung. Durch diesen Schritt wird die Gefahr einer Infektionsübertragung reduziert und erhöht die Sicherheit des Produktes (Scarborough et al. 1995; Swenson et al. 2003). So konnten Studien nachweisen, dass zum Beispiel der HIV-Virus durch die Demineralisierung inaktiviert und eliminiert wird (Mellonig

et al. 1992). Nach einer Gefriertrocknung wird die so entstandene demineralisierte Knochenmatrix in die verschiedenen Anwendungsformen gebracht (Gruskin et al. 2012). Es gibt Pulver, Granulate, Gele oder pastöse Formulierungen, sowie Kombinationsprodukte mit allogenen Knochenchips oder Kalziumsulfat-Granulaten. Die am häufigsten verwendete Anwendungsform des DBM ist die pastöse Form, da es gut bei verschiedenen Defektformen angewandt werden kann und trotzdem der Auswaschung durch Blut widersteht. Vermischt wird das DBM-Pulver hier mit wasserlöslichen Polymeren wie Natrium-Hyaluronsäure, Carboxymethylzellulose, Glycerin oder porzinem kollagenem Hydrogel. Eine umfangreiche Auflistung der verschiedenen DBM-Darreichungsformen wurde von Gruskin et al. gegeben (Gruskin et al. 2012). Zudem werden die Produkte oft sterilisiert, um eine Kontamination durch Bakterien oder andere hygienische Verunreinigung auszuschließen (De Long et al. 2007). Zur Anwendung kommen Hitzesterilisation, Ethylenoxid, γ - oder Ebeam-Bestrahlung oder chemische Lösungen. Weitere Möglichkeiten der Sterilisation sind ultraviolettes Licht, Dioxide oder Dampfbehandlungen (Munting et al. 1988; Glowacki 2005). Bei dem hier verwendeten DBM Produkt wurde ein chemisches Kaltsterilisationsverfahren mit Peressigsäure angewandt (Pruss et al. 2001).

Angewandt wird DBM unter anderem in der Zahnmedizin und bei zahlreichen orthopädischen Indikationen. In der Zahnmedizin wird es vor allem bei peridontalen Eingriffen zur Regeneration oder bei der Kieferrekonstruktion, zum Beispiel nach dem Zahnersatz, eingesetzt (Cairo et al. 2015). In der Orthopädie werden Produkte mit DBM unter anderem bei Arthodesen, bei der Behandlung von Pseudarthrosen, der Rekonstruktion von metakarpalen Defekten oder der Behandlung von Knochenzysten angewandt (Ramos-Pascua et al. 2014; Drosos et al. 2015). Bei Krankheiten der Wirbelsäule findet DBM vor allem Anwendung bei der Fusion der Wirbelkörper (Lee et al. 2005; Guerado et al. 2011).

Wird DBM direkt und ohne Zugabe an den gewünschten Ort appliziert, wirkt es als Füllmittel und durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren osteoinduktiv. Es kann aber zudem als Matrix für Medikamente oder biologisch aktive Substanzen eingesetzt werden (siehe 5.3.2 – DBM als Trägermaterial). Durch die Kombination erhält man ein Allo-Implantat, welches seine eigenen heilungsfördernden Eigenschaften und biologisch aktive Stoffe oder Medikamente mitbringt und so ihre Wirkung, am Ort der Heilung bereitstellt (Wu, Grainger 2006).

Andere Knochenersatzmaterialien

Synthetische Ersatzmaterialien werden als Alternative zu den oben genannten Knochenersatzmaterialien erforscht, um eine industrielle Fertigung zu ermöglichen oder zu vereinfachen. Das Biomaterial sollte idealerweise biokompatibel sein, eine minimal fibrotische Reaktion hervorrufen, dem Remodelling unterliegen und die Knochenneubildung fördern (Giannoudis et al. 2005). Nachteile bei der Verwendung von synthetischen Materialien sind meist eine geringe oder nicht planbare Resorptionsrate, Grenzen der Möglichkeiten der intraoperativen Anwendung durch Materialbeschaffenheit und

Fremdkörperreaktionen, die wiederum zu schlechten klinische Heilungsergebnissen führen können (Cornell 1999; Bostman et al. 2000).

Keramiken zählen zu den synthetischen Scaffolds aus Kalzium-Phosphat und finden schon seit 1980er Jahren Anwendung in der Zahnmedizin und Orthopädie (Bohner 2000). Sie besitzen keine osteogenen oder osteoinduktiven Eigenschaften, aber wenn sie in Verbindung mit gesundem Knochen verarbeitet werden, wird direkt auf der Oberfläche der Keramik Osteoid produziert und somit neuer Knochen gebildet. (Giannoudis et al. 2005).

Produkte aus Kollagen werden hauptsächlich als Trägermaterial für andere osteokonduktive, osteoinduktive oder osteogene Faktoren eingesetzt oder spielen eine Rolle als Zusatz bei einer zu geringen Menge an Autograft (Giannoudis et al. 2005).

Andere Knochenersatzmaterialien basieren auf Naturmaterialien wie zum Beispiel Korallenschwämme. Meereskorallen bilden poröse Strukturen aus Kalzium-Phosphat, die humanem spongiosen Knochen ähnlich sind. Sie werden entweder gesammelt oder industriell produziert. Ihre Anwendung wird häufig im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren erforscht (Coughlin et al. 2006; Fu et al. 2013; Du et al. 2015). Weitere natürliche Materialien umfassen marine Schwämme (Green et al. 2003) oder Chitosan (Mukherjee et al. 2003).

2.2 BONE MORPHOGENETIC PROTEIN

Urist et al. zeigte 1965, dass demineralisierter Knochen eine ektope Knochenbildung induzieren kann (Urist 1965). Zurückzuführen war dieser Effekt auf Wachstumsfaktoren, die zur TGF- β Superfamilie gezählt werden. Hierzu gehören die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), die Growth Differentiation Factors (GDFs), sowie Aktine und Inhibine (Ai-Aql et al. 2008).

Das humane Genom kodiert über 20 homodimere und heterodimere BMP-Liganden, von denen einige anhand ihrer Aminosäuresequenz und Funktion in vier Untergruppen eingeteilt werden können (Rahman et al. 2015). Gruppe eins beinhaltet BMP-2 und -4, Gruppe zwei besteht aus BMP-5, -6, -7, -8a und 8b. Eine dritte Gruppe umfasst BMP-9, -10 und Gruppe vier beinhaltet BMP-12, -13 und -14 (Carreira et al. 2014). Während der physiologischen Frakturheilung werden BMPs von den mesenchymalen Stromazellen, den Osteoblasten und Chondrozyten produziert. Durch die Wachstumsfaktoren werden zelluläre Prozesse angeregt, die zu einer Bildung von Knorpel und Knochen führen. Dazu gehören die Stimulation der Chemotaxis, der Proliferation und der Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen, Förderung der Angiogenese und die Synthese von extrazellulärer Matrix (Reddi 2001).

Obwohl die unterschiedlichen BMPs in ihrer Struktur und Funktion eng verwandt sind, spielen sie in unterschiedlichen Phasen der Knochenheilung eine Rolle. BMP-5 und -6 wurden bei Mäusen zwischen Tag 3 und 21 nach einer Fraktur nachgewiesen und es wird ein regulatorischer Effekt auf die intramembranöse und enchondrale Ossifikation vermutet. BMP-3, -4, -7 und -8 zeigen eine erhöhte Expression während der Phase der Resorption von kalzifiziertem Knorpel und der damit direkt verbundenen Knochenneubildung (Cho et al. 2002; Ai-Aql et al. 2008). BMP-2 und -4 werden in einer sehr frühen Phase der Knochenheilung exprimiert, wahrscheinlich um die Differenzierung von Vorläuferzellen in

chondrogene oder osteogene Zellen zu forcieren (Ai-Aqi et al. 2008). BMP-2, -6 und -9 werden als die stärksten Promoter der Zelldifferenzierung von mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten vermutet (Cheng et al. 2003; Beederman et al. 2013).

BMPs entfalten ihre Wirkung über eine Rezeptorbindung. Als Rezeptoren für die Bone Morphogenetic Proteine sind drei BMPRI Rezeptoren (Bone morphogenetic protein receptor type I-A= BMPRIA or ALK3, BMPRIB/ALK6 und ALK2) und drei BMPRII Rezeptoren (BMPRIIB, actin-related protein-IIA = ACTRIIA und ACTRIIB) bekannt (Rahman et al. 2015). Wie weiter unten (Abb. 2) dargestellt bindet der BMP-Ligand an den BMPRII, dadurch wird BMPRI phosphoryliert und eine intrazelluläre Signalkaskade, genannt der Smad-pathway, wird induziert. Die Smads (SMA And Mothers Against Decapentaplegic) sind intrazelluläre Proteine, die für die Transduktion des Signals von der Zelloberfläche in den Nucleus verantwortlich sind. Sie können in drei Klassen eingeteilt werden (I) R-Smad (receptor-regulated Smad), (II) co-Smad (common mediator Smad) und (III) I-Smad (antagonistic/inhibitory Smad) (Wu et al. 1991). Durch die Ligandenbindung und die Rezeptorzusammenwirkung wird eine Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die dazu führt, dass ein aktivierter R-Smad einen heteromeren Komplex mit co-Smad bildet, der dadurch in den Nucleus translozieren kann. Im Nucleus bindet dieser Komplex an spezifische Transkriptionsfaktoren und beeinflusst so via Genexpression unter anderem die Osteoblastendifferenzierung (Rahman et al. 2015).

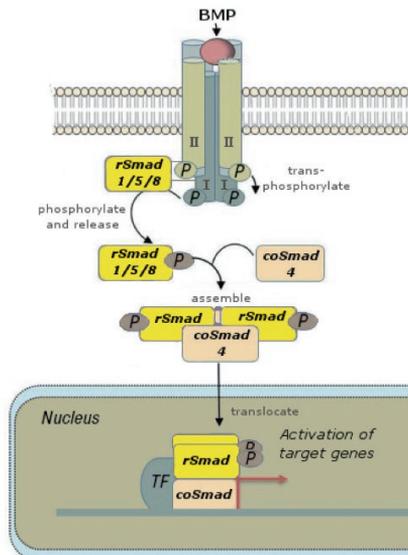


Abb. 2 BMP Signalling

BMP bindet an den Rezeptorkomplex und setzt dadurch eine Phosphorylierungskaskade in Gang. Es wird ein Komplex aus verschiedenen Smads gebildet, der in den Nucleus transloziert. Im Nucleus werden durch diesen Komplex Zielgene aktiviert (Giese 2014).

BMPs und andere Wachstumsfaktoren genießen ein wachsendes Interesse in der orthopädischen Chirurgie bei der Behandlung von Frakturen, Pseudarthrosen oder anderen Eingriffen, bei denen eine Förderung der Knochenheilung notwendig ist. Zu Anfang stammte das BMP aus Kadaverknochen, da so aber nur kleinere Mengen produzierbar waren, wird nun die rekombinante Gentechnologie zur Produktion genutzt. Zugelassen ist die klinische Anwendung von rekombinanten humanen BMP-2 (rhBMP-2) zur Förderung der Knochenheilung von offenen Schienbeinfrakturen sowie zur monosegmentalen, anterioren, lumbalen Spondylogenese nach einem sechsmonatigen konservativen Therapieverfahren (Woo 2013).

2002 evaluierte die BESTT Gruppe (BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma) in einer großen, multinationalen, prospektiven, randomisiert-kontrollierten Studie den Effekt von INFUSE (rhBMP-2 auf einem Kollagenschwamm, Medtronic Sofamor Danek, Tennessee) auf die Heilung von offenen Tibiafrakturen. Die Gruppe behandelt mit BMP-2 zeigte ein geringeres Verlustrisiko, signifikant weniger invasive Folgeeingriffe und eine signifikant schnellere Frakturheilung (Govender et al. 2002).

Die klinische Anwendung von BMP-2 wird aber hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen kritisch diskutiert. Woo et al. fasste in einer Veröffentlichung von 2012 die Nebenwirkung, die der FDA's Manufacturer and User Facility Device Experience (MAUDE) Datenbank übermittelt wurden, zusammen. Die unerwünschten Nebenwirkungen umfassten Infektionen, heterotope Ossifikationen, übermäßige Kallusbildung, Bildung von Pseudarthrosen, Osteolysen oder die Ausbildung eines lokalen Ödems (Woo 2013). Woo schreibt dennoch selbst, dass die Ergebnisse der Auswertung kritisch diskutiert werden müssen und die Anzahl der Berichte in MAUDE nicht dafür verwendet werden sollten eine definitive Inzidenzrate für Nebenwirkungen durch die Anwendung von rhBMP-2 zu ermitteln.

Für die Anwendung von BMP-2 im Wirbelsäulenbereich sind Nebenwirkungen wie neurologische Ausfälle, Schmerzen, eine retrograde Ejakulation oder überwachsender Knochen im Spinalkanal, Radikulitiden und Osteolysen bekannt (Vaidya et al. 2007; Rihn et al. 2009; Carragee et al. 2011).

In der Forschung wird BMP-2 im Zusammenhang mit der Frakturheilung und Knochenwachstumsförderung (Schmidmaier et al. 2001a; Einhorn et al. 2003; Fassbender et al. 2014b), bei Untersuchungen zur Knorpelheilung (Zhang et al. 2015), im Zusammenhang mit der Signalkaskade während der Heilung (Minkwitz et al. 2015) und zum Beispiel im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus (Xu et al. 2016) erforscht.

2.3 KNOCHENINFEKTIONEN UND ANTIBIOTIKAEINSATZ

Kommt es zu einer Infektion im Rahmen einer Verletzung oder eines Eingriffes am muskuloskeletalen System, bedeutet dies eine erhöhte Anzahl oder verlängerte Behandlungen (Poultides et al. 2010) und beträchtliche Kosten. Im Rahmen einer Studie wurden die Kosten für eine Behandlung eines orthopädischen Eingriffes im Zusammenhang mit einer Infektion als die zweithöchsten beziffert, direkt nach den Eingriffen im Zusammenhang mit kardiovaskulären Behandlungen (Chu et al. 2005). Rubin et al.

ermittelten Kosten von 35.000 US-Dollar pro Patient mit Osteomyelitis (Rubin et al. 1999). Whitehouse et al. beschrieben eine Verlängerung der Hospitalisierung um zwei Wochen und eine Steigerung der Kosten um 300% als eine Folge von Infektionen nach orthopädischen Eingriffen (Whitehouse et al. 2002).

Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion im Rahmen eines orthopädischen Eingriffs ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Wichtig bei Frakturen ist der Frakturtyp, so liegt die Infektionswahrscheinlichkeit einer offenen Fraktur bei 30%. Außerdem spielen die Ernährung und der Lebensstil (Rauchen, Alkohol, Drogen oder die Anwendung von Glukokortikoiden), immunsuppressive Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, endokrinologische Störungen (Diabetes mellitus) oder Vaskulitiden eine wichtige Rolle (Mouzopoulos et al. 2011; Bennett et al. 2014).

An der infektiösen Entzündung des Knochenmarks, der Osteomyelitis, sind meist eine Mischung aus verschiedenen Erregern beteiligt, wobei *Staphylococcus aureus* am häufigsten eine Rolle spielt (Lew et al. 1997; Song et al. 2001). Die Folge einer Osteomyelitis ist eine progressive entzündliche Zerstörung des Gewebes (Petty 1996). Die Behandlung bleibt eine Herausforderung und umfasst meist mehrere Eingriffe mit möglichen Komplikationen. Zu Beginn steht ein radikales Debridement des infizierten Gewebes inklusive Knochen. Zusätzlich zu der meist nun notwendigen Stabilisierung des geschaffenen Defektes ist eine antibiotische Behandlung notwendig (Mauffrey et al. 2015). Diese umfasst neben der Möglichkeit einer lokalen Antibiose (siehe unten) eine systemische Anwendung von Antibiotika.

Hinzuzufügen ist, dass die Anwendung von Implantaten das Risiko einer Infektion zusätzlich steigert (Trampuz et al. 2006). Es kann sich ein Biofilm entwickeln, was wiederum die Behandlung verlängert und die Resistenzentwicklung bei den beteiligten Bakterien verstärken kann (Costerton et al. 1999).

Die Anwendung eines Antibiotikums ist bei der Behandlung von Knocheninfekten immer notwendig und oft werden diese systemisch verabreicht. Die Nachteile einer solchen systemischen antibiotischen Behandlung reichen von systemischen Nebenwirkungen, wie die Oto- und Nephrotoxizität im Rahmen der Behandlung mit Antibiotika, wie Gentamicin (Blunston et al. 2015), bis zu einer unvollständigen Anreicherung in ischämischen und nekrotischen Geweben (Lewis et al. 2012). Durch das Erreichen von supraletalen Dosen der eingesetzten Antibiotika am Wirkort wird die Entwicklung von Resistenzen bei den beteiligten Bakterienstämmen zusätzlich verstärkt (Kohanski et al. 2010; Gullberg et al. 2011; Baharoglu et al. 2014). So gibt es einen Anstieg von Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und anderen multiresistenten Keimen (Multi-Drug Resistant Organisms, MDROs) (Arnold et al. 2006; Calhoun et al. 2009; Pendleton et al. 2015).

Um die oben genannten Nachteile einer systemischen antibiotischen Therapie zu vermeiden, werden Systeme zur lokalen Versorgung mit einem Antibiotikum erforscht. Häufige Anwendung findet antibiotisch-angereicherter Zement (Nijhof et al. 2000; Waldman et al. 2000). Hinzu kommt, dass die Behandlung von offenen komplizierten Frakturen, großflächiger Knochenrevisionen nach Osteomyelitis und die Behandlung von infizierten Pseudarthrosen eine besondere Herangehensweise erfordert. In diesen Fällen muss nicht nur die Infektion behandelt werden, sondern auch die Knochenheilung, zur Überbrückung

eines großen Defektes gefördert werden. Üblicherweise werden in diesen Fällen zu einem Antibiotikum Knochenersatzmaterialien mit einer heilungsfördernden Komponente verwendet (Waldman et al. 2000; Deirmengian et al. 2003). Neben anderen Kombinationen zur antiinfektiösen Therapie lokal am Knochen (Diefenbeck et al. 2006; Swieringa et al. 2008; Neut et al. 2009; Zhang et al. 2014) wird unter anderem der Einsatz von angereicherter demineralisierter Knochenmatrix diskutiert (Kramer et al. 1981; Saraf et al. 2010; Lewis et al. 2012).

Die Entscheidung für ein bestimmtes Antibiotikum ist abhängig von den beteiligten Mikroorganismen und eine bakteriologische Untersuchung mit Antibiotogramm ist für die Entscheidungsfindung unerlässlich. Entscheidend hierfür ist auch, ob es sich um eine Infektprophylaxe oder –behandlung handelt (Campoccia et al. 2010). Im Rahmen der Behandlung von Knocheninfekten verwendete Antibiotika umfassen β -Laktam Antibiotika wie Cefalotin oder Cefalozin und Aminoglycoside wie Tobramycin, Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin (Heck et al. 1995; Mousset et al. 1995; Campoccia et al. 2010; Randelli et al. 2010). Campoccia et al. listet die Möglichkeiten an Antibiotika mit der Angabe des abgedeckten Keimspektrum und der jeweiligen Stabilität (Campoccia et al. 2010).

Das in dieser Studie verwendete Gentamicin wirkt sowohl gegen gramnegative Keime als auch gegen den meist beteiligten *Staphylococcus aureus* und ist somit geeignet eine Osteomyelitis prophylaktisch zu vermeiden und zu behandeln (Stewart et al. 2010). Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes Antibiotikum und wird von *Micromonospora purpurea* produziert. Es gehört zu der Gruppe der Aminoglycoside und zeichnet sich durch eine konzentrationsabhängige antibakterielle Wirkung aus. Das bedeutet, dass die bakterizide Wirkung der Aminoglycoside abhängig ist von der Konzentration des Antibiotikums. Ist die Konzentration also hoch genug, werden die Bakterien getötet (Lacy et al. 1998). Dies steht im Gegensatz zu der Wirkung der β -Laktame, deren Wirkung davon abhängig ist, dass die ausreichende Konzentration des Antibiotikums auch über einen bestimmten Zeitraum aufrecht erhalten bleibt (Hendriks et al. 2004).

In der orthopädischen Chirurgie findet Gentamicin im Zusammenhang mit Knochentransplantaten Anwendung in Form von angereicherten Zementen, Polymethylmethacrylat (PMMA) Kugeln und Kalizumcarbonat-Pulvern (Klemm 2001; Balato et al. 2015; Coraca-Huber et al. 2015).

2.4 ZIELE UND HYPOTHESEN DER STUDIE

Ziel dieser Studie war die präklinische Analyse der Anwendbarkeit und Kompatibilität der demineralisierten Knochenmatrix *DBMpastös* und Anreicherungen derselben einmal mit BMP-2 und mit Gentamicin.

Folgende Hypothesen sollten dabei überprüft werden:

1. *DBMpastös* ist mit dem Applikationssystem perioperativ mischbar und in der Operation anwenderfreundlich.
2. *DBMpastös* ist zur Behandlung des Bohrlochdefektes geeignet und induziert eine Knochenneubildung.
3. Angereichert mit BMP-2 wird die Knochenneubildung verstärkt.
4. *DBM* angereichert mit Gentamicin hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Knochenheilung.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERSUCHSTIERE

Das Projekt wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales unter der Projektnummer G0341/12 genehmigt. In den Versuch zur Testung der demineralisierten Knochenmatrix wurden sechs Merino-Mix Schafe eingeschlossen. Des Weiteren wurden acht Tiere für die Gewinnung der Kontrollproben verwendet (siehe 3.1.2). Die Tiere wurden von einem konventionellen Züchter bezogen, da in der Nähe von Berlin kein Zuchtbetrieb von Schafen für Versuchszwecke existiert. Alle Tiere waren weibliche, mindestens zwei Jahre alte Schafe der Rasse Merino x Schwarzköpfiges Fleischschaf mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 70 kg.

3.1.1 HALTUNG UND EINGANGSUNTERSUCHUNG

Die Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin des Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1 in 13353 Berlin, gehalten. Vor jedem Eingriff wurde den Tieren ein Zeitraum von mindestens eine Woche zur Eingewöhnung gegeben, in dem die Tiere an das Handling durch den Menschen gewöhnt wurden.

Gruppen aus vier bis acht Tieren wurden auf einer Fläche von etwa 20 m² gehalten. Die Haltung erfolgte auf gehäckseltem Stroh und die durchschnittliche Stalltemperatur betrug 20°C mit einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von 65%. Als Grundfutter wurde den Tieren zweimal pro Tag Heu sehr guter Qualität in mehreren Heurufen angeboten. Eine Fütterung von pelletiertem Kraft- und Grünfutter, wie Äpfeln und Karotten, erfolgte zur Konditionierung und Stressreduktion der Tiere per Hand. Tränkwasser stand den Tieren ad libitum über Selbsttränken zur Verfügung.

Nach der Anlieferung wurden die Tiere einer Eingangsuntersuchung unterzogen. Der allgemeine Gesundheitszustand wurde festgestellt, sowie das Zahnalter und die Klauengesundheit. Außerdem wurden die Tiere zusätzlich mit einer stallinternen Ohrmarke zur Identifikation versehen. Zur Parasitenprophylaxe wurde 1,5 ml Ivomec (Ivomec® Pour-on Lösung zum Auftragen auf die Haut für Rinder und Rotwild, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) auf die Haut aufgetragen sowie 2 Boli Panacur (Panacur® Boli 250 mg für Schafe, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) oral verabreicht. Durch die subkutane Gabe von 0,5 ml des Prostaglandin-Analogons Estrumate (Estrumate® 250 µg/ml Injektionslösung, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) wurde eine eventuell bestehende Frühträchtigkeit abgebrochen. Zur Infektionsprophylaxe gegen Lippengrind und Atemwegsinfekten wurde den Tieren 1 ml Xylexis (Zoetis® ad us. vet., Immunmodulator, inaktiviertes Parapoxvirus ovis, Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz) und 2,5mg/kg KG Tulathromycin (Draxxin® 10% ad us. vet., Injektionslösung, Zoetis Schweiz GmbH, Zürich, Schweiz) subkutan injiziert.

Die Tiere wurden für die Aufwachphase nach der Operation und bei Krankheitsanzeichen im gleichen Stall in einem extra eingezäunten Bereich separiert.

Dadurch konnten Verletzungen vermieden und der Stress beim Handling reduziert werden. Durch eine Nahrungskarenz von 12-24 h vor der Operation wurde das Risiko einer Regurgitation und einer Pansentympanie vermindert. Es wurde hierbei keine vollständige Entleerung des Pansens erreicht, was bei Wiederkäuer auch nicht erwünscht ist. Durch die nur mäßige Füllung des Pansens wurde das Risiko der übermäßigen Aufgasung des Pansens reduziert.

3.1.2 VERSUCHSAUFBAU UND STUDIENDESIGN

In Anlehnung an vorangegangene Studien von Doernberg et. al und Nuss et. al (von Doernberg et al. 2006; Nuss et al. 2006) wurden den Tieren Bohrlochdefekte mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Tiefe von bis zu 15 mm (abhängig von dem Knochen und der Lokalisation) in metaphysären und diaphysären Knochen gesetzt. Ziel war es die Knochenheilung nach drei und nach neun Wochen und unterschieden nach den beiden Knochenlokalisationen zu untersuchen. Die metaphysären Defekte wurden jeweils einmal in den proximalen und distalen Teil des Humerus und Femurs und die diaphysären Defekte proximal und distal in Metakarpus und Metatarsus platziert. Daraus ergaben sich acht Bohrlochdefekte pro Körperseite (Abb. 3).

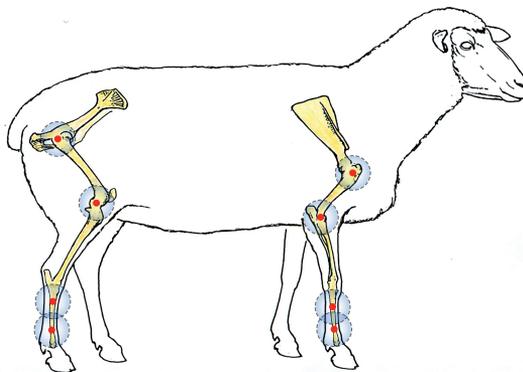


Abb. 3 Schematische Darstellung der Lokalisationen der Bohrlochdefekte

Bohrlöcher im metaphysären Humerus und Femur und diaphysären Metakarpus und -tarsus. Pro Knochen wurden jeweils ein Bohrlochdefekt proximal und distal gesetzt. Abbildung modifiziert nach (Nuss et al. 2006)

Die Bohrlöcher wurden entweder mit demineralisierter Knochenmatrix (DBM), DBM angereichert mit BMP-2 (DBM+BMP-2) oder DBM angereichert mit Gentamicin (DBM+Gentamicin) gefüllt. Zuerst wurden die Defekte auf der rechten Körperseite gesetzt und nach einer Standzeit von sechs Wochen auf der linken Körperseite. Nach einer weiteren Standzeit von drei Wochen wurden die Tiere euthanasiert, so dass sich für die Defekte der rechten Körperseite ein Heilungszeitraum von neun Wochen und für die

Defekte der linken Körperseite eine Heilungszeit von drei Wochen ergab. In die Defekte beider Körperseiten wurden immer die gleichen Materialtypen eingebracht.

Die Materialien wurden auf die Bohrlochdefekte der sechs Tiere so aufgeteilt, dass zum Ende des Versuches pro Lokalisation (metaphysär und diaphysär) und pro Zeitpunkt (drei und neun Wochen) acht Proben (n=8) gewonnen werden konnten (Tab. 3). Indem pro Knochen nur ein Materialtyp (zum Beispiel DBM angereichert mit BMP-2 oder mit Gentamicin) verwendet wurde, konnte sichergestellt werden, dass zwei unterschiedliche Anreicherungen die Knochenheilung nicht gegensätzlich beeinflussen konnten. Während der postoperativen Phase kam es zu dem Versterben von Schaf Nr. 5, so dass sich die Probenanzahl zum Teil auf n=6 verringerte (siehe 3.8 und Tab. 18).

Tab. 3 Materialverteilung pro Tier und operiertem Knochen

Lokalisation \ Schaf	Schaf					
	1	2	3	4	5	6
Humerus	DBM	DBM + Gentamicin	DBM	DBM + BMP-2	DBM + BMP-2	DBM + Gentamicin
Femur	DBM + Gentamicin	DBM	DBM + BMP-2	DBM	DBM + Gentamicin	DBM + BMP-2
Metakarpus	DBM	DBM + BMP-2	DBM + Gentamicin	DBM + BMP-2	DBM + Gentamicin	DBM
Metatarsus	DBM + BMP-2	DBM	DBM + BMP-2	DBM + Gentamicin	DBM	DBM + Gentamicin

Darstellung der Materialien in den Bohrlochdefekten nach Lokalisation. Im proximalen und distalen Defekt des jeweiligen Knochens wurde der gleiche Materialtyp angewandt. Das Schaf Nr. 5 wurde nicht ersetzt und ist hier grau hinterlegt dargestellt

Um die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren, wurden die Kontrollproben eines anderen Projektes im Rahmen des Tierversuchs genutzt. Als Negativkontrolle dienten Leerdefekte. Um einen Vergleich mit dem aktuell in der Klinik angewandten Goldstandard anstellen zu können, wurden zudem Bohrlochdefekte mit autologem Knochenmaterial gefüllt. Für die Kontrollproben (und zur Testung anderer Materialien) wurden acht Tiere operiert und die daraus gewonnenen Proben für beide Projekte verwendet. Alle Tiere wurden auf die gleiche Art behandelt, operiert und betreut. Die Bohrlochdefekte der Kontrollproben wurden wie oben beschrieben positioniert und gesetzt.

3.2 MATERIAL

3.2.1 DEMINERALISIERTE KNOCHENMATRIX (DBM)

Als Knochentransplantat wurde das zugelassene Medizinprodukt demineralisierte Knochenmatrix *pastös* (DBMp) verwendet. Es wurde vom dem Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (DIZG, zertifiziert nach ISO 9001/13485, www.dizg.de, Berlin, Deutschland) für den Versuch bereitgestellt (Abb. 4). Es handelt sich um ein

gebrauchsfertiges Produkt und besteht aus gefriergetrocknetem humanem Knochenmaterial. Das hier verwendete DBMp besteht aus 30% demineralisierter Knochenmatrix in einer Mischung von Natrium-Hyaluronat, Natriumchlorid, Natriummonophosphat und Natriumdiphosphat in Wasser für Injektionszwecke.



Abb. 4 DBMpastös des Deutschen Institut für Zell- und Gewebersatz

3.2.2 BMP-2

Das verwendete Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) stammt aus einem Kit für humane Anwendungen: InductOs 12 mg (Dibotermis alfa, Wyeth Pharmaceuticals, Hants, Vereinigtes Königreich). Der Wirkstoff Dibotermis alfa ist ein humanes Knochen-Morphogeneseprotein-2 (rhBMP-2) und wird in einer Ovarial-Zelllinie des chinesischen Hamsters (CHO) rekombinant produziert. InductOs ist zugelassen für die klinische Anwendung bei Erwachsenen mit degenerativen Bandscheibenerkrankungen zur anterioren Lendenwirbelfusion und zur Behandlung von akuten offenen Frakturen der Tibia.

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 8,4 ml des mitgelieferten Wassers für Injektionszwecke in die Durchstechflasche des Dibotermis alfa injiziert und das Pulver durch langsames Schwenken aufgelöst.

3.2.3 GENTAMICIN

Als häufig verwendeter Wirkstoff zur Behandlung und Prophylaxe von Knocheninfekten, wurde das bakterizid wirkende Aminoglycosidantibiotikum Gentamicin (Gentamicin-ratiopharm®, 80 mg / 2 ml, Injektionslösung, Merckle GmbH, Blaubeuren, Deutschland) verwendet. Es ist zugelassen zur Behandlung von Infektionen mit Bakterien, die gegen den Wirkstoff Gentamicin empfindlich sind und wird unter anderem zur Behandlung bei Sepsis, Infektionen der Haut und Weichteile und Infektionen nach Operationen verwendet.

3.3 OPERATIVES VORGEHEN UND MATERIALEINSATZ

3.3.1 MATERIALANMISCHUNG

Zur Anreicherung und Anwendung der demineralisierten Knochenmatrix wurde ein intraoperatives Anreicherungsverfahren in Form einer Mischspritze (Bone Cement Delivery System, P-System, MEDMIX SYSTEMS AG, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Hierbei

handelt es sich um eine Kunststoffspritze mit integrierter Mischvorrichtung durch die ein Mischen von zwei oder mehreren Komponenten unter sterilen Bedingungen möglich wird. Nach dem Befüllen und Verschließen der Spritze können die Komponenten durch einen Hebel mit integriertem Propeller durch Aufwärts-, Abwärts- und Rotationsbewegungen vermengt werden. Ist der Mischvorgang abgeschlossen, kann durch das Aufsetzen einer Kunststoffkappe auf den Spritzenkolben die Mischfunktion blockiert und die Spritze zur Materialapplikation verwendet werden (Bormann et al. 2014) (Abb. 5).

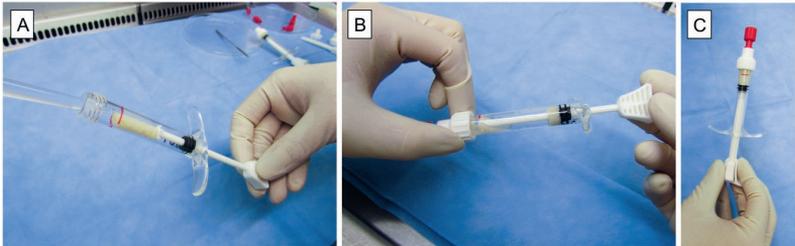


Abb. 5 Materialanmischung in der Mischspritze

(A) Einwaage der demineralisierten Knochenmatrix und Zugabe der Materialien (B) Vermengung der Komponenten durch Bewegung des Mischpropellers (C) Blockade der Mischfunktion und Anwendung der Spritze zur Materialapplikation

Pro Operation wurde die demineralisierte Knochenmatrix perioperativ unter sterilen Bedingungen angereichert. In je einer Spritze wurde die Menge an Knochentransplantat für zwei Bohrlochdefekte angemischt. Durch eine Markierung auf der Außenseite der Spritze wurde sichergestellt, dass pro Bohrloch genau die Hälfte der gemischten Transplantatmenge verwendet wurde.

In alle Mischspritzen wurden die Materialien wie in der Tab. 4 beschrieben eingewogen und pipettiert. Die verwendeten Konzentrationen für Antibiotika-angereicherte Zemente für die Endoprothetik (1-4 mg Gentamicin / 40 g Zement) (Dunne et al. 2008; Hinarejos et al. 2015) lagen der hier verwendeten Gentamicin Konzentration (2 mg Gentamicin / 40 mg DBMp) zugrunde. Die Konzentration an verwendetem rhBMP-2 basierte auf einer vorangegangenen Studie durch Maus et. al und auf *in vitro* Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe (Maus et al. 2008a). Das Aqua dest. wurde zugegeben, da das verwendete Gentamicin und BMP-2 nur als Lösung vorlag und so die Flüssigkeitsmenge in allen Anreicherungen konstant gehalten wurde.

Tab. 4 Materialmenge und Konzentration pro Mischspritze

Bezeichnung	Zugabe pro Bohrloch	DBM/ Spritze	Substanz/ Spritze	Zugabe Substanzlösung	Zugabe Aqua dest.	Konzentration
DBM	200 mg DBMp	600 mg	–	–	750 µl	
DBM + BMP-2	200 mg DBMp + 80 µg BMP-2	600 mg	240 µg	160 µl	590 µl	0,4 µg BMP-2/ mg DBMp
DBM + Gentamicin	200 mg DBMp + 10 mg Gentamicin	600 mg	30 mg	750 µl	–	50 µg Gentamicin/ mg DBMp

Der Mischvorgang erfolgte bei allen Anreicherungen analog. Nach dem Befüllen der Spritze und dem Aufsetzen eines Verschlusskonus (Combi-Stopper-Verschlusskonus, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Materialien wie oben beschrieben durch mindestens 10 Auf- und Abwärtsbewegungen des Hebels vermischt (Bormann 2014).

Um beim Befüllen der Bohrlochdefekte eine kontinuierliche Füllung des Defektes zu gewährleisten, wurde zudem eine auf 2 cm gekappte, zuvor sterilisierte, Pipettenspitze (200 µl, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) auf die Mischspritze aufgebracht (siehe 3.3.3 und Abb. 8).

3.3.2 VORBEREITUNG UND ANÄSTHESIE

Zur Einleitung der Narkose wurde den Tieren, je nachdem welche Körperseite operiert wurde, in die kotalaterale Vena cephalica ein Venenverweilkatheter (BD-Venflon™ Pro Safety, 18GA, 1,3x32mm, 103 ml / min, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) eingebracht. Über diesen Venenverweilkatheter wurden 5 bis 8 ml Blut für Serumuntersuchungen (siehe 3.4) gewonnen und das Schaf im Anschluss mittels 10 – 16 mg/kg KG Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5 g, Nycomed Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) sediert.

Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Laryngoskops mit langem Spatel (Modell Foregger, 30 cm für Tiere, RGQ, Tuttlingen, Deutschland) und einem Tubus (Mallinckrodt Hi-Contour Oral/Nasal Tracheal Tube Cuffed, Murphy Eye, 8,5 mm, Covidien llc, Nansfield, USA) intubiert. Zum Schutz vor Aspiration wurde der Tubus mit 16 ml bis 18 ml Luft geblockt und mit Hilfe eines Klebebandes (Leukoplast® 1,25 cm Breite, BSN medical GmbH, Hamburg Deutschland) im Maulwinkel des Tieres fixiert. Es erfolgte eine Vertiefung der Narkose durch ein Inhalationsnarkosegerät (Dräger Cato PM8050cd, Drägerwerk AG & co. KGaA, Lübeck, Deutschland) mit einem O₂ und N₂O Gemisch im Verhältnis 3:1 zusammen mit 2% Isofluran (Forene®, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bis zu einem expiratorischen Isoflurangehalt von 1,7%. Das Isofluran wurde mittels eines Verdampfers (Ohmeda Isotec 5, BOC Healthcare, Manchester, United Kingdom) dem Schaf zugeführt. Zwischen Beatmungsschläuchen und Narkosegerät wurde zudem ein Klimatisierungsfilter (Ultipor Pall Klimatisierungsfilter, Pall Newquay, Cornwall, United Kingdom) zwischengeschaltet.

Die weitere Beatmung und Aufrechterhaltung der Narkose während der Operation erfolgte bei einer Frequenz von 12-20 Atemzügen pro Minute und einem Minutenvolumen von 10-15 ml / kg Körpergewicht. Die Maßnahmen zur intraoperativen Überwachung sind in Tab. 5 dargestellt. Eine Magensonde (Durchmesser 14 mm, Willy Rüsch AG, Deutschland) verhinderte ein Aufgasen des Pansens während der Narkose. Die angewandten Medikamente sind zusammen mit ihrer Indikation in Tab. 6 gelistet.

Tab. 5 Intraoperative Überwachung der Narkose

Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Lachgas und Isofluran	Messung in inspiratorischer und expiratorischer Atemluft mittels Capnograph (Monitor Capnomac, Datex Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland bzw. NGM 1000, Fritz Stephan GmbH Medizintechnik, Gackebach, Deutschland)
Blutdruck	Unblutig mittels Manschette an Vordergliedmaße
Sauerstoffsättigung	Infrarotsonde am Ohr
Blutgasanalyse	Venenverweilkatheter in die Vena auricularis oralis oder aboralis (BD-Venflon™ Pro Safety, 20GA, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) und Analyse mittels Radiometer (Radiometer ABL 700 Serie, Radiometer GmbH, Willich, Deutschland)

Nach der Einleitung wurden die Tiere in halb-linksseitige oder halb-rechtsseitige Seitenlage gebracht und auf dem Operationstisch fixiert. Alle Klauen wurden mit sauberen Papiertüchern umwickelt. Um ein Austrocknen der Augen während der Operation zu verhindern, wurden beide Augen mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) befeuchtet.

Tab. 6 Medikamentenanwendung mit Indikation vor, während und nach der Operation

Infektionsprophylaxe	Intravenöser Bolus vor der Operation von 3 g Ampicillin-Natrium und Sulbactam-Natrium (Unacid® 3g, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und 100 ml Metronidazol (METRONIDAZOL, 5 mg / ml, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland); am Ende der Operation subkutane Injektion von 3 ml Veracin/ 50 kg KG (Veracin RS, Injektionssuspension, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland)
Prophylaxe eines Labmagengeschwürs	Intravenös 120 mg Pantoprazol (Pantoprazol Actavis 40 mg, Actavis Deutschland GmbH & Co.KG, München, Deutschland)
Kreislaufstabilisierung und Ausgleich des Flüssigkeitshaushaltes	Intravenös über Dauertropf von 1000- 2000 ml Jonosteril (Jonosteril® Infusionslösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland)
Blutdruckausgleich	Nach drei Stunden Operationszeit langsame intravenöse Infusion von 500ml Plasmavolumenersatzmittel (Volulyte 6%, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland)
Prophylaxe der Hypoglykämie	Langsame intravenöse Infusion von 500 ml 10% Glucoselösung (Glucosteril ® 10%, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland)
Schmerzprophylaxe	Subkutane Injektion von 4 mg/kg KG des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Carprofen (Paracarb Rind 50mg/ml, IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Deutschland); transkutane Gabe von Fentanyl über ein Pflaster für 3 Tage (Durogesic ® SMAT 75 µg/h transdermales Pflaster, Janssen-CILAG, Neuss, Deutschland); intravenöse Fentanylboli 5 min vor dem Hautschnitt und bei Anstieg der Herzfrequenz im Abstand von 30-45 min (Fentanyl®- Janssen 0,5 mg, Janssen-CILAG, Neuss, Deutschland); am Ende der Operation subkutane Injektion von 2,2 ml Flunixin-Meglumin / 50 kg KG (Finadyne®, RPS 83mg/ml, Intervet GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)

Die Operation erfolgte unter sterilen Kautelen. Hierzu wurde das Operationsfeld großflächig mit einer Schermaschine (Favorita II GT 104, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland; Scherkopf GH 703/10, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) geschoren. Aufgrund des stark talgigen Belages von Schafhaut wurde die Haut zunächst mit Seife (Lifosan®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland) gereinigt und im Anschluss noch einmal fein mit einem Einmalrasierer (Wilkinsons Sword, Solingen, Deutschland) rasiert. Danach wurde die Haut mit jodhaltiger Seife (Jodosept PVP®; Vetoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) gewaschen.

Um die genaue Lage der Bohrlöcher im proximalen und distalen Metakarpus und -tarsus festzulegen, wurde zunächst die gesamte Knochenlänge ausgemessen. Die Position des Wundzuganges wurde dann bei 25 % und 75 % der Länge mit Hilfe von je einer Kanüle (BD Microlance™, 24 G, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) markiert. Die genaue Lage der Markierung wurde mittels Bildwandler (SIREMOBIL Iso-C

C-Arm, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) kontrolliert und korrigiert. Die Kanülen wurden im Anschluss durch sterile Hautklammern (Manipler®AZ, B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland) ersetzt.

Das Schaf wurde mit sterilen Tüchern abgedeckt und die Operationsgebiete mit einer Polyvidon-Jod haltigen Lösung (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

3.3.3 OPERATION

Für den Vergleich mit dem klinischen Goldstandard wurde einem Teil der Tiere parallel zu dem Setzen der ersten Bohrlöcher autologes Knochenmaterial entnommen. Die Entnahme erfolgte je nach operierter Seite am kontralateralen Beckenkamm (Crista iliaca). Nach einem Zugang über einen ca. 5 cm langen Hautschnitt und Präparation durch das subkutane Fettgewebe wurde die seitlich an die Beckenschaukel ansetzende Muskulatur mittels Kauter abgelöst. Die Kortikalis wurde mit Hilfe eines Meißels deckelartig eröffnet und die Spongiosa durch einen scharfen Löffel gewonnen. Bis zur Einbringung in ein Bohrloch wurde das autologe Knochenmaterial in einer sterilen Spritze (Inject® Solo, Einmalspritze 20 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufbewahrt. Danach wurde der „Deckel“ des Beckenkammes wieder reponiert und mittels U-Heft (Mersilene® 0, Polyethylenterephthalat, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) fixiert und die Wunde analog zu den restlichen Operationsgebieten schichtgerecht verschlossen.

Die Bohrlochdefekte am proximalen und distalen Humerus, am proximalen Femur sowie am proximalen Metakarpus und –tarsus wurden von lateral gesetzt (Nuss et al. 2006). Ein Beschreibung der Zugänge und der Position der Bohrlochdefekte in den Knochen ist in Tab. 7 und eine graphische Darstellung der Zugänge der metaphysären Defekte ist in Abb. 6 zu finden.

Tab. 7 Zugang und Positionierung der Bohrlochdefekte

Proximale Metaphyse des Humerus	Hautschnitt von Akromion der Scapula bis zum distalen Ende des Tuberculum majus des Humerus; kaudale Verlagerung des Teiles des Musculus deltoideus, der am Akromion ansetzt; Bohrlochdefekt kaudal zur Insertionsstelle des Musculus infraspinatus gesetzt
Distalen Epiphyse des Humerus	Hautschnitt über dem Epicondylus lateralis humeri; Durchtrennung des proximalen Anteils des seitlichen Kollateralbandes dem Faserverlauf folgend; Defektsetzung in der Mulde des Ansatzpunktes des Bandes
Proximale Metaphyse des Femur	Hautschnitt über dem Trochanter major; vertikale Durchtrennung der tiefen Schicht der Fascia lata und longitudinale Teilung der medialen Glutealmuskulatur; Freilegung des lateralen Teil des Musculus quadriceps und longitudinale Durchtrennung des lateralen Muskelbauches; Bohrloch wird zentral und 1,5 cm distal der Spitze des Trochanter major gesetzt
Distale Epiphyse des Femur	Hautschnitt über der medialen Femurkondyle bis zur Tuberositas tibiae; Durchtrennung des Musculus sartorius zwischen dem kranialen und kaudalen Anteilen; Defektsetzung proximal zum Ursprung des lateral Kollateralbandes
Diaphysäre Defekte	2 cm langer Hautschnitt auf Höhe der zur Positionierung gesetzten Hautklammer unter Schonung der Strecksehne; Durchtrennung des Bindegewebes bis auf den Knochen und Verlagerung der Strecksehne nach kranial; Bohrlochdefektsetzung unikortikal am proximalen Defekt lateral und am distalen Defekt von der medialen Seite aus

Im Anschluss daran wurden die sterilen Tücher entfernt und zum Ablassen angesammelter Pansengase über die bereits gelegte Pansensonde das Tier in Brust-Bauch Lage verbracht. Das Tier wurde nun in Rückenlage mit leichter Neigung auf die rechte oder linke Körperseite verbracht, die Operationsgebiete erneut gewaschen und desinfiziert und das Tier mit sterilen Tüchern abgedeckt. Am distalen Femur sowie für die distalen diaphysären Defekte erfolgte der Zugang von medial (Tab. 7) (Nuss et al. 2006).

Die Hautränder wurden mittels Wundspreizer nach Gelpi aus dem Operationsgebiet gehalten und die Blutstillung erfolgte durch einen Elektrokauter. Mit Hilfe eines Kirschner-Bohrdrahtes, der zudem als Führungshilfe für den Knochenbohrer genutzt wurde, wurde die Position des zu setzenden Bohrlochdefektes am Knochen markiert. Anschließend wurde eine maßgefertigte Schablone angesetzt. Die Schablone diente der Positionierung einer Schraube aus Titan in standardisiert 2 cm Entfernung zum Bohrloch. Mit Hilfe der Schraube konnte das Bohrloch bei der Probenentnahme auch nach neun Wochen Heilungszeit identifiziert werden. Die Schablone diente außerdem zusammen mit einem Bohrstopp (Spezialanfertigung 12,5 cm, Durchmesser 1 cm, Centrum für wissenschaftliche Werkstätten, Charité, Berlin, Deutschland) als Abstandshalter, so dass der gebohrte Defekt eine Tiefe von 15 mm behielt. Entlang der Führung des Kirschner-Drahtes wurde nun mit

Hilfe eines Knochenbohrers (Arthrex® kanülierte Kopffräse 6.0 mm, Arthrex GmbH, München, Deutschland) der Knochendefekt gesetzt. Während der Bohrung wurde der Knochenbohrer mit Hilfe einer Spüllösung (Ampuwa®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) gekühlt. Bei den diaphysären Defekten erfolgte die Defektsetzung durch die Kortikalis bis zum Kontakt mit der Kortikalis der gegenüberliegenden Seite. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Schablone und einem Spiralbohrer (Spiralbohrer 1,5mm, Synthes GmbH, Umkirch bei Freiburg, Deutschland) die 2 mm Kortikalisschraube (selbstschneidende Kortikalisschraube, 12mm Länge, Synthes GmbH, Umkirch bei Freiburg, Deutschland) in 2 cm Entfernung zum Bohrloch platziert (Abb. 7).

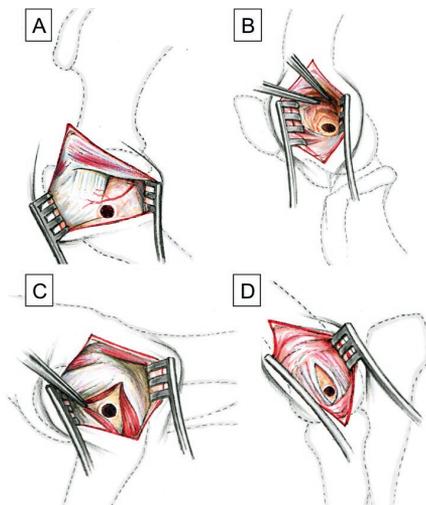


Abb. 6 Chirurgischer Zugang der metaphysären Bohrlochdefekte

Bohrlochdefektposition am proximalen (A), distalen (B) Humerus und proximalen (C), distalen (D) Femur. Zeichnung modifiziert nach (Nuss et al. 2006)

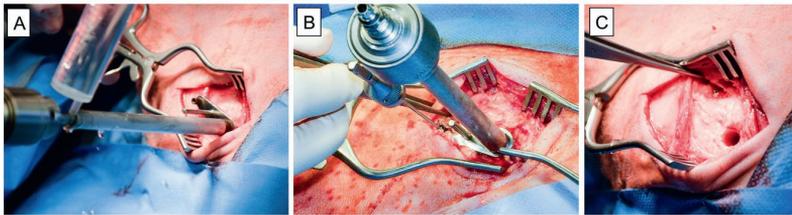


Abb. 7 Defektsetzung

(A) Bohrung des Defektes unter Kühlung des Bohrers und mit Hilfe der Schablone und dem Bohrstopf (B) Bohrung der Windung für die Positionsschraube mit Hilfe der Schablone (C) Bohrlochdefekt Humerus proximalis, Schaf Nr. 4, Operation der rechten Körperseite

Nach der Spülung (Ampuwa®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) des Defektes wurde das Bohrloch befüllt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Bohrloch kontinuierlich von der Tiefe her und bis zum oberen Bohrlochrand vollständig gefüllt war (Abb. 8).



Abb. 8 Füllung des Bohrlochdefektes

A) Füllung des Bohrloches mit Hilfe der Mischspritze. (B und C) Die gekappte Pipettenspitze stellt sicher, dass das Bohrloch kontinuierlich gefüllt wird. Bohrlochdefekt Metatarsus distalis, Schaf Nr.4, Operation der rechten Körperseite

Nach dem Befüllen der Defekte erfolgte sein schichtweiser Wundverschluss (Tab. 8). Die Haut wurde anschließend gereinigt und ein Aluminium Spray (Aluminium 33 mg, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) aufgetragen.

Tab. 8 Nähte und Nahtmaterialien Wundverschluss

Seitliches Kollateralband des Articulatio humeri	Einzelknopfhefte (Vicryl Plus 2-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien)
Knochenhaut der diaphysären Defekte	Kirschnernaht (Vicryl Plus 2-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien)
Muskulatur	Kirschnernaht (Vicryl Plus 2-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien)
Unterhaut	Kirschnernaht (Vicryl 3-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien)
Haut	U-Hefte (Prolene 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)

Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere mit reinem Sauerstoff beatmet. Zur Kontrolle und Dokumentation der Lage der Bohrlochdefekte wurde eine Röntgenaufnahme in latero-lateralem Strahlengang von allen operierten Knochen (Humerus/Femur 135 kV, 5 mAs; Metakarpus/-tarsus 66 kV, 2,5 mAs) angefertigt (Abb. 9).

**Abb. 9 Kontrollröntgenaufnahme im Anschluss an die Operation**

Dargestellt werden das proximale und distale Bohrloch im rechten Metatarsus. Zwischen den Bohrlöchern sind die Positionsschrauben in einem definierten Abstand von 2,5 cm zum Bohrloch zu sehen. Schaf Nr. 1, Material: DBM

Um das Ablassen der angesammelten Pansengase zu erleichtern, wurden die Tiere in Brust-Bauch Lage gebracht und das Gas durch leichten Druck auf die linke Flankengegend über die bereits gelegte Pansensonde entlassen. Im Stall wurden die Tiere in stabile Seitenlage mit eingeschlagenen Vordergliedmaßen auf ein Heubett gelegt, so dass das

Aufstehen erleichtert wurde. Nach Stabilisierung der Atmung und sichtbarem Schluckreflex wurden die Tiere im Stall extubiert. Der Venenverweilkatheter in der Vordergliedmaße und in der Ohrvene wurde mit einem Verband abgedeckt und für die Nachsorge am folgenden Tag belassen.

3.3.4 POSTOPERATIVE PHASE

Am ersten Tag post OP wurde der Kreislaufzustand der Tiere, die Rektaltemperatur und der Wundverschluss kontrolliert. Über den Venenverweilkatheter wurden 5-8 ml Blut zur Serumuntersuchung (siehe 3.4) gewonnen und im Anschluss wurde den Tieren als Bolus intravenös 100 ml Metronidazol zur Infektionsprophylaxe und 120 mg Pantoprazol intravenös zur Prophylaxe eines Labmagengeschwürs verabreicht. Bis zum Ziehen der Fäden am Tag 10 post OP wurde täglich der Heilungsverlauf, der Gesundheitszustand der Tiere und das Gangbild kontrolliert. Die Tiere erhielten jeden Tag subkutan 2,2 ml Flunixin-Meglumin / 50 kg KG zur postoperativen Analgesie und alle zwei Tage subkutan 3 ml Veracil / 50 kg KG zur postoperativen Infektionsprophylaxe. Die Tiere wurden nach dem Aufwachen nicht immobilisiert und konnten sich frei bewegen. Am dritten Tag post OP wurde das Fentanylpflaster erneuert. Am fünften Tag post OP erfolgte eine weitere Blutentnahme von 5-8 ml Blut zur Serumuntersuchung aus der V. cephalica der linken oder rechten Vordergliedmaße. Zehn Tage post OP wurde das Fentanylpflaster entfernt und die Fäden gezogen. Die Tiere wurden anschließend weiter in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité gehalten. Der Allgemeinzustand, die Futteraufnahme, das Gewicht, der Heilungsfortschritt sowie das Gangbild wurden regelmäßig kontrolliert.

3.3.5 EUTHANASIE UND PROBENGEWINNUNG

Nach Ablauf der neun Wochen und Operation auf beiden Körperseiten wurde den Tieren nach eingehender Untersuchung des Allgemeinzustandes und des Gangbildes analog zur Narkosevorbereitung ein Venenverweilkatheter in die Vena cephalica der Vordergliedmaße gelegt. Die Tiere wurden zunächst mit 25-30 mg/kg KG Thiopental-Natrium intravenös sediert. Die Euthanasie erfolgte im Anschluss durch die Gabe von 100ml Kaliumchlorid (Kaliumchlorid-Lösung Fresenius, Kaliumchlorid 0,0746 g, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) über den Venenverweilkatheter.

Es erfolgte die Entnahme des Humerus, Femurs, Metakarpus und Metatarsus auf beiden Seiten. Die umgebende Muskulatur wurde für den röntgenologischen Nachweis eventueller exogener Knochenbildungen zunächst belassen. Nach Anfertigung der Röntgenaufnahmen (siehe 3.5.1) wurde das umgebende Weichgewebe entfernt und das verheilte Bohrloch mit Hilfe der Schablone und der Positionsschraube identifiziert. Die Knochenstücke wurden durch eine Knochensäge mit einem Abstand von mindestens 3 cm zum Bohrloch abgesetzt. Die Knochenoberfläche wurde dabei geschont. Zur weiteren Orientierung wurde das proximale Ende der Probe markiert. Um die sofort einsetzende Autolyse zu stoppen, wurden die Proben in einer isotonen Formaldehyd-Alkohol-Lösung (324 ml 34% Formaldehydlösung, 550 ml 100% Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitat-Natrium- Puffer pH=7,3 und 6g Glucose) für fünf Tage fixiert.

3.4 SERUMGENTAMICINKONZENTRATION

Zur Untersuchung des Blutes auf systemische Gentamicinkonzentration wurde den Tieren vor der Operation, am Tag nach der Operation und fünf Tage nach der Operation venöses Blut entnommen. Nach der Entnahme wurden die Blutproben mindestens 20 min aufrecht bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei 3000 g 10 min bei 24°C zentrifugiert (ROTIXA/RP, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Das überstehende Serum wurde anschließend in Küvetten (1,5 ml, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) aliquotiert und nicht gebrauchte Mengen bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Gentamicinkonzentration erfolgte über das Labor Berlin – Charité Vivantes, Sylter Straße 2 in 13353 Berlin, über einen Test des Cobas C Systems (GENT2, Roche/Hitachi Cobas C System; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Der Test beruht auf der kinetischen Wechselwirkung von Mikropartikeln in einer Lösung (kinetic interaction of microparticles in a solution = KIMS). Das Gentamicin in der Serumprobe konkurriert mit einem Arzneimittelkonjugat um Bindungsstellen des Gentamicin-Antikörpers auf den Mikropartikeln. Die kinetische Wechselwirkung der Mikropartikel ist indirekt proportional zu der vorhandenen Gentamicinmenge im Serum.

3.5 RADIOLOGISCHE MESSUNGEN

3.5.1 RÖNTGENAUFNAHMEN

Um eine ektope Knochenbildung, als Reaktion auf die BMP-2 Applikation, auszuschließen, wurden die Knochen zusammen mit umliegendem Weichteilgewebe bei der Probengewinnung über eine Röntgenaufnahme untersucht. Die Röntgenaufnahmen wurden einmal rechts und einmal links anliegend im latero-lateralen Strahlengang (50 mAs, 35 kV, FAXITRON MX-20 Portable X-Ray, Faxitron Bioptics Llc, Arizona USA) angefertigt. Die Aufnahmen dienten zudem der genauen Lokalisation der Bohrlochdefekte bei der Probenentnahme.

3.5.2 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE

Ein Teil der Beurteilung der Knochenheilung umfasste die Untersuchung der Proben mit Hilfe eines μ CTs (VivaCT 40 SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Schweiz). Die Knochenscans wurden durchgeführt als sich die Proben in der Phase der Entwässerung (Tab. 10) befanden.

Für den Scan wurden die Proben in einen Probenhalter aus Polyoxymethylen eingespannt und vor dem Austrocknen mit alkoholgetränkten Mullbinden geschützt (Abb. 10). Der Bohrlochdefekt wurde in Richtung Strahlengang ausgerichtet. Die Scans wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: Röntgenspannung 70 kV, Röntgenstromstärke 114 μ A, kein Filter, Belichtungszeit 381 ms, Auflösung 1 Voxel entspricht 17 μ m und ohne Wiederholung der Aufnahme pro Projektion.

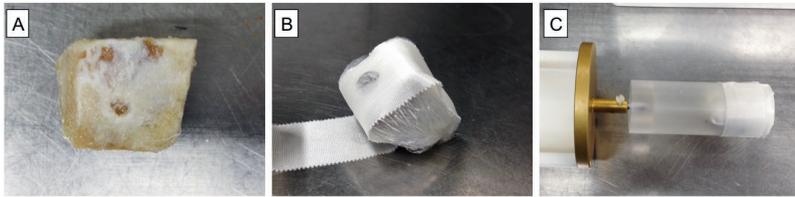


Abb. 10 Vorbereitung der Proben für den μ CT-Scan

(A) Probe von Schaf Nr. 4, Femur proximalis, 9 Wochen (B) Schutz vor Austrocknung (C) eingespannte Probe für Scan

Zu Beginn wurde eine Übersichtsaufnahme (sog. Scout-View) erstellt. Anhand dieser wurde der zu scannende Bereich markiert. Der Bereich wurde so gewählt, dass das gesamte Bohrloch inklusive umgebendem nativen Knochengewebe dargestellt wurde.

Die Scandaten wurden über ein standardisiertes computergestütztes Vorgehen zu Bilderstapeln rekonstruiert. Mit Hilfe des SCANCO Medical Evaluationsprogrammes wurde im Anschluss die Auswertung der Bohrlochdefekte vorgenommen. Dazu wurde die Region of Interest (ROI) in Form eines Zylinders festgelegt (Abb. 12). Die Markierung erfolgte über das Einzeichnen eines Kreises in die Schnittbilder. Der Durchmesser des Kreises entsprach dem ursprünglich gesetzten Bohrlochdefekt (Durchmesser 6 mm). Die Höhe des Zylinders wurde durch die Anzahl der markierten Schnittbilder bestimmt. (Abb. 11). Ein Schnittbild hat die Höhe von einem Voxel und das entspricht einer Dicke von 17 μ m. Als Beginn und Ende der ROI wurde die Höhe des Bohrlochdefektes definiert, in dem das Bohrloch noch vollständig von Knochen umgeben war (Abb. 11). Daraus ergab sich die Höhe des ausgewerteten GOBJ in Form eines Zylinders. Bei dem knocheninneren Ende des Bohrlochdefektes der metaphysären Defekte musste eine Alternative gefunden werden. Aufgrund der konusförmigen Spitze des verwendeten Knochenbohrers verjüngt sich der Durchmesser des Bohrloches zum Knocheninneren hin (Abb. 12). Deshalb wurde in diesem Fall das Ende des Zylinders als das Schnittbild definiert wo zuletzt ein Kreis mit einem Durchmesser von 6 mm platziert werden konnte. Die Höhe des Zylinders der metaphysären Bohrlochdefekte schwankte zwischen 420 und 879 Slices (entspricht 7,14 bis 14,96 mm) und die der diaphysären Bohrlöcher zwischen 22 und 149 Slices (entspricht 0,37 bis 2,53 mm).

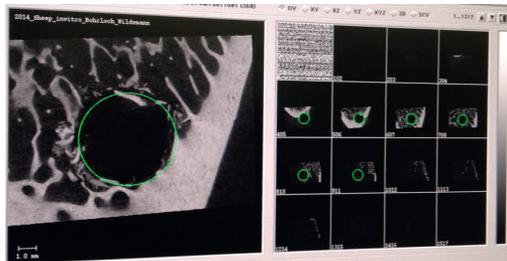


Abb. 11 Markierung der ROI (Scanco Medical Evaluationsprogramm)

(links) Vergrößerte Darstellung eines Slices mit eingezeichneter ROI (rechts) Übersichtsdarstellung der Slices mit Anzahl der markierten Slices. Schaf Nr. 4, Femur proximalis, 3 Wochen

Durch die Markierung der Region of Interest (ROI) wurde über das Scanco Medical Evaluationsprogramm ein zylinderförmiges Global Object (GOBJ) erstellt (Abb. 12). Dieses GOBJ wurde im Anschluss für die Auswertung herangezogen.

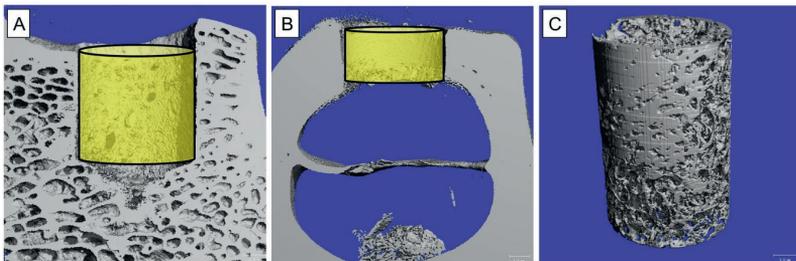


Abb. 12 Dreidimensionale Darstellung der ROI der μ CT Auswertung

Beispiel für ein GOBJ der metaphysären (A) und der diaphysären (B) Bohrlochdefekte.

(C) herausgerechneter, dreidimensional dargestellter Knochenzylinder nach Markierung des GOBJ. Bei dem metaphysären Defekt (A) ist dargestellt, dass nur die Teile des Bohrloches für die ROI ausgewählt wurden, wo das Bohrloch komplett von Knochen umgeben war. Aufgrund dessen, wurde ein Teil des Knochens (A – rechts im Bild) nicht in die Auswertung miteinbezogen. Bei dem metaphysären Defekt (A) ist das konusförmig zulaufende Ende des Bohrloches zu erkennen.

Für die Auswertung musste ein Schwellenwert (Threshold in Hounsfield – Einheiten [HU]) definiert werden. Dieser legte fest, welche Strukturen als Knochen (Bone Volume, BV) in die Auswertung miteingingen. Hierfür wurde eine Stelle mit nativem Knochengewebe in einer gewissen Entfernung zum Bohrloch ausgewählt und der Threshold ermittelt, an dem sich die Knochenstruktur in starker Intensität und vollständig strukturiert darstellte. Der Median des Thresholds für alle Proben befand sich bei 189,9 HU, das entspricht 392,6 mg Kalziumhydroxyapatit pro cm^3 . Zur Evaluation wurde die Bone Volume Fraktion (BV/TV), also der Knochen volumenananteil, herangezogen. Dieser Wert beschreibt das Verhältnis des Volumens des Knochens (Bone Volume, BV) zum gesamten

Volumen (Total Volume, TV) und wird in Prozent angegeben (Goulet et al. 1994). Das Total Volume entspricht dem oben markierten GOBJ.

3.6 HISTOLOGIE

3.6.1 HISTOLOGISCHE PROBENBEARBEITUNG

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Proben in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet. Nach der Fixierung (siehe 3.3.5) wurden die Proben 1,5 h in fließendem Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tab. 10) entwässert. Die aufsteigenden Alkoholkonzentrationen wurden aus Ethanol (Ethanol 100 Vol.-%, Herbeta-Arzneimittel, Berlin Deutschland) und Aqua dest. hergestellt. Die Alkohole wurden alle 3-4 Tage gewechselt. Vor der Kunststoffeinbettung wurden die Proben zusätzlich mit Xylol (Xylene, Mallinckrodt Baker BV, Deventer Holland) behandelt. Durch die Prä- und die Infiltrationslösung wurde sichergestellt, dass das gesamte Probenstück mit den Lösungen des polymerisierenden Kunststoffes durchtränkt war und die Kunststoffeinbettung erfolgreich ist. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass so wenig Luft wie möglich in den Knochenproben verbleibt, denn durch Luftblasen kann das Aushärten des Kunststoffes behindert und das Anfertigen der histologischen Dünnschnitte erschwert werden. Durch eine Vakuumbehandlung mit Hilfe eines Exsikkators (600mbar, 10 min, Nalgene™ Polycarbonat-Exsikkator, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) sollte dies verhindert werden. Der Luftauszug erfolgte immer nach dem Verbringen der Proben in eine neue Lösung. In der Präinfiltrations- und Infiltrationsphase wurde den Proben täglich via Exsikkator Luft entzogen.

Die eigentliche Kunststoffeinbettung erfolgte in Gläsern oder passenden Kunststoffförmchen. Nach dem Verbringen der Probe in das flüssige Polymerisationsgemisch wurden die Proben abermals mit dem Exsikkator entlüftet, entstandene Luftblasen wurden von der Kunststoffoberfläche entfernt und die Proben 4 Tage zum Aushärten in einen Kühlschrank mit einer Temperatur von 4°C verbracht. Eine Auflistung der Gebrauchslösungen mit Zusammensetzungen ist in der Tab. 9 zu finden.

Tab. 9 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen für die Kunststoffeinfettung

Präinfiltration	1000 ml Technovit Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland) mittels Aluminiumoxid-Ionenaustauschersäule (Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entstabilisiert und anschließend mit 5 g Härter 1 (Technovit®, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland) 30 min verrührt
Infiltrationslösung	800 ml entstabilisierte Basislösung mit 80 g PMMA Pulver (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland) etwa 3 h vermischt; anschließend 30 min mit 4 g Härter 1 verrührt und auf 1000 ml mit entstabilisierter Basislösung aufgefüllt
Polymerisation Stammlösung A	800 ml entstabilisierte Basislösung mit 160 g PMMA Pulver 3 h verrührt, anschließend mit ca. 4 g Härter 1 30 min verrührt und auf 1000 ml mit entstabilisierter Basislösung aufgefüllt
Polymerisation Stammlösung B	30 ml entstabilisierte Basislösung mit 4 ml Härter 2 (N,N, 3,5-Tetramethylanilin, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland) und 2 ml Regler (1-Decanthiol, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim Deutschland) verrührt und mit entstabilisierter Basislösung auf 50 ml aufgefüllt
Polymerisationsgemisch	Stammlösung A und B im Verhältnis 9:1 durch Schwenken vermischt

Tab. 10 Fixierung, Entwässerung und Kunststoffeinfettung

Fixierlösung (10% Formaldehyd)	5 d	100 % Ethanol	21 d
Wässern mit Leitungswasser	1,5 h	Xylol	4 h
70 % Ethanol	7 d	Präinfiltration (4°C)	4 d
80 % Ethanol	14 d	Infiltration (4°C)	14 d
96 % Ethanol	14 d	Polymerisation (4°C)	4 d

Nach dem Aushärten des Kunststoffes wurden die Proben aus den Formen entnommen und bei Raumtemperatur weitere 24 h unter dem Abzug belassen. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Tischschleifmaschine (MetaServ® 250, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und einem groben Schleifpapier (Körnungsgröße P80, Bühler, ITW Test & Measurement GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in die richtige Form und auf die richtige Ebene für das Anfertigen der histologischen Schnitte geschliffen. Die Ebene war erreicht, wenn das Bohrloch zentriert war und, bestenfalls in einem Radius von mindestens 2 cm, vollständig von Knochen umgeben war. Für das Anfertigen der Schnitte in der zweiten Ebene (Ebene 2, siehe 3.7) der metaphysären Defekte wurden zunächst die Schnitte von Ebene 1 abgenommen. Der Block wurde anschließend zusätzlich von der Knocheninnenseite aus bis auf den Bohrlochdefekt angeschliffen. Die so entstandenen Blöcke mussten vor dem Einspannen in das Mikrotom mit einem zweiten Kunststoff

(Technovit® 3040, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) erhöht werden.



Abb. 13 Geschliffener PMMA-Block für die Anfertigung der Dünnschnitte

PMMA-Block mit Anschlag beider Ebenen mit Blick auf Ebene 1. Schaf Nr. 4, Femur proximalis, 9 Wochen

Mit Hilfe des Hartschnittmikrotoms (Leica SM2500S, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und einem Stahlmesser (Spezialmesser für Leica SM2500, 16 cm, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) wurde von jeder Probe und jeder Ebene in einer Schnittdicke von 6 μm 10 aufeinander folgende Dünnschnitte angefertigt. Als Schneideflüssigkeit diente eine Alkohol- Triton X – Lösung (Triton X-100, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Nach dem Aufziehen der Schnitte auf den Objektträger, wurden sie mit Hilfe von 70 % Alkohol und einer Strecklösung (70% Alkohol, Bytoxyethylacetat, im Verhältnis 6:4 vermischt) gestreckt und geglättet. Vor dem Pressen der Schnitte auf den Objektträger mittels Kurbelpresse wurden die Schnitte mit einer Kunststoffolie (Kisol-Folie, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) abgedeckt. Die Schnitte wurden im Anschluss in der Presse 48 h im Brutschrank bei 60°C getrocknet. Bei der gesamten Probenbearbeitung wurde darauf geachtet, dass die Markierung des proximalen Endes des Bohrloches beibehalten wurde und nach der Anfertigung der Schnitte auf dem Objektträger markiert wurde.

3.6.2 KONVENTIONELLE FÄRBUNGEN

Vor den jeweiligen Färbungen mussten die Schnitte mit Hilfe von 2-Methoxyethylacetat (MEA; Merck KGaA, Darmstadt Deutschland) entplastet werden. Im Anschluss wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und Aqua dest. rehydriert (Tab. 11).

Tab. 11 Entplasten und Rehydrierung

2-Methoxyethyl-acetate I	30 min	96 % Ethanol	2 min
2-Methoxyethyl-acetate II	30 min	80 % Ethanol	2 min
2-Methoxyethyl-acetate III	30 min	70 % Ethanol	2 min
100 % Ethanol I	2 min	Aqua dest.	2 min
100 % Ethanol II	2 min		

Kombinierte Safranin O / von Kossa Färbung

Die Färbung diente der Unterscheidung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe. Mineralisierter Knochen stellt sich schwarz dar und nicht mineralisierte Strukturen, wie Bindegewebe oder Muskulatur, werden in unterschiedlichen Rottönen gefärbt (Abb. 23). In der Tab. 12 sind die Gebrauchslösungen mit ihrer Zusammensetzung dargestellt und in Tab. 13 werden die Schritte der Färbung beschrieben.

Tab. 12 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen für die kombinierte Safranin O / von Kossa – Färbung

Silbernitrat	3 % Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumthiosulfat	5 % Natriumthiosulfat-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Safranin- O	Safranin Orange (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Vitro Clud	Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland)

Tab. 13 Färbeprotokoll Safranin O / von Kossa - Färbung

3 % Silbernitratlösung	10 min	Safranin O.	8 min
Aqua dest.	3x spülen	Aqua dest.	5x tauchen
Natriumcarbonat- Formaldehyd	2 min	96 % Ethanol	2x 2 min
Wässern mit Leitungswasser	10 min	100 % Ethanol	2x 2 min
5 % Natriumthiosulfat	5 min	Xylol I	5 min
Wässern mit Leitungswasser	10 min	Xylol II	5 min
Aqua dest.	5x tauchen	Eindecken mit Vitroclud	

Movat Pentachrom Färbung

Diese Färbung zeichnet sich durch eine differenzierte Darstellung unterschiedlicher Gewebe aus. Dadurch ermöglicht sie die Unterscheidung zwischen Bindegewebe und Knochen und zahlreichen anderen Komponenten. Mineralisiertes Knorpelgewebe ist leuchtend gelb, nicht mineralisierter Knorpel grün und mineralisierter Knorpel stellt sich ebenfalls gelb dar. Bindegewebige Komponenten sind grün und blau angefärbt. Zusätzlich kann in den Zellen das rötlich gefärbte Zytoplasma von den blauschwarz gefärbten Zellkernen unterschieden werden (Abb. 25) (Movat 1955; Olah et al. 1977). Die Zusammensetzung der Gebrauchslösungen ist in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen der Movat Pentachrom Färbung

Alcianblau	1 % wässrige Lösung (8 GX, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
Alkalischer Ethanol	10 ml 25 % Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 180 ml mit 96 % Ethanol
Weigert's Eisenhämatoxylin	Eisenhämatoxylin A und B (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland) im Verhältnis 1:1 mischen
Brilliant Crocein-Säurefuchsin	Brilliantcrocein R (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland)
Essigsäure	0,5 % Lösung Essigsäure (Merck DGaA, Darmstadt, Deutschland)
PWS	5 % Phosphorwolframsäure (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)
Saffron du Gâtinais	6 g Saffron du Gâtinais (Sigma- Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Deutschland) in 100 ml 100 % Ethanol lösen

Tab. 15 zeigt die Arbeitsschritte der Movat Pentachrom – Färbung.

Tab. 15 Färbeprotokoll Movat Pentachrom

Alcianblau	10 min	5 % PWS	20 min
Leitungswasser	5 min	0,5 % Essigsäure	1 min
Alkalischer Ethanol	1 h	100 % Ethanol	3x 2 min
Wässern mit Leitungswasser	10 min	Saffron du Gâtinais	1 h
Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min	100 % Ethanol	3x 2 min
Wässern mit Leitungswasser	15 min	Xylol I	5 min
Brillant Crocein-Säurefuchsin	12 min	Xylol II	5 min
0,5 % Essigsäure	kurz spülen	Eindecken mit Vitroclud	

3.6.3 OSTEOKLASTENANFÄRBUNG

Um einen Aufschluss über Knochenabbauprozesse zu bekommen, wurden aktive Osteoklasten durch die TRAP-Färbung (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) rot angefärbt. Als Gegenfärbung diente Methylgrün, welches die Zellkerne grün färbt und einen guten Kontrast zu den rotgefärbten Osteoklasten bot. Das Prinzip der TRAP-Färbung basiert auf dem Nachweis der tartratresistenten sauren Phosphatase (Tartrate Resistent Acid Phosphatase, TRAP), einem Enzym, das von ausgereiften und aktiven Osteoklasten gebildet wird. Als Färbelösungen (Tab. 16) wurde das in Dimethylformamid gelöste Substrat Naphthol AS-MIX-Phosphat sowie das Diazoniumsalz Fast Red Violett LB Salt eingesetzt. Die Phosphatase in den Osteoklasten spaltet dabei Phosphat von der Naphtholverbindung ab, wodurch das freie Naphthol an das Diazoniumsalz binden kann und so ein roter Farbstoff gebildet wird (Abb. 16). Wichtig bei der Durchführung der TRAP-Färbung (Tab. 17) war, dass nach der Gegenfärbung mit Methylgrün, die Schnitte nicht zu lange in 100 % Alkohol und Xylol belassen wurden, da durch diesen Schritt der rote Farbstoff ausgewaschen werden kann.

Tab. 16 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen der TRAP-Färbung

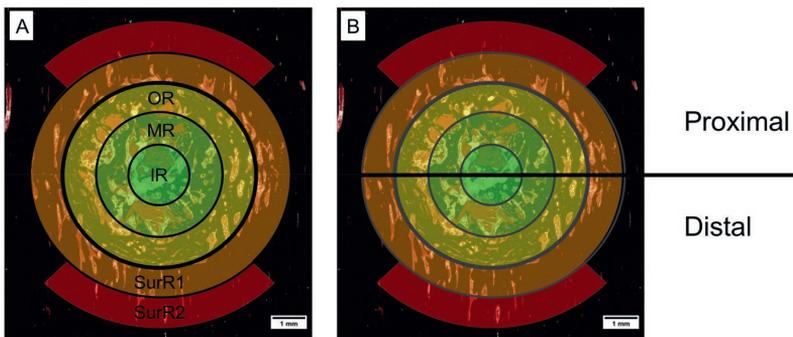
TRAP-Puffer	3,28 g Na-Acetat (Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe Deutschland) und 2,3 g Na-Tartrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
TRAP-Färbelösung	200 ml TRAP-Puffer mit 4 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) mit 2 ml Triton X (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland), 40 mg Naphthol AS-MIX-Phosphat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) und 240 mg Fast Red Violett LB Salt (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) verrühren
Methylgrün	Methyl Green (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA)

Tab. 17 Färbeprotokoll TRAP-Färbung

TRAP-Puffer	10 min	100 % Alkohol	kurz spülen
TRAP-Färbelösung (37°C)	16 h	Xylol	eintauchen
Aqua dest.	spülen	Eindecken mit Vitroclud	
Methylgrün	5 min		

3.7 AUSWERTUNG HISTOLOGIE

Für den Vergleich der Heilungsprozesse in den Präparaten wurde zunächst die sogenannte Region of Interest (ROI) definiert. In Anlehnung an die Studie von Doernberg et. al (von Doernberg et al. 2006) wurde das Bohrloch in drei Regionen in Form von Ringen unterteilt. Auf eine innere Region (Inner Ring; IR) mit einem Radius von 1 mm folgte zum Bohrlochrand hin der mittlere Ring (Middle Ring; MR) und der äußere Ring (Outer Ring; OR) mit jeweils 1 mm Breite (Abb. 14). Um Veränderungen im umliegenden Knochen untersuchen zu können, wurden zudem zwei ROIs um den Bohrlochdefekt herum definiert. Direkt an den Bohrlochdefekt folgend lag die erste umgebende ROI (Surrounding ROI 1, SurR1). Darauf folgte in Form eines Viertelringes eine zweite umgebende ROI (Surrounding ROI 2, SurR2) proximal und distal des Bohrloches. Die Form eines Viertelringes resultierte aus der geringen Knochenbreite der diaphysären Defekte, aufgrund derer seitlich der Bohrlöcher nicht genug umgebender Knochen für einen zweiten vollständigen Ring vorhanden war. Beide umgebenden ROIs hatten eine zusätzliche Breite von 1 mm. Zusätzlich wurden alle ROIs in einen proximalen und distalen Teil unterteilt. Dies geschah um einen Unterschied zwischen dem Knochenwachstum des proximalen und des distalen Anteils der ROI untersuchen zu können (Abb. 14). Verglichen wurden hier das anhand der Safranin O / von Kossa- Färbung gemessene prozentuale Knochenvolumen.

**Abb. 14 Regions of Interest der deskriptiven und histomorphometrischen Auswertung**

(A) Unterteilung des Bohrloches in einen inneren (IR), mittleren (MR) und äußeren Ring (OR). Zudem Betrachtung der umgebenden Regionen unterteilt in eine innere umgebende (SurR1) und äußere ROI (SurR2). (B) Zusätzliche Unterteilung der einzelnen ROI in einen proximalen und distalen Anteil.

Die Unterteilung des Bohrloches in drei zusätzliche Regionen wurde genutzt, um eine genauere deskriptive Auswertung, mit Beschreibung des Verlaufs der Knochenbildung, zu ermöglichen. Zudem diente sie dem Vergleich des gemessenen Knochenvolumens zwischen den unterschiedlichen Regionen (siehe 4.5.3 – zentripetale Heilung) und der Analyse ob zwischen dem proximalen Anteil der einzelnen ROI und dem distalen Anteil ein Unterschied in der Knochenheilung besteht (siehe 4.5.2). Für die histomorphometrische Auswertung zur Quantifizierung der Knochen-, DBM und Bindegewebsvolumen anhand der Safranin O / von Kossa- und Movat Pentachrom – Färbung wurde das Bohrloch als eine Region of Interest in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 6mm behandelt. Dies ermöglichte einen besseren Vergleich der Materialien zu den unterschiedlichen Zeitpunkten und Lokalisationen.

Um eine genauere Aussage über die Knochenheilung der Bohrlochdefekte machen zu können, wurde für die metaphysären Bohrlochdefekte eine zweite Schnittebene für das Anfertigen der histologischen Dünnschnitte definiert. Ziel war es die Knochenheilung einmal am, der Knochenoberfläche zugewandten, äußeren Ende des Bohrlochdefektes (Level 1) und einmal am, im Knocheninneren liegenden, inneren Ende des Bohrlochdefektes (Level 2) zu untersuchen (Abb. 15) (siehe 3.6.1). Aufgrund der geringen Dicke der Kortikalis der diaphysären Defekte (zum Teil nur 0,37 mm) war es hier nicht möglich zwei unterschiedliche Schnitttiefen zu betrachten.

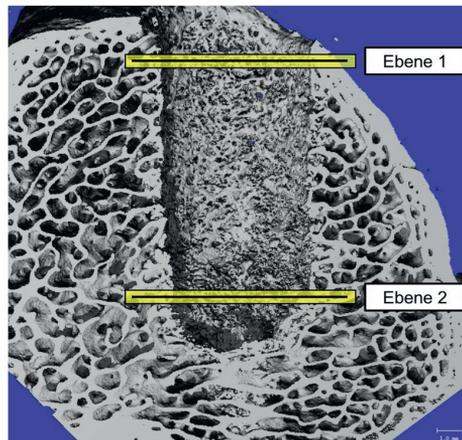


Abb. 15 Schnittebenen der metaphysären Bohrlochdefekte

Unterteilung der metaphysären Bohrlochdefekte in zwei Ebenen. Ebene 1 auf der Knochenoberfläche zugewandten Seite und Ebene 2 am zum Knocheninneren hin orientierten Ende des Bohrloches. Schaf Nr. 4, Femur proximalis, 3 Wochen

3.7.1 DESKRIPTIVE AUSWERTUNG

Für die deskriptive Analyse wurden die Gewebeschnitte der Safranin O / von Kossa- und der Movat-Pentachrom-Färbung verwendet.

Zunächst wurden bei allen Präparaten die Schnitt- und Färbequalität beurteilt. Im Anschluss wurde die Abgrenzbarkeit des Bohrloches vom umliegenden Gewebe untersucht, wobei eine schlechte Abgrenzbarkeit für ein gutes Zuwachsen des Bohrlochdefektes steht.

Anhand der Safranin O / von Kossa-Färbung wurde der mineralisierte Knochen genauer betrachtet. Getrennt nach ROI (OR, MR und IR) erfolgte eine eingehende histologische Untersuchung der Gewebe mit eingehender Betrachtung der Knochenmorphologie. In den umliegenden ROIs wurden die Menge und der Aufbau des Knochens im Vergleich zu unverändertem Knochen betrachtet. Dadurch konnte festgehalten werden, ob es zu einer Verdichtung oder Auflockerung des Knochens, um das Bohrloch herum, kam.

Durch die Movat-Pentachrom-Färbung konnte neben dem Knochen und dem Bindegewebe das eingebrachte Material, DBM oder autologes Knochenmaterial evaluiert werden. Die bindegewebigen Anteile wurden anhand ihrer Menge und dem dominierenden Zelltyp charakterisiert. Zudem wurde das Auftreten von Entzündungszellen, Gefäßen und Knorpel dokumentiert. Bei dem eingebrachten Material wurde die Menge betrachtet und anhand der umgebenden Zellen und dem Verhalten zum umliegenden Gewebe bestimmt, ob das Material eher in neugebildeten Knochen eingebaut oder durch Zellen abgebaut wird. Zudem wurden die Anzeichen einer Entzündung in Form des Auftretens von Riesenzellen, der Menge und Verteilung von Leukozyten und einer erhöhten Vaskularisierung dokumentiert.

3.7.2 HISTOMORPHOMETRIE

Zur histomorphometrischen Auswertung der Präparate wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und mit dem Computerprogramm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen Deutschland) mit einem 2.5 x Objektiv in Form einer Moskaikaufnahme digitalisiert. Mittels Adobe Photoshop CC (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) wurden die Bilder vertikal ausgerichtet und zugeschnitten. Im Anschluss erfolgte über das Programm ImageJ 1.49 die histomorphometrische Auswertung mit Hilfe eines halbautomatisierten Makros. Hierfür wurde das Bohrloch in Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 6 mm vorgegeben, dieser wurde falls notwendig noch an die realistische Form des Bohrlochrandes angepasst. Das Programm ImageJ markierte nun im Anschluss die oben beschriebenen ROIs (siehe 3.7) und die Auswertung erfolgte anhand dieser Einteilung. Durch die Ermittlung des prozentualen Anteils der Gewebe in der jeweiligen ROI konnten die unterschiedlichen Materialgruppen verglichen werden.

Auf Basis der Safranin O / von Kossa-Färbung wurde der prozentuale Anteil des mineralisierten Knochengewebes bestimmt. Anhand der Movat Pentachrom-Färbung konnte der prozentuale Anteil des Knochens und des Bindegewebes bestimmt werden. So wurde zum Beispiel das mineralisierte Knochengewebe in der Safran O / von Kossa Färbung anhand der charakteristischen Schwarzfärbung gemessen. Hierfür wurde anhand

einer Farbtabelle und eines Histogramms ein Schwellenwert ermittelt, über den im Anschluss die Auswertung erfolgte.

In den Schnitten gefärbt nach Movat Pentachrom konnte zusätzlich zu der Auswertung des Knochengewebes und des Bindegewebes der prozentuale Anteil der eingebrachten demineralisierten Knochenmatrix bestimmt werden. Sie stellte sich durch eine charakteristische Rotfärbung dar (Abb. 27). Im Rahmen des halbautomatisierten Makros wurde demineralisierte Matrix per Hand markiert und gemessen. Um Fehler zu vermeiden und die Gewebedifferenzierung genauer möglich zu machen, wurden die Präparate parallel unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet.

3.7.3 PROZENTUALER FLÄCHENBESATZ MIT OSTEOLASTEN UND OSTEOKLASTEN

Um Aufschluss über die Knochenauf- und -abbauprozesse im heilenden Knochen zu bekommen, wurde der prozentuale Besatz der Knochen- und DBM-Oberfläche mit Osteoklasten und Osteoblasten bestimmt. Hierfür wurden die Schnitte der TRAP-Färbung (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) verwendet. Es wurden 15 Einzelaufnahmen in dem 20x Objektiv pro Schnitt mittels Durchlichtmikroskopie angefertigt. Pro ROI wurden vier Einzelaufnahmen, je eine im proximalen und distalen Teil der ROI und zwei in den lateralen Anteilen der ROI, gemacht. In der inneren Region (IR) wurde aus Platzgründen nur eine Einzelaufnahme und in der zweiten umgebenden Region (SurR2) nur jeweils eine in proximalen und eine im distalen Teil angefertigt. Das ergab insgesamt 15 Einzelaufnahmen pro Schnitt.

Die Auswertung erfolgte im Anschluss über ein halbautomatisiertes Makro mit Hilfe des Programmes ImageJ 1.49. Zuerst wurde die Knochenoberfläche und dann die von Osteoklasten und die von Osteoblasten besetzte Knochenoberfläche markiert. Definiert wurde eine Zelle als Osteoklast, wenn sie TRAP-positiv war und/oder folgende Kriterien erfüllte: große Zellgröße, multiple Zellkerne mit hohem Zytoplasma-Kern-Verhältnis, Orientierung an der Knochenoberfläche und Ausbildung einer aktiven Kontaktzone zum Knochen mit Resorptionsaktivität (Rauigkeit der Knochenoberfläche mit eventuellen Resorptionslakunen). Die Osteoblasten zeigten im Vergleich zu den Osteoklasten eine kleinere Zellgröße, eine Grünfärbung der Zellkerne durch die Methylgrüngegenfärbung und eine dachziegelartige Aneinanderreihung auf der Knochenoberfläche. Die Markierung der Zellen auf der DBM-Oberfläche erfolgte auf die gleiche Weise (Abb. 16). Die DBM-Oberfläche konnte in den Einzelaufnahmen gut von dem neugebildeten Knochen unterschieden werden. Sie zeigte eine ausgereifte, lamelläre Knochenstruktur mit deutlich abgebrochenen Rändern. Durch die Markierung der mit Osteoklasten oder Osteoblasten besetzten Knochen- und DBM-Oberfläche wurde der prozentuale Zellbesatz dieser zwei Zellarten bestimmt.

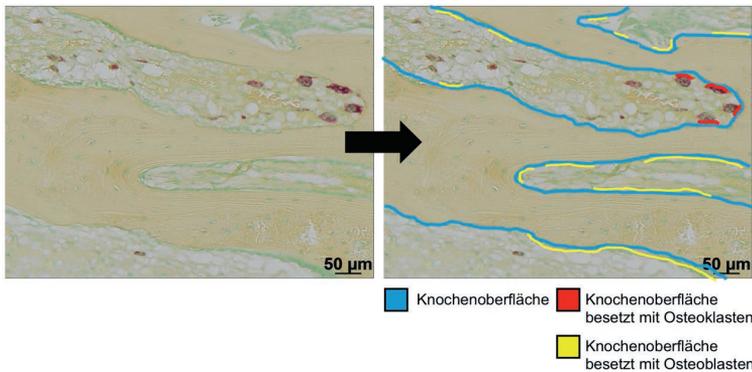


Abb. 16 Auswertung TRAP-Färbung

(links) Ausgangsbild, Schaf Nr. 6, DBM, Metakarpus distalis, 9 Wochen, SurR1, Aufnahme links-lateral (rechts) Markierung der Knochenoberfläche (blau), der Oberfläche besetzt mit Osteoklasten (rot) und Osteoblasten (gelb).

3.8 STATISTIK

Die Ausgangsprobenzahl des Versuches lag bei n=8 Proben pro angewandtem Material und Lokalisation. Wie in 4.3 beschrieben, verstarben drei Tiere im Laufe des Versuches, davon konnten zwei ersetzt werden. Auf den Ersatz des Tieres Nr. 5 wurde verzichtet. Dies reduzierte die Probenanzahl zum Teil auf n=6 (Tab. 18).

Tab. 18 Probenanzahl (n) pro Auswertmethode, Lokalisation und Material

Auswertung	Lokalisation	DBM	DBM+ BMP-2	DBM+ Gentamicin	Leer	Autol. Spong.
µCT	diaphysär	6	8	6	8	7
	metaphysär	8	6	6	7	8
Histologie	diaphysär	6	8	6	8	8
	metaphysär	6	8	6	7 (8)	8

Reduktion der Probenanzahl (n) auf teilweise n=6 durch Versterben von drei Tieren im Laufe des Versuches. Zwei Tiere konnten ersetzt werden, auf den Ersatz des Schafes Nr. 5 wurde verzichtet. Probenanzahl von n=7 bzw. 8 der Leerproben basierte auf der Verteilung der Proben auf die Tiere des Partnerprojektes.

Bei den ermittelten Werten in diesem Projekt handelte es sich um nicht parametrische Daten und die Werte wurden als ungepaart gehandhabt. Die Proben stammten zum Teil aus einem Tier und zum Teil aus verschiedenen Tieren und teilweise wurden die Defekte zwar in den gleichen Knochen in einem Tier aber in eine proximale bzw. distale Lokalisation gesetzt. Somit handelte es sich bei den hier ermittelten Werten um gemischte Daten. Die

unterschiedlichen Knochen oder Knochenlokalisationen wurden für die weitere Arbeit als unterschiedliche Objekte definiert und die Daten somit als unabhängig/ungepaart gehandhabt. Auch bei der Betrachtung der zwei Heilungszeitpunkte (drei und neun Wochen) gab es keine longitudinale Beobachtung. Die Zeitkomponente war somit nicht als eine abhängige Größe zu verstehen, sondern es wurden zeitversetzt zwei Experimente (wenn auch in der gleichen Beobachtungseinheit, dem Schaf) durchgeführt. Somit sind auch die hier ermittelten Werte als unabhängig zu sehen. Die Auswertung der Daten wurde mit Prof. Dr. med Dirk Stengel (Zentrum für klinische Forschung, Unfallkrankenhaus Berlin, Warener Str.7, 12683 Berlin) besprochen.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 22 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) verwendet. Für den Vergleich der verschiedenen Materialien zu einem Zeitpunkt wurde eine one way ANOVA (Analysis of Variances) mit nachfolgendem Dunnett's T3 Test gewählt. Da von keiner Varianzgleichheit ausgegangen wurde, bot sich der T3 nach Dunnett an.

Für die Testung auf Unterschiede zwischen dem proximalen und dem distalen Anteil einer ROI, für den Vergleich der Zunahme des Knochenvolumens von drei zu neun Wochen und für den Vergleich der Knochenmenge in der umgebenden ROI zwischen den zwei Heilungszeitpunkten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Er wurde hier verwendet, da in diesen Fällen immer nur ein Parameter (Knochenmenge in proximalen bzw. distalem Anteil der ROI oder Knochenmenge zu drei oder zu neun Wochen) in einer Materialgruppe und nicht die Materialgruppen untereinander verglichen wurden.

Das Signifikanzniveau war bei allen Test $p \leq 0,05$. Die Ergebnisse sind als Boxplots mit Medianen und den unteren und oberen Quartilen dargestellt, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Materialien über eckige Klammern markiert sind. Die gegenüber den anderen Materialien signifikant unterschiedliche Materialgruppe ist durch einen Haken gekennzeichnet. Die restlichen Striche markieren die Materialien gegen die die Materialgruppe signifikante Unterschiede zeigt. Eine signifikante Gewebezu- bzw. -abnahme von drei zu neun Wochen wird in den Abbildungen über ein Sternchen über der jeweiligen Materialgruppe gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 ANREICHERUNGSVERFAHREN

Wie schon in vorangegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe dargestellt (Bormann et al. 2014), ist das hier verwendete Anreicherungsverfahren eine gute Möglichkeit zur Vermengung verschiedener Komponenten. Das Mischen in der Spritze funktionierte gut und resultierte in einer homogenen, pastösen Masse. Die Sterilität der Komponenten in der Spritze war weiterhin gegeben. Nach jeder Operation wurden die Spritzen gereinigt, durch Dampfsterilisation sterilisiert und für jede Operation neu befüllt. Nach wiederholter Sterilisation war bei zwei der insgesamt sechs verwendeten Spritzen der Spritzenkolben leicht schwergängig, die Spritzen waren aber weiterhin verwendbar. Die restlichen Spritzen funktionierten auch nach wiederholter Sterilisation tadellos.

Um die demineralisierte Matrix und die Flüssigkeiten homogen zu vermischen, waren zehn Schübe mit dem Mischpropeller ausreichend. Die Homogenität blieb über die gesamte Dauer der Lagerung während der Operation erhalten. Das Gemisch war pastös und konnte gut in die Bohrlochdefekte eingefüllt werden. Die Struktur blieb auch im Bohrloch erhalten, so dass das Knochentransplantat nicht ausgeschwemmt wurde und am Wirkort blieb. Dies konnte auch in einem Vorversuch an Kadaverknochen bestätigt werden. Hierfür wurden Bohrlochdefekte mit dem Knochentransplantat gefüllt und wie oben beschrieben behandelt und histologische Schnitte angefertigt. Durch histologische Färbungen konnte auch nach der Einbettung in Polymethylmethacrylat die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix im Bohrlochdefekt nachgewiesen werden.

4.2 SERUMGENTAMICINKONZENTRATION

Um systemische Gentamicin-Konzentrationen nach der lokalen Gabe am Knochen ausschließen zu können, wurden die Serumproben mit Hilfe des *in-vitro* KIMS-Test (kinetic interaction of microparticles in a solution, KIMS) untersucht.

Dreiundzwanzig der insgesamt dreißig Proben zeigten eine Gentamicin-Konzentration unterhalb des Referenzbereiches (0,5 – 2 mg/l) und sieben Proben zeigten eine Konzentration an der unteren Grenze des Referenzbereiches (0,5 – 0,7 mg/l). Hierbei handelte es sich um die Serumwerte im Rahmen der Operation der rechten Körperseite von Schaf Nr. 2 zu allen drei Entnahmezeitpunkten (0,59 – 0,73 mg/l) und Schaf Nr. 6 zu einem und fünf Tage nach der Operation (0,55 – 0,58 mg/l). Bei der Blutentnahme im Rahmen der Operation der linken Körperseite zeigte das Schaf Nr. 6 am Tag der Operation und fünf Tage nach der Operation ein Serumgentamicinkonzentration an der unteren Grenze des Referenzbereiches (0,54 mg/l).

4.3 OPERATIONSVERLAUF UND HEILUNGSPROZESS

Fünf der insgesamt acht operierten Schafe tolerierten beide Operationen ohne größere Komplikationen. Die Tiere standen innerhalb von 12 Stunden selbstständig und zeigten eine ungestörte Futteraufnahme. Die Lahmheit war in den ersten drei Tagen nur geringgradig und alle Tiere liefen innerhalb der ersten sechs bis sieben Tage nach beiden Operationen lahmheitsfrei.

Zwei Tiere zeigten zu Tag 6 und Tag 7 nach der ersten Operation medial am Knie und ein Tier am zehnten Tag nach der zweiten Operation im Bereich des Hüfthöckers eine leichte Schwellung. Die Tiere liefen über die ganze Zeit lahmheitsfrei und die Schwellung war nach einem Tag zurückgegangen. Sonst heilten die Wunden gut ab und zeigten keine Entzündungsanzeichen. Es kam zu keinen Nahtdehiszenzen, keinen Wundinfektionen oder überschießenden Narbenbildungen.

Im Laufe des Versuches verstarben drei Tiere. Ein Tier wurde während der zweiten Operation noch in Narkose euthanasiert. Das Tier erholte sich nach der ersten Operation zwar schnell und zeigte bei der Allgemeinuntersuchung keine Auffälligkeiten. Während der zweiten Operation fielen jedoch blasse Maulschleimhäute auf und eine Blutgasanalyse ergab einen Hämatokritwert von 9,7%. Eine Bauchpunktion auf intraabdominale Blutung war ohne besonderen Befund. Nach einer Bluttransfusion von 450 ml von einem gesunden Spendertier stieg der Hämatokrit auf 10,3% an, verblieb aber bei diesem Wert. Als das Tier auch bei verminderter Isoflurangabe keine selbstständige Atemtätigkeit oder einen Pupillarreflex aufwies, wurde es durch die intravenöse Gabe von 100 ml Kaliumchlorid euthanasiert. Die Auswertung des Blutes im Labor ergab eine chronische Anämie aufgrund eines Kupfermangels.

Ein anderes Tier fiel bei Anlieferung durch einen nasalen Stridor und einen mukopurulenten Nasenausfluss mit verstärkt abdominaler Atmung auf. Eine Allgemeinuntersuchung ergab eine geringgradig inspiratorisch verschärfte Atmung und sonst ein gutes Allgemeinbefinden. Das Tier wurde mit 3 ml Veracin/ 50 kg KG und 3 ml Catosal (Catosal® 10%, Injektionslösung, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) behandelt. Als das Tier nach sieben Tagen weiterhin wechselnd verstärkte Atmung mit mukopurulentem Nasenausfluss zeigte wurde das Tier mit 2,5 mg / kg KG Baytril (Baytril® 10%, Injektionslösung, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) behandelt. Daraufhin verschwanden die Symptome, das Tier zeigte ein gutes Allgemeinbefinden. Als das Tier eine weitere Woche symptomlos blieb, wurde die Operation an der rechten Körperseite durchgeführt. Die Narkose und Operation verlief ohne weitere Auffälligkeiten und Komplikationen. In den ersten zwei Tagen nach der Operation zeigte das Tier ein gutes Allgemeinbefinden und nur eine geringgradige Lahmheit. Am dritten Tag nach der Operation fiel das Tier mit schwarzgefärbten blutig-wässrigem Durchfall auf. Die rektale Temperatur betrug 36,5°C, das Allgemeinbefinden war deutlich reduziert, die Schleimhäute porzellanblass und das Tier war dehydriert. Eine Blutuntersuchung ergab einen Hämatokritwert von 10%. Trotz einer intensiven Therapie mit Wärmezufuhr, Infusionen mit glucosehaltigen Lösungen und Plasmaexpander, sowie einer intensiven schmerz- und infektionsprophylaktischen Behandlung verschlechterte sich der Zustand des Tieres stark. Eine Bluttransfusion von 300 ml Blut eines gesunden Spendertieres zeigte keine Wirkung

und der Hämatokrit verschlechterte sich auf 5%. Daraufhin wurde das Tier nach einer Sedation durch die intravenöse Gabe von 100ml Kaliumchlorid euthanasiert

Ein drittes Tier musste im Verlauf nach der ersten Operation euthanasiert werden. Das Tier zeigte sich vor und direkt nach der Operation mit gutem Allgemeinbefinden, die Operation verlief komplikationslos. Am vierten Tag nach der Operation fiel das Tier durch ein reduziertes Allgemeinbefinden, eine sistierende Futteraufnahme und fehlenden Kotabsatz auf. Die Allgemeinuntersuchung ergab eine rektale Temperatur von 38,6°C, normal geformten Kot im Rektum, keine Pansenmotorik und eine angespannte Abdominaldecke. Das Tier war mittelgradig dehydriert und eine Blutgasanalyse ergab einen Hämatokrit von 50%. Trotz intensiver Behandlung durch intravenöse Infusionen, oraler Gabe von Pansenstimulanzien sowie einer infektiionsprophylaktischen und analgetischen Therapie zeigte das Tier im Laufe des Tages keine Verbesserung. Auf die subkutane Gabe von 1,5 ml Neostigmin (Konstigmin®, Injektionslösung, Vetoquinol AG, Ittingen, Deutschland) hin zeigte das Tier Kotabsatz, das Allgemeinbefinden verschlechterte sich dennoch weiterhin, so dass das Tier euthanasiert wurde. Eine postmortale Sektion ergab eine mit Petechien durchsetzte Bauchdecke und einen mit Ingesta und rötlichem Sekret angefüllten Bauchraum. Die Labmagenauskleidung wies vier Ulcera auf, von denen einer in das Omentum majus perforiert war.

4.4 RADIOLOGISCHE ERGEBNISSE

4.4.1 RÖNTGENAUFNAHMEN

Im Rahmen der Probengewinnung wurden Röntgenaufnahmen von den entnommenen Knochen zusammen mit dem umliegenden Weichteilgewebe angefertigt. Ziel war es eine eventuelle ektope Knochenbildung nach der Gabe von BMP-2 nachzuweisen. Dies war in keiner Probe der Fall. Die Positionsschrauben und die Bohrlöcher waren gut erkennbar (Abb. 17) und die Aufnahmen dienen somit zusätzlich der Orientierung am Knochen für die Probengewinnung.



Abb. 17 Röntgenaufnahme ex vivo

Schaf Nr. 2, Darstellung von Humerus, Metakarpus, Femur und Metatarsus (von links nach rechts) der linken Körperseite nach drei Wochen Heilungszeit. Es ist keine ektope Knochenbildung sichtbar. Die Bohrlöcher sowie die Positionsschrauben sind gut zu erkennen.

4.4.2 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE

In der Abb. 18 sind dreidimensionale Rekonstruktionen der μ CT Scans als Auf- und Seitenansicht des Bohrloches als Beispiel für eine diaphysäre und metaphysäre Bohrlochheilung zu sehen. Repräsentative Schnittbilder für den Heilungsverlauf der verschiedenen Materialien werden in der Abb. 19 dargestellt.

Die Schnittbilder des μ CTs zeigten bei den diaphysären Defekten nach drei Wochen keine röntgendichten Strukturen in der Gruppe DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten. Alle Defekte der Gruppe behandelt mit autologem Knochenmaterial, zeigten röntgendichte Strukturen innerhalb des Bohrlochs. Eine Unterscheidung zwischen neugebildetem Knochen und eingebrachter autologer Spongiosa war nicht möglich (siehe 5.3.1).

Nach neun Wochen waren die Bohrlöcher der Gruppe DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa vollständig geheilt. Die Bohrlochdefekte von DBM, DBM+Gentamicin und die der Leerkontrollen waren unvollständig geheilt.

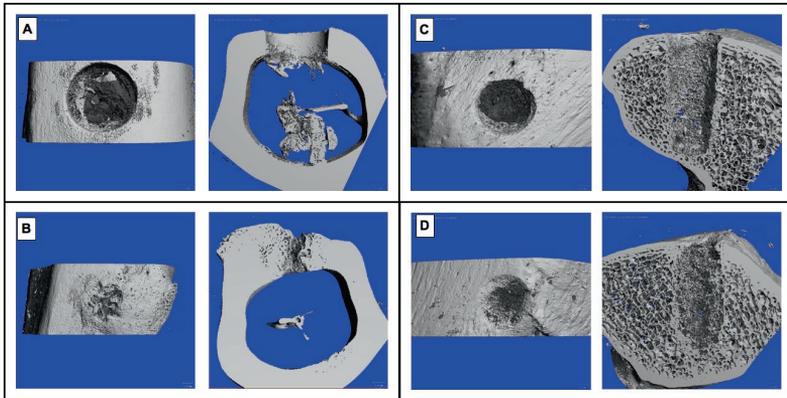


Abb. 18 Dreidimensionale Rekonstruktion der μ CT Scans

(A & B) Beispiele für diaphysäre Bohrlochdefekte zu drei (A) und neun Wochen (B) (Schaf Nr. 6, DBM+Gentamicin) und (C & D) für metaphysäre Bohrlochdefekte zu drei (C) und neun Wochen (D) Heilungszeit (Schaf Nr. 3, DBM)

Die metaphysären Defekte zeigten zu drei und neun Wochen ein ähnliches Bild wie die diaphysären. Im Unterschied zu den diaphysären Bohrlöchern zeigte die Gruppe DBM+Gentamicin nach neun Wochen nur in zwei von sechs Defekten ein geringgradiges Knochenwachstum.

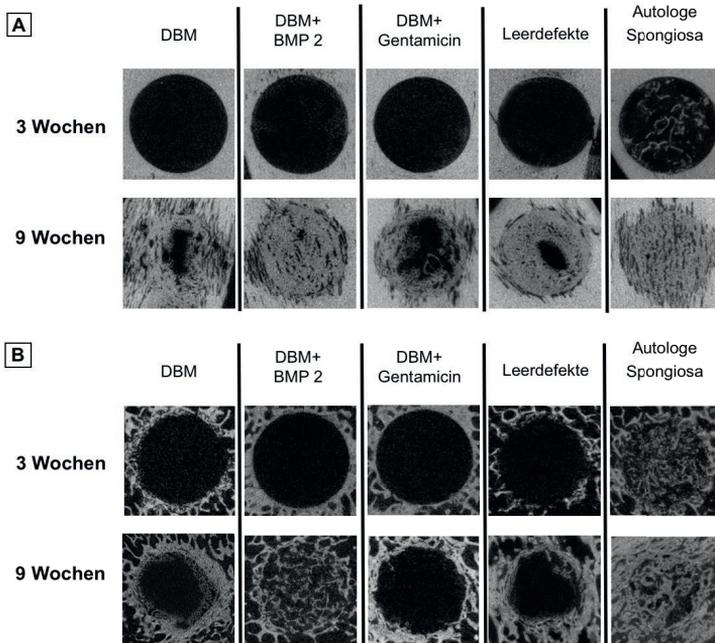


Abb. 19 μCT-Schnittbilder zur deskriptiven Auswertung

Darstellung der Heilungsverläufe anhand der μCT-Schnittbilder getrennt nach drei und neun Wochen Heilungszeit; diaphysäre (A) und metaphysäre Bohrlöcher (B) im Vergleich

Die quantitative Messung des Knochenvolumens zeigte bei allen Materialgruppen der diaphysären Bohrlochdefekte eine signifikante Zunahme des Bone Volume of Total Volume (BV/TV) von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,002$). Der Vergleich des prozentualen Knochenanteils der Materialgruppen untereinander zeigt zu drei Wochen ein signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe autologe Spongiosa im Vergleich zu den restlichen Materialien (ANOVA, $p \leq 0,02$). Zu neun Wochen weist DBM+BMP-2 ein tendenziell höheres Knochenvolumen im Vergleich zu DBM und DBM+Gentamicin auf. DBM+BMP-2, die Leerdefekte und die Gruppe autologe Spongiosa zeigen ähnlich viel Knochenvolumen (Abb. 20).

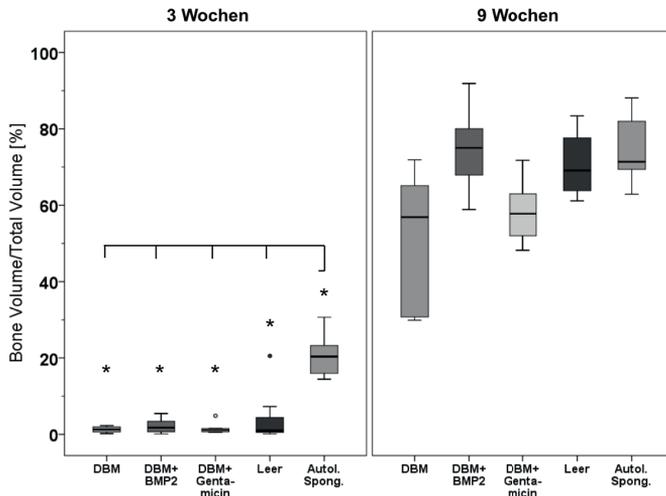


Abb. 20 Knochenvolumen der diaphysären Bohrlochdefekte (μ CT)

Quantitative Bestimmung des Knochenvolumens (Bone Volume) in Prozent vom gesamten Volumen der Region of Interest (Bone Volume of Total Volume). Vergleich der Materialgruppen zu drei Wochen (links) und neun Wochen Heilungszeit (rechts). Die Gruppe autologe Spongiosa zeigte zu drei Wochen ein signifikant höheres Knochenvolumen als die restlichen Materialgruppen (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,02$). Alle Materialgruppen zeigten eine signifikante Knochenzunahme (markiert durch ein Sternchen über der jeweiligen Materialgruppe) von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U $p \leq 0,002$).

Bei den metaphysären Defekten zeigten die Gruppen DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und die Leerdefekte eine signifikante Knochenzunahme von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,009$). Zur Auswertung der metaphysären Defekte wurde zur Ermittlung eines Nativwertes für das prozentuale Knochenvolumen bei zehn Nativproben das Bone Volume of Total Volume (BV/TV) gemessen. Der Median der Nativproben ergab ein BV/TV von 21,56% und ist in den folgenden Abbildungen als horizontale Linie dargestellt (Abb. 21). Im Vergleich der Materialien untereinander zeigte die Gruppe behandelt mit autologer Spongiosa das signifikant höchste Knochenvolumen zum Zeitpunkt drei und neun Wochen (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,015$). Das Knochenvolumen der Bohrlöcher dieser Gruppe war zu beiden Zeitpunkten höher als das der Nativproben. Zu neun Wochen zeigte sich zudem ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen der Gruppe DBM+BMP-2 gegenüber DBM und DBM+Gentamicin (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,018$) (Abb. 21).

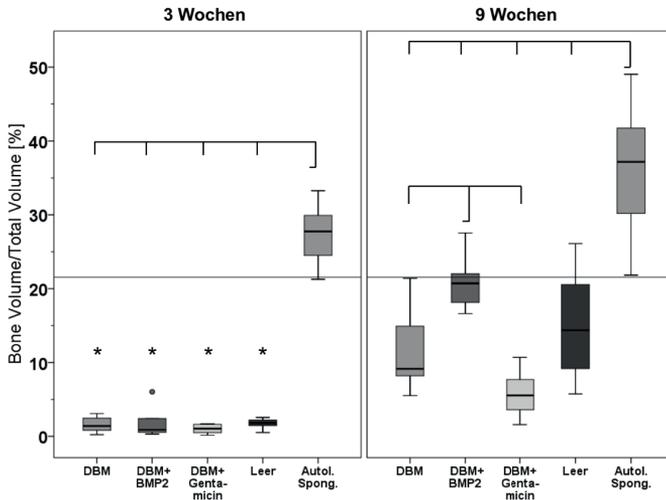


Abb. 21 Knochenvolumen der metaphysären Bohrlochdefekte (μ CT)

Gezeigt wird das prozentuale Knochenvolumen (Bone Volume of Total Volume) der metaphysären Defekte. Die horizontale Linie markiert den prozentualen Knochengehalt der Nativproben (21,56%). Eine signifikante Knochenzunahme von drei zu neun Wochen war in den Gruppen DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten zu beobachten (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,009$). Zu beiden Heilungszeitpunkten wies die Gruppe autologe Spongiosa den signifikanten höchsten Knochenanteil auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,018$).

4.5 HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE

4.5.1 DESKRIPTIVE AUSWERTUNG

Für die deskriptive Auswertung wurden die Schnitte gefärbt nach Safranin O / von Kossa und Movat Pentachrom verwendet. Das Bohrloch war zentral und mittig positioniert und wie beschrieben (siehe 3.7) in die verschiedenen Regions of Interest unterteilt (Abb. 14).

Alle Schnitte waren von sehr guter Färbequalität, die unterschiedlichen Gewebe waren kräftig angefärbt und gut voneinander zu differenzieren. Die Schnittqualität war bis auf einzelne Ausnahmen sehr gut. Gelegentlich kam es zu dem Ausbrechen einzelner Trabekel des umgebenden Knochens bei den metaphysären Defekten. In den meisten Fällen betraf das nur umliegenden Gebiete und die Proben konnten in die Auswertung mit eingehen.

Kombinierte Safranin O / von Kossa Färbung

Aufgrund der schwarzen Färbung des mineralisierten Knochens eignet sich die Färbung nach Safranin O / von Kossa gut zur Beurteilung des Knochengewebes. Auf die anderen Komponenten des Bohrloches (eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix, autologe Spongiosa und Bindegewebe) wird in der Beschreibung der Movat Pentachrom Färbung eingegangen. Bei den diaphysären Defekten waren die Bohrlochdefekte aller

Gruppen zum Heilungszeitpunkt drei Wochen gut von der Umgebung abgrenzbar und das dominierende Gewebe im Bohrloch war Bindegewebe (Abb. 23). Im Bohrloch zeigten die Gruppe DBM, DBM+Gentamicin und die Leerdefekte kleine Mengen an einwachsendem Knochen. Der Knochen wuchs in Form von kleinen Trabekeln aus Geflechtknochen von dem Bohrlochrand aus ein und beschränkte sich auf den äußeren Ring (Abb. 22).

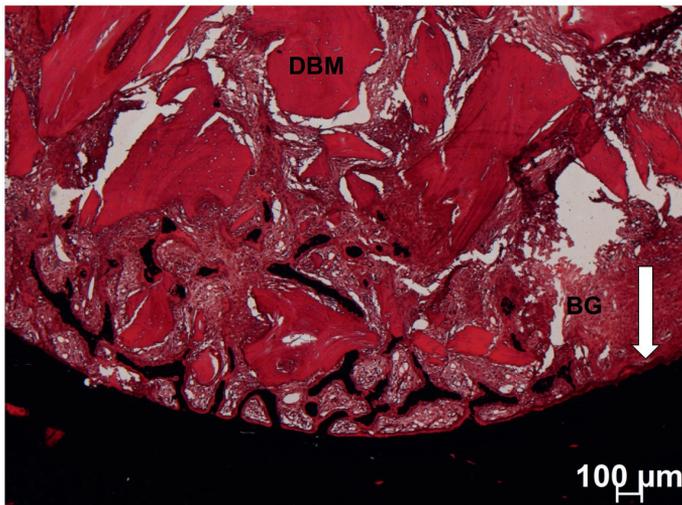


Abb. 22 Knochenbildung im Bohrloch (Safranin O / von Kossa)

Darstellung der Knochenneubildung im Bohrloch. Der Knochen wächst in Form von dünnen Trabekeln (schwarz) vom Bohrlochrand (durch einen Pfeil markiert) aus ein. Im Bohrloch ist zudem die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix (DBM) und Bindegewebe (BG) zu erkennen. Schaf Nr. 3, DBM+Gentamicin, diaphysär, 3 Wochen, 5x Objektiv

Nur die Gruppe DBM+BMP-2 zeigte im äußeren Ring größere Mengen Knochengewebe, welches auch in kleinen Mengen bis in den inneren Ring des Bohrloches reichte. Die Gruppe autologe Spongiosa zeigte Knochengewebe im gesamten Bohrloch, der Knochen war aufgrund der reifen Knochenstruktur als eingebrachtes autologes Knochenmaterial erkennbar. Eine genauere Unterscheidung ob es sich um eingebrachtes Knochenmaterial oder neugebildeten Knochen handelt war nicht möglich (siehe 5.3.1). Der umgebende Knochen war in allen Gruppen unverändert und präsentierte sich als einheitliche Fläche aus lamellärem, kortikalem Knochen.

Zu neun Wochen waren die Bohrlochränder der Gruppen DBM, DBM+Gentamicin und der Gruppe autologe Spongiosa nur noch geringgradig von der Umgebung abgrenzbar und in fünf von acht Proben der Gruppe DBM+BMP-2 und der Leerdefekte nicht mehr abgrenzbar. In allen Defekten war das dominierende Gewebe im Bohrloch zu diesem Zeitpunkt Knochen. Der Knochen war bei DBM+BMP-2 und den Leerdefekten flächig mit nur noch kleinen bindegewebigen Löchern. In der Gruppe DBM, DBM+Gentamicin und autologe Spongiosa hatte der Knochen im äußeren Ring die Form von breiten, Trabekeln,

die zu Flächen verschmolzen. In allen Gruppen reichte die Knochenbildung bis in den inneren Ring, wobei sie hier, mit Ausnahme der Gruppe DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa, ausdünnte. In der Gruppe DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa zeigte der Knochen bis in das Bohrlochzentrum breite Trabekel bis hin zu verschmolzenen Flächen. Der umgebende Knochen zeigte in allen Gruppen eine Auflockerung der Knochenstruktur mit einer Bildung von „Lücken“, die in allen Gruppen außer bei DBM+Gentamicin bis in die zweite umgebende ROI reichte (siehe Auflockerungen im Knochen um das Bohrloch herum in Abb. 23, DBM+Gentamicin 9 Wochen).

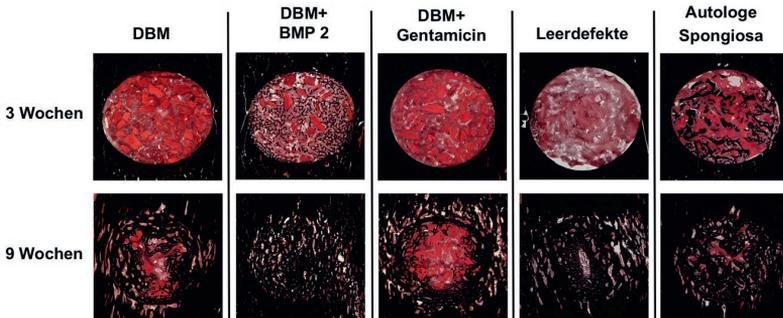


Abb. 23 Histologische Beispiele der diaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa)

Vergleich der Materialien nach drei (oben) und neun Wochen (unten) Heilungszeit. Zu drei Wochen ist eine Knochenheilung bei DBM+BMP-2 sichtbar und die Gruppe autologe Spongiosa zeigt gebrochene Trabekel im Bohrloch. Bei DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten ist keine Knochenheilung sichtbar. Zu neun Wochen sind die Bohrlöcher bei DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa vollständig und bei DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten unvollständig geheilt.

Bei den metaphysären Defekten waren zum Zeitpunkt drei Wochen die Bohrlöcher der Gruppen DBM, DBM+Gentamicin und die der Leerdefekte sehr gut von umgebenden Knochen abzugrenzen, bei der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa war dies nur noch bedingt möglich (Abb. 24). In allen Gruppen war das vorherrschende Gewebe Bindegewebe. In den Gruppen DBM, DBM+Gentamicin, den Leerdefekten und der Gruppe autologe Spongiosa beschränkte sich das Knochenwachstum auf den äußeren Ring (Abb. 24). Allein in der Gruppe DBM+BMP-2 reichte die Knochenbildung bis in den inneren Ring des Bohrloches. Der Knochen zeigte sich in allen Gruppen als dünne Trabekel aus Geflechtknochen, die vom Bohrlochrand aus in das Bohrloch einwuchsen. In der Gruppe autologe Spongiosa zeigte sich Knochenmaterial über das gesamte Bohrloch verteilt. In der Gruppe DBM, DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa war der umgebende Knochen in der ersten umgebenden ROI (SurR1) verdichtet. Er bestand aus Geflechtknochen in Form von kleinen, dünnen Trabekeln, die ein engmaschiges Netz bildeten (siehe Leerdefekt 3 Wochen in Abb. 24). Das Gewebe der Ebene 2 verhielten sich wie das der Ebene 1.

Zu neun Wochen waren die Bohrlöcher der Gruppen DBM+Gentamicin und die Leerdefekte sehr gut von der Umgebung abzugrenzen. In der Gruppe DBM war die Abgrenzung etwas geringer und in den Gruppen DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa

nicht mehr möglich. In der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa war das dominierende Gewebe Knochen und in den restlichen Gruppe Bindegewebe. Die Knochenbildung der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa füllte das gesamte Bohrloch aus und zeigte sich im äußeren Ring als breite Trabekel aus lamellärem Knochen. Zum Zentrum des Bohrloches hin wurden die Trabekel dünner und bestanden aus Geflechtknochen. In der Gruppe DBM war im äußeren Ring viel Knochen festzustellen, der in dünnen Trabekeln mit in den mittleren Ring reichte. Bei DBM+Gentamicin und den Leerdefekten zeigten sich nur am Bohrlochrand kleine dünne Trabekel, die sich auf den äußeren Ring beschränkten. Die Verdichtung der umgebenden ROI war nur noch bei fünf von acht Proben der Leerdefekte sichtbar. Der umgebende Knochen verhielt sich sonst wie nativer Knochen. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen Ebene 1 und Ebene 2.

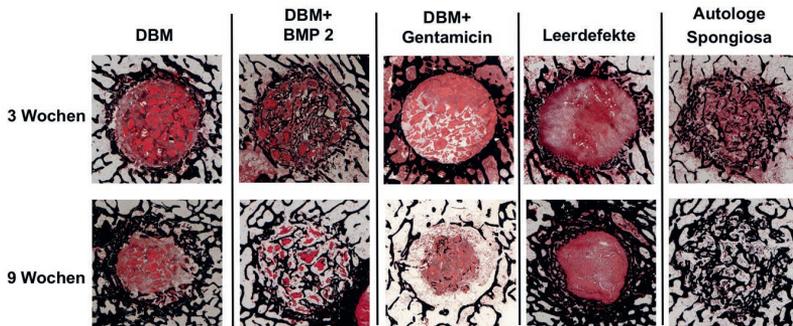


Abb. 24 Histologische Beispiele der metaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa)

Darstellung des Heilungsfortschrittes der Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Die Unterschiede zwischen den Materialien waren vor allem zu neun Wochen deutlicher im Vergleich zu den diaphysären Bohrlochern zu sehen. DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa zeigten eine vollständige Bohrlochheilung im Gegensatz zu DBM und den Leerdefekte. Der Fortschritt der Knochenheilung von DBM und den Leerdefekten scheint vergleichbar. Bei DBM+Gentamicin war keine Knochenheilung festzustellen.

Movat Pentachrom

Die Auswertung des Knochengewebes ergab keine Unterschiede zu der Auswertung nach Safranin O / von Kossa, deshalb wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen. Aufgrund der differenzierten Färbung konnte anhand dieser Färbung das Augenmerk auf das Bindegewebe, das eingebrachte Material (DBM oder autologe Spongiosa) und Anzeichen einer Entzündung in Form der Vaskularisierung und dem Auftreten von Leukozyten und mehrkernigen Riesenzellen gerichtet werden.

Die Abb. 25 und Abb. 26 zeigen einen Vergleich der histologischen Schnittbilder der Materialgruppen der diaphysären und metaphysären Bohrlochdefekte zu drei und neun Wochen.

Wie in der deskriptiven Beschreibung der Färbungen nach Safranin O / von Kossa zeigte sich hier kein Unterschied zwischen der Ebene 1 und 2 der metaphysären Defekte. Die nachfolgende Beschreibung gilt somit für beide Ebenen.

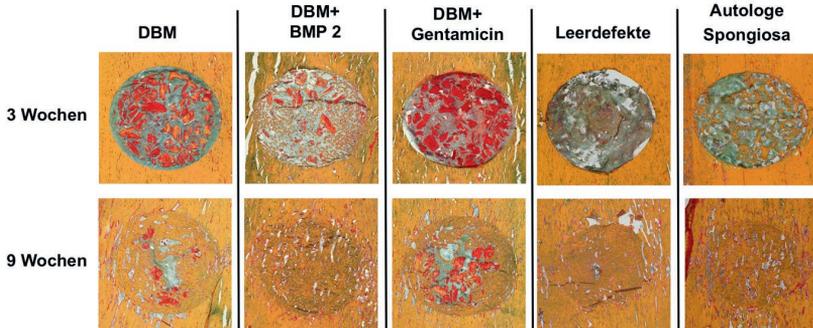


Abb. 25 Histologische Beispiele der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)

Darstellung des Heilungsfortschrittes der Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Unterscheidung des Knochengewebes (gelb), Bindegewebes (blau - grün) und der eingebrachten demineralisierten Matrix (rot).

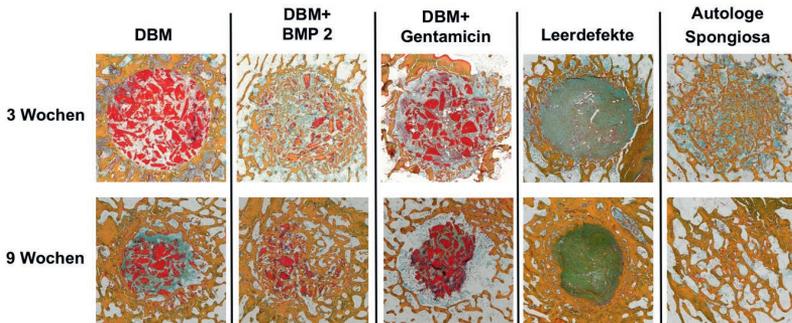


Abb. 26 Histologische Beispiele der metaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)

Darstellung des Heilungsfortschrittes der Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Vor allem die eingebrachte demineralisierte Matrix (rot) ist zwischen den neugebildeten Trabekeln (gelb) gut zu erkennen.

Bindegewebe und eingebrachtes Material (demineralisierte Knochenmatrix und autologe Spongiosa)

Das Bindegewebe präsentierte sich in einem frühen Heilungsstadium als eine Fläche aus Fibrozyten und – blasten (Abb. 29) oder bei Fortschreiten der Heilung als ein feinfaseriges Netz aus Fibrozyten und vereinzelt Adipozyten (Abb. 35). Das eingebrachte Material war entweder die demineralisierte Knochenmatrix (DMBp) oder autologe Spongiosa. Die DBM stellte sich in Form von Bruchstücken in roter Farbe mit sichtbarer Knochenstruktur mit leeren Osteozytenlakunen dar (Abb. 27).

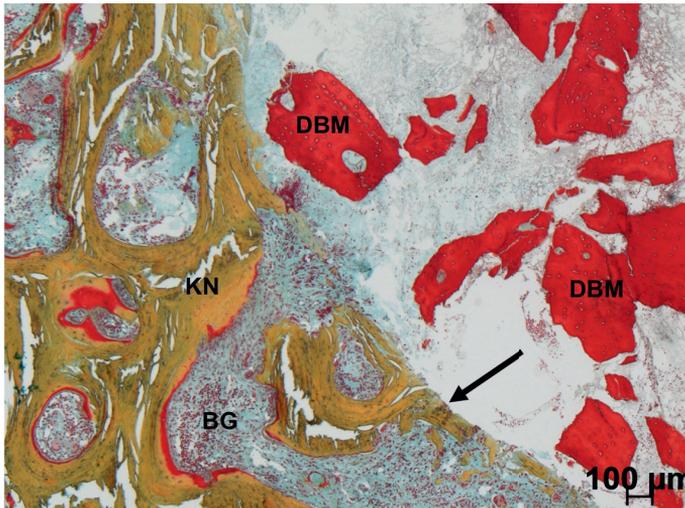


Abb. 27 DBM-Bruchstücke (Movat Pentachrom)

Die Bruchstücke eingebrachter demineralisierter Knochenmatrix (DBM) liegen im Bohrloch. Der Pfeil weist auf den Bohrlochrand, der von Knochen trabekeln (KN) und Bindegewebe (BG) gebildet wird. Schaf Nr. 3, DBM, mPH, 3 Woche, Objektiv 5x

Die eingebrachte autologe Spongiosa war wie der umgebende und neugebildete Knochen gelb gefärbt. Sie konnte aufgrund ihrer Form gut von dem neugebildeten Knochen unterschieden werden. Sie präsentierte sich in Form von breiteren Trabekeln die zum großen Teil gebrochen waren und aus lamellärem Knochen mit Osteozyten bestanden (Abb. 28).

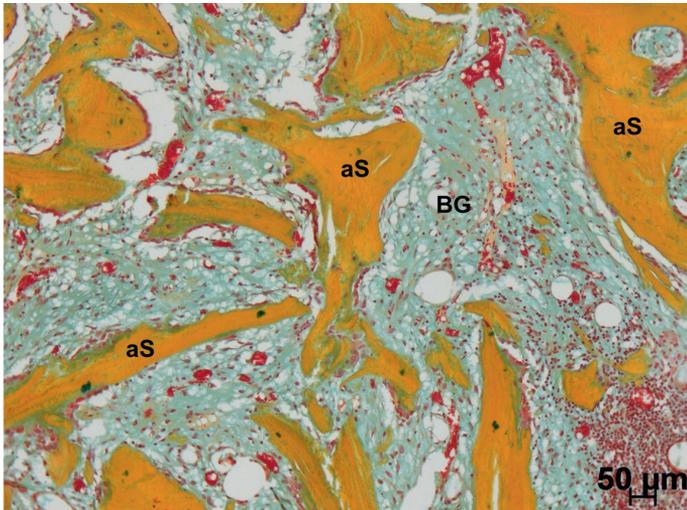


Abb. 28 Autologe Spongiosa (Movat Pentachrom)

Darstellung der eingebrachten autologen Spongiosa (aS) im Bohrloch. Die autologe Spongiosa zeigt sich in Form von breiten Trabekeln mit zum Teil abgebrochenen Enden, die im Bindegewebe (BG) im Bohrloch liegen. Schaf Nr. 2, autologe Spongiosa, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 10x

Bei dem Vergleich der Materialgruppen untereinander bestand bei den diaphysären Defekten das Bindegewebe zum Zeitpunkt drei Wochen vor allem aus Fibrozyten und –blasten in Form einer einheitlichen Fläche. Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix war in den Gruppen DBM und DBM+Gentamicin in großer Menge vorhanden. In der Gruppe DBM+BMP-2 konnten nur noch geringe Mengen festgestellt werden. Vor allem in der Gruppe DBM wurde die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix stark abgebaut, ein Einbau fand im äußeren Ring in die neugebildeten Trabekel statt (Abb. 29).

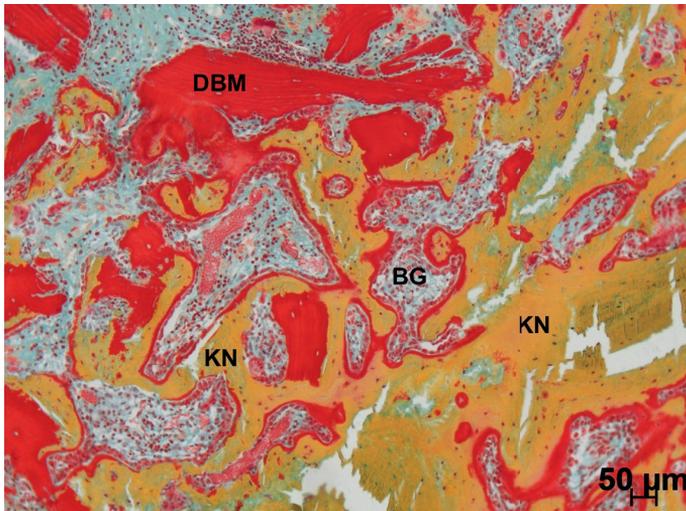


Abb. 29 Einbau der DBM in neugebildete Trabekel (Movat Pentachrom)

Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix (DBM) wird in die neugebildeten Knochen trabekel (KN) eingebaut. Zwischen den Trabekeln ist das Bindegewebe (BG) als Fläche sichtbar. Schaf Nr. 2, DBM, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 10x

Eingebrachte DBM, Knochen und autologe Spongiosa wurde durch Osteoklasten abgebaut. Als Osteoklast wurde eine große Zelle mit hohem Zytoplasmaanteil definiert, die sich durch mehrere Zellkerne und einer Orientierung an der Knochenoberfläche auszeichnet. Die Zelle präsentiert sich oft mit einer angerauten Fläche (Hinweis auf Ausbildung der „ruffled border“), die dem Knochen zugewandt ist (Abb. 30). Durch die Färbung der Osteoklasten durch die TRAP-Färbung konnte ein Einblick in die Prozesse des Remodellings und des Abbaus der eingebrachten DBM gewonnen werden (3.7.3).

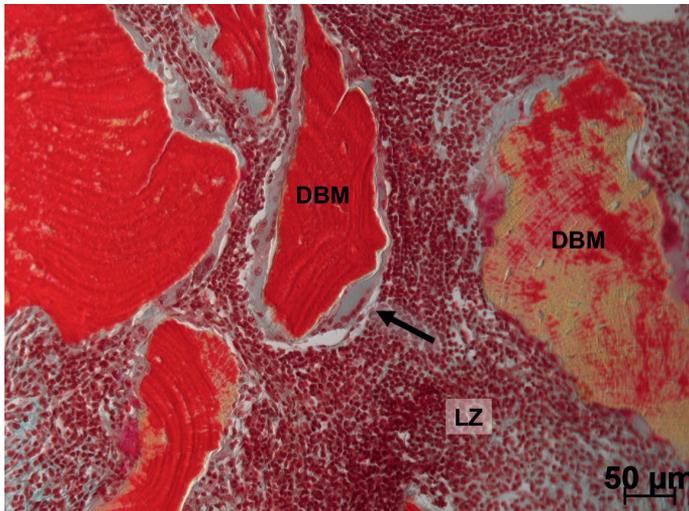


Abb. 30 Osteoklast (Movat Pentachrom)

Abbau der DBM von Osteoklasten (Pfeil). Die DBM ist von Leukozytenansammlungen (LZ) umgeben.
Schaf Nr. 3, DBM, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 20x

In der Gruppe autologe Spongiosa füllte die eingebrachte Spongiosa das Bohrloch aus und wurde vor allem im äußeren Ring stark in neugebildeten Trabekel eingebaut (Abb. 31).

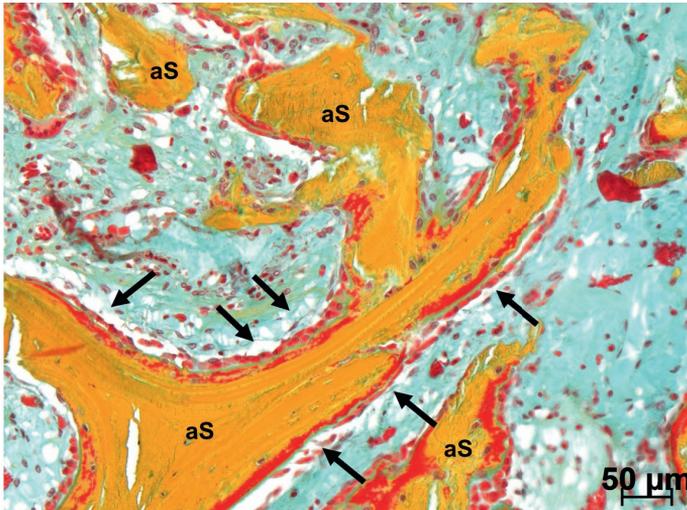


Abb. 31 Einbau der autologen Spongiosa in neugebildete Trabekel (Movat Pentachrom)

Besiedelung der autologen Spongiosa (aS) mit Osteoid (rote Linien an der Knochenoberfläche) bildenden Osteoblasten (Pfeile) und somit Einbau in die neugebildeten Knochen trabekel. Schaf Nr. 2, autologe Spongiosa, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 20x

Zu neun Wochen zeigte sich das Bindegewebe als feinfaseriges Netz aus reifen Fibrozyten und Adipozyten. Nur in der Gruppe DBM blieb die Anordnung des Bindegewebes bei fünf von sechs Proben flächig. Das Bindegewebe in den Auflockerungen in der Bohrlochumgebung (siehe 4.5.4 – Auflockerungen in der Bohrlochumgebung) bestand hauptsächlich aus Fibrozyten und die Knochenoberflächen waren dicht mit Osteoblasten besetzt (Abb. 32).

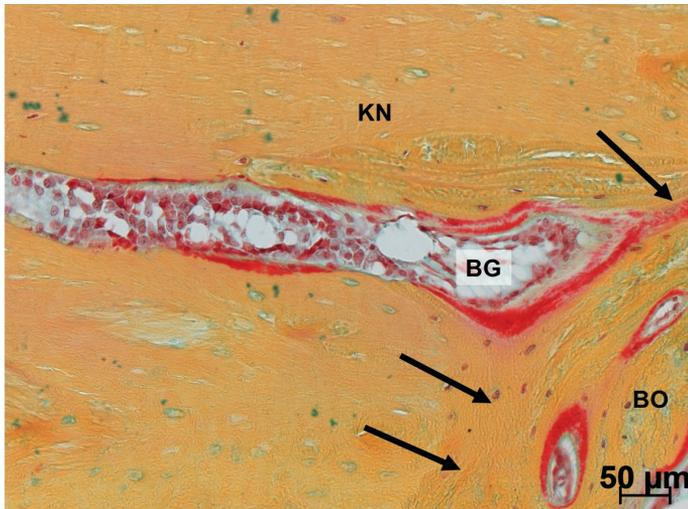


Abb. 32 Auflockerung in der Bohrlochumgebung (Movat Pentachrom)

Auflockerung im umgebenden Knochen (KN) des Bohrloches (BO) bei den diaphysären Defekten zu neun Wochen. Sie geht vom Bohrlochrand (durch Pfeile markiert) aus und ist mit Bindegewebe (BG) gefüllt. In der Auflockerung sind auf der Knochenoberfläche die in Reihen angeordneten Osteoblasten zu sehen. Schaf Nr. 4, DBM+Gentamicin, diaphysär, 9 Wochen, Objektiv 20x

Die DBM war bis in das Zentrum des Bohrloches bei der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin noch vereinzelt vorhanden. Die eingebrachte autologe Spongiosa war nicht mehr vom neugebildeten Knochen zu unterscheiden bzw. nicht mehr vorhanden.

Bei den metaphysären Bohrlochdefekten zu drei Wochen war das Bindegewebe bei allen Gruppen flächig. Die dominierenden Zellen waren Fibrozyten und –blasten. Das Bindegewebe der umgebenden Regions of Interest bestand in allen Gruppen aus sehr gefäßreichem Bindegewebe mit einem erhöhten zellulären Aufkommen (mehrkernige Riesenzellen, Erythrozyten und Leukozyten). Das erhöhte Zell- und Gefäßaufkommen der umgebenden ROI war unabhängig von der Verdichtung des trabekulären Knochens um das Bohrloch herum. Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix war in allen Gruppen in Form von Brocken in großer Menge über das gesamte Bohrloch verteilt vorhanden und wurde vor allem in der Gruppe DBM+BMP-2 und DBM+Gentamicin stark abgebaut (Abb. 26). Nur bei DBM+BMP-2 wurden die demineralisierte Knochenmatrix im äußeren Ring in die neugebildeten Trabekel eingebaut. In der Gruppe autologe Spongiosa war das eingebrachte Knochenmaterial in großer Menge im gesamten Bohrloch vorhanden und wurde im äußeren Ring vermehrt in die neugebildeten Trabekel eingebaut.

Nach neun Wochen Heilungszeit zeigten die Defekte der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa über das gesamte Bohrloch hinweg Bindegewebe als feinfaseriges Netz aus Fibrozyten und Adipozyten. Die Gruppe DBM und DBM+Gentamicin wiesen vor allem flächiges Bindegewebe mit Fibroblasten auf. Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix beschränkte sich in allen Gruppen auf das Bohrlochzentrum. In der Gruppe

DBM+BMP-2 lagen die DBM Brocken zwischen den Trabekeln im vollständig geheilten Bohrloch und wurden von Osteoklasten abgebaut. Bei den Gruppen DBM und DBM+Gentamicin lagen die Brocken im Zentrum des noch unvollständig geheilten Bohrloches und wurden ebenfalls verstärkt abgebaut. Die eingebrachte autologe Spongiosa war nicht mehr vom neugebildeten Knochen zu unterscheiden.

Vaskularisierung und Entzündungszeichen

Bei allen Defekten wurde die Vaskularisierung in Form von Gefäßen oder Lakunen gefüllt mit Erythrozyten (Abb. 33) beurteilt. Zudem wurde auf die Menge und Verteilung der Leukozyten und das Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen geachtet.

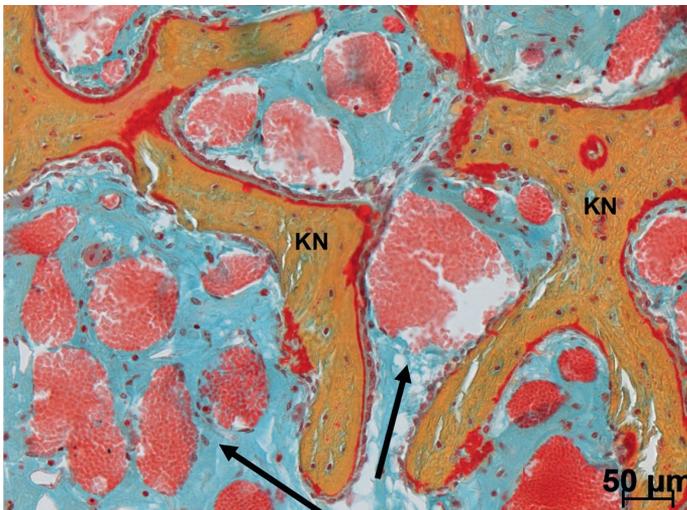


Abb. 33 Erhöhte Vaskularisierung (Movat Pentachrom)

Darstellung einer erhöhten Vaskularisierung in Form von Lakunen gefüllt mit Erythrozyten (Pfeil) zwischen Trabekeln des neugebildeten Knochens (KN). Schaf Nr. 1, DBM+Gentamicin, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 20x

Die vorkommenden Leukozytenansammlungen bestanden aus einem Gemisch aus Makrophagen, Histozyten und Lymphozyten (Abb. 34).

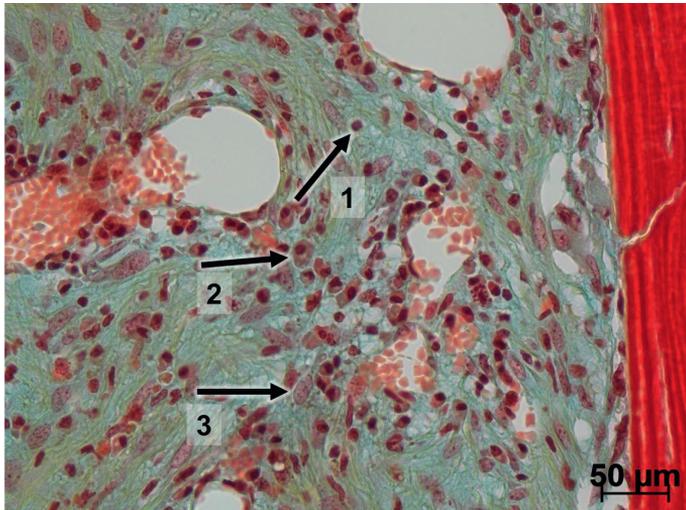


Abb. 34 Leukozyten im Detail (Movat Pentachrom)

Die Leukozytenansammlungen zwischen den DBM bestehen aus einem Gemisch aus Lymphozyten (Pfeil 1), Makrophagen (Pfeil 2) und Histiocyten (Pfeil 3). Sie befinden sich hauptsächlich in großen Ansammlungen um die DBM-Bruchstücke (rot, rechts im Bild) herum. Schaf Nr. 1, DBM, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 40x

Die mehrkernigen Riesenzellen zeigten sich als große Zelle mit viel Zytoplasma und mehreren Zellkernen, die sich in Hufeisenform anordneten (Abb. 35).

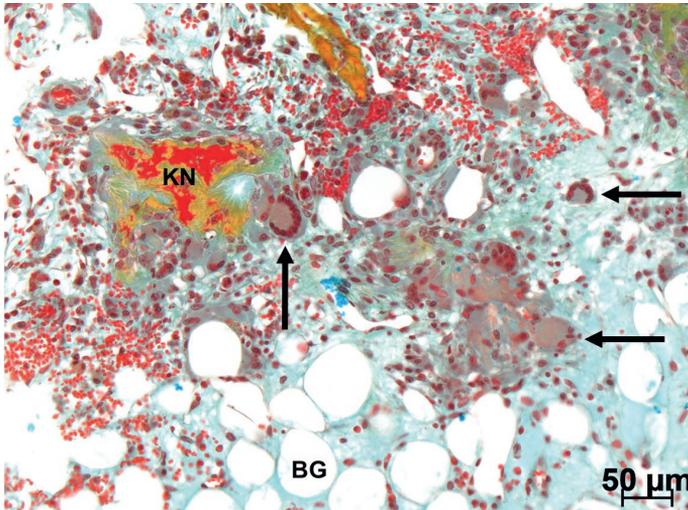


Abb. 35 Mehrkernige Riesenzelle an Knochenstück (Movat Pentachrom)

Mehrkernige Riesenzellen (Pfeile) mit mehreren Zellkernen, die sich zum Teil in Hufeisenform anordneten. Das Bindegewebe (BG) zeigte sich als feinfaseriges Netz aus Fibrozyten und Adipozyten. Im Bindegewebe war Knochen (KN) zu finden. Schaf Nr. 3, Leer, metaphysär, 3 Wochen, Objektiv 20x

Bei den diaphysären Defekten zeigte sich nach drei Wochen Heilungszeit in den Gruppen DBM, DBM+Gentamicin und autologe Spongiosa eine erhöhte Vaskularisierung im Bohrloch in Form von Lakunen gefüllt mit Erythrozyten. In der Gruppe DBM+BMP-2 und den Leerdefekten konnten nur wenig Lakunen gefunden werden. Leukozyten konnten nur in den mit DBM und dessen Anreicherung behandelten Gruppen gefunden werden. Vor allem in der Gruppe DBM präsentierten sie sich in großen wolkenartigen Ansammlungen zwischen den DBM-Brocken (Abb. 30). In den restlichen DBM-Anreicherungen fanden sich nur kleinere, vereinzelt Ansammlungen von Leukozyten. Mehrkernige Riesenzellen traten nur vereinzelt in zwei Proben der Gruppe autologen Spongiosa in der Bohrlochumgebung auf. Nach neun Wochen Heilungszeit fiel nur noch bei den Leerdefekten, vor allem im äußeren und mittleren Ring eine erhöhte Vaskularisierung auf. Es konnten keine Leukozytenansammlungen oder Riesenzellen festgestellt werden.

Die metaphysären Defekte fielen zum Zeitpunkt drei Wochen in allen Gruppen mit einer erhöhten Vaskularisierung im Bohrloch und in der -umgebung auf. Leukozyten waren nur in den Bohrlochdefekten behandelt mit DBM und dessen Anreicherungen in Form großen Ansammlungen an den DBM-Brocken zu finden. In allen Materialgruppen traten in ein bis zwei Defekten pro Gruppe mehrkernige Riesenzellen auf, diese waren vereinzelt und befanden sich vor allem in der Bohrlochumgebung. Zu neun Wochen war die Vaskularisierung in allen Gruppen erhöht und zeigte sich sowohl in Form von Lakunen bis hin zu voll ausgebildeten Gefäßen, die bis in die Bohrlochumgebung hineinreichten. Die Leukozytenansammlungen reduzierten sich in der Gruppe DBM, DBM+BMP-2 und DBM+Gentamicin auf einen schmalen Saum an den DBM-Brocken und vereinzelt,

kleinere Wolken. Die Ausnahme bildeten die Gruppe DBM+BMP-2 und DBM+Gentamicin in der Ebene 2. Hier bildeten die Leukozyten große Flächen um die DBM-Brocken herum. Mehrkernige Riesenzellen fanden sich nur noch sehr vereinzelt in der Bohrlochumgebung. Kam es zu einer Verdichtung des Knochengewebes um das Bohrloch herum, zeigte sich auch hier das Bindegewebe aktiviert. Es kam zu einer hohen Vaskularisierung, einem erhöhten Aufkommen an Entzündungszellen und das Auftreten von Riesenzellen war zahlreicher.

Knorpel

In vereinzelt Proben aller Materialgruppen konnte Knorpel nachgewiesen werden. Es handelte es sich um kleine Inseln mit enchondraler Knochenbildung, die sich meist am Bohrlochrand befanden (Abb. 36). Zwei von acht metaphysäre Proben der Gruppe DBM zeigten in der Ebene 1 am Bohrlochrand entlang eine längere enchondrale Knochenbildungsfläche. Ein vermehrtes Vorkommen in einer Materialgruppe, einer Lokalisation oder einem Zeitpunkt konnte nicht festgestellt werden.

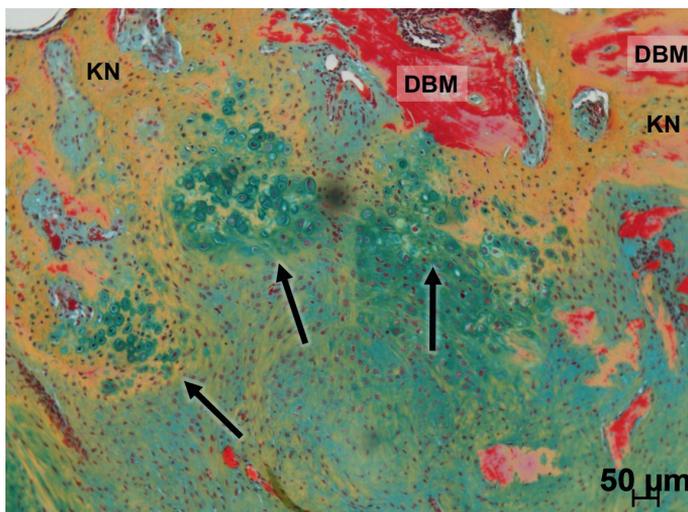


Abb. 36 Enchondrale Knochenbildung (Movat Pentachrom)

Vereinzelt enchondrale Knochenbildung (durch Pfeile markiert). Neben dem Knorpel sind die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix (DBM) im Knochen (KN) zu erkennen. Schaf Nr. 1, DBM, metaphysär, 9 Wochen, Objektiv 10x

4.5.2 VERGLEICH DER KNOCHENHEILUNG ZWISCHEN PROXIMAL UND DISTAL

Um einen Unterschied im Heilungsfortschritt zwischen den proximalen und distalen Anteilen der ROI zu detektieren, wurden diese getrennt voneinander anhand der Färbung nach Safranin O / von Kossa analysiert. Verglichen wurde das Knochenvolumen im proximalen Anteil zu dem im distalen Anteil je nach Region of Interest (IR, MR, OR, SurR1 und SurR2) getrennt nach Material (DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin, Leerdefekte und autologe Spongiosa), Lokalisation (diaphysär und metaphysär), Schnittebene bei den metaphysären Defekten (Ebene 1 und Ebene 2) und Zeitpunkt (drei und neun Wochen) (Abb. 37).

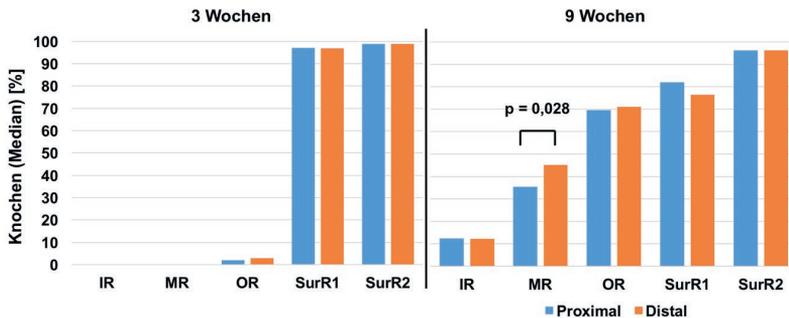


Abb. 37 Vergleich proximaler und distaler Anteil der ROI (Safranin O / von Kossa)

Dargestellt wird der prozentuale Knochenanteil (Median) der diaphysären Bohrlochdefekte der Gruppe DBM als Beispiel für den Vergleich des proximalen Anteils (blau) und des distalen Anteils (orange) in einer ROI. Der distale Anteil des mittleren Ringes (MR) des Bohrloches zeigte hier zu neun Wochen ein signifikant höheres Knochenvolumen im Vergleich zum proximalen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,028$).

Bei den insgesamt 180 Vergleichen ergaben sich neun signifikante Unterschiede zwischen dem proximalen und distalen Anteil (Tab. 19). Die signifikanten Unterschiede verteilen sich über die verschiedenen Materialien, Lokalisationen, Heilungszeiten und ROI ohne schlüssiges Verteilungsmuster. In der Auswertung ließ sich somit kein Unterschied bezüglich der Knochenheilung zwischen den proximalen und distalen Anteilen feststellen. Die ROIs wurden in der restlichen Arbeit nicht getrennt ausgewertet.

Tab. 19 Signifikante Unterschiede zwischen proximalem und distalem Anteil einer ROI getrennt nach Lokalisation und Heilungszeitpunkt

Material	Lokalisation	Zeitpunkt	Level 1 oder Level 2	Region of Interest	Höheres Knochenvolumen (proximal o. distal)	Signifikanz- level
DBM	diaphysär	9 Wo		MR	D	0,028
BMP-2	metaphysär	3 Wo	1	OR	P	0,028
BMP-2	metaphysär	3 Wo	2	IR	P	0,043
Gentamicin	metaphysär	9 Wo	1	OR	D	0,028
Gentamicin	metaphysär	9 Wo	2	OR	P	0,042
Autol. Spong.	metaphysär	9 Wo	2	OR	P	0,036
Autol. Spong.	diaphysär	3 Wo		MR	D	0,025
Autol. Spong.	diaphysär	3 Wo		OR	D	0,017
Autol. Spong.	diaphysär	9 Wo		MR	D	0,036

4.5.3 HISTOMORPHOMETRIE SAFRANIN O / VON KOSSA

Der Vergleich der gemessenen Knochenvolumina im Bohrloch getrennt nach den drei Regions of Interest (IR, MR und OR), zeigte eine Knochenzunahme vom inneren Ring (Defektzentrum) zum äußeren Ring in allen Materialgruppen (Abb. 38). Bei den diaphysären Bohrlochdefekten und den metaphysären Defekten der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa war die Tendenz nach neun Wochen Heilungszeit nicht mehr so deutlich nachvollziehbar, da die Bohrlöcher zum größten Teil schon vollständig geheilt waren.

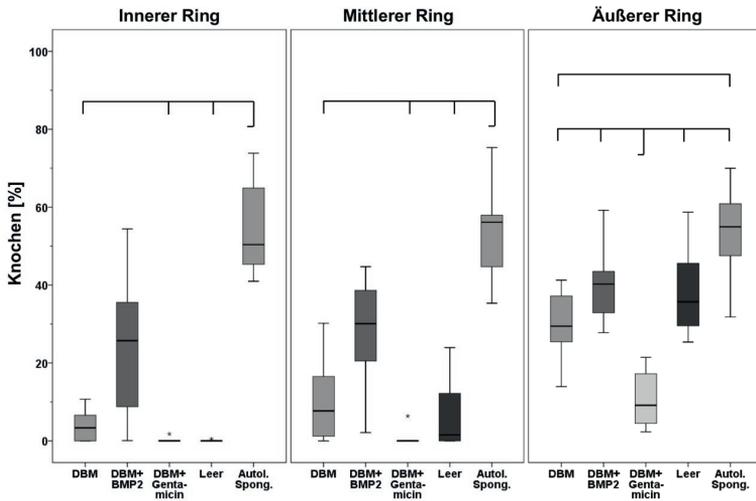


Abb. 38 Zentripetale Knochenheilung (Safranin O / von Kossa)

Vergleich der Materialien im Bohrloch getrennt nach den drei Regions of Interest innerer Ring (IR, Defektzentrum), mittlerer Ring (MR) und äußerer Ring (OR). Es zeigte sich eine Zunahme der gemessenen Knochenmenge in allen Materialgruppen vom inneren Ring zum äußeren Ring. Hier am Beispiel der metaphysären Bohrlochdefekte der Ebene 1 zum Zeitpunkt 9 Wochen dargestellt. (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$)

Für den Vergleich der verschiedenen Materialien untereinander zu den beiden Heilungszeitpunkten wurde das Bohrloch nicht unterteilt in Ringe betrachtet. Die histomorphometrische Auswertung des prozentualen Anteils an mineralisiertem Knochen ergab für die diaphysären Bohrlochdefekte eine signifikante Knochenzunahme von drei zu neun Wochen in allen Materialgruppen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,002$) (Abb. 39). Zum Zeitpunkt drei Wochen zeigten die Defekte mit autologer Spongiosa den höchsten Anteil an mineralisiertem Knochen. Der Anteil war gegenüber der Gruppe DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten signifikant höher (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,04$). Den zweithöchsten Knochenanteil zeigte die Gruppe DBM+BMP-2. Das Knochenvolumen war auch gegenüber DBM und DBM+Gentamicin signifikant erhöht (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,03$). Die Gruppen DBM, DBM+Gentamicin und die Leerdefekte zeigten alle einen vergleichbar geringen Anteil an Knochen. Zum Zeitpunkt neun Wochen wies DBM+BMP-2 das höchste Knochenvolumen mit einem signifikanten Unterschied zu DBM und DBM+Gentamicin auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,044$). Der Knochenanteil der restlichen Materialgruppen zeigten nur geringe Unterschiede.

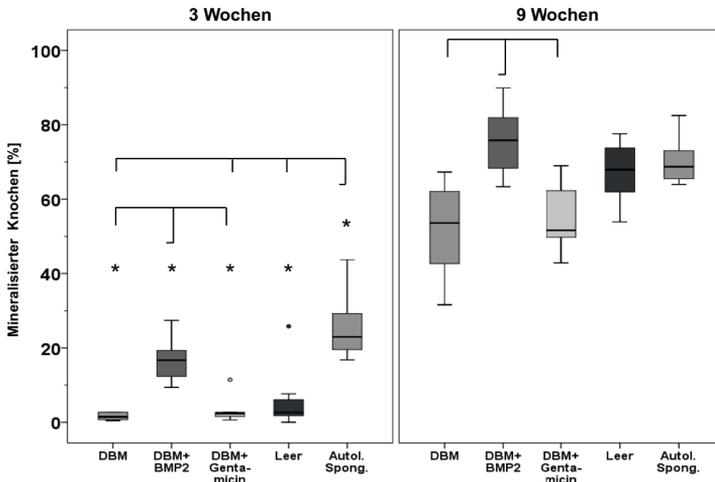


Abb. 39 Prozentualer Knochenanteil der diaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa)

Prozentualer Anteil des mineralisierten Knochens des gesamten Bohrloches der verschiedenen Materialgruppen zu drei (links) und neun (rechts) Wochen Heilungszeit. In allen Materialgruppen kam es zu einer signifikanten Knochenzunahme von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,002$). Zu beiden Zeitpunkten zeigte DBM+BMP-2 signifikant mehr Knochen im Vergleich zu DBM und DBM+Gentamicin (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,044$).

Um wie bei den Auswertungen via μ CT einen Vergleichswert für den Knochenanteil der metaphysären Bohrlochdefekte zu bekommen, wurde an zehn Nativproben der prozentuale Knochenanteil ermittelt. Der Median der Nativproben lag bei 30,03% Knochenanteil und ist in den folgenden Graphiken der metaphysären Bohrlochdefekte als horizontale Linie dargestellt (Abb. 40).

Bei den metaphysären Bohrlochdefekten der Ebene 1 kam es in allen Materialgruppen zu einer signifikanten Zunahme des Knochens von drei Wochen zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$) (Abb. 40). Die Gruppe autologe Spongiosa zeigte zu drei Wochen das höchste Knochenvolumen mit einem signifikanten Unterschied zu den anderen Materialien auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,001$). Das Knochenvolumen in dieser Materialgruppe lag über dem Nativwert. Das zweithöchste Knochenvolumen zeigte die Gruppe DBM+BMP-2 mit einem signifikanten Unterschied gegenüber DBM und DBM+Gentamicin ($p \leq 0,047$). Die Leerdefekte wiesen eine kleine Menge an Knochen auf mit einem signifikanten Unterschied zu DBM und DBM+Gentamicin (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,03$). Diese zwei Materialgruppen zeigten nur sehr geringes Knochenwachstum. Vergleichend zu den diaphysären Defekten sind zu neun Wochen deutlichere Unterschiede zwischen den Materialgruppen zu sehen. Die Gruppe autologe Spongiosa zeigte weiterhin das höchste Knochenvolumen mit einem signifikanten Unterschied zu DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,001$). Der Median dieser Gruppe lag weiterhin über dem gemessenen Nativwert. Die Gruppe DBM+BMP-2

wies ein Knochenvolumen im Bereich des Nativwertes auf. DBM und die Leerdefekte zeigten ein ähnliches Maß an Knochenbildung und die Gruppe DBM+Gentamicin zeigte eine signifikant geringste Knochenbildung (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$).

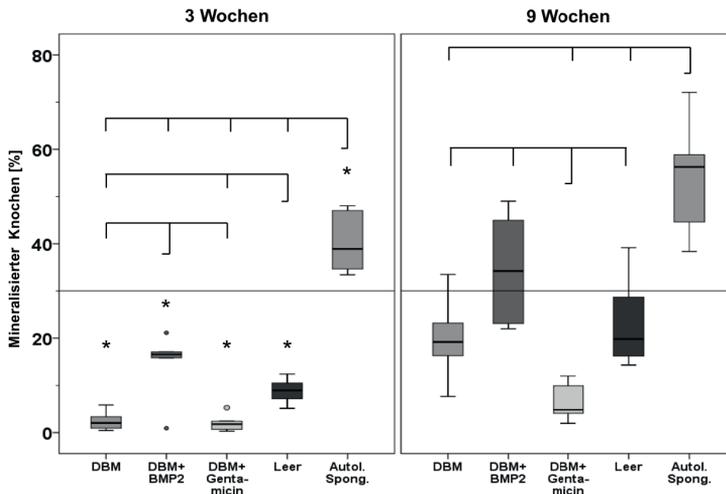


Abb. 40 Prozentualer Knochenanteil der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Safranin O / von Kossa)

Prozentualer Anteil des mineralisierten Knochens. Der prozentuale Knochenanteil der Nativproben (30,03%) in Form einer horizontalen Linie dargestellt. Sowohl zu drei als auch zu neun Wochen war ein signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe autologe Spongiosa zu erkennen (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,001$). Zu neun Wochen wies DBM+Gentamicin den signifikant geringsten Knochenanteil auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$). In allen Materialgruppen kam es zu einer signifikanten Zunahme des Knochenvolumens von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$).

In der Ebene 2 der metaphysären Defekte zeigten die Materialgruppen ein ähnliches Muster wie in Ebene 1 (Abb. 52). Eine signifikante Knochenzunahme von drei auf neun Wochen zeigten die Gruppen DBM, DBM+BMP-2, die Leerdefekte und die Gruppe behandelt mit autologer Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$). Zu drei Wochen war das Knochenvolumen bei autologer Spongiosa signifikant höher im Vergleich zu DBM, DBM+BMP-2 und den Leerdefekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,001$). Zu neun Wochen war der Knochenanteil dieser Gruppe gegenüber allen anderen Materialien signifikant erhöht (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,046$). Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen DBM+Gentamicin und DBM+BMP-2 und den Leerdefekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,011$). DBM+BMP-2 zeigte signifikant mehr Knochen als DBM (ANOVA, Dunnett's T3, $p = 0,02$).

4.5.4 HISTOMORPHOMETRIE MOVAT PENTACHROM

Durch die histomorphometrische Auswertung der Movat Pentachrom-Färbung war es möglich neben dem Knochenvolumen die Menge an eingebrachter demineralisierter Knochenmatrix und neugebildetem Bindegewebe zu bestimmen. Diese Komponenten sind, die Materialgruppen untereinander vergleichend, in den Abb. 41 und Abb. 43 dargestellt.

Da auf das Knochenwachstum in der histomorphometrischen Auswertung nach Safranin O / von Kossa genau eingegangen wurde und in der Auswertung nach Movat Pentachrom nur geringe Unterschiede dazu festgestellt wurden, wird hier das Augenmerk auf die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix und das Bindegewebe gelegt (Abb. 42). Der in der Movat Pentachrom-Färbung histomorphometrisch gemessene Knochenanteil ist in den Abb. 41, Abb. 42 und Abb. 44 dargestellt.

Analog zu der radiologischen und histologischen Auswertung der Safranin O / von Kossa-Färbung wurde der Median des Knochenvolumens von Nativproben ermittelt. Er betrug in der Färbung nach Movat Pentachrom 21,94%. Von drei zu neun Wochen reduzierte sich die Menge an eingebrachter demineralisierter Knochenmatrix bei den diaphysären Bohrlochdefekten in den Gruppen DBM und DBM+BMP-2 signifikant (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,009$). In beiden Ebenen der metaphysären Defekte zeigte die demineralisierte Knochenmatrix eine Tendenz zur Reduktion. Das Bindegewebe reduzierte sich von drei zu neun Wochen in allen Lokalisationen proportional zu der Knochenzunahme. Bei den diaphysären Defekten zeigten alle Materialien eine signifikante Reduktion des Bindegewebsanteils (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,002$), bei den metaphysären Defekte der Ebene 1 reduzierte sich das Bindegewebe in den Leerdefekten und der Gruppe der autologen Spongiosa und in der Ebene 2 in der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa signifikant (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,038$).

Diaphysäre Bohrlochdefekte

Bei den diaphysären Bohrlochdefekten zeigte die Gruppe DBM+BMP-2 tendenziell eine geringere Menge an demineralisierter Knochenmatrix zu beiden Zeitpunkten. Es konnten zwischen den Materialgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der bindegewebige Anteil im Bohrloch der Leerdefektgruppe war zu drei Wochen signifikant höher als in den anderen Materialgruppen (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,048$). Zu Neun Wochen zeigte die Gruppe autologe Spongiosa signifikant mehr Bindegewebe als die Leerdefekte (ANOVA, Dunnett's T3, $p = 0,049$). Die restlichen Materialgruppen verhielten sich ähnlich zueinander (Abb. 42).

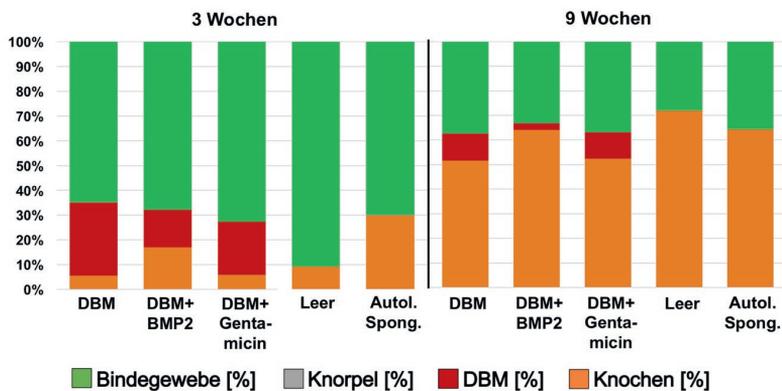


Abb. 41 Gewebekomponenten im Bohrloch der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)

Vergleich der prozentualen Anteile der verschiedenen Gewebearten im Bohrloch zu drei (links) und neun Wochen Heilungszeit (rechts). Unterscheidung nach prozentualem Knochengewebe (gelb), eingebrachter demineralisierter Knochenmatrix (rot), Knorpel (grau) und Bindegewebe (grün). Zunahme des Knochengewebes, Reduktion des Bindegewebsanteils und Reduktion der demineralisierten Knochenmatrix von drei zu neun Wochen.

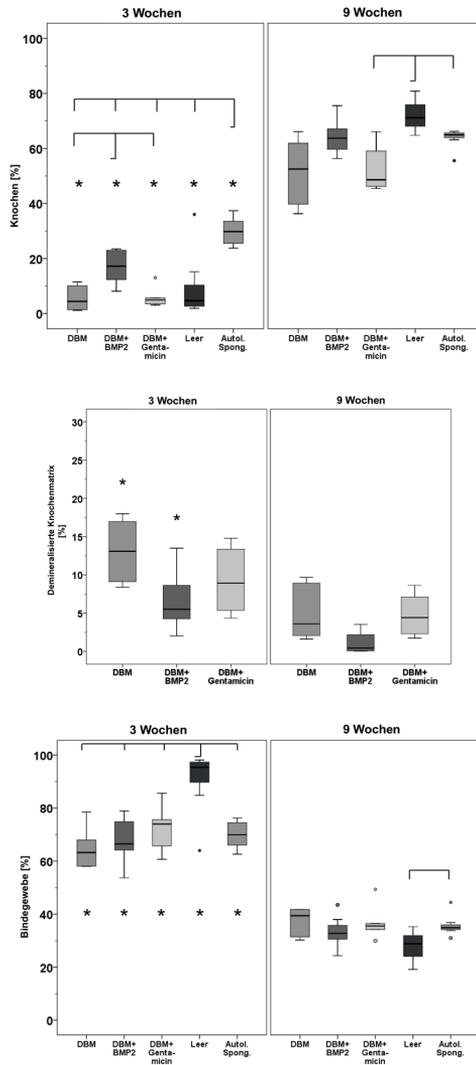


Abb. 42 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, demineralisierter Knochenmatrix und Bindegewebe der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)

Prozentualer Anteil des Gewebes im gesamten Bohrloch der verschiedenen Materialgruppen zu den drei (links) und neun Wochen (rechts) Heilungszeit. Vergleich des Knochenvolumens, Menge an demineralisierter Matrix und Bindegewebsmenge (von oben nach unten). Zu neun Wochen zeigten die Leerdefekte den höchsten Knochenanteil mit einem signifikanten Unterschied zu der autologen Spongiosa und DBM+Gentamicin (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,045$). Reduktion der demineralisierten Knochenmatrix von drei zu neun Wochen in der Gruppe DBM und DBM+BMP-2 (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,009$) ohne signifikanten Unterschied zwischen den Materialgruppen. Es kam zu einer

signifikanten Reduktion des Bindegewebsanteils von drei zu neun Wochen in allen Materialgruppen (gezeigt durch ein Sternchen unterhalb der Materialgruppen, Mann-Whitney-U, $p \leq 0,002$) und die Leerdefekte zeigen zu drei Wochen den signifikante höchsten Bindegewebsanteil im Vergleich zu allen anderen Materialgruppen (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,048$).

Metaphysäre Bohrlochdefekte

Die Auswertung der metaphysären Bohrlochdefekte zeigte zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied im Anteil der demineralisierten Knochenmatrix zwischen den Materialgruppen. Bezogen auf den Bindegewebsanteil zeigten die Leerdefekte zu drei Wochen den signifikant höchsten Anteil (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,013$) im Vergleich zu den anderen Gruppen. Zu neun Wochen kann nur zwischen den Leerdefekten und der autologen Spongiosa ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Bindegewebsanteils festgestellt werden (ANOVA, Dunnett's T3, $p = 0,017$), die restlichen Gruppen schienen vergleichbar (Abb. 44).

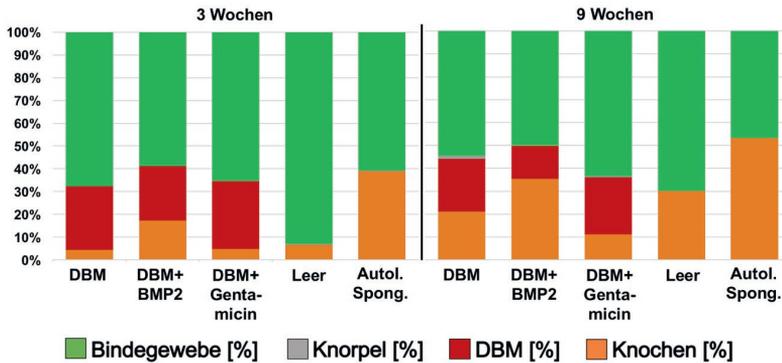


Abb. 43 Gewebekomponenten im Bohrloch der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom)

Prozentualer Anteil des Gewebes im gesamten Bohrloch verschiedenen Materialgruppen zu drei (links) und neun Wochen (rechts). Zunahme des Knochen- und Abnahme des Bindegewebsanteils. Die Reduktion der eingebrachten demineralisierten Knochenmatrix ist nur bei DBM+BMP-2 deutlich.

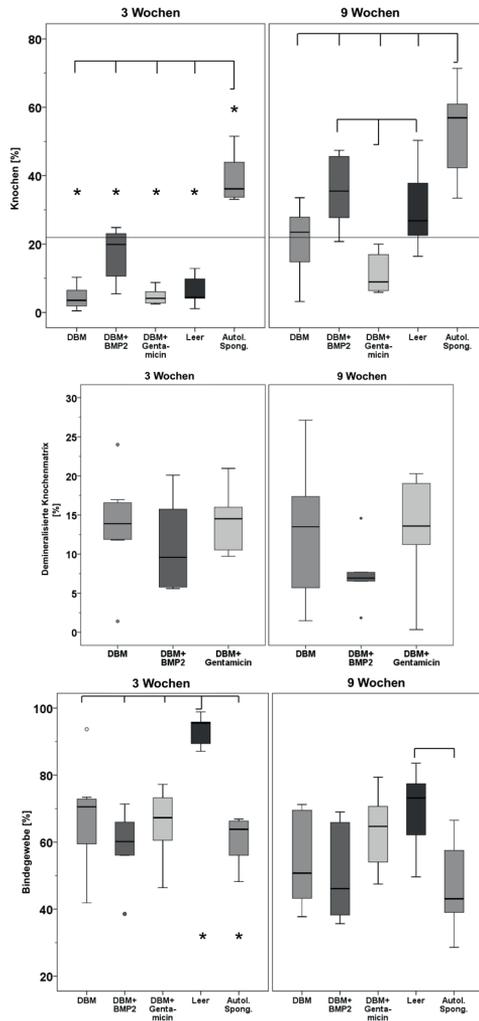


Abb. 44 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, demineralisierter Knochenmatrix und Bindegewebe der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom)

Prozentualer Anteil der Gewebe im gesamten Bohrloch. Das Knochenvolumen der Nativproben wird in der Graphik als horizontale Linie dargestellt. Zu beiden Zeitpunkten zeigte die Gruppe autologe Spongiosa den signifikant höchsten Knochenanteil (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,017$). Es kam zu keiner sichtbaren Reduktion der demineralisierten Matrix von drei zu neun Wochen Heilungszeit und es konnte kein Unterschied zwischen den Materialgruppen festgestellt werden. Zu drei Wochen zeigten die Leerdefekte den signifikant höchsten Bindegewebsanteil (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,017$). Es kam zu einer signifikanten Reduktion des Bindegewebsanteils von drei zu neun Wochen in den Leerdefekten und der Gruppe behandelt mit autologer Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,038$).

In der Ebene 2 der metaphysären Bohrlochdefekte verhielten sich die Materialien zueinander wie in der Ebene 1. Die Menge an eingebrachter demineralisierter Knochenmatrix wies keine Veränderung von drei zu neun Wochen auf und es konnte kein Unterschied zwischen den Materialien festgestellt werden. Die Leerdefekte zeigten auch hier den höchsten Bindegewebsanteil zu drei Wochen mit einem signifikanten Unterschied zu DBM, DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa ($p \leq 0,013$). Nach neun Wochen wies DBM+BMP-2 die geringste Menge an Bindegewebe mit einem signifikanten Unterschied zu DBM, DBM+BMP-2 und den Leerdefekten ($p \leq 0,017$) auf und die Gruppe autologe Spongiosa zeigte signifikant weniger Bindegewebe als die Leerdefekte ($p \leq 0,025$) (Abb. 54).

Bohrlochumgebung

Um Veränderungen in der Knochenstruktur um das Bohrloch herum detektieren zu können, wurden die umgebende Knochenregion auf ihren prozentualen Knochenanteil untersucht. Die Regionen um das Bohrloch zeigten eine Verringerung des prozentualen Knochenvolumens von drei zu neun Wochen. Eine signifikante Knochenreduktion zeigte sich bei DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und den Defekten behandelt mit autologer Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,004$) (Abb. 45).

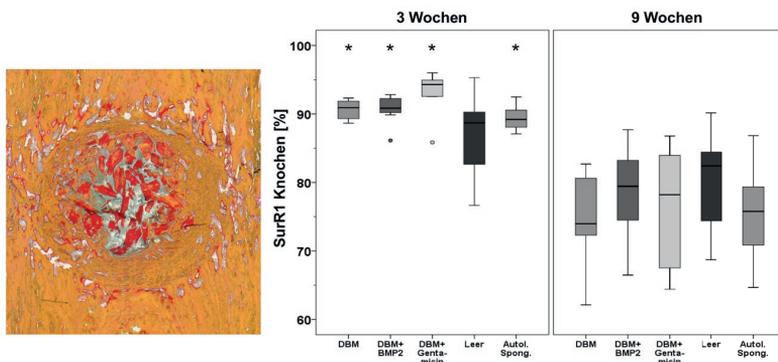


Abb. 45 Bohrlochumgebung der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)

(links) Histologisches Beispiel der Auflockerungen der Knochentrabekel in der Bohrlochumgebung. Schaf Nr. 4, DBM+Gentamicin, diaphysär, 3 Wochen, Objektiv 2,5x
(rechts) Prozentualer Knochenanteil in der Bohrlochumgebung (SurfR1) der verschiedenen Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Signifikante Reduktion des Knochengewebes von drei zu neun Wochen in den Gruppen DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und autologer Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,004$).

Die umgebenden Regionen der metaphysären Bohrlochdefekte zeigten im Gegensatz dazu eine Erhöhung des Knochenvolumens von drei zu neun Wochen in allen Materialgruppen (Abb. 46). Signifikant war die Zunahme des Knochenvolumens in der Gruppe DBM, DBM+BMP-2, den Leerdefekten und autologer Spongiosa in der Ebene 1

(Mann-Whitney-U, $p \leq 0,015$) und bei DBM, DBM+BMP-2 und den Leerdefekten der Ebene 2 (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$).

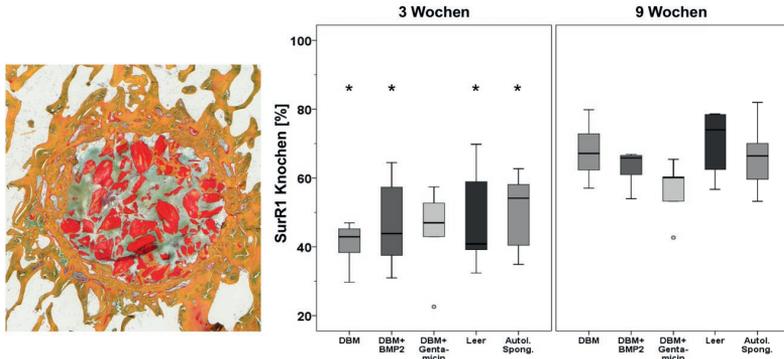


Abb. 46 Bohrlochumgebung der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom)

(links) Histologisches Beispiel der Verdichtung der Knochen trabekel in der Bohrlochumgebung. Schaf Nr. 4, DBM, metaphysär, 9 Wochen, Objektiv 2,5 x.

(rechts) Prozentualer Knochenanteil in der Bohrlochumgebung (SurR1) der verschiedenen Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Signifikante Erhöhung des Knochenanteils in den Gruppen DBM, DBM+Gentamicin, Leerdefekte und autologe Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,015$).

4.5.5 FLÄCHENBESATZ MIT OSTEOLASTEN UND OSTEOKLASTEN

Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und -klasten

Um einen Einblick in die Auf- und Abbauprozesse des Knochens zu erlangen, wurde der prozentuale Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten ermittelt. Unterschiede in Bezug auf den osteoblastären Besatz der Knochenoberfläche waren marginal, sowohl zwischen den Materialien als auch zu den verschiedenen Zeitpunkten und in den unterschiedlichen Lokalisationen. Tendenziell sah man in allen Lokalisationen zu drei Wochen den geringsten Flächenbesatz mit Osteoblasten in der Gruppe autologe Spongiosa und den höchsten in der Gruppe DBM+BMP-2. Signifikante Unterschiede zeigten sich lediglich in den diaphysären Bohrlochdefekten zwischen DBM+BMP-2 und autologer Spongiosa ($p = 0,01$). Zu neun Wochen verhielten sich die Materialien sehr ähnlich – ein signifikanter Unterschied bestand zwischen DBM und autologer Spongiosa ($p = 0,016$). Bei den metaphysären Bohrlochdefekten waren auch hier nur tendenzielle Unterschiede zwischen den Materialien festzustellen. Einzig zu neun Wochen war zwischen autologer Spongiosa und den Leerdefekten der Ebene 1 ein signifikanter Unterschied zu sehen ($p = 0,041$).

Insgesamt war der Anteil an Osteoklasten auf der Knochenoberfläche gering. Zu drei Wochen zeigte die Gruppe autologe Spongiosa in allen Lokalisationen den höchsten Besatz mit Osteoklasten. Bei den diaphysären Bohrlochdefekten konnte ein signifikanter

Unterschied von autologer Spongiosa zu DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten festgestellt werden ($p \leq 0,025$) (Abb. 47). Außerdem war die Knochenoberfläche in der Gruppe DBM+BMP-2 signifikant mehr mit Osteoklasten besetzt im Vergleich zu DBM+Gentamicin ($p \leq 0,035$). Die signifikanten Unterschiede der metaphysären Bohrlochdefekte beschränkten sich auf einen höheren Besatz bei autologer Spongiosa im Vergleich zu DBM+Gentamicin in der Ebene 1 ($p = 0,09$) (Abb. 48). Zu neun Wochen konnte kein Unterschied zwischen den Materialien gemessen werden. Die Erhöhung des Besatzes von drei zu neun Wochen bei den metaphysären Bohrlochdefekten war in beiden Ebenen sehr gering. Tendenziell zeigte die Gruppe autologe Spongiosa den stärksten osteoklastären Knochenabbau, gefolgt von DBM+BMP-2 und den Leerdefekten.

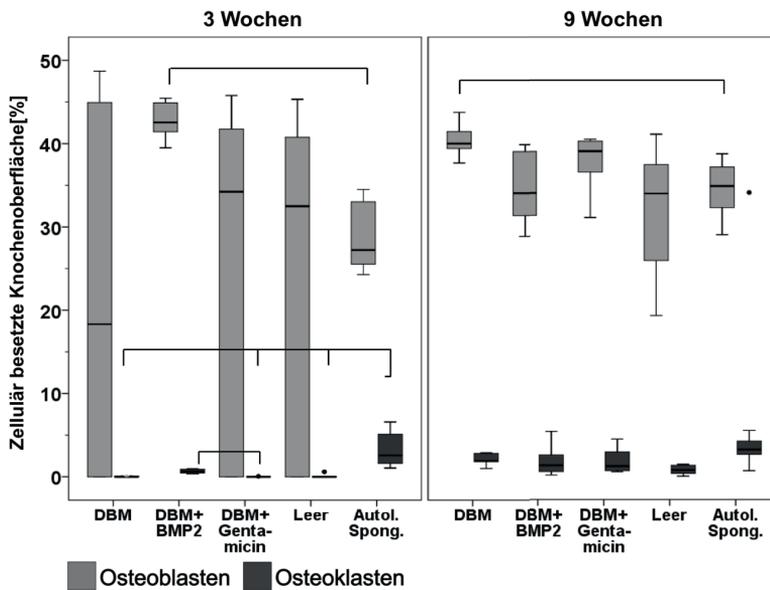


Abb. 47 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der diaphysären Bohrlochdefekte (TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten (hellgrau) und Osteoklasten (dunkelgrau) der verschiedenen Materialien zu drei (links) und neun Wochen (rechts) Heilungszeit. Signifikant höherer Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten zu drei Wochen in der Gruppe DBM+BMP-2 im Vergleich zur autologen Spongiosa (ANOVA, Dunnett's T3, $p = 0,011$). Signifikant höherer Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoklasten in der Gruppe autologe Spongiosa im Vergleich zu DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,025$).

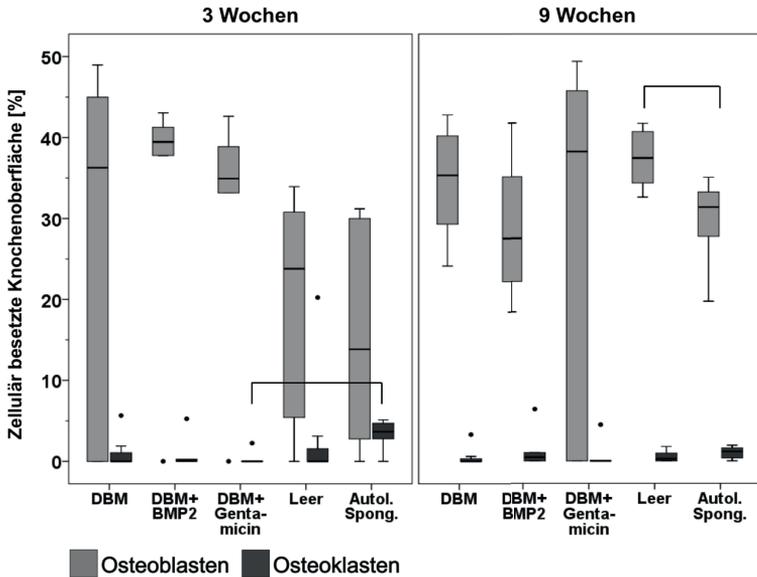


Abb. 48 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz der Knochenoberfläche. Geringster Knochenbesatz mit Osteoblasten in der Gruppe autologe Spongiosa zu drei und neun Wochen. Zu neun signifikanter Unterschied zwischen autologer Spongiosa und Leerdefekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p = 0,041$). Zu drei Wochen höchster osteoklastärer Knochenbesatz in der Gruppe autologe Spongiosa (ANOVA, Dunnett's, T3, $p = 0,09$).

Zellen auf der DBM-Oberfläche

Wie auf der Knochenoberfläche konnte auch der prozentuale Besatz der DBM-Oberfläche mit Osteoklasten oder Osteoblasten beurteilt werden (Abb. 49 und Abb. 50). Zu drei Wochen war die DBM-Oberfläche in allen Lokalisationen bei der Gruppe DBM+BMP-2 in gleichem Maß mit Osteoblasten wie auch Osteoklasten besetzt. In der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin war die Oberfläche der eingebrachten demineralisierten Knochenmatrix vor allem von Osteoklasten besetzt, der Besatz mit Osteoblasten war sehr gering. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in einem höheren Besatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten in der Gruppe DBM+BMP-2 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen in den diaphysären Defekten (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,014$). Sonst waren die Unterschiede nur tendenziell.

Zu neun Wochen unterschieden sich die Gruppen nur tendenziell. Bei den diaphysären Defekten überwog der osteoblastäre Besatz der DBM-Oberfläche nun in der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin, sowohl gegenüber dem osteoklastären Besatz, als auch gegenüber der Gruppe DBM+BMP-2. Hier überwog der Besatz mit Osteoklasten gegenüber dem mit Osteoblasten. Die metaphysären Bohrlochdefekte zeigen zu neun Wochen in allen

Gruppen einen höheren Besitz mit Osteoklasten. Den höchsten Anteil an Osteoblasten zeigt die Gruppe DBM gefolgt von DBM+BMP-2, die Gruppe DBM+Gentamicin zeigte keinen Besitz mit Osteoblasten.

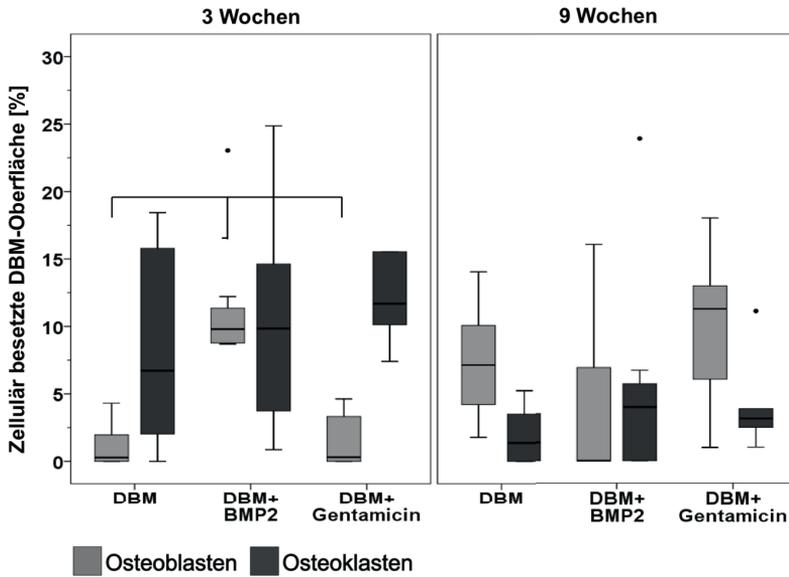


Abb. 49 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der diaphysären Bohrlochdefekte (TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz der Oberfläche der eingebrachten demineralisierten Knochenmatrix mit Osteoblasten (hellgrau) und Osteoklasten (dunkelgrau) zu drei (links) und neun Wochen (rechts). Zu drei Wochen ist die DBM-Oberfläche der Gruppe DBM+BMP-2 zu gleichen Teilen mit Osteoblasten und Osteoklasten besetzt, in der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin überwiegt der osteoklastäre Besatz.

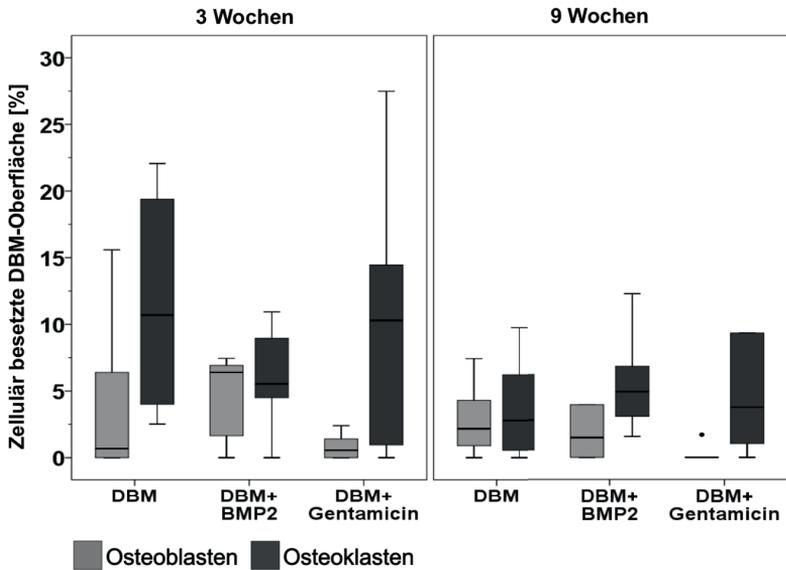


Abb. 50 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz auf der Oberfläche der eingebrachten demineralisierten Knochenmatrix. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Materialien festzustellen. Zu drei Wochen überwiegt in der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin der Besatz mit Osteoklasten.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von demineralisierter Knochenmatrix (DBM) und von DBM angereichert mit BMP-2 oder Gentamicin auf die Knochenheilung zu untersuchen. Dafür wurden diaphysäre und metaphysäre Bohrlochdefekte mit den oben genannten Materialien gefüllt und nach drei und neun Wochen Heilungszeit untersucht. Der Effekt auf die Heilung wurde mit dem klinischen Goldstandard, der autologen Knochenspongiosa und Leerdefekten verglichen.

Mit Hilfe histologischer Färbungen gelang ein Einblick in die morphologischen Vorgänge im Laufe der Heilung und durch eine radiologische, histomorphometrische und histochemische Auswertung konnte eine quantitative Aussage über die Beeinflussung der Knochenheilung durch die Materialien getroffen werden.

5.1 TIERMODELL

Das Schaf als Versuchstier

Um die Biokompatibilität, die gewünschten mechanischen Eigenschaften und die Sicherheit von Implantaten, Knochenersatzmaterialien und Biomaterialien zu gewährleisten, müssen diese verschiedenen Untersuchungen unterzogen werden. Da trotz vielfältiger Möglichkeiten der *in vitro* Analyse die dadurch gewonnenen Erkenntnisse nicht eins zu eins auf die Situation im lebendem Organismus übertragen werden können, sind *in vivo* Studien, trotz zahlreicher Fortschritte der Forschung diese zu ersetzen, unerlässlich (Stokes 2015; Nikolakis et al. 2016).

Ziel dieser Studie war es Erkenntnisse über die Anwendbarkeit eines Knochenersatzmaterials und dessen Einfluss auf die Knochenheilung zu gewinnen, um diese auf den klinischen Alltag übertragen zu können. Um dies möglich zu machen, war es notwendig ein Tiermodell mit ähnlichen Gegebenheiten wie im Menschen, zum Beispiel eine ähnliche Knochengröße, zu wählen.

In der orthopädischen Forschung werden verschiedene Tiermodelle genutzt. Aus Kostengründen, aufgrund der unkomplizierten Haltung und des einfachen Handlings sind Ratten, Mäuse und Kaninchen die meist genutzten Tierarten (Martini et al. 2001). Problematisch für orthopädische Studien ist die schlechte Vergleichbarkeit zu der Situation im Menschen. Die höchste Ähnlichkeit zum menschlichen Knochen zeigt das Schwein, dennoch sind bei dieser Tierart die tierartgerechten Haltungsbedingungen anspruchsvoll und der Umgang mit den Tieren erfordert viel Aufmerksamkeit und ein geschultes Personal (Pearce et al. 2007). Auch der Knochen vom Hund zeigt eine hohe Ähnlichkeit zum humanen Knochen. Aber aufgrund der hohen Haltungsansprüche, aus ethischen Gründen und wegen der geringen Verfügbarkeit dieser Tierart, wird der Hund meist nicht als Versuchstier gewählt.

In dieser Studie bot sich das Schaf als Versuchstier an. Von 1990 bis 2001 kamen in 9-12 % der klinischen Studien Schafe als Versuchstiere zum Einsatz (Martini et al. 2001).

Kleine Wiederkäuer werden in Studien zu Knochendefekten in langen Röhrenknochen oft im Zusammenhang mit dem Einsatz von Knochenersatzmaterialien und bei Studien zur osteosynthetischen Stabilisierung von Frakturen verwendet (Boutrand 2012).

Schafe sind in größerer Anzahl schnell und einfach erhältlich und haben eine dem Menschen ähnliche Knochengröße und ein ähnliches Gesamtgewicht (Newman et al. 1995). Die Haltung ist vergleichsweise anspruchslos und auch der Umgang mit den Tieren ist schnell und einfach zu erlernen.

Obwohl das Schaf eine höhere trabekuläre Knochendichte im Vergleich zum Menschen aufweist (Nafei et al. 2000; Liebschner 2004), wird es als geeignetes Versuchstier bezüglich der Knochenheilung diskutiert. Es zeigt eine ähnliche Knochenheilungs- und Remodellingrate im Vergleich zum Menschen (Pastoureau et al. 1989; Chavassieux et al. 1997) und ein ähnlich schnelles Einwachsen von porösen Implantaten (den Boer et al. 1999). Zudem kann bei Schafen durch einen einfachen und schnellen Zugang zum Beckenknochen autologes Knochenmaterial gewonnen werden (Muschler et al. 2010).

Dennoch müssen einige Besonderheiten beachtet werden. Sollen metabolische Einflüsse auf die Knochenheilung untersucht werden, ist das Schaf nur bedingt geeignet. Auf Basis der Ernährung als Herbivora besitzt das Schaf als Wiederkäuer eine dem Menschen sehr ferne Methodik der Nahrungsaufschlüsselung und damit verbunden der Resorption von Nährstoffen, Mineralien und Vitaminen. Hinsichtlich der Knochenmorphologie ist der kortikale Knochen bei Schafen bis zum Alter von 7-9 Jahren vornehmlich plexiform (Reichert et al. 2009) und im Winter kann es zu einem spontanen Knochenverlust mit anschließender Neubildung kommen (Bonucci et al. 2014). Dies muss bei der Wahl des Tiermodells je nach Fragestellung beachtet werden.

Bohrlochmodell

Gemäß dem Prinzip der drei R's von Russel und Burch aus dem Jahr 1959 (Russell et al. 1959) ist man in der klinischen Forschung angehalten, neben der Entwicklung von Methoden um Tierversuche zu vermeiden oder zu ersetzen (Replacement), die Versuchstierzahl und deren Belastung so gering wie möglich zu halten (Reduktion und Refinement). Um trotzdem eine ausreichend hohe Probenanzahl zu erreichen, sind bestimmte Tiermodelle gefragt.

Bei der Untersuchung des Effektes von Knochenersatzmaterialien auf die Knochenheilung bietet sich ein Bohrlochmodell an. Wie durch Nuss et al beschrieben, werden hierbei Bohrlochdefekte in den Knochen gesetzt (Nuss et al. 2006) und im Anschluss mit einem Biomaterial oder Knochenersatzmaterial gefüllt. Durch das Setzen mehrerer Bohrlöcher können verschiedene Biomaterialien in einem Tier (Apelt et al. 2004; von Rechenberg et al. 2013), oder zum Beispiel Bohrlochdefekte mit unterschiedlichen Diametern untersucht werden (Malhotra et al. 2014). In dieser Studie wurde in Femur, Humerus, Metakarpus und Metatarsus jeweils in den proximalen und distalen Anteil des Knochens ein Bohrlochdefekt gesetzt. So konnten insgesamt 40 Bohrlöcher bei nur fünf operierten Tieren untersucht werden. Das für diese Studie gewählte Bohrlochmodell bietet also eine gute Möglichkeit zum einen die Versuchstierzahl gering zu halten und zum anderen verschiedene Materialien in einem Tier zu testen.

Ein Nachteil des Bohrlochdefektes ist, dass es sich um ein ungestörtes Heilungsmodell handelt, also ohne kritische Defektgröße oder einer mechanischen Instabilität. Auch die Leerdefekte zeigten in der hier vorgestellten Studie eine gute Knochenneubildung und im Vergleich dazu zeigte die eingesetzte DBM keine verstärkten knochenheilungsfördernden Eigenschaften.

Eine Möglichkeit ist, dass sich die Förderung der Knochenbildung durch die DBM aufgrund des kleinen Bohrlochdefektes (Durchmesser 6mm x Höhe maximal 15mm) nicht ausreichend herauskristallisieren konnte. Die Maße des Bohrlochdefektes orientierte sich an vorangegangenen Studien (Apelt et al. 2004; Theiss et al. 2005; Nuss et al. 2006; von Rechenberg et al. 2013). Die ISO empfiehlt zum Beispiel für zylindrische Implantate in Femur oder Tibia einen Durchmesser von 4 mm und eine Länge von 12 mm (Pearce et al. 2007).

Heilungsfördernde Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren werden in der Klinik vor allem bei der Knochenheilung von kritischen Defektgrößen eingesetzt, damit die Heilung überhaupt stattfinden kann und keine Pseudarthrose entsteht (Hinsenkamp et al. 2014). Knochendefekte kritischer Größe werden beim Schaf aber erst ab einer Länge von 25-40mm (Femur oder Tibia) als solche definiert (Kirker-Head et al. 1998; Gugala et al. 1999; Kon et al. 2000). Auf den Einfluss der DBM auf die Knochenheilung in kritischen Defektgrößen wird weiter unten genauer eingegangen (siehe 5.3.2).

Das hier gewählte Bohrlochmodell bot also die Möglichkeit einen Überblick über den Einfluss verschiedener Materialien auf die Knochenheilung zu gewinnen und die Versuchstierzahlen gemäß den Anforderungen des Tierschutzes gering zu halten. Mit den so gewonnenen Erkenntnissen konnte eine Basis für weitere Forschungsansätze geschaffen werden.

Heilungszeitpunkte

Durch die Operation beider Körperseiten in einem Abstand von sechs Wochen konnten in einem Tier zwei Heilungszeitpunkte untersucht werden (siehe 3.1.2). Für diesen Versuch wurden die Heilungszeitpunkte drei und neun Wochen gewählt Diese Auswahl basierte auf Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen des eigenen Instituts. Peters et al. analysierten die Knochenheilung einer tibialen Osteotomie am Schafsknochen mit anschließender Fixation durch einen instabilen Fixateur nach zwei, drei, sechs, neun Wochen und nach sechs Monaten. Da nach drei Wochen die Bildung von Geflechtknochen im Vergleich zu zwei Wochen weiter vorangeschritten und somit besser zu beurteilen war, bot sich drei Wochen als ein früher Heilungszeitpunkt für die Untersuchung an. Der späte Heilungszeitpunkt nach neun Wochen wurde gewählt, da hier im Vergleich zu sechs Wochen Heilungszeit kein starker Unterschied im Heilungsfortschritt festgestellt werden konnte (Peters et al. 2010). Durch die Auswahl dieser zwei Zeitpunkte ergab sich die Möglichkeit einen frühen und einen späten Punkt der Heilung zu untersuchen und zu vergleichen.

Da es sich bei dem Versuch durch Peters et al. um einen Osteotomiemodell mit einer instabilen Fixation handelt, kann die Orientierung an dieser Studie in Bezug auf die Wahl der Heilungszeitpunkte kritisch diskutiert werden. Rechenberg et al. wählte zum Beispiel

bei einer Untersuchung am Bohrlochmodell mit zwei, vier und sechs Monaten spätere Zeitpunkte (von Rechenberg et al. 2013). Die Bohrlochdefekte in dieser Studie wurden aber mit Kalziumphosphat-Zementen gefüllt. Diese müssen erst abgebaut werden, um durch neugebildeten Knochen ersetzt zu werden was eine längere Heilungszeit bedeutet. Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix bietet hingegen eine osteokonduktive Matrix und wird für das Einwachsen von Knochen genutzt. Es bot sich also die Wahl von früheren Heilungszeitpunkten an.

Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse in der hier vorgestellten Studie lassen sich die gewählten Heilungszeitpunkte dennoch kritisch diskutieren. Nach drei Wochen sind in der radiologischen Auswertung keine deutlichen Unterschiede zwischen den Materialgruppen zu erkennen. So hätte ein späterer Zeitpunkt eventuell mehr Aufschluss geben können. Für die metaphysären Bohrlochdefekte war die Wahl von neun Wochen Heilungszeit optimal, da die Unterschiede zwischen den Materialien gut zu sehen waren. Da die diaphysären Defekte deutlich schneller geheilt sind (siehe 5.2), waren zu neun Wochen keine signifikanten Unterschiede mehr festzustellen. Für die Defekte aus dieser Lokalisation wäre ein früherer Heilungszeitpunkt interessant gewesen.

Auch für zukünftige Studien wäre die Wahl von sechs Wochen als später Heilungszeitpunkt vorteilhafter. Kommt es zu dem Versterben eines Tieres im Rahmen der zweiten Operation, sind die zuvor gesetzten Proben schon drei Wochen geheilt und können im Zusammenhang mit dem frühen Heilungszeitpunkt ausgewertet werden. Dies war in dem hier vorgestellten Studiendesign nicht möglich, die Bohrlochdefekte des ersten Eingriffes waren zum Zeitpunkt der zweiten Operation sechs Wochen in Heilung. Hinzu kam, dass der zweite Eingriff eine zusätzliche Belastung für die Tiere bedeutete. Die drei verstorbenen Tiere wiesen chronische Erkrankungen auf, die schon vor dem Verbringen in die tierexperimentelle Einrichtung bestanden haben. Obwohl die restlichen Tiere die Operationen allgemein gut vertragen haben, gilt es für zukünftige Studien zu überlegen die Einzelbelastung der Tiere zu reduzieren und die zwei Heilungszeitpunkte nicht in einem sondern aufgeteilt auf zwei Tiere zu untersuchen. Das erhöht zwar die Versuchstierzahl, die Belastung der einzelnen Tiere würde aber verringert.

5.2 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNG DER BOHRLOCHDEFEKTE

Vergleich der Heilung der diaphysären und metaphysären Defekte

In dieser Studie wurde die Knochenheilung an zwei unterschiedlichen Knochenlokalisationen untersucht, dem diaphysären Knochen, der aus kortikalem Knochen besteht und metaphysärem Knochen, der vornehmlich aus spongiosen Knochen aufgebaut ist (Clarke 2008).

Die Materialgruppen der metaphysären Defekte wiesen zu neun Wochen in der radiologischen und der histomorphometrischen Untersuchung deutliche Heilungsunterschiede auf. In den diaphysären Defekten waren, parallel zu einem hohen Knochengehalt in allen Materialgruppen, keine deutlichen Unterschiede zu sehen (Abb. 20). Außerdem fiel in der deskriptiven Auswertung auf, dass in den diaphysären Bohrlochdefekten zu neun Wochen in allen Materialgruppen das Knochengewebe bis in

das Bohrlochzentrum eingewachsen war. In den metaphysären Gruppen war das nur in der Gruppe DBM+BMP-2 und autologe Spongiosa zu beobachten (siehe 4.5.1). Das lässt darauf schließen, dass die diaphysären Defekte schneller heilten.

Untersuchungen der Frakturheilung basieren zumeist auf diaphysären Frakturmodellen (Claes et al. 2011). Studien, die die Heilung in diaphysären Lokalisation mit der in metaphysären vergleichen, sind selten und mit kontroversen Ergebnissen. Eine experimentelle Studie verglich bei einer Distractionsosteogenese am Hund metaphysäre und diaphysäre Heilungskapazitäten und zeigte eine signifikant höhere Knochenbildungs- und Mineralisationsrate in den metaphysären Regionen (Aronson et al. 1994). Eine Erklärung hierfür ist die größere aktive Knochenoberfläche, die stärkere Blutversorgung und das dickere Periostem mit einem höheren Zellgehalt in den metaphysären Regionen (Fan et al. 2008). Auch Uthhoff et al. hingegen schließt in einer Studie über die Heilungsvorgänge von metaphysären Frakturen, dass die Heilung kortikalen Knochens hinter der von spongiösem zurückbleibt (Uthhoff et al. 1981). Claes et al. bestätigen dies nicht. Diese Studie zeigte, dass metaphysärer Knochen im Rahmen einer Heilung zumindest gleichen biomechanischen Prinzipien, wie diaphysärer Knochen folgt (Claes et al. 2011).

Eine Studie aus dem Jahr 1989 untersuchte die Knochenheilung anhand einer tibialen Verlängerungsosteotomie an Schafen und verglich so metaphysäre und diaphysäre Knochenregionen. Auf Basis einer geringeren mechanischen Stabilität in den metaphysären Regionen stellten sie in Frage, ob die Heilung in metaphysären Regionen wirklich besser ist (Steen et al. 1989). Fraglich ist, ob diese Ergebnisse mit den hier ermittelten vergleichbar ist, da es sich bei Steen et al. um eine Studie zur Distractionsosteogenese handelt und die Knochenheilung nur an unterschiedlichen Knochenregionen in einem Knochen, der Tibia, untersucht worden sind. Weitere Studien, die die metaphysäre mit der diaphysären Heilung vergleichen, sind selten und bieten somit einen weiteren Forschungsansatz.

In den in dieser Studie untersuchten Bohrlochdefekte heilten die diaphysären schneller als die metaphysären. Vorteil der langsameren Heilung der metaphysären Bohrlochdefekte war, dass der unterschiedliche Einfluss der Materialien auf die Knochenheilung stärker zum Tragen kam und so besser verglichen werden konnte. Die diaphysären Defekte sind zu neun Wochen schlicht schon zu weit eingehellt und die Unterschiede zwischen den Materialgruppen nicht mehr zu erkennen. Da ein Ziel dieser Studie war, den Einfluss der verschiedenen Materialien auf die Knochenheilung zu untersuchen, boten die metaphysären Defekte zu neun Wochen hierfür die bessere Möglichkeit.

Zentripetale Knochenheilung im Bohrloch

Um einen genaueren Einblick in die Heilungsvorgänge im Bohrloch zu gewinnen, wurde das Bohrloch in drei Regions of Interest (ROI) unterteilt, den inneren (IR), mittleren (MR) und äußeren Ring (OR) (siehe 3.7). In den Gruppen DBM, DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten stieg der Knochengehalt vom inneren zum äußeren Ring an (Abb. 38). Je nach Heilungsfortschritt konnte das in allen Gruppen und Lokalisationen nachvollzogen werden. War das Bohrloch, wie bei DBM+BMP-2 zu neun Wochen in den

diaphysären Bohrlochdefekten, schon vollständig geheilt, konnte diese Entwicklung nicht mehr aufgezeigt werden. Auch in der Gruppe der autologen Spongiosa war die Entwicklung geringer, da hier quantitativ nicht zwischen dem eingebrachten Material und dem neugebildeten Knochen unterschieden werden konnte (siehe 5.3.1).

Eine ähnliche zentripetale Entwicklung konnte in der Morphologie des neugebildeten Knochens beobachtet werden. Der Knochen wächst vom Bohrlochrand in das Defektzentrum ein und breitet sich somit mit fortschreitender Heilung vom äußeren Ring (OR) bis in den inneren Ring (IR) aus (siehe 4.5.1 und Abb. 51). Der immature Geflechtknochen, bestehend aus dünnen engmaschig vernetzten Trabekeln, besetzt mit Osteoid-bildenden Osteoblasten (Abb. 29 und Abb. 31), wächst zunächst vom Bohrlochrand aus immer weiter bis zum Defektzentrum ein und wird im Anschluss im gleichen Ablauf (also von OR zu IR) durch lamellären Knochen ersetzt. Dieser präsentierte sich dann in den metaphysären Defekten als ausgereifter Knochen aus breiteren Trabekeln oder als Flächen mit kleineren Auflockerungen in den diaphysären Defekten (DBM+BMP-2 in Abb. 25 und Abb. 26). Die Einheilung des Knochens und im Anschluss daran die Ausreifung des Knochens erfolgte also immer in gleicher Weise, sie begann am Bohrlochrand und schritt zentripetal in Richtung Defektzentrum fort.

Enchondrale Knochenbildung

In ein paar Defekten fielen Areale mit Chondrozyten am Bohrlochrand auf. Sie kamen nur vereinzelt und über alle Materialgruppen verteilt vor. Da die Knorpelbildung nicht mit vermehrten Entzündungszeichen, einer mechanischen Instabilität oder der Anwendung eines bestimmten Materials verbunden war, ist es also wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen Zufallsbefund handelt.

Auflockerung bzw. Verdichtung in den umgebenden Regionen

Zusätzlich zum Bohrlochdefekt selbst wurden zwei Regionen in der Bohrlochumgebung beurteilt (SurR1 und SurR2 in der Abb. 14). Hier fiel in der histomorphometrischen Untersuchung eine signifikante Knochenreduktion in der Bohrlochumgebung der diaphysären Defekte auf (Abb. 45). In der deskriptiven Auswertung konnte diese in Form von Lücken in der kortikalen Knochenstruktur beobachtet werden (Abb. 32).

Durch das Setzen eines Bohrlochdefektes in den kortikalen Teil des Knochens wird seine Festigkeit, vor allem hinsichtlich auf Torsionskräfte, negativ beeinflusst (Ho et al. 2010). Um das auszugleichen, setzten Umbauprozesse (siehe 2.1 - Remodellierung) ein, um die damit verbundene Schwächung des Knochens zu mindern. Verbunden damit sind Umstrukturierungsprozesse in der Bohrlochumgebung, die als Auflockerungen zu Tage treten. Eventuell spielte auch die Induktion einer lokalen Osteonekrose durch den Bohrvorgang und dem damit verbundenen Temperaturanstieg (Pandey et al. 2013) eine Rolle. Schäden am Knochen, zum Beispiel durch die Bohrung, gehen mit einer Erniedrigung der Osteozytenzahl (durch Apoptose) einher (Franssen et al. 2008). Dadurch wird wiederum die Hemmung der Osteoklasten verringert und somit eine lokale Knochenresorption induziert (Noble 2003; Gu et al. 2005). Ob das hier zum Tragen kam,

müsste durch eingehende Untersuchungen, vor allem zu einem früheren Zeitpunkt, verifiziert werden.

Die in dieser Studie beobachteten Auflockerungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie durch Goodman et al., die keine Reaktion des umgebenden Knochens auf einen tibial-gesetzten Bohrlochdefekt beobachtet konnten (Goodman et al. 1993). Eine Erklärung ist, dass hier titanlegierte Partikel in die Bohrlochdefekte eingebracht wurden. Auch nach 16 Wochen, war die Knochenheilung in den Bohrlochdefekten nicht so weit fortgeschritten wie in den Bohrlochdefekten behandelt mit DBM oder den Anreicherungen von DBM. Das Remodelling der Bohrlochumgebung ist eine Folge der Defektheilung. Ist diese wie bei Goodman et al. verringert, werden diese nicht deutlich sichtbar oder bleiben ganz aus.

Bei den metaphysären Bohrlochdefekten hingegen zeigte sich von drei auf neun Wochen eine signifikante Erhöhung des Knochenvolumens in der Bohrlochumgebung (Abb. 46). Diese zeigte sich als eine Verdichtung der umgebenden Knochenstruktur um das Bohrloch herum, in Form von einem engmaschigen Netz aus dünnen Knochen trabekeln. Zusammen mit der Verdichtung des Knochengewebes zeigte sich hier ein reaktives Bindegewebe in Form einer erhöhten Vaskularisierung und einem erhöhten Zellaufkommen (siehe 4.5.1 - Vaskularisierung und Entzündungszeichen).

Eine Verdichtung in der Bohrlochumgebung konnte auch in einer experimentellen Studie durch Bernhardsson et al. beobachtet werden (Bernhardsson et al. 2015). Da durch eine Instabilität des Knochendefektes die Knochenheilung verlängert wird (Epari et al. 2006), wird durch das Verdichten der Knochenstruktur in der Defektumgebung der Defekt stabilisiert. Zudem kommt es durch die Defektsetzung zu einem Anstoßen von Heilungsprozessen mit einer verstärkten Durchblutung der Defektregion in Kombination mit Zellmigration zum Heilungsgeschehen hin (Dimitriou et al. 2005). Es bildet sich also eine reaktive Zone um das Bohrloch, von der aus der Knochen in den Defekt hineinwachsen und diesen somit verschließen kann.

Reaktion auf das eingebrachte Material (autologe Spongiosa und DBM)

Die in dieser Doktorarbeit untersuchten Bohrlöcher wurden entweder mit autologer Knochenspongiosa, DBM oder angereicherter DBM gefüllt. Die eingebrachte autologe Spongiosa konnte in der deskriptiven Auswertung zu drei Wochen noch gut von dem neugebildeten Knochen unterschieden werden. Sie präsentierte sich in Form von breiten Trabekeln mit abgebrochenen Enden (Abb. 28). Im Laufe der Heilung wurde die eingebrachte autologe Spongiosa durch die Besiedelung mit Osteoblasten (Abb. 31) als Matrix für die Neubildung von Knochen genutzt, so dass nach neun Wochen auch deskriptiv keine Unterscheidung zwischen der autologen Spongiosa und neugebildetem Knochen möglich war. Die Besiedelung der autologen Spongiosa mit Osteoblasten folgte der Knochenbildung und begann somit auch am Bohrlochrand und schritt mit fortschreitender Heilung in Richtung Defektzentrum fort.

Die eingebrachte DBM wurde im Laufe der Defektheilung in neugebildeten Knochen ein- (Abb. 29) oder durch Osteoklasten abgebaut (siehe 4.5.5 und 5.2 - TRAP Abb. 30). Bei den diaphysären Defekten zeigte sich das in einer Reduktion des DBM-Gehaltes der

Bohrlöcher von drei zu neun Wochen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 42). Bei den metaphysären Bohrlochdefekten konnte die Reduktion der DBM nicht nachvollzogen werden (Abb. 44). Eine Erklärung hierfür ist, dass der Ein- und Abbau der DBM der Bildung von neuem Knochen folgt (Abb. 51) und dies bei den metaphysären Defekten noch nicht weit genug fortgeschritten war, dass histomorphometrisch ein quantitativer Unterschied festgestellt werden konnte.

Flächenbesatz mit Osteoblasten und Osteoklasten

Die TRAP-Färbung ermöglichte einen Einblick in die Auf- und Abbauprozesse des Knochens und die Ein- und Abbauvorgänge der eingebrachten DBM.

Betrachtet man zunächst den prozentualen Zellbesatz der Knochenoberfläche fällt auf, dass die Gruppe der autologen Spongiosa in beiden Lokalisationen zu drei Wochen den signifikant höchsten Knochenbesatz mit Osteoklasten (Abb. 47 und Abb. 48) zeigte. Dies ist dadurch erklärbar, da es sich bei der eingebrachten autologen Knochenspongiosa um Knochenmaterial handelt, welches im Laufe der Defektheilung neben einem Einbau in die neugebildeten Trabekel auch durch Osteoklasten abgebaut wird.

In den diaphysären Bohrlochdefekten zeigte die Gruppe DBM+BMP-2 zu drei Wochen ebenfalls einen gesteigerten Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoklasten. Eine mögliche Erklärung ist die Steigerung der osteoklastären Aktivität durch BMP-2 (Kaneko et al. 2000). So konnte die eigene Arbeitsgruppe *in vitro* zeigen, dass die Gabe von BMP-2 zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an Resorptionslakunen durch Osteoklasten führte (Wildemann et al. 2005). Eine initiale Knochenresorption in einer frühen Phase der Heilung nach Anwendung von hochdosiert rhBMP-2 konnte auch in anderen Untersuchungen nachgewiesen werden (Seeherman et al. 2010; Kim et al. 2014). Pobloth et al. bestätigten dies durch eine zystenartige Bildung und eine Osteolyse der Wirbel nach einer zervikalen Dissektomie und intervertebralen Fusion am Schafsmodell (Pobloth et al. 2015).

Des Weiteren sind in der Beurteilung des Besatzes der Knochenoberfläche zwar eine zeitliche Veränderung und lokale Unterschiede zu sehen. Zwischen den Materialien aber gibt es, vor allem beim Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten, nur geringe Unterschiede und die Gewebe zeigten insgesamt eine hohe Variabilität.

Deutlichere Unterschiede des Zellbesatzes waren auf der DBM-Oberfläche bei den diaphysären Bohrlochdefekten zu sehen (Abb. 49 und Abb. 50).

Wie in Abbildung 51 dargestellt kommt es in Verbindung mit dem Einwachsen des Knochens zu einem Einbau der DBM. War die Knochenheilung noch nicht weit genug fortgeschritten, war das Bohrloch nur mit Bindegewebe und DBM gefüllt. Die eingebrachte DBM wurde zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich abgebaut und die Oberfläche war mit Osteoklasten besetzt. Zusammen mit der Bildung der Knochen trabekel vom Bohrlochrand aus wurde die DBM mit Osteoblasten besiedelt und in die neugebildeten Knochen trabekel eingebaut. Die restliche DBM, vor allem der Teil im Defektzentrum, den die Knochenneubildung noch nicht erreicht hatte, wurde abgebaut. Das zeigte sich durch eine Besiedelung der Oberfläche mit Osteoklasten. War das Bohrloch vollständig mit

Knochen trabekeln durchzogen, wurden die verbliebenen DBM Reste von Osteoklasten abgebaut und nun war die Oberfläche hauptsächlich mit Osteoklasten besetzt.

Gezeigt werden konnte diese Entwicklung durch den prozentualen Flächenbesatz der DBM-Oberfläche anhand der TRAP-Färbung. Zu drei Wochen zeigte die Gruppe DBM+BMP-2 den signifikant höchsten Besatz mit Osteoblasten im Vergleich zu DBM und DBM+Gentamicin (Abb. 49). Die deskriptive Auswertung zeigte einen Einbau der eingebrachten DBM in die neugebildeten Knochen trabekel am Bohrlochrand (Abb. 29) und die histomorphometrische Auswertung zeigte zu drei Wochen eine signifikant höhere Knochenneubildung als in der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin (Abb. 21). In diesen zwei Gruppen war zu drei Wochen die Knochenneubildung noch nicht weit genug fortgeschritten und der Besatz mit Osteoklasten überwog. Mit fortschreitendem Einwachsen der Knochen trabekel wird ein Teil der DBM mit Osteoblasten besiedelt und in den neugebildeten Knochen eingebaut. Die DBM im Defektzentrum, die noch nicht in die Knochenneubildung einbezogen ist, wird weiterhin von Osteoklasten abgebaut (Abb. 51). Bei gleichem Ein- und Abbau herrscht nun ein Ausgleich der Besiedelung der DBM mit Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 49 – DBM+BMP-2 zu drei Wochen). Überwiegt der Einbau der DBM ist die Oberfläche überwiegend mit Osteoblasten besiedelt (Abb. 49 – DBM und DBM+Gentamicin zu neun Wochen). Zum Ende der Defektheilung werden die Reste der DBM abgebaut und somit überwiegt bei Abschluss der Knochenheilung wieder der Besatz der Oberfläche mit Osteoklasten. Das wird in der Gruppe DBM+BMP-2 zu neun Wochen ersichtlich, das Bohrloch ist vollständig mit Knochen gefüllt und die verbliebene DBM ist vorwiegend mit Osteoklasten besetzt (Abb. 51). In der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin ist die Knochenheilung zu neun Wochen nun weiter fortgeschritten und die DBM wird vermehrt in den neugebildeten Knochen eingebaut und zeigt nun einen hohen Besatz ihrer Oberfläche mit Osteoblasten (Abb. 49).

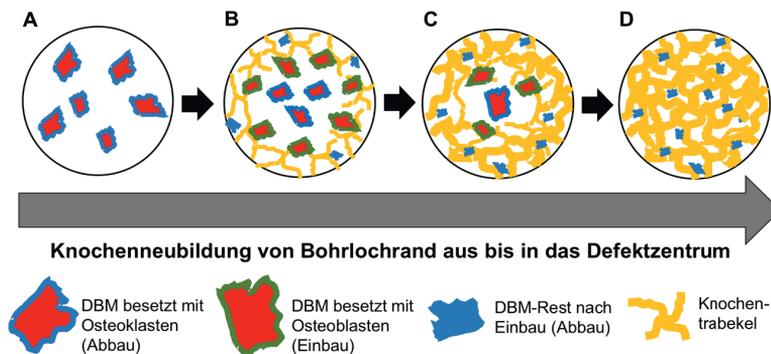


Abb. 51 Ein- und Abbau der eingebrachten DBM im Verlauf der Knochenneubildung

Schematische Darstellung der Reaktion auf die eingebrachte DBM im Verlauf der Knochenneubildung im Bohrloch (von links nach rechts). Die Knochen trabekel (gelb) wachsen im Verlauf der Heilung vom Bohrlochrand aus bis in das Defektzentrum ein. (A) Zu Beginn der Heilung ist die DBM mit Osteoklasten besetzt (blauer Rand) und wird vorwiegend abgebaut. (B) Mit dem Einwachsen der

Knochenrabekel wird die DBM mit Osteoblasten besetzt (grüner Rand) und in den neugebildeten Knochen eingebaut, der Einbau überwiegt. (C) Die Knochenheilung schreitet in Richtung Defektzentrum vor und die DBM wird eingebaut. (D) Nach vollständigem Verschluss des Bohrloches werden die zwischen den Knochenrabekel liegenden Reste der DBM (blaue Bruchstücke) abgebaut, nun überwiegt der Abbau der DBM.

Fazit der Untersuchung des Zellbesatzes auf der DBM-Oberfläche ist somit, dass die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix in die neugebildeten Trabekel eingebaut wird, vorausgesetzt die Knochenheilung ist schon weit genug fortgeschritten. Ist dies noch nicht der Fall oder ist die Knochenheilung schon weitestgehend abgeschlossen, überwiegt der Abbau der eingebrachten DBM durch Osteoklasten.

Leukozytenansammlungen

In der deskriptiven Auswertung fielen in den Gruppen behandelt mit DBM oder deren Anreicherungen Ansammlungen an Leukozyten auf (siehe 4.5.1 – Vaskularisierung und Entzündungszeichen und Abb. 34). Die Leukozytenansammlungen konnten vor allem in den Defekten nach drei Wochen Heilungszeit und nur in den Gruppen behandelt mit DBM, DBM+BMP-2 und DBM+Gentamicin beobachtet werden.

Zu diskutieren ist, ob es sich hierbei um eine immunologische Reaktion auf die eingebrachte DBM handelt. Durch die Implantation von Materialien in den Organismus werden biologische Reaktionen hervorgerufen und je nach Material und dessen chemischen und biochemischen Eigenschaften ist die Reaktionsintensität unterschiedlich. Eine Abwehrreaktion des Körpers umfasst eine Entzündung, die in einer akuten (Exsudation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen zusammen mit dem Austritt von neutrophilen Granulozyten) und einer chronischen Phase (Aufreten von Makrophagen und Lymphozyten und Proliferation von Fibroblasten und Blutgefäßen) abläuft (Anderson 2001). Auf zellulärer Ebene spielen im frühen Stadium neutrophile Granulozyten eine Rolle. Bei chronischen Reaktionen sind antikörperproduzierende Lymphozyten bzw. Plasmazellen und Makrophagen wichtige Komponenten (Apelt et al. 2004; Theiss et al. 2005). Eine weitere wichtige Zellart im Zusammenhang mit Entzündungen und Fremdkörperreaktionen sind mehrkernige Riesenzellen. Sie bilden sich durch die Fusion von Makrophagen (DeFIFE et al. 1999) und sind Bestandteil der Heilung nach der Anwendung von abbaubaren Biomaterialien (Anderson 1988) (Abb. 35).

Einige Studien belegen, dass DBM keine nennenswerten immunologischen Fremdkörperreaktionen hervorruft (Tuli, Singh 1978). Durch die saure Demineralisierung werden zelluläre Komponenten eliminiert. Das Fehlen dieser Zellstrukturen liefert ein nicht immunogenes Produkt, was wiederum die Gefahr der Transplantatabstoßung reduziert (Glowacki, Mulliken 1985). Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Markel et al., die in einem Mausmodell nach subkutaner Injektion von verschiedenen DBM Produkten eine signifikante entzündliche Reaktion auf die applizierten DBM-Produkte feststellten (Markel et al. 2012). Eine Möglichkeit ist die Reaktion auf Trägerstoffe (Kalziumsulfat, Hyaluronidase, Kollagen oder Glycerol). Da diese Stoffe ebenfalls resorbiert werden, könnten auch diese für eine minimale lokale entzündliche Reaktion verantwortlich sein (Frank et al. 1981).

Wichtig ist, dass in dieser Studie eine DBM aus humanem Knochen in einem kleinen Wiederkäufer angewandt wurde. Es handelt sich also um ein xenogenes Implantat, was in diesem Zusammenhang für die Ansammlung an Leukozyten im Rahmen einer immunologischen Reaktion verantwortlich sein kann. Dennoch fehlte das Auftreten von neutrophilen Granulozyten und mehrkernige Riesenzellen fanden sich nur vereinzelt in den Geweben und hier vor allem in der Bohrlochumgebung (siehe 4.5.1 – Vaskularisierung und Entzündungszeichen). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix zu einem Teil in neugebildeten Knochen eingebaut wurde spricht für eine eher milde Entzündungsreaktion auf die eingebrachte DBM. Um dies genauer zu untersuchen, wären weiterführende Studien mit eventueller immunhistologischer Färbung von Zellen des Immunsystems interessant.

5.3 EINFLUSS DER MATERIALIEN AUF DIE KNOCHENHEILUNG

Der Einfluss der einzelnen Materialien auf die Knochenheilung wurde radiologisch (μ CT), histologisch und histochemisch analysiert.

Ein Vorteil der radiologischen Auswertung war, dass das Bohrloch als dreidimensionales Gebilde evaluiert werden konnte (Abb. 12). In der Histologie wurden in einzelnen Ebenen Schnitte angefertigt und somit konnte nur ein Ausschnitt an einer Stelle des Bohrloches untersucht werden. Um einen Einblick in die Vorgänge des gesamten Bohrloches zu erlangen, wurden bei den metaphysären Schnitten zwei unterschiedliche Schnitttiefen untersucht, einmal am äußeren Ende und einmal am inneren Ende des Bohrloches (Ebene 1 und Ebene 2) (siehe 3.7). Da die Knochenheilung in beiden Ebenen vergleichbar war, wurden in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Ebene 1 dargestellt. Die Graphiken zur Ebene 2 sind im Anhang zu finden (siehe 9.4). Aufgrund der geringen Kortikalisdicke der diaphysären Defekte (zum Teil maximal 2 mm Dicke) war es hier nicht möglich in einer zweiten Ebene Schnitte anzufertigen.

In der Auswertung zeigte die Gruppe behandelt mit autologer Spongiosa die stärksten Heilungstendenzen. DBM angereichert mit BMP-2 steigerte die Knochenheilung im Vergleich zu der singulären Anwendung von DBM. Die Gruppe DBM und die Leerdefekte zeigten eine unvollständige Knochenheilung und waren im Fortschritt der Heilung vergleichbar. DBM angereichert mit Gentamicin verzögerte die Knochenheilung.

5.3.1 AUTOLOGE SPONGIOSA

Die Autologe Knochenspongiosa zeigte in diesem Versuch die stärkste Induktion der Knochenneubildung und nur die Anreicherung der DBM mit BMP-2 zeigte eine ähnliche Knochenheilungsförderung.

Ein Nachteil der radiologischen und histomorphometrischen Auswertung in dieser Studie war die fehlende Differenzierungsmöglichkeit zwischen eingebrachtem Material und neugebildetem Knochen. Die Gruppe der autologen Spongiosa zeigte sowohl zu drei als auch zu neun Wochen den höchsten Knochenanteil (Abb. 21 und Abb. 24). Auffallend war,

dass der Gehalt an mineralisiertem Knochen in den metaphysären Bohrlochdefekten höher war als der Median des Knochenvolumens der Nativproben. Zu drei Wochen waren die Bohrlochdefekte in keiner Gruppe vollständig geheilt und deskriptiv fiel auf, dass das Bohrloch hauptsächlich mit eingebrachtem autologen Knochenmaterial gefüllt war (Abb. 23). Es handelte sich zu diesem Zeitpunkt also um dicht gepackte eingebrachte autologe Spongiosa. Eine Erklärung für das höhere Knochenvolumen zu neun Wochen wäre, dass neugebildeter Knochen enger liegende Knochen trabekel als ausgereiftes Knochengewebe aufweist, was in einem höheren Knochenvolumen resultiert. Zudem besteht die Möglichkeit, dass zwischen den neugebildeten Knochen trabekeln noch Reste eingebrachter autologe Spongiosa zu liegen kommen, was wiederum die gemessene Knochendichte erhöhen würde. Bestätigt werden konnte dies nicht, da aufgrund der hohen Besiedelung der autologen Spongiosa mit Osteoblasten keine Unterscheidung zwischen eingebrachtem Material und neugebildetem Knochen möglich war. Quantitativ war zu keinem Zeitpunkt eine Unterscheidung möglich, was somit ein Nachteil der Methodik der Auswertung in dieser Studie war.

In der Klinik nutzen behandelnde Ärzte bildgebende Verfahren wie Röntgen oder Computertomographie (CT) (Calori et al. 2015; Miska et al. 2016) um beim Einsatz von Knochenmaterialien die Stabilität und die mechanische Belastbarkeit des Implantates oder des neugebildeten Knochens abschätzen zu können. Eingebrachter autologer Knochen ist auf Röntgenbildern sichtbar. Zwischen neugebildeten Knochen und eingebrachtem Material kann aber mit den oben genannten Methoden nicht unterschieden werden und somit ist eine Aussage über den Grad der Einheilung schwer zu treffen. DBM ist im Gegensatz dazu nicht oder nur gering röntgendicht (Fassbender et al. 2014b) und röntgendichte Strukturen treten erst auf, wenn sich neuer Knochen gebildet hat. Deshalb wollen sich viele Chirurgen nicht auf dessen mechanische Stabilität im Laufe der Heilung verlassen (Horvathy et al. 2015).

Alternativen zur Evaluierung der Heilung ist die Magnetresonanztomographie (MRT) (Rankine et al. 2015) oder zum Beispiel die Markierung mit Fluorochromen. Der Vorteil des MRTs ist eine differenziertere Darstellung von Weichteilgeweben, womit Heilungsvorgänge genauer identifiziert und beurteilt werden können. Die Markierung mit Fluorochromen wird für Fragen im Zusammenhang mit renaler Osteodystrophie oder Hyperparathyreoidismus (Coen et al. 2006; Rauch 2006) genutzt. Fluorochrome werden aufgrund ihrer hohen Affinität zu Kalzium an Orten der aktiven Mineralisierung von Hydroxyapatit eingebaut (Frost 1963) und können anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Das ermöglicht eine *in vivo* Markierung von Kalzifikationsherden in Knochen (Pautke et al. 2010; Poulsson et al. 2014) und eröffnet so weitere Möglichkeiten der Beurteilung der Knochenheilung.

Dennoch ist die Unterscheidung zu einem frühen Heilungszeitpunkt eher von wissenschaftlichem als von klinischem Interesse. Der Einbau und somit die Nutzung der eingebrachten autologen Spongiosa in neugebildeten Knochen und die starke Induktion der Knochenneubildung zeigen deren Potential für eine Förderung der Knochenheilung, auch ohne Unterscheidung im frühen Stadium der Heilung.

5.3.2 DEMINERALISIERTE KNOCHENMATRIX

In der Gruppe behandelt mit DBM war die Menge an neugebildetem Knochen zu neun Wochen mit dem gebildeten Knochenvolumen der Leerdefekte vergleichbar oder tendenziell geringer. Eine Steigerung der Knochenneubildung durch die Anwendung von DBM konnte nicht nachgewiesen werden.

Voraussetzung für die Wirksamkeit eines DBM Präparates ist, dass die osteoinduktiven Proteine in minimal notwendiger, aber ausreichender Konzentration mit einer konstanten Freigabe über einen bestimmten Zeitraum an den Wirkort verbracht werden (Zheng et al. 2013). Eine Möglichkeit für die hier festgestellte limitierte osteoinduktive Kapazität ist eine unzureichende Konzentration der hierfür notwendigen Faktoren.

So konnte festgestellt werden, dass in verschiedenen DBM Produkten BMP in sehr variabler Menge enthalten sind (Bae et al. 2006; Beaman et al. 2006). Eine Studie durch Blum et al. analysierte den Gehalt von BMP-2/4, TGF- β 1 und IGF-I in DBM-Präparaten verschiedener Gewebekbanken und fand BMP-2 Level zwischen 2,1 und 65,8 ng/g DBM (Blum et al. 2004). So beeinflussen Produktionsprozesse (Munting et al. 1988), die Art der Sterilisation und der Prozess der Demineralisierung die osteoinduktiven Eigenschaften der DBM Produkte (Han et al. 2003; Takikawa et al. 2003; Peterson et al. 2004). Außerdem wird der Einfluss von Trägermaterialien auf eine unterschiedliche osteoinduktive Aktivität diskutiert (Acarturk et al. 2006). Aufgrund von nicht vergleichbaren Tiermodellen und Analysemethoden sind in diesem Bereich noch weitere Studien notwendig (Gruskin et al. 2012).

Wildemann et al. verglichen den Gehalt von acht verschiedenen Wachstumsfaktoren in drei kommerziell erhältlichen DBM Präparaten. Für BMP-2 gefolgt von IGF-I, TGF- β 1, VEGF, FGFa und PDGF-bb wurden die höchsten Werte gemessen und die extrahierbaren Mengen an TGF- β 1 und PDGF unterschieden sich deutlich zwischen den DBM-Präparaten. Im Durchschnitt war BMP-2 in einer Konzentration von 3,6 μ g/g Probe extrahierbar und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Präparaten festgestellt werden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede der Konzentrationen an Wachstumsfaktoren zwischen den erhältlichen DBM-Formulierungen nicht so groß waren wie Unterschiede zwischen den Chargen (Wildemann et al. 2007). Untersuchungen von Bae et al. bestätigen dies indem sie signifikant unterschiedliche Gehalte an BMP-2 und BMP-7 in verschiedenen Chargen mit der Folge einer unterschiedlichen Knocheninduktionskapazität *in vivo* nachwiesen (Bae et al. 2010). Da es sich bei der DBM um ein allogenes Knochenersatzmaterial basierend auf humanem Spendermaterial handelt, spielen hier Donor-abhängige Unterschiede eine Rolle (Zhang et al. 1997; Lohmann et al. 2001; Traianedes et al. 2004; Pietrzak et al. 2006). Auch in einer *in vitro* Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine starke Donor-abhängige Variabilität in der Wirkung von DBM auf Zellen festgestellt werden (Bormann et al. 2010).

Um nachzuweisen, dass zu geringe Gehalte an Wachstumsfaktoren in dem in dieser Studie verwendeten DBM-Produkt bzw. der -Charge für die geringe Förderung der Knochenneubildung verantwortlich waren, wäre eine quantitative Bestimmung vor der Verwendung im Tier notwendig gewesen. Da das in dieser Studie nicht gemacht wurde, muss dies hier Spekulation bleiben. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, dass die hier angewandte DBM zwar die Knochenheilung fördert, die Effekte sich aber im Vergleich zu

den Leerdefekten aufgrund des ungestörten Heilungsmodells oder der kleinen Defektgröße nicht ausreichend herauskristallisieren konnten.

Im Gegensatz zu Horváthy et al., die durch die Anwendung von DBM einen vollständigen Verschluss eines Schädeldefektes kritischer Größe bei der Ratte und somit eine Knochenheilungsverbesserung zeigen konnten (Horvathy et al. 2015), bestätigen andere Studien die limitierte Knochenheilungsförderung durch DBM auch in Tiermodellen mit kritischer Defektgröße. Eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe zeigte an einem 4 mm langen Defekt am Rattenfemur, dass auch nach 42 Tagen nur die mit rhBMP-2 behandelte Kontrollgruppe eine knöcherne Defektüberbrückung aufwies. Die angewandte demineralisierte Knochenmatrix konnte keine Regeneration des Defektes herbeiführen (Fassbender et al. 2014b). Alaei et al. wies in einem Mausmodell anhand eines kritischen Defektes mit Hilfe osteogener Reportertransgene die knocheninduzierenden Eigenschaften der DBM nach. Diese waren jedoch im Vergleich zu der Gruppe behandelt mit rhBMP-2 limitiert und zeigten keine verbesserte Heilung im Vergleich zu der leeren Kontrollgruppe (Alaei et al. 2014). In einem Schädeldefekt kritischer Größe bei Ratten zeigte das angewandte DBM sogar eine signifikant geringere Knochenbildung als die Leerkontrollen (Stancoven et al. 2013). Auch in anderen Studien mit kritischen Defektgrößen an der Ratte verfügte DBM nur über eine limitierte Knochenheilungsförderung (Intini et al. 2008; Kim et al. 2012), so konnte auch nach 90 Tagen keine komplette Regeneration eines kritischen Defektes an dem Schädeldach der Ratte erreicht werden (de Oliveira et al. 2008).

Auf Basis dieser Studien und der Ergebnisse in dieser Doktorarbeit muss die DBM als Alternative zur autologen Spongiosa kritisch diskutiert werden. Die Anwendung von autologer Spongiosa zeigte eine stärkere Defektheilung als die von DBM. Neben den sehr guten osteokonduktiven, osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften der autologen Spongiosa hat ihre Anwendung zudem den Vorteil einer nur minimalen Gefahr der immunologischen Abstoßung und einer guten Histokompatibilität (Samartzis et al. 2005). Dennoch bleibt der Nachteil einer hohen Entnahmemorbidität verbunden mit Schmerz, der Gefahr der Hämatombildung, Infektionsgefahr und Gefahr einer Frakturierung (Sasso et al. 2005; Myeroff et al. 2011). Allogene oder synthetische Materialien haben eventuell eine teure Herstellung und limitierte osteogene oder osteoinduktive Eigenschaften. Außerdem können immunologische oder nicht-immunologische entzündliche Reaktionen hervorrufen werden und einige von ihnen bergen ein gewisses Risiko der Krankheitsübertragung (Tosti et al. 2010; Ozdemir et al. 2011; Dinopoulos et al. 2012). Auch bringt die Demineralisierung der DBM den Nachteil einer geringen mechanischen Stabilität (Soicher et al. 2013). Die fehlende Stabilität durch die DBM kann eine Erklärung für die geringe Knochenheilungsförderung in kritischen Defekten sein, da eine mechanische Stabilisierung des Defektes Voraussetzung ist für eine vollständige Rekonstruktion. Als Folge der geringen strukturellen Unterstützung wird DBM vor allem in strukturell stabilen Situationen eingesetzt (Nandi et al. 2010).

In diesem Zusammenhang kann aber auch der Einsatz von autologer Knochen-spongiosa bei kritischen Knochendefekten kritisch diskutiert werden, da spongiöse Knochenmatrix ebenfalls nur eine geringe strukturelle Unterstützung bietet. Wichtig ist aber, dass die starke osteogene und osteoinduktive Wirkung der autologen Knochen-spongiosa

das ausgleicht und dass durch den Einbau mit Hilfe von „creeping substitution“ (schleichender Ersatz) eine größere strukturelle Unterstützung geboten wird (Greenwald et al. 2001).

Vorteil der Allografts und der DBM ist, dass sie in standardisierten Prozessen in fast allen Applikationsformen produziert werden können und so direkt und in fast unbeschränkter Menge erhältlich sind (Pacaccio et al. 2005).

Allgemein sind Studien hoher Evidenzstufe, die die klinische Anwendung von autologem Knochenmaterial mit anderen Knochenersatzmaterialien vergleichen, selten (De Long et al. 2007). Laureau et al. schließt in einer Literaturrecherche mit 395 Publikationen bezogen auf die Anwendung von Auto- und Allografts im Bereich der Fuß- und Knöchelarthrodese, dass die Anwendung von Autograft und spongiösem Allograft eine Tendenz zur besseren Heilung zeigt. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (Lareau et al. 2015). De Long et al. listet Empfehlungsgrade für verschiedene Knochenersatzmaterialien und schließt nur für BMP-2 und -7 und für Hydroxyapatit auf einen hohen Empfehlungsgrad, basierend auf Studien mit der Evidenzstufe I. Zu einer Empfehlung von DBM fehlen Studien mit hohem Evidenzgrad und zu Autografts wurden keine Studien gefunden, die die Effektivität von Autografts mit anderen Knochenersatzmaterialien vergleichen. Betont wird hierbei, dass nicht die Wirkung der Materialien in Frage gestellt werden soll, sondern eine große Notwendigkeit für kontrollierte, prospektive und randomisierte Studien in diesem Bereich herrscht (De Long et al. 2007). Die Ergebnisse wurden in einem späteren Review von Drosos et al. bestätigt (Drosos et al. 2015).

DBM als Trägermaterial

Auch wenn, wie in dieser Studie gezeigt, die DBM alleine im Vergleich zu der Kontrolle mit autologer Spongiosa und den Leerdefekten die Defektheilung nicht verstärkt fördern konnte, birgt sie die Möglichkeit in der Klinik als Trägermaterial eingesetzt zu werden. Da sie während der Operation direkt appliziert wird, können so bioaktive Stoffe an die operierte Stelle verbracht werden (Holt et al. 2012). Dadurch wird die Funktion des Knochenersatzmaterials selbst (Defektfüllung, Unterstützung der Knochenheilung) mit dem Anbieten von biologisch wirksamen Stoffen an Ort und Stelle kombiniert (Wu, Grainger 2006). In anderen Studien wurde die DBM mit Wachstumsfaktoren, wie dem Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Platelet-derived growth factor (PDGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) und BMPs kombiniert (Lu et al. 2002; Emad et al. 2006; Chen et al. 2009). Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination mit multipotenten Zellen (Liu et al. 2008; Gu et al. 2014; Wen et al. 2015), mit Antibiotika (Saraf et al. 2010; Lewis et al. 2012) oder die Kombination mit small interfering RNA (siRNA) im Zusammenhang mit einer Reduktion der Bildung von Osteoklasten im Rahmen der Erforschung von Osteoporose (Wang et al. 2010).

Wachstumsfaktoren haben eine kurze biologische Halbwertszeit *in vivo* (BMP-2 7-16 Minuten) (Poynton et al. 2002; Wegman et al. 2011). Eine kontrollierte Applikation am Ort der Wirkung ist somit wichtig, um ihre Wirkung zu gewährleisten. Hierfür ist ein Trägermaterial nötig (Maus et al. 2008b). Eine Studie verglich die Stimulation von

Knochenzellen durch BMP-tragendes DBM mit der singulären Anwendung von rhBMP. Die Anwendung von BMP alleine steigerte die Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Zellen nur um fünf Tage, wohingegen die rhBMP/DBM-Kombination diese Aktivitätssteigerung für 14 Tage aufrecht hielt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es zu einer Bindung des BMPs in dem DBM mit einer kontinuierlichen Freisetzung kommt (Peel et al. 2003). In Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Freisetzungskinetik von BMP-2 aus DBM untersucht. Hierfür wurde das gleiche DBM *pastös* wie in der hier vorgestellten Studie mit rhBMP-2 gemischt und in einem Zellkulturmedium inkubiert. Über einen Zeitraum von 56 Tagen wurden Elutionsproben genommen und die BMP-2 Konzentration via ELISA (Human BMP-2 Quantikine ELISA, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) quantifiziert. In den ersten vier Tagen konnte eine schnelle Freisetzung des BMP-2, gefolgt von einer langsamen und inkompletten Freisetzung bis zum 56. Tag gemessen werden. Um festzustellen ob auch nach 56 Tagen noch BMP-2 in dem DBM gebunden war, wurden C2C12 Zellen (Zelllinie aus Myoblasten der Maus) auf dem verbliebenen rhBMP/DBM-Mixturen kultiviert und die Zellaktivität mit Hilfe der Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Gezeigt werden konnte, dass auch nach 56 Tagen BMP-2 noch in der demineralisierten Knochenmatrix gebunden war und zwar in ausreichender Menge, um eine Zellstimulation hervorzurufen. Daraus folgt, dass die Kombination aus DBM mit BMP-2 eine Kombination mit langer Bindung und kontinuierlicher Freisetzung des Wachstumsfaktors an der Applikationsstelle bietet, mit der Möglichkeit einer konstanten Knochenheilungsförderung am Wirkort. Nutzbar wäre dies bei der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe.

Dies wurde durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt. Die Defekte behandelt mit DBM+BMP-2 zeigten bereits nach drei und bis zu neun Wochen eine Steigerung der Knochenbildung. Das bestätigte die Ergebnisse der *in vivo* Versuche und zeigte die Knochenheilungsförderung auf Basis einer langen Bindung von BMP-2 in der DBM kombiniert mit einer konstanten Freisetzung über neun Wochen hinweg.

Intraoperative Anwendbarkeit des DBM Produktes

Durch die pastöse Darreichungsform des in diesem Versuch verwendeten DBM-Produktes stellt sich die Frage, ob die eingebrachte DBM überhaupt am Wirkort verbleibt. Auf Grund der geringen Defekttiefe und des fehlenden „Bodens“ (Abb. 18) ist vor allem bei den diaphysären Bohrlochdefekten die Gefahr der Auswaschung groß. Zusätzlich wurde aufgrund des in diesem Versuch verwendeten Antibiotikums, welches nur in flüssiger Form für den klinischen Gebrauch zugelassen ist, dem DBM in allen Gruppen eine bestimmte Menge Flüssigkeit zugesetzt (siehe 3.3.1). Das verstärkte die Gefahr der Auswaschung und vor der Anwendung im Tier musste sichergestellt werden, dass die DBM an der applizierten Stelle verbleibt.

In Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Viskosität des verwendeten DBM-Präparates untersucht. Die mit Flüssigkeit versetzte DBM wurde in Gefäße äquivalenter Größe zum Bohrlochdefekt gefüllt und zu definierten Zeitpunkten geprüft, ob das Material ausläuft. Wurden ausreichende Inkubationszeiten eingehalten (60 Minuten), verblieb auch das mit Flüssigkeit angereicherte DBM an Ort und Stelle und lief nur sehr

langsam oder gar nicht aus. Da die Materialien vor Beginn der Operation vermischt wurden, wurde in allen Fällen die Inkubationszeit ausreichend eingehalten. Bewiesen wird der Verbleib der eingebrachten DBM im Bohrloch durch die histologische Auswertung. Die eingebrachte demineralisierte Knochenmatrix konnte in den Färbungen nach Movat Pentachrom gut dargestellt werden und war auch in den diaphysären Bohrlochdefekten gut sichtbar (Abb. 27).

Die Mischung und Anreicherung der DBM erfolgte in diesem Versuch mit Hilfe einer Mischspritze der Firma MedMix System AG wie in Gliederungspunkt 3.3.1 beschrieben. Wie schon durch Bormann et al. gezeigt, konnten die Komponenten mit Hilfe der Mischspritze in einem einfachen Vorgang homogen vermischt werden (Bormann et al. 2014). Um die Bohrlöcher homogen zu füllen, war ein Aufsatz notwendig (Abb. 8), damit war das Befüllen der Bohrlöcher zügig und einfach möglich. Vorversuche und die histologische Auswertung zeigten, die eingefüllte DBM verblieb im Bohrloch und somit am Ort der gewünschten Wirkung. Die hier dargestellte Methode ist somit eine gute perioperative Anreicherungsmöglichkeit für DBM und eignet sich für eine intraoperative Anwendung.

5.3.3 DBM ANGEREICHERT MIT BMP-2

DBM angereicht mit BMP-2 als Alternative zur autologen Spongiosa

Ein Ergebnis dieser Studie war, dass DBM angereicht mit BMP-2 die Knochenheilung steigert und so eine mögliche Alternative zu dem klinischen Goldstandard, der autologen Knochenspongiosa, bietet.

Aufgrund des Fehlens eines zusätzlichen Eingriffes am Beckenkamm ist die Folge der Anwendung von BMP-2 eine kürzere Operationszeit, ein geringerer intraoperativer Blutverlust und eine geringere Gefahr für Infektionen und Entzündungen (Jones et al. 2006). Tressler et al. verglich in einer retrospektiven Studie die Verwendung von autologem Knochenmaterial zu der Anwendung von rhBMP-2, bei der Behandlung der Pseudarthrose bei 93 Patienten. Sie konnten keinen statistischen Unterschied zwischen den zwei Behandlungen feststellen. Dennoch war die Anwendung des autologen Materials mit einem höheren Blutverlust und einer verlängerten Operationszeit vergesellschaftet. Auf Basis dessen schließt die Studie, dass die Anwendung von rhBMP-2 eine mögliche Alternative bei der Therapie von Pseudarthrosen darstellt (Tressler et al. 2011).

Auch in dieser Studie zeigte sich eine vergleichbare Heilung zwischen der Gruppe behandelt mit BMP-2 und der Gruppe autologe Spongiosa. In den histologischen Färbungen der Gruppe DBM+BMP-2 zeigten sich schon zu drei Wochen in beiden Bohrlochlokalisationen (diaphysär und metaphysär) über das ganze Bohrloch verteilt dünne Knochentrabekel (Abb. 23 und Abb. 24). Auch in der histomorphometrischen Auswertung war DBM+BMP-2 die Gruppe mit dem zweithöchsten Knochenanteil. Nach neun Wochen Heilungszeit waren die Bohrlöcher der metaphysären Bohrlochdefekten vollständig geheilt. Verschiedene Studien bestätigen die verstärkte Knochenheilung durch die Anwendung von BMP-2 (Giannoudis et al. 2009; Ghodasra et al. 2015; Poon et al. 2016).

Probleme der klinischen Anwendung und DBM als Trägermaterial für BMP-2

Wie in Gliederungspunkt 2.2 diskutiert, ist bei der Anwendung von BMP-2 im Rahmen der Knochenheilung mit Nebenwirkungen zu rechnen. Die für diese Studie relevanten Nebenwirkungen, wie Entzündungsreaktionen, Infektionen, heterotope und überschießende Ossifikation oder Osteolyse (Carragee et al. 2011; Woo 2013), konnten nicht beobachtet werden. Das vermehrte Auftreten von Leukozyten konnte auch in der Gruppe DBM und DBM+Gentamicin beobachtet werden und unterschied sich nicht zwischen den drei Gruppen (siehe 5.2 - Leukozytenansammlungen).

Die oben genannten Nebenwirkungen von BMP-2 stehen im Zusammenhang mit den in der Klinik eingesetzten Dosen. Klinische Studien über die Anwendung von BMP-2 im Bereich des Schädels und bei orthopädischer Indikation haben gezeigt, dass supraphysiologische Dosen des rekombinanten Proteins gebraucht werden um eine Gewebereaktion hervorzurufen (Ripamonti et al. 2014). Die Notwendigkeit hoher Dosen an BMP-2 basiert darauf, dass für die Knochenheilung verschiedene Wachstumsfaktoren und andere Stoffe benötigt werden um das für die Knochenheilung notwendige orchestrierte Zusammenspiel möglich zu machen. Wird nur ein Morphogen der TGF- β Superfamilie eingesetzt, werden sogenannte „Mega-Dosierungen“ notwendig (Ripamonti et al. 2014).

Folglich sind Ansätze zur Reduktion der eingesetzten Dosis notwendig. Eine Möglichkeit ist die Kombination mit einem geeigneten Trägermaterial. Herausfordernd ist aber das variable Freisetzungsprofil aus dem Carrier und somit eine kontrollierte Anreicherung von BMP-2 am Wirkort (Boerckel et al. 2011). In der Klinik wird rhBMP-2 auf einem Kollagenschwamm eingesetzt. Nachteil ist das schnelle Freisetzen des Wachstumsfaktors aus diesem Träger (Giteau et al. 2008) und die nicht vorhersagbare Rate der Biodegradation (Tan et al. 2007). Ohne eine kontrollierbare Freisetzungskinetik werden wieder höhere Dosierungen benötigt, was das Problem der Nebenwirkungen nicht löst. Hinzukommen die hohen Kosten, die bei der Behandlung mit BMP-2 anfallen (Dahabreh et al. 2009).

Ein Ziel ist also die Verfügbarkeit von BMP-2 am Wirkort zu verlängern. Neben den in der Einleitung genannten allgemeinen Eigenschaften sollte das ideale Trägermaterial das rhBMP vor dem Abbau schützen und so die Bioaktivität erhalten (Bessa et al. 2008).

Neben den kollagenbasierten Trägermaterialien werden noch natürliche Polymere wie Gelatine, Alginate oder Chitosan verwendet (Liu et al. 2009; Kolambkar et al. 2011). Agrawal et al. gibt in einem Review Artikel einen Überblick über die verschiedenen Carrier-Systeme (Agrawal et al. 2016). Eine weitere Möglichkeit ist die Beschichtung von Implantaten. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde über die letzten Jahre ein kontrolliertes „Drug Delivery System (DDS), basierend auf einer Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung (PDLLA), von osteosynthetischen Implantaten mit Wachstumsfaktoren wie IGF-I, TGF- β 1 oder BMP-2 entwickelt und untersucht. Gezeigt werden konnte eine stabile Inkorporation der Wachstumsfaktoren in der Implantatbeschichtung mit einer kontinuierlichen Freisetzung über 42 Tage (Schmidmaier et al. 2001a; Schmidmaier et al. 2001b; Schmidmaier et al. 2008). Angewandt in einem Osteotomiemodell der Ratte, zeigte die Gruppe behandelt mit dem BMP-2 beschichteten Implantat eine gesteigert Knochenheilung (Fassbender et al. 2014a). Neben Metallimplantaten wurde ein auf monofilamenten basierender Scaffold

erfolgreich mit PDLLA beschichtet (Calafi et al. 2014), und bietet so eventuell auch die Möglichkeit der Freisetzung von Wachstumsfaktoren.

In der hier vorgestellten Studie wurde das BMP mit Hilfe von DBM an den Ort der Wirkung verbracht. Diese Kombination bietet eine lange Bindung des BMP-2 kombiniert mit einer konstanten Freisetzung. Wie in Gliederungspunkt 5.3.2 beschrieben, konnte in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, die Bindung von BMP-2 über 56 Tage hinaus nachgewiesen werden. In diesem Versuch wurde das gleiche DBM-Produkt wie in dieser Studie verwendet.

Hinzu kommt, dass das hier verwendete DBM-Produkt bei der Produktion mit Hyaluronsäure versetzt wird (DIZG 2011), was für die lange Bindung des BMPs in der DBM verantwortlich sein könnte. Patterson et al. zeigte, dass die Freigabe an Wachstumsfaktoren direkt proportional zu der Degradationsrate eines Hyaluronsäurehydrogels stattfand. Basis dessen war eine elektrostatische Interaktion zwischen dem kationischen rhBMP-2 und dem Hydrogel (Patterson et al. 2010). Die Kombination aus rhBMP-2 und der DBM mit der darin enthaltenen Hyaluronsäure könnte also für eine gute Bindung des Wachstumsfaktors in der DBM verantwortlich sein. Eine weitere theoretische Möglichkeit für die Bindung des BMP-2 in der DBM basiert auf dem in der extrazellulären Matrix enthaltenen Kollagen und Heparin, über die es zu einer Bindung des Wachstumsfaktors kommen kann (Kim et al. 2011).

Die lange Bindung des BMPs, kombiniert mit der konstanten Freisetzung über einen gewissen Zeitraum, ermöglicht die Reduktion der in der Klinik angewandten Dosen an BMP-2 und somit eine Reduktion von damit verbundenen Nebenwirkungen. Dies wird durch die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie bestätigt. Zur Behandlung einer akuten Tibiafraktur wird eine Dosis von 12 mg Diboterminalpha (InductOs, Wyeth Pharmaceuticals, Hants, Vereinigtes Königreich) empfohlen (EMA 2016). Bezogen auf die Defektgröße bedeutet das in der Klinik eine Anwendung von 1538,46 μg BMP-2 pro cm^3 Defekt (in dieser Studie: 80 μg BMP-2 pro 0,424 cm^3 Defekt, also 188,68 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) und somit eine um den Faktor 8 höhere Dosis als in der hier vorgestellten Studie. Die starke Knochenheilungsfördernde Wirkung des DBM angereichert mit BMP-2, trotz der deutlich geringeren Dosierung als in der Klinik, bestätigt den Vorteil der Kombination aus DBM und BMP-2 und die Möglichkeit der Dosisreduktion für die Anwendung in der Klinik.

Die Kombination aus BMP-2 und DBM bietet außerdem noch einen weiteren Vorteil. Da es sich bei der Knochenheilung um ein gut orchestriertes Zusammenspiel verschiedener Faktoren handelt, ist, um die Knochenheilung zu ermöglichen oder zu verstärken, nicht nur die Anwendung eines einzelnen Wachstumsfaktors nötig. Durch die kombinierte Anwendung von BMP-2 mit DBM wird nicht nur ein stark osteogener Wachstumsfaktor an den gewünschten Ort verbracht, sondern es werden zusätzlich andere wichtige Faktoren und Kollagen durch das verwendete DBM bereitgestellt. Die Kombination von DBM und rh-BMP-2 bietet somit eine starke Kombination für die Förderung der Knochenheilung, was durch die Untersuchungen dieser Studie bestätigt werden konnte. Dennoch sind hierfür weitere Studien, zum Beispiel eine Studie zur angewandten Dosis von DBM und Studien zur klinischen Anwendung dieser Kombination am Patienten, notwendig.

Agrawal et al. schließt in einem aktuellen Review Paper zu den verschiedenen Trägermaterialien von BMP-2, dass es weiterhin Forschungsbedarf nach dem idealen Trägermaterial gibt. Die Kombination aus kosteneffektiv und therapeutisch effizient zusammen mit einer langen Wirkzeit des BMP-2 in der minimal notwendigen Konzentration stellt weiterhin eine Herausforderung dar (Agrawal, Sinha 2016). Ripamonti et al. sieht als zukunftssträchtige Herangehensweise in Richtung Knocheninduktion eher eine Entwicklung von Behandlungsstrategien, die spezifisch auf die Defektart und den Patienten zugeschnitten sind (Ripamonti et al. 2014).

5.3.4 DBM ANGEREICHERT MIT GENTAMICIN

In dieser Studie resultierte die Anreicherung von DBM mit Gentamicin in einer geringeren Knochenbildung. In der radiologischen und histomorphometrischen Auswertung der metaphysären Bohrlochdefekte zeigte die Gruppe mit Gentamicin-angereicherter DBM zu neun Wochen das signifikant geringste Knochenvolumen (Abb. 40). Der Unterschied des Knochengehaltes zu den anderen Materialgruppen war in den diaphysären Gruppen noch zu erkennen, aber nicht mehr signifikant (Abb. 39). Da die diaphysären Defekte schneller heilten als die metaphysären, bedeutet dies, dass die Anwendung von Gentamicin-angereicherter DBM die Knochenheilung zwar verzögert, aber nicht hemmt.

Die Heilungsverzögerung könnte mit einer zytotoxischen Wirkung durch Gentamicin zusammenhängen. In verschiedenen Studien wurde von dosisabhängigen zytotoxischen Effekten von Antibiotika auf Osteoblasten und Chondrozyten berichtet (Antoci et al. 2007; Duewelhenke et al. 2007). Hohe Konzentration an Gentamicin hemmten die Proliferation und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark und könnten so die Knochenheilung negativ beeinflussen (Chang et al. 2006). Auch ein negativer Einfluss auf Osteoblasten-ähnliche Zellen konnte gezeigt werden (Isefuku et al. 2003). Rathbone et al. untersuchte den Effekt von 21 verschiedenen Antibiotika, in acht unterschiedlichen Konzentrationen, auf Osteoblasten bezüglich der Zellzahl und Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP). Neben einem starken negativen Effekt von Tetrazyklinen und Ciprofloxacin reduziert eine Konzentration von bis zu 200 µg/ml Gentamicin die Zellzahl und die Zellaktivität und hatte somit einen negativen Einfluss (Rathbone et al. 2011).

Im Gegensatz dazu stehen Studien, in denen kein negativer Effekt auf Osteoblasten-ähnliche Zellen oder die Knochenheilung festgestellt werden konnte. So zeigte sich in einer *in vitro* Studie durch Bormann et al. bei der Kombination des gleichen DBM *pastös* wie in der hier vorgestellten Studie mit Gentamicin, bis auf einen nicht signifikanten Effekt am ersten Tag, kein zytotoxischer Einfluss auf Osteoblasten-ähnliche Zellen (Bormann et al. 2014). Auch Lewis et al. konnten weder *in vivo* noch *in vitro* einen negativen Effekt von Gentamicin auf die osteoinduktiven Eigenschaften der DBM feststellen (Lewis et al. 2012). Auch ein mit Gentamicin beschichteter Nagel zeigte keinen negativen Einfluss auf die Frakturheilung. In dieser Studie wurde eine Tibiafraktur der Ratte mit Hilfe eines intramedullären, mit Gentamicin beschichteten Kirschner-Drahtes, stabilisiert und die Heilung radiologisch, biomechanisch und histologisch untersucht. Trotz ausreichender

antimikrobieller Wirkung konnten keine negativen Auswirkungen auf die Knochenheilung festgestellt werden (Fassbender et al. 2013). Auch andere *in vivo* Studien zeigten keinen negativen Einfluss der intramuskulären Gentamicingabe auf die Knochenheilung (Haleem et al. 2004). Kim et al. zeigte an einem Defekt kritischer Größe am Rattenschädel zwar eine reduzierte Bildung von neuem Knochen bei mit Gentamicin-angereicherter DBM im Vergleich zur Gruppe behandelt mit DBM, dennoch zeigte auch die Gentamicin Gruppe hier eine bessere Heilung als die Kontrollgruppe (Kim et al. 2004), was den Ergebnissen in der hier vorgestellten Studie widerspricht. Wichtig zu beachten ist, dass Gentamicin konzentrationsabhängig wirkt. Das könnte eine Erklärung für die Unterschiede in den oben genannten Studien sein.

Neben den oben genannten Gründen für deutliche Hemmung der Knochenheilung könnte in diesem Versuch die Tatsache, dass es um ein nicht infiziertes Gebiet handelt, eine Rolle spielen. Wird Gentamicin lokal in einem infizierten Wundgebiet angewandt, wird durch eine Prävention der entzündlichen Zerstörung des Gewebes durch die entstehende Osteomyelitis die Knochenheilung gefördert (Stewart et al. 2010). In diesem Versuch hatte zuvor keine Infektion stattgefunden und es gab auch keine schon bestehende Osteomyelitis, die es zu therapieren galt. So zeigte in unserer Studie die Gruppe behandelt mit Gentamicin eine Heilungsverzögerung, die auf eventuellen zytotoxischen Effekten von Gentamicin basiert. Da die Heilung aber trotzdem stattgefunden hat, war die Heilung nur verzögert und nicht vollständig gehemmt.

Gentamicin und Trägermaterialien

Um Resistenzentwicklungen zu verhindern und trotzdem eine ausreichende Wirkkonzentration zu erreichen, ist eine kontrollierte Freisetzungskinetik des Antibiotikums aus dem Trägermaterial wichtig. Fälle wie, dass nach fünf Jahren immer noch Gentamicin aus angereicherten Kügelchen freigesetzt wird (Neut et al. 2003), gilt es zu verhindern. Wie in dieser Studie, gibt es die Möglichkeit demineralisierte Knochenmatrix als Trägermaterial für Gentamicin zu verwenden. Dafür müssen aber bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Für eine adäquate antimikrobielle Therapie wird eine antibiotische Wirkung von mindestens drei Tagen empfohlen (Holtom et al. 2003). Lewis et al. untersuchte in einer *in vitro* Studie die Freisetzungskinetik einer Gentamicin-beladenen demineralisierten Knochenmatrix und den Einfluss auf Osteoblasten. Zudem wurde die antibiotische DBM in den Muskel von Ratten implantiert und histologisch ausgewertet. In der Studie konnte eine therapeutisch relevante Antibiotikafreigabe über 13 Tage nachgewiesen werden. Das freigesetzte Antibiotikum hatte keinen Einfluss auf Osteoblasten *in vitro* und auf die Osteoinduktivität *in vivo* (Lewis et al. 2012). In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurden ebenfalls die Freisetzungskinetik, sowie der Einfluss der verwendeten Antibiotika auf C2C12 Zellen untersucht. Hierbei wurden DBM-Antibiotika Mischungen mit einem Medium versetzt und 56 Tage inkubiert und die freigesetzte Antibiotikakonzentration gemessen. Der Einfluss auf primäre osteoblastenähnliche Zellen wurde durch Testung der Zellviabilität (Alamar Blue® Test) und einer Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität untersucht. Außerdem wurde die Wirksamkeit des freigesetzten Antibiotikums mittels Inhibitionstest mit *Staphylococcus aureus* geprüft. Das verwendete Gentamicin wurde in den ersten drei

Tagen vollständig freigesetzt. Die Elutionsproben mit dem freigesetzten Antibiotikum hemmten das bakterielle Wachstum von *S. aureus* bis mindestens Tag 3 (Bormann et al. 2014). Damit konnte eine ausreichend lange und konstante Freisetzung des Antibiotikums mit therapeutischer Wirkung nachgewiesen werden und präsentiert die Mischung aus DBM und Gentamicin als wirkungsvolle Kombination für die Prävention und Behandlung von infizierten orthopädischen Defekten.

Da die Wirkung von Gentamicin von der Konzentration des Antibiotikums abhängig ist, könnte die kontinuierliche Freisetzung aus der DBM über einen gewissen Zeitraum für die in dieser Studie beobachtete Heilungsverzögerung verantwortlich sein. Dagegen spricht, dass die Heilungsverzögerung in den metaphysären Defekten nicht nur in den ersten 14 Tagen auftrat, sondern über neun Wochen aufrechterhalten blieb.

In der klinischen Praxis ist die Anwendung von antibiotika-angereicherten Zementen weit verbreitet (Nijhof et al. 2000; Perry et al. 2002), bietet jedoch einige Nachteile. So konnte eine erhöhte Anzahl an Infektionen mit resistenten Keimen bei Patienten nach Behandlung mit antibiotischen Zementen gefunden werden (Sanzen et al. 1988; Hope et al. 1989). Außerdem sind sie meist nicht biologisch abbaubar und müssen dementsprechend chirurgisch entfernt werden (Henry et al. 1990; Anguita-Alonso et al. 2006). Das ist bei der Anwendung von DBM nicht der Fall, da diese, wie in dieser Studie gezeigt, neben einem Abbau durch Osteoklasten in den neugebildeten Knochen eingebaut wird. Auf Basis dieses Vorteils und der langen Bindung und konstanten Freisetzung des Gentamicins aus der DBM kann angereicherte DBM, je nach Indikation, eine Alternative zu den bisher verwendeten Zementen bieten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich DBM durch die konstante Freisetzung des Antibiotikums über einen definierten Zeitraum in therapeutische wirksamer Konzentration als Trägermaterial für Gentamicin eignet und eine Möglichkeit zur lokalen Therapie und Prävention einer Infektion am Knochen bietet.

Ausschluss einer systemischen Konzentration an Gentamicin

Durch die Anreicherung von DBM mit Gentamicin sollte in dieser Studie eine lokale Anwendung des Antibiotikums untersucht werden. Um systemische Effekte des angewandten Gentamicin auszuschließen, wurde in Serumproben die Konzentration an Gentamicin bestimmt (siehe 3.4 und 4.2). Die Proben zeigten in den meisten Fällen eine Konzentration unterhalb des Referenzbereiches, also eine Konzentration unter 0,5 mg/l. Systemisch verabreicht sollte Gentamicin eine Serumkonzentration von 5-10 mg/l erreichen (Hammett-Stabler et al. 1998), um ausreichend antimikrobiell zu wirken und dennoch sicher zu sein. Einige Fallberichte berichten von systemischen Nebenwirkungen mit möglichem Zusammenhang zu der Anwendung von antibiotisch-angereicherten Zementen (Dovas et al. 2008; Haeberle et al. 2009), andere Studien widerlegen diese Vermutungen (Springer et al. 2004). Da sie in dieser Studie gemessenen Konzentrationen deutlich unter diesem Wert bewegten war eine systemische Wirkung des lokal angewandten Gentamicins unwahrscheinlich.

5.4 FAZIT

Mit dieser Studie wurde die Anwendung von DBM und die Anreicherung der DBM mit BMP-2 oder Gentamicin im Rahmen der Heilung eines Bohrlochdefektes am Schafmodell untersucht.

Das Tiermodell liefert die Möglichkeit die Versuchstierzahl zu reduzieren und trotzdem verschiedene Biomaterialien zu untersuchen. Durch das Setzen der Bohrlochdefekte in zwei verschiedenen Knochenlokalisationen konnten diaphysäre und metaphysäre Defekte verglichen werden und durch das zweimalige Operieren der Tiere wurde der Vergleich von zwei verschiedenen Heilungszeitpunkten in einem Tier ermöglicht. Aufgrund der langsameren Heilung der metaphysären Defekte konnten die Unterschiede in der Knochenheilung der verschiedenen Materialgruppen stärker aufgezeigt werden und ließen somit einen Materialvergleich zu.

Vergleicht man die Materialgruppen mit dem Goldstandard, zeigte sich, dass DBM als Alternative zur autologen Spongiosa zwar den Nachteil der zusätzlichen Operation umgeht, aber alleine eingesetzt nicht den gleichen fördernden Effekt besitzt. DBM angereichert mit BMP-2 ist durch die lange Bindung von BMP-2 an den Ort der Wirkung verbunden mit der kontinuierlichen Freigabe eine starke Kombination auch für die Heilung kritischer Knochendefekte. DBM eignet sich somit sehr gut als Trägermaterial für BMP-2. Die Kombination aus DBM und Gentamicin verzögert hingegen die Knochenheilung. Sie ist wahrscheinlich gut nutzbar in der Infektionsprophylaxe und -therapie, hierfür sind aber weitere Studien notwendig.

Diese Studie ermöglichte einen Einblick in die histologischen Vorgänge der Knochenheilung im Zusammenhang mit dem Einsatz von demineralisierter Knochenmatrix und zeigte die Möglichkeiten von DBM als Trägermaterial auf.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kommt es zu Knochendefekten kritischer Größe, einer mechanischen Instabilität oder einer Infektion, kann es zu einer Störung der Knochenheilung kommen. Um diese zu behandeln und eine ausbleibende Heilung zu verhindern, wird der Einsatz von Knochenersatzmaterialien notwendig. Klinischer Goldstandard hierfür ist autologe Knochenspongiosa. Die Gewinnung dieses Materials bedeutet aber einen zusätzlichen Eingriff, zumeist am Beckenkamm, verbunden mit möglichen Komplikationen. Eine Alternative hierfür können allogene Knochenersatzmaterialien wie zum Beispiel die demineralisierte Knochenmatrix (DBM) sein.

In dieser Studie wurde die intraoperative Anwendung von DBM und dessen Einfluss auf die Knochenheilung am Bohrlochmodell des Schafes untersucht. Zusätzlich wurde die DBM mit Hilfe einer speziellen Mischspritze mit rhBMP-2 und Gentamicin angereichert und die Knochenheilung zu der singulären Anwendung von DBM verglichen. Hierfür wurden Bohrlochdefekte in den proximalen und distalen Anteil von Femur, Humerus, Metakarpus und Metatarsus in Schafen gesetzt und mit den Materialien gefüllt. Nach drei und neun Wochen Heilungszeit erfolgte eine radiologische, histologische und histomorphometrische Auswertung der Proben. Zusätzlich Bohrlochdefekte mit autologer Spongiosa für den Vergleich mit dem klinischen Goldstandard gefüllt und untersucht. Diese dienten zusammen mit Leerdefekten als Kontrollproben.

Die Knochenheilung wurde im Vergleich zu der Anwendung von autologer Spongiosa durch die eingesetzte DBM nicht verstärkt und zeigte eine vergleichbare Knochenheilung wie die Leerdefekte. Die Anreicherung der DBM mit rhBMP-2 steigerte die Knochenheilung und zeigte eine mit der autologen Spongiosa vergleichbare Defektheilungsförderung. Die Anwendung von DBM angereichert mit Gentamicin verzögerte die Knochenheilung.

Die DBM eignet sich durch die gute Bindung von BMP-2, kombiniert mit einer konstanten Freisetzung als gutes Trägermaterial und ist in dieser Kombination als mögliche Alternative zur autologen Spongiosa zu sehen. Die Kombination mit Gentamicin verzögerte die Knochenheilung, hemmte diese aber nicht. Hier wäre die Untersuchung der Knochenheilungsförderung in Kombination mit einem infizierten Heilungsmodell interessant und bietet weitere Forschungsansätze. Die DBM kann somit in Bezug auf eine Förderung der Knochenheilung alleine nicht als Alternative zur autologen Spongiosa bestehen. Dennoch zeigte sie gute Eigenschaften als Trägermaterial und birgt hier eine Möglichkeit für die Behandlung kritischer Knochendefekte und infizierten Frakturen.

7 SUMMARY

Effect of demineralized bone matrix (DBM) and enrichments with BMP-2 or gentamicin on bone healing in a sheep model

A consequence of critical-size bone defects, mechanical instability or infection of fractures can be an impaired bone healing. To treat or prevent this consequence a wide spectre of bone grafting materials are used. Autologous bone graft is considered the gold standard in bone grafting procedures but due to its disadvantages, there is a need for an alternative. This study evaluated the intraoperative application of demineralized bone matrix (DBM) and the enrichment with BMP-2 and Gentamicin as an alternative to autologous spongiosa in a drill hole model in sheep.

Drill hole defects (diameter 6mm x depth max. 15 mm) were placed in the proximal and distal part of femur, humerus, metakarpus and metatarsus of merino-mix sheep and filled with either DBM, DBM enriched with BMP-2 or DBM enriched with Gentamicin. Defects filled with autologous spongiosa and empty defects served as a control. After three and nine weeks healing time the samples were analysed radiographically, histologically and histochemically.

The singular use of DBM showed a similar bone healing as the empty controls and no enhancement of the bone healing compared to the group treated with autologous spongiosa. DBM enriched with BMP-2 enhanced bone healing to a similar extent as the group treated with autologous spongiosa. Enriched with Gentamicin the bone healing was reduced.

Based on the long-term binding of BMP-2 in DBM combined with a continuous release, DBM is a good carrier for BMP-2. This is therefore a suitable combination to treat an impaired bone healing or critical size defects as an alternative to autologous spongiosa. The combination with Gentamicin delayed the bone healing but did not inhibit it. This combination maybe holds advantages in case of an infected fracture or osteomyelitis, but this still has to be determined by further studies.

DBM alone cannot stand as an alternative to autologous spongiosa in terms of enhancing the bone healing, but it holds a promising potency as a carrier and therefore for the treatment of critical size defects or infected fractures.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ACARTURK T. O., HOLLINGER J. O.** (2006) Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plast Reconstr Surg* 118, 862-873
- ADAMS C. I., KEATING J. F., COURT-BROWN C. M.** (2001) Cigarette smoking and open tibial fractures. *Injury* 32, 61-65
- AGRAWAL V., SINHA M.** (2016) A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*
- AI-AQL Z. S., ALAGL A. S., GRAVES D. T., GERSTENFELD L. C., EINHORN T. A.** (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87, 107-118
- ALAEF F., HONG S. H., DUKAS A. G., PENSAK M. J., ROWE D. W., LIEBERMAN J. R.** (2014) Evaluation of osteogenic cell differentiation in response to bone morphogenetic protein or demineralized bone matrix in a critical sized defect model using GFP reporter mice. *J Orthop Res* 32, 1120-1128
- ANDERSON J. M.** (1988) Inflammatory response to implants. *ASAIO Journal* 34, 101-107
- ANDERSON J. M.** (2001) Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research* 31, 81-110
- ANGUITA-ALONSO P., ROUSE M. S., PIPER K. E., JACOFISKY D. J., OSMON D. R., PATEL R.** (2006) Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res* 445, 239-244
- ANTOCI V., JR., ADAMS C. S., HICKOK N. J., SHAPIRO I. M., PARVIZI J.** (2007) Antibiotics for local delivery systems cause skeletal cell toxicity in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 462, 200-206
- APPEL D., THEISS F., EL-WARRAK A. O., ZLINSZKY K., BETTSCHART-WOLFISBERGER R., BOHNER M., MATTER S., AUER J. A., VON RECHENBERG B.** (2004) In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 25, 1439-1451
- ARNOLD S. R., ELIAS D., BUCKINGHAM S. C., THOMAS E. D., NOVAIS E., ARKADER A., HOWARD C.** (2006) Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pediatr Orthop* 26, 703-708
- ARONSON J., SHEN X.** (1994) Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. *Clin Orthop Relat Res*, 25-30
- ARRINGTON E. D., SMITH W. J., CHAMBERS H. G., BUCKNELL A. L., DAVINO N. A.** (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*, 300-309
- BAE H., ZHAO L., ZHU D., KANIM L. E., WANG J. C., DELAMARTER R. B.** (2010) Variability across ten production lots of a single demineralized bone matrix product. *J Bone Joint Surg Am* 92, 427-435
- BAE H. W., ZHAO L., KANIM L. E., WONG P., DELAMARTER R. B., DAWSON E. G.** (2006) Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 1299-1306; discussion 1307-1298
- BAHAROGLU Z., MAZEL D.** (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38, 1126-1145
- BALATO G., ASCIONE T., ROSA D., PAGLIANO P., SOLARINO G., MORETTI B., MARICONDA M.** (2015) Release of Gentamicin from Cement Spacers in Two-Stage Procedures for Hip and Knee Prosthetic Infection: An in Vivo Pharmacokinetic Study with Clinical Follow-Up. *J Biol Regul Homeost Agents* 29, 63-72
- BANWART J. C., ASHER M. A., HASSANEIN R. S.** (1995) Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 20, 1055-1060
- BAUER T. W., MUSCHLER G. F.** (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*, 10-27
- BEAMAN F. D., BANCROFT L. W., PETERSON J. J., KRANSDORF M. J.** (2006) Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin North Am* 44, 451-461
- BEEDERMAN M., LAMPLIT J. D., NAN G., WANG J., LIU X., YIN L., LI R., SHUI W., ZHANG H., KIM S. H., ZHANG W., ZHANG J., KONG Y., DENDULURI S., ROGERS M. R., PRATT A., HAYDON R. C., LUU H. H., ANGELES J., SHI L. L., HE T.-C.** (2013) BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering* Vol.06No.08, 21
- BENNETT J. E., DOLIN R., BLASER M. J.** (2014) Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, Elsevier Health Sciences
- BERNHARDSSON M., SANDBERG O., ASPENBERG P.** (2015) Experimental models for cancellous bone healing in the rat: Comparison of drill holes and implanted screws. *Acta Orthop* 86, 745-750
- BESSA P. C., CASAL M., REIS R.** (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to the clinic, part II (BMP delivery). *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2, 81-96
- BISHOP G. B., EINHORN T. A.** (2007) Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 31, 721-727

- BISHOP J. A., PALANCA A. A., BELLINO M. J.,LOWENBERG D. W.** (2012) Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg* 20, 273-282
- BLUM B., MOSELEY J., MILLER L., RICHELSON K.,HAGGARD W.** (2004) Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 27, s161-165
- BLUNSTON M. A., YONOVITZ A., WOODAHL E. L.,SMOLENSKY M. H.** (2015) Gentamicin-induced ototoxicity and nephrotoxicity vary with circadian time of treatment and entail separate mechanisms. *Chronobiol Int* 32, 1223-1232
- BOERCKEL J. D., KOLAMBKAR Y. M., DUPONT K. M., UHRIG B. A., PHELPS E. A., STEVENS H. Y., GARCIA A. J.,GULDBERG R. E.** (2011) Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32, 5241-5251
- BOHNER M.** (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4, 37-47
- BONUCCI E.,BALLANTI P.** (2014) Osteoporosis-bone remodeling and animal models. *Toxicol Pathol* 42, 957-969
- BORMANN N., PRUSS A., SCHMIDMAIER G.,WILDEMANN B.** (2010) In vitro testing of the osteoinductive potential of different bone allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 130, 143-149
- BORMANN N., SCHWABE P., SMITH M. D.,WILDEMANN B.** (2014) Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure. *Bone* 59, 162-172
- BOSTMAN O.,PIHLAJAMAKI H.** (2000) Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 21, 2615-2621
- BOUSTRAND J.-P.** (2012) Biocompatibility and performance of medical devices, Elsevier
- BYRDONE A. S., MEEK D.,MACLAINE S.** (2010) Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 224, 1329-1343
- CAIRO F.,PAGLIARO U.** (2015) Regenerative Therapies in the Treatment of Intra-bony Defects Show High Clinical Efficacy. *J Evid Based Dent Pract* 15, 108-112
- CALAFI A., BORMANN N., SCHARNWEBER D., RENTSCH B.,WILDEMANN B.** (2014) A new concept for a drug releasing modular scaffold. *Materials Letters* 119, 119-122
- CALHOUN J. H., MANRING M. M.,SHIRTLIFF M.** (2009) Osteomyelitis of the long bones. *Semin Plast Surg* 23, 59-72
- CALORI G. M., COLOMBO M., BUCCI M., MAZZA E. L., FADIGATI P.,MAZZOLA S.** (2015) Clinical effectiveness of Osigraft in long-bones non-unions. *Injury* 46 Suppl 8, S55-64
- CAMPOCCIA D., MONTANARO L., SPEZIALE P.,ARCIOLA C. R.** (2010) Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* 31, 6363-6377
- CARRAGEE E. J., HURWITZ E. L.,WEINER B. K.** (2011) A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11, 471-491
- CARREIRA A. C., LOJUDICE F. H., HALCSIK E., NAVARRO R. D., SOGAYAR M. C.,GRANJEIRO J. M.** (2014) Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93, 335-345
- CHANG Y., GOLDBERG V. M.,CAPLAN A. I.** (2006) Toxic effects of gentamicin on marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Relat Res* 452, 242-249
- CHAU A. M., XU L. L., VAN DER RIJT R., WONG J. H., GRAGNANIELLO C., STANFORD R. E.,MOBBS R. J.** (2012) Reconstruction versus no reconstruction of iliac crest defects following harvest for spinal fusion: a systematic review: A review. *J Neurosurg Spine* 16, 565-572
- CHAVASSIEUX P., BUFFET A., VERGNAUD P., GARNERO P.,MEUNIER P. J.** (1997) Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes. *Bone* 20, 451-455
- CHEN L., HE Z., CHEN B., ZHAO Y., SUN W., XIAO Z., ZHANG J., YANG M., GAO Z.,DAI J.** (2009) Direct chemical cross-linking of platelet-derived growth factor-BB to the demineralized bone matrix improves cellularization and vascularization. *Biomacromolecules* 10, 3193-3198
- CHENG H., JIANG W., PHILLIPS F. M., HAYDON R. C., PENG Y., ZHOU L., LUU H. H., AN N., BREYER B., VANICHAKARN P., SZATKOWSKI J. P., PARK J. Y.,HE T. C.** (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 1544-1552
- CHO T. J., GERSTENFELD L. C.,EINHORN T. A.** (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17, 513-520
- CHU V. H., CROSSLIN D. R., FRIEDMAN J. Y., REED S. D., CABELL C. H., GRIFFITHS R. I., MASSELINK L. E., KAYE K. S., COREY G. R., RELLER L. B., STRYJEWSKI M. E., SCHULMAN K. A.,FOWLER V. G., JR.** (2005) *Staphylococcus aureus* bacteremia in patients with prosthetic devices: costs and outcomes. *Am J Med* 118, 1416
- CLAES L., REUSCH M., GOCKELMANN M., OHNMACHT M., WEHNER T., AMLING M., BEIL F. T.,IGNATIUS A.** (2011) Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing. *J Orthop Res* 29, 425-432
- CLARKE B.** (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S131-139
- COEN G., BALLANTI P., BALDUCCI A., GRANDI F., MANNI M., MANTELLA D., PIERANTOZZI A., RUGGERI M., SARDELLA D., SORBO G.,BONUCCI E.** (2006) Renal osteodystrophy: alpha-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin-A, matrix GLA protein serum levels, and bone histomorphometry. *Am J Kidney Dis* 48, 106-113
- COPUROGLU C., CALORI G. M.,GIANNOUNDIS P. V.** (2013) Fracture non-union: who is at risk? *Injury* 44, 1379-1382

- CORACA-HUBER D. C., WURM A., FILLE M., HAUSDORFER J., NOGLER M., VOGT S., KUHN K. D.** (2015) Antibiotic-loaded calcium carbonate/calcium sulfate granules as co-adjuvant for bone grafting. *J Mater Sci Mater Med* 26, 5344
- CORNELL C. N.** (1999) Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 30, 591-598
- COSTERTON J. W., STEWART P. S., GREENBERG E. P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322
- COUGHLIN M. J., GRIMES J. S., KENNEDY M. P.** (2006) Coralline hydroxyapatite bone graft substitute in hindfoot surgery. *Foot Ankle Int* 27, 19-22
- COURT-BROWN C. M., MCBIRNIE J.** (1995) The epidemiology of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 77, 417-421
- COURT-BROWN C. M., MCQUEEN M. M.** (2008) Nonunions of the proximal humerus: their prevalence and functional outcome. *J Trauma* 64, 1517-1521
- COZEN L.** (1972) Does diabetes delay fracture healing? *Clin Orthop Relat Res* 82, 134-140
- CROCKETT J. C., ROGERS M. J., COXON F. P., HOCKING L. J., HELFRICH M. H.** (2011) Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124, 991-998
- CYPHER T. J., GROSSMAN J. P.** (1996) Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35, 413-417
- DAHABREH Z., CALORI G., KANAKARIS N., NIKOLAOU V., GIANNOUDIS P.** (2009) A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *Int Orthop* 33, 1407-1414
- DE LONG W. G., JR., EINHORN T. A., KOVAL K., MCKEE M., SMITH W., SANDERS R., WATSON T.** (2007) Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89, 649-658
- DE OLIVEIRA R. C., DE OLIVEIRA F. H., CESTARI T. M., TAGA R., GRANJEIRO J. M.** (2008) Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 19, 749-754
- DEFIFE K. M., JENNEY C. R., COLTON E., ANDERSON J. M.** (1999) Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion. *The FASEB journal* 13, 823-832
- DEIRMENGIAN C., GREENBAUM J., STERN J., BRAFFMAN M., LOTKE P. A., BOOTH R. E., JR., LONNER J. H.** (2003) Open debridement of acute gram-positive infections after total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*, 129-134
- DEN BOER F. C., PATKA P., BAKKER F. C., WIPPERMANN B. W., VAN LINGEN A., VINK G. Q., BOSHIJZEN K., HAARMAN H. J.** (1999) New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 17, 654-660
- DIEFENBECK M., MUCKLEY T., HOFMANN G. O.** (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury* 37 Suppl 2, S95-104
- DIMITRIOU R., KANAKARIS N., SOUCACOS P. N., GIANNOUDIS P. V.** (2013) Genetic predisposition to non-union: evidence today. *Injury* 44 Suppl 1, S50-53
- DIMITRIOU R., MATALIOTAKIS G. I., ANGOULES A. G., KANAKARIS N. K., GIANNOUDIS P. V.** (2011) Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 42 Suppl 2, S3-15
- DIMITRIOU R., TSIRIDIS E., GIANNOUDIS P. V.** (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36, 1392-1404
- DINOPOULOS H., DIMITRIOU R., GIANNOUDIS P. V.** (2012) Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon* 10, 230-239
- DINOPOULOS H. T., GIANNOUDIS P. V.** (2006) Safety and efficacy of use of demineralised bone matrix in orthopaedic and trauma surgery. *Expert Opin Drug Saf* 5, 847-866
- DIZG** (2011) Datenblatt DIZG "gebrauchsfertige" DBM. http://www.dizg.de/images/pdf/deutsch/downloads/datenblatt_gebrauchsfertige_dbms.pdf. 2011, Accessed 01-19-16
- VON DOERNBERG M. C., VON RECHENBERG B., BOHNER M., GRUNENFELDER S., VAN LENTHE G. H., MULLER R., GASSER B., MATHYS R., BAROUD G., AUER J.** (2006) In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27, 5186-5198
- DOVAS S., LIAKOPOULOS V., PAPTHEODOROU L., CHRONOPOULOU I., PAPAVALIIOU V., ATMATZIDIS E., GIANNOPOULOU M., ELEFTHERIADIS T., SIMOPOULOU T., KARACHALIOS T., STEFANIDIS I.** (2008) Acute renal failure after antibiotic-impregnated bone cement treatment of an infected total knee arthroplasty. *Clin Nephrol* 69, 207-212
- DROSOS G. I., TOUZOPOULOS P., VERVERIDIS A., TILKERIDIS K., KAZAKOS K.** (2015) Use of demineralized bone matrix in the extremities. *World J Orthop* 6, 269-277
- DU B., LIU W., DENG Y., LI S., LIU X., GAO Y., ZHOU L.** (2015) Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. *Int J Nanomedicine* 10, 2555-2565
- DUEWELHENKE N., KRUT O., EYSEL P.** (2007) Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 54-63

- DUNNE N. J., HILL J., MCAFEE P., KIRKPATRICK R., PATRICK S., TUNNEY M.** (2008) Incorporation of large amounts of gentamicin sulphate into acrylic bone cement: effect on handling and mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. *Proc Inst Mech Eng H* 222, 355-365
- EINHORN T. A.** (1998) Breakout session. 1: Definitions of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, S353
- EINHORN T. A., LANE J. M.** (1998) Significant advances have been made in the way surgeons treat fractures. *Clin Orthop Relat Res*, S2-3
- EINHORN T. A., MAJESKA R. J., MOHAIDEEN A., KAGEL E. M., BOUXSEIN 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
- EMA E. M. A.** (2016) Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels InductOs.
http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000408/WC500032317.pdf. 2016, Accessed 02-29-2016
- EMAD B., SHERIF EL M., BASMA G. M., WONG R. W., BENDEUS M., RABIE A. B.** (2006) Vascular endothelial growth factor augments the healing of demineralized bone matrix grafts. *Int J Surg* 4, 160-166
- EPARI D. R., SCHELL H., BAIL H. J., DUDA G. N.** (2006) Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 38, 864-870
- FAN W., CRAWFORD R., XIAO Y.** (2008) Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats. *Bone* 42, 81-89
- FASSBENDER M., MINKWITZ S., KRONBACH Z., STROBEL C., KADOW-ROMACKER A., SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B.** (2013) Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone* 55, 298-304
- FASSBENDER M., MINKWITZ S., STROBEL C., SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B.** (2014a) Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. *Int J Mol Sci* 15, 8539-8552
- FASSBENDER M., MINKWITZ S., THIELE M., WILDEMANN B.** (2014b) Efficacy of two different demineralised bone matrix grafts to promote bone healing in a critical-size-defect: a radiological, histological and histomorphometric study in rat femurs. *Int Orthop* 38, 1963-1969
- FOWLER B. L., DALL B. E., ROWE D. E.** (1995) Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 24, 895-903
- FRANK M. S., NAHATA M. C., HILTY M. D.** (1981) Glycerol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, adverse reactions, and clinical use. *Pharmacotherapy* 1, 147-160
- FRANSSSEN B. B., VAN DIEST P. J., SCHURMAN A. H., KON M.** (2008) Drilling K-wires, what about the osteocytes? An experimental study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 128, 83-87
- FREELAND A. E., REHM J. P.** (2004) Autogenous bone grafting for fractures of the hand. *Tech Hand Up Extrem Surg* 8, 78-86
- FROST H. M.** (1963) Measurement of human bone formation by means of tetracycline labelling. *Can J Biochem Physiol* 41, 31-42
- FU K., XU Q., CZERNUSZKA J., TRIFFITT J. T., XIA Z.** (2013) Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomed Mater* 8, 065007
- GHODASRA J. H., WEATHERFORD B. M., NICKOLI M. S., DALEY E. L., CHEN K., ZHANG L.-Q., HASHMI S. Z., HSU E. L., HSU W. K.** (2015) The effect of rhBMP-2 in a novel, non-instrumented extremity nonunion model. *Journal of Orthopaedic Science*
- GIANNOUDIS P. V., DINOPOULOS H., TSIRIDIS E.** (2005) Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3, S20-27
- GIANNOUDIS P. V., EINHORN T. A.** (2009) Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40 Suppl 3, S1-3
- GIESE G.** (2014) Establishment of BMP-7 signaling analysis in tenocytes. Academic, Department, Charité Universitätsmedizin Berlin, Bachelor, B. WILDEMANN
- GITEAU A., VENIER-JULIENNE M.-C., AUBERT-POUËSSEL A., BENOIT J.-P.** (2008) How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *International Journal of Pharmaceutics* 350, 14-26
- GLOWACKI J.** (2005) A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. *Cell Tissue Bank* 6, 3-12
- GLOWACKI J., MULLIKEN J. B.** (1985) Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg* 12, 233-241
- GOODMAN S., DAVIDSON J., FOMASIER V.** (1993) Histological reaction to titanium alloy and hydroxyapatite particles in the rabbit tibia. *Biomaterials* 14, 723-728
- GOULET R. W., GOLDSTEIN S. A., CIARELLI M. J., KUHN J. L., BROWN M. B., FELDKAMP L. A.** (1994) The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* 27, 375-389
- GOVENDER S., CSIMMA C., GENANT H. K., VALENTIN-OPRAN A., AMIT Y., ARBEL R., ARO H., ATAR D., BISHAY M., BORNER M. G., CHIRON P., CHOONG P., CINATS J., COURTENAY B., FEIBEL R., GEULETTE B., GRAVEL C.,**

- HAAS N., RASCHKE M., HAMMACHER E., VAN DER VELDE D., HARDY P., HOLT M., JOSTEN C., KETTERL R. L., LINDEQUE B., LOB G., MATHEVON H., MCCOY G., MARSH D., MILLER R., MUNTING E., OEVRE S., NORDSLETTEN L., PATEL A., POHL A., RENNIE W., REYNDEERS P., ROMMENS P. M., RONDIA J., ROSSOUW W. C., DANEEL P. J., RUFF S., RUTER A., SANTAVIRTA S., SCHILDHAUER T. A., GEKLE C., SCHNETTLER R., SEGAL D., SEILER H., SNOWDOWN R. B., STAPERT J., TAGLANG G., VERDONK R., VOGELS L., WECKBACH A., WENTZENSEN A., WISNIEWSKI T. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A, 2123-2134
- GREEN D., HOWARD D., YANG X., KELLY M., OREFFO R. O. (2003) Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation. *Tissue Eng* 9, 1159-1166
- GREENWALD A. S., BODEN S. D., GOLDBERG V. M., KHAN Y., LAURENCIN C. T., ROSIER R. N., AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS. THE COMMITTEE ON BIOLOGICAL I. (2001) Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 2 Pt 2, 98-103
- GRUSKIN E., DOLL B. A., FUTRELL F. W., SCHMITZ J. P., HOLLINGER J. O. (2012) Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev* 64, 1063-1077
- GU G., MULARI M., PENG Z., HENTUNEN T. A., VAANANEN H. K. (2005) Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 1095-1101
- GU H., XIANG Z., YIN X., LI B., MEI N., LI G., WANG C. (2014) Bone regeneration in a rabbit ulna defect model: use of allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity. *Cell Tissue Res* 358, 453-464
- GUERADO E., FUERSTENBERG C. H. (2011) What bone graft substitutes should we use in post-traumatic spinal fusion? *Injury* 42 Suppl 2, S64-71
- GUGALA Z., GOGOLEWSKI S. (1999) Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma* 13, 187-195
- GULLBERG E., CAO S., BERG O. G., ILBACK C., SANDEGREN L., HUGHES D., ANDERSSON D. I. (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog* 7, e1002158
- HABIBOVIC P., DE GROOT K. (2007) Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 25-32
- HAEBERLE M., WITTNER B. (2009) Is gentamicin-loaded bone cement a risk for developing systemic allergic dermatitis? *Contact Dermatitis* 60, 176-177
- HAKEOS W. M., RICHARDS J. E., OBREMSKEY W. T. (2011) Plate fixation of femoral nonunions over an intramedullary nail with autogenous bone grafting. *J Orthop Trauma* 25, 84-89
- HALEEM A. A., ROUSE M. S., LEWALLEN D. G., HANSSSEN A. D., STECKELBERG J. M., PATEL R. (2004) Gentamicin and vancomycin do not impair experimental fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 22-24
- HAMMETT-STABLER C. A., JOHNS T. (1998) Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. *National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem* 44, 1129-1140
- HAN B., TANG B., NIMNI M. E. (2003) Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res* 21, 648-654
- HECK D., ROSENBERG A., SCHINK-ASCANI M., GARBUS S., KIEWITT T. (1995) Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 10, 470-475
- HENDRIKS J. G., VAN HORN J. R., VAN DER MEI H. C., BUSSCHER H. J. (2004) Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials* 25, 545-556
- HENRY S. L., OSTERMANN P. A., SELIGSON D. (1990) The prophylactic use of antibiotic impregnated beads in open fractures. *J Trauma* 30, 1231-1238
- HINAREJOS P., GUIRRO P., PUIG-VERDIE L., TORRES-CLARAMUNT R., LEAL-BLANQUET J., SANCHEZ-SOLER J., MONLLAU J. C. (2015) Use of antibiotic-loaded cement in total knee arthroplasty. *World J Orthop* 6, 877-885
- HINSENKAMP M., COLLARD J. F. (2014) Growth factors in orthopaedic surgery: demineralized bone matrix versus recombinant bone morphogenetic proteins. *Int Orthop*
- HO K. W. K., GILBODY J., JAMESON T., MILES A. W. (2010) The effect of 4 mm bicortical drill hole defect on bone strength in a pig femur model. *Arch Orthop Trauma Surg* 130, 797-802
- HOLT D. J., GRAINGER D. W. (2012) Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* 64, 1123-1128
- HOLTOM P. D., PATZAKIS M. J. (2003) Newer methods of antimicrobial delivery for bone and joint infections. *Instr Course Lect* 52, 745-749
- HOPE P. G., KRISTINSSON K. G., NORMAN P., ELSON R. A. (1989) Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. *J Bone Joint Surg Br* 71, 851-855
- HORVATHY D. B., VACZ G., TORO I., SZABO T., MAY Z., DUARTE M., HORNYAK I., SZABO B. T., DOBO-NAGY C., DOROS A., LACZA Z. (2015) Remineralization of demineralized bone matrix in critical size cranial defects in rats: A 6-month follow-up study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*
- HSU S. L., WANG C. J. (2014) The use of demineralized bone matrix for anterior cruciate ligament reconstruction: a radiographic, histologic, and immunohistochemical study in rabbits. *J Surg Res* 187, 219-224

- INTINI G., ANDREANA S., BUHITE R. J., BOBEK L. A.** (2008) A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried stem and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol* 79, 1217-1224
- ISEFUKU S., JOYNER C. J., SIMPSON A. H.** (2003) Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 17, 212-216
- JOHNSON L. L., MORRISON K. M., WOOD D. L.** (2000) The application of arthroscopic principles to bone grafting of delayed union of long bone fractures. *Arthroscopy* 16, 279-289
- JONES A. L., BUCHOLZ R. W., BOSSE M. J., MIRZA S. K., LYON T. R., WEBB L. X., POLLAK A. N., GOLDEN J. D., VALENTIN-OPRAN A.** (2006) Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 88, 1431-1441
- KANEKO H., ARAKAWA T., MANO H., KANEDA T., OGASAWARA A., NAKAGAWA M., TOYAMA Y., YABE Y., KUMEGAWA M., HAKEDA Y.** (2000) Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 27, 479-486
- KHAN S. N., CAMMISA F. P., JR., SANDHU H. S., DIWAN A. D., GIRARDI F. P., LANE J. M.** (2005) The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13, 77-86
- KIM H. P., JI Y. H., RHEE S. C., DHONG E. S., PARK S. H., YOON E. S.** (2012) Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose-derived stem cells combined with demineralized bone matrix in a rat critically-sized calvarial defect model. *Curr Stem Cell Res Ther* 7, 165-172
- KIM R. Y., OH J. H., LEE B. S., SEO Y. K., HWANG S. J., KIM I. S.** (2014) The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption. *Biomaterials* 35, 1869-1881
- KIM S. G., CHUNG T. Y., KIM M. S., LIM S. C.** (2004) The effect of high local concentrations of antibiotics on demineralized bone induction in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 708-713
- KIM S. H., TURNBULL J., GUIMOND S.** (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209, 139-151
- KINACI A., NEUHAUS V., RING D. C.** (2014) Trends in bone graft use in the United States. *Orthopedics* 37, e783-788
- KIRK J. F., RITTER G., WATERS C., NARISAWA S., MILLAN J. L., TALTON J. D.** (2013) Osteoconductivity and osteoinductivity of NanoFUSE((R)) DBM. *Cell Tissue Bank* 14, 33-44
- KIRKER-HEAD C. A., GERHART T. N., ARMSTRONG R., SCHELLING S. H., CARMEL L. A.** (1998) Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res*, 205-217
- KLEMM K.** (2001) The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clin Microbiol Infect* 7, 28-31
- KOHANSKI M. A., DEPRISTO M. A., COLLINS J. J.** (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37, 311-320
- KOLAMBKAR Y. M., DUPONT K. M., BOERCKEL J. D., HUEBSCH N., MOONEY D. J., HUTMACHER D. W., GULDBERG R. E.** (2011) An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials* 32, 65-74
- KON E., MURAGLIA A., CORSI A., BIANCO P., MARCACCI M., MARTIN I., BOYDE A., RUSPANTINI I., CHISTOLINI P., ROCCA M., GIARDINO R., CANCEDDA R., QUARTO R.** (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49, 328-337
- KRAMER S. J., SPADARO J. A., WEBSTER D. A.** (1981) Antibacterial and osteoinductive properties of demineralized bone matrix treated with silver. *Clin Orthop Relat Res*, 154-162
- KWIATKOWSKI T. C., HANLEY E. N., RAMP W. K.** (1996) Cigarette smoking and its orthopedic consequences. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 25, 590-597
- LACY M. K., NICOLAU D. P., NIGHTINGALE C. H., QUINTILIANI R.** (1998) The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 27, 23-27
- LAREAU C. R., DEREN M. E., FANTRY A., DONAHUE R. M., DIGIOVANNI C. W.** (2015) Does autogenous bone graft work? A logistic regression analysis of data from 159 papers in the foot and ankle literature. *Foot Ankle Surg* 21, 150-159
- LEE K. J., ROPER J. G., WANG J. C.** (2005) Demineralized bone matrix and spinal arthrodesis. *Spine J* 5, 217S-223S
- LEW D. P., WALDVOGEL F. A.** (1997) Osteomyelitis. *N Engl J Med* 336, 999-1007
- LEWIS C. S., SUPRONOWICZ P. R., ZHUKAUSKAS R. M., GILL E., COBB R. R.** (2012) Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank* 13, 119-127
- LIEBSCHNER M. A.** (2004) Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 25, 1697-1714
- LIU G., SUN J., LI Y., ZHOU H., CUI L., LIU W., CAO Y.** (2008) Evaluation of partially demineralized osteoporotic cancellous bone matrix combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Calcif Tissue Int* 83, 176-185
- LIU Y., LU Y., TIAN X., CUI G., ZHAO Y., YANG Q., YU S., XING G., ZHANG B.** (2009) Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model. *Biomaterials* 30, 6276-6285
- LODER R. T.** (1988) The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res*, 210-216

- LOHMANN C. H., ANDREACCHIO D., KOSTER G., CARNES D. L., JR., COCHRAN D. L., DEAN D. D., BOYAN B. D., SCHWARTZ Z.** (2001) Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg* 121, 583-590
- LU M., RABIE A. B.** (2002) The effect of demineralized intramembranous bone matrix and basic fibroblast growth factor on the healing of allogeneic intramembranous bone grafts in the rabbit. *Arch Oral Biol* 47, 831-841
- LUDWIG S. C., KOWALSKI J. M., BODEN S. D.** (2000) Osteoinductive bone graft substitutes. *Eur Spine J* 9 Suppl 1, S119-125
- MACDONALD K. M., SWANSTROM M. M., MCCARTHY J. J., NEMETH B. A., GULIANI T. A., NOONAN K. J.** (2010) Exaggerated inflammatory response after use of recombinant bone morphogenetic protein in recurrent unicameral bone cysts. *J Pediatr Orthop* 30, 199-205
- MALHOTRA A., PELLETIER M. H., YU Y., CHRISTOU C., WALSH W. R.** (2014) A sheep model for cancellous bone healing. *Front Surg* 1, 37
- MARKEL D. C., GUTHRIE S. T., WU B., SONG Z., WOOLEY P. H.** (2012) Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. *J Inflamm Res* 5, 13-18
- MARSH J.** (2006) Principles of bone grafting: non-union, delayed union. *Surgery (Oxford)* 24, 207-210
- MARTINI L., FINI M., GIAVARESI G., GIARDINO R.** (2001) Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51, 292-299
- MARX R. E., WONG M. E.** (1987) A technique for the compression and carriage of autogenous bone during bone grafting procedures. *J Oral Maxillofac Surg* 45, 988-989
- MAUFFREY C., HAKE M. E., CHADAYAMMURI V., MASQUELET A. C.** (2015) Reconstruction of Long Bone Infections Using the Induced Membrane Technique: Tips and Tricks. *J Orthop Trauma*
- MAUS U., ANDEREYA S., GRAVIUS S., OHNSORGE J. A., NIEDHART C., SIEBERT C. H.** (2008a) BMP-2 incorporated in a tricalcium phosphate bone substitute enhances bone remodeling in sheep. *J Biomater Appl* 22, 559-576
- MAUS U., ANDEREYA S., GRAVIUS S., SIEBERT C. H., OHNSORGE J. A., NIEDHART C.** (2008b) Lack of effect on bone healing of injectable BMP-2 augmented hyaluronic acid. *Arch Orthop Trauma Surg* 128, 1461-1466
- MCKIBBIN B.** (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B, 150-162
- MEGAS P.** (2005) Classification of non-union. *Injury* 36 Suppl 4, S30-37
- MELLONIG J. T., PREWETT A. B., MOYER M. P.** (1992) HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 63, 979-983
- MINKWITZ S., FASSBENDER M., KRONBACH Z., WILDEMANN B.** (2015) Longitudinal analysis of osteogenic and angiogenic signaling factors in healing models mimicking atrophic and hypertrophic non-unions in rats. *PLoS One* 10, e0124217
- MISKA M., FINDEISEN S., TANNER M., BIGLARI B., STUDIER-FISCHER S., GRUTZNER P. A., SCHMIDMAIER G., MOGHADDAM A.** (2016) Treatment of nonunions in fractures of the humeral shaft according to the Diamond Concept. *Bone Joint J* 98-B, 81-87
- MORGAN S. J., JERAY K. J., SALIMAN L. H., MILLER H. J., WILLIAMS A. E., TANNER S. L., SMITH W. R., BRODERICK J. S.** (2006) Continuous infusion of local anesthetic at iliac crest bone-graft sites for postoperative pain relief. A randomized, double-blind study. *J Bone Joint Surg Am* 88, 2606-2612
- MOUSSET B., BENOIT M. A., DELLOYE C., BOUILLET R., GILLARD J.** (1995) Biodegradable implants for potential use in bone infection. An in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate. *Int Orthop* 19, 157-161
- MOUZOPOULOS G., KANAKARIS N. K., KONTAKIS G., OBAKPOVWE O., TOWNSEND R., GIANNODIS P. V.** (2011) Management of bone infections in adults: the surgeon's and microbiologist's perspectives. *Injury* 42 Suppl 5, S18-23
- MOVAT H. Z.** (1955) Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol* 60, 289-295
- MUKHERJEE D. P., TUNKLE A. S., ROBERTS R. A., CLAVENNA A., ROGERS S., SMITH D.** (2003) An animal evaluation of a paste of chitosan glutamate and hydroxyapatite as a synthetic bone graft material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67, 603-609
- MULARI M., VAARANIEMI J., VAANANEN H. K.** (2003) Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech* 61, 496-503
- MUNTING E., WILMART J. F., WIJNE A., HENNEBERT P., DELLOYE C.** (1988) Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand* 59, 34-38
- MUSCHLER G. F., RAUT V. P., PATTERSON T. E., WENKE J. C., HOLLINGER J. O.** (2010) The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 123-145
- MYEROFF C., ARCHDEACON M.** (2011) Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Am* 93, 2227-2236
- NAFEI A., DANIELSEN C. C., LINDE F., HVID I.** (2000) Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties. *J Bone Joint Surg Br* 82, 910-920
- NANDI S. K., ROY S., MUKHERJEE P., KUNDU B., DE D. K., BASU D.** (2010) Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 132, 15-30

- NEUT D., VAN DE BELT H., VAN HORN J. R., VAN DER MEI H. C., BUSSCHER H. J. (2003) Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* 24, 1829-1831
- NEUT D., KLUIJN O. S., CRIELAARD B. J., VAN DER MEI H. C., BUSSCHER H. J., GRIJPMMA D. W. (2009) A biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis. *Acta Orthop* 80, 514-519
- NEWMAN E., TURNER A. S., WARK J. D. (1995) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16, 277S-284S
- NIJHOF M. W., STALLMANN H. P., VOGELY H. C., FLEER A., SCHOULS L. M., DHERT W. J., VERBOUT A. J. (2000) Prevention of infection with tobramycin-containing bone cement or systemic ceftazolin in an animal model. *J Biomed Mater Res* 52, 709-715
- NIKOLAKIS G., ZOSCHKE C., MAKRANTONAKI E., HAUSMANN C., SCHAFFER-KORTING M., ZOUBOULIS C. C. (2016) [Experimental models of human skin aging]. *Hautarzt*
- NOBLE B. (2003) Bone microdamage and cell apoptosis. *Eur Cell Mater* 6, 46-55
- NUSS K. M., AUER J. A., BOOS A., VON RECHENBERG B. (2006) An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 7, 67
- OLAH A. J., SIMON A., GAUDY M., HERRMANN W., SCHENK R. K. (1977) Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain. *Stain Technol* 52, 331-337
- OZDEMIR M. T., KIR M. C. (2011) Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. *Indian J Orthop* 45, 226-230
- PACACCIO D. J., STERN S. F. (2005) Demineralized bone matrix: basic science and clinical applications. *Clin Podiatr Med Surg* 22, 599-606, vii
- PANCHBHAVI V. K. (2010) Synthetic bone grafting in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 15, 559-576
- PANDEY R. K., PANDA S. (2013) Drilling of bone: A comprehensive review. *Journal of clinical Orthopaedics and Trauma* 4, 15-30
- PASTOUREAU P., CHARRIER J., BLANCHARD M. M., BOIVIN G., DULOR J. P., THERIEZ M., BARENTON B. (1989) Effects of a chronic GRF treatment on lambs having low or normal birth weight. *Domest Anim Endocrinol* 6, 321-329
- PATTERSON J., SIEW R., HERRING S. W., LIN A. S., GULDBERG R., STAYTON P. S. (2010) Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* 31, 6772-6781
- PAUTKE C., VOGT S., KREUTZER K., HACZEK C., WEXEL G., KOLK A., IMHOFF A. B., ZITZELSBERGER H., MILZ S., TISCHER T. (2010) Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling. *J Anat* 217, 76-82
- PEARCE A. I., RICHARDS R. G., MILZ S., SCHNEIDER E., PEARCE S. G. (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13, 1-10
- PEEL S. A., HU Z. M., CLOKIE C. M. (2003) In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: in vitro studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg* 14, 284-291
- PENDLETON A., KOCHER M. S. (2015) Methicillin-resistant staphylococcus aureus bone and joint infections in children. *J Am Acad Orthop Surg* 23, 29-37
- PERRY A. C., ROUSE M. S., KHALIQ Y., PIPER K. E., HANSSON A. D., OSMON D. R., STECKELBERG J. M., PATEL R. (2002) Antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate in a novel continuous flow chamber. *Clin Orthop Relat Res*, 49-53
- PETERS A., SCHELL H., BAIL H. J., HANNEMANN M., SCHUMANN T., DUDA G. N., LIENAU J. (2010) Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues. *Histol Histopathol* 25, 1149-1162
- PETERSON B., WHANG P. G., IGLESIAS R., WANG J. C., LIEBERMAN J. R. (2004) Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am* 86-A, 2243-2250
- PETTY W. (1996) DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF BONE INFECTIONS. Edited by Luis E. Jauregui. New York, Marcel Dekker, 1995. \$150.00, 466 pp. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 78, 798-798
- PIETRZAK W. S., WOODSELL-MAY J., MCDONALD N. (2006) Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg* 17, 84-90
- POBLOTH A. M., DUDA G. N., GIESECKE M. T., DIENELT A., SCHWABE P. (2015) High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model. *J Tissue Eng Regen Med*
- POON B., KHA T., TRAN S., DASS C. R. (2016) Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. *J Pharm Pharmacol*
- POULSSON A. H., EGLIN D., ZEITER S., CAMENISCH K., SPRECHER C., AGARWAL Y., NEHRBASS D., WILSON J., RICHARDS R. G. (2014) Osseointegration of machined, injection moulded and oxygen plasma modified PEEK implants in a sheep model. *Biomaterials* 35, 3717-3728
- POULTSIDES L. A., LIAROPOULOS L. L., MALIZOS K. N. (2010) The socioeconomic impact of musculoskeletal infections. *J Bone Joint Surg Am* 92, e13

- POYNTON A. R.,LANE J. M.** (2002) Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 27, S40-48
- PRUSS A., BAUMANN B., SEIBOLD M., KAO M., TINTELNOT K., VON VERSEN R., RADTKE H., DORNER T., PAULI G.,GOBEL U. B.** (2001) Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals* 29, 59-66
- RAHMAN M. S., AKHTAR N., JAMIL H. M., BANIK R. S.,ASADUZZAMAN S. M.** (2015) TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res* 3, 15005
- RAMOS-PASCUA L. R., SANCHEZ-HERRAEZ S., CASAS-RAMOS P., MOLNAR FUENTES S.,SANTOS SANCHEZ J. A.** (2014) Investigating a potential biological treatment to prevent pathological fractures caused by unicameral bone cysts in children under 8 years. *Injury* 45 Suppl 4, S28-35
- RANDELLI P., EVOLA F. R., CABITZA P., POLLI L., DENTI M.,VAIENTI L.** (2010) Prophylactic use of antibiotic-loaded bone cement in primary total knee replacement. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18, 181-186
- RANKINE J. J., HODGSON R. J., TAN H. B., COX G.,GIANNOUDIS P. V.** (2015) MRI appearances of the femur following bone graft harvesting using the Reamer-Irrigator-Aspirator. *Injury* 46 Suppl 8, S65-67
- RATHBONE C. R., CROSS J. D., BROWN K. V., MURRAY C. K.,WENKE J. C.** (2011) Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthop Res* 29, 1070-1074
- RAUCH F.** (2006) Watching bone cells at work: what we can see from bone biopsies. *Pediatr Nephrol* 21, 457-462
- VON RECHENBERG B., GENOT O. R., NUSS K., GALUPPO L., FULMER M., JACOBSON E., KRONEN P., ZLINSZKY K.,AUER J. A.** (2013) Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 85, 130-138
- REDDI A. H.** (2001) Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S1-6
- REICHERT J. C., SAIFZADEH S., WULLSCHLEGER M. E., EPARI D. R., SCHUTZ M. A., DUDA G. N., SCHELL H., VAN GRIENSVEN M., REDL H.,HUTMACHER D. W.** (2009) The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30, 2149-2163
- RENTSCH C., SCHNEIDERS W., MANTHEY S., RENTSCH B.,RAMMELT S.** (2014) Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomater* 4
- RIHN J. A., MAKDA J., HONG J., PATEL R., HILIBRAND A. S., ANDERSON D. G., VACCARO A. R.,ALBERT T. J.** (2009) The use of RhBMP-2 in single-level transforaminal lumbar interbody fusion: a clinical and radiographic analysis. *Eur Spine J* 18, 1629-1636
- RIPAMONTI U., DUARTE R.,FERRETTI C.** (2014) Re-evaluating the induction of bone formation in primates. *Biomaterials* 35, 9407-9422
- ROGERS G. F.,GREENE A. K.** (2012) Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg* 23, 323-327
- RUBIN R. J., HARRINGTON C. A., POON A., DIETRICH K., GREENE J. A.,MOIDUDDIN A.** (1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis* 5, 9-17
- RUSSELL W. M. S., BURCH R. L.,HUME C. W.** (1959) The principles of humane experimental technique
- RUTER A.,MAYR E.** (1999) [Pseudarthrosis]. *Chirurg* 70, 1239-1245
- SAMARTZIS D., SHEN F. H., GOLDBERG E. J.,AN H. S.** (2005) Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 1756-1761
- SANDERS D. W., GALPIN R. D., HOSSEINI M.,MACLEOD M. D.** (2002) Morbidity resulting from the treatment of tibial nonunion with the Ilizarov frame. *Can J Surg* 45, 196-200
- SANZEN L.,WALDER M.** (1988) Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci in an orthopaedic department. *J Hosp Infect* 12, 103-108
- SARAF S. K., YADAV A., NAGWANI S.,SEN M.** (2010) Decal bone matrix as a local antibiotic delivery vehicle in a MRSA-infected bone model: An experimental study. *Indian J Orthop* 44, 246-251
- SASSO R. C., LEHUEC J. C., SHAFFREY C.,SPINE INTERBODY RESEARCH G.** (2005) Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 18 Suppl, S77-81
- SCARBOROUGH N. L., WHITE E. M., HUGHES J. V., MANRIQUE A. J.,POSER J. W.** (1995) Allograft safety: viral inactivation with bone demineralization. *Contemp Orthop* 31, 257-261
- SCHMIDMAIER G., SCHWABE P., STROBEL C.,WILDEMANN B.** (2008) Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury* 39 Suppl 2, S37-43
- SCHMIDMAIER G., SCHWABE P., WILDEMANN B.,HAAS N. P.** (2007) Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury* 38 Suppl 4, S35-41
- 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 (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-

- beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28, 341-350
- SCHMIDMAIER G., WILDEMANN B., STEMBERGER A., HAAS N., RASCHKE M.** (2001b) Biodegradable poly (D, L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 58, 449-455
- SCHMIDT C., IGNATIUS A. A., CLAES L. E.** (2001) Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 54, 209-215
- SEEHERMAN H. J., LI X. J., BOUXSEIN M. L., WOZNEY J. M.** (2010) rhBMP-2 induces transient bone resorption followed by bone formation in a nonhuman primate core-defect model. *J Bone Joint Surg Am* 92, 411-426
- SEN M. K., MICLAU T.** (2007) Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 38 Suppl 1, S75-80
- SIMPSON C., JAYARAMARAJU D., AGRAHARAM D., GUDIPATI S., SHANMUGANATHAN R., GIANNOUDIS P. V.** (2015) The effects of diabetes medications on post-operative long bone fracture healing. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 25, 1239-1243
- SINGH A. K., MOHAPATRA D. P., KUMAR V.** (2011) Spectrum of primary bone grafting in cranio maxillofacial trauma at a tertiary care centre in India. *Indian J Plast Surg* 44, 29-35
- SOICHER M. A., CHRISTIANSEN B. A., STOVER S. M., LEACH J. K., FYHRIE D. P.** (2013) Remineralization of demineralized bone matrix (DBM) via alternating solution immersion (ASI). *J Mech Behav Biomed Mater* 26, 109-118
- SONG K. M., SLOBODA J. F.** (2001) Acute hematogenous osteomyelitis in children. *J Am Acad Orthop Surg* 9, 166-175
- SPRINGER B. D., LEE G. C., OSMON D., HAIDUKIEWYCH G. J., HANSSSEN A. D., JACOFSKY D. J.** (2004) Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*, 47-51
- STANCOVEN B. W., LEE J., DIXON D. R., MCPHERSON J. C., 3RD, BISCH F. C., WIKESJO U. M., SUSIN C.** (2013) Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *J Periodontol Res* 48, 243-251
- STEEN H., FJELD T. O.** (1989) Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia. *Clin Orthop Relat Res*, 297-305
- STEWART R. L., COX J. T., VOLGAS D., STANNARD J., DUFFY L., WAITES K. B., CHU T.-M.** (2010) The use of a biodegradable, load-bearing scaffold as a carrier for antibiotics in an infected open fracture model. *Journal of orthopaedic trauma* 24, 587-591
- STOKES W. S.** (2015) Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: The way forward. *Hum Exp Toxicol* 34, 1297-1303
- SWENSON C. L., ARNOZKY S. P.** (2003) Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 323-332
- SWIERINGA A. J., GOOSEN J. H., JANSMAN F. G., TULP N. J.** (2008) In vivo pharmacokinetics of a gentamicin-loaded collagen sponge in acute periprosthetic infection: serum values in 19 patients. *Acta Orthop* 79, 637-642
- TAKIKAWA S., BAUER T. W., KAMBIC H., TOGAWA D.** (2003) Comparative evaluation of the osteoinductivity of two formulations of human demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res A* 65, 37-42
- TAN K. J., LIAO S., CHAN C. K.** (2007) Controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-7 in nanoscaffolds. *Nanomedicine (Lond)* 2, 385-390
- THEISS F., APELT D., BRAND B., KUTTER A., ZLINSZKY K., BOHNER M., MATTER S., FREI C., AUER J. A., VON RECHENBERG B.** (2005) Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26, 4383-4394
- TOSTI R., ILYAS A. M.** (2010) The role of bone grafting in distal radius fractures. *J Hand Surg Am* 35, 2082-2084
- TRAIANEDES K., RUSSELL J. L., EDWARDS J. T., STUBBS H. A., SHANAHAN I. R., KNAACK D.** (2004) Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 70, 21-29
- TRAMPUZ A., WIDMER A. F.** (2006) Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* 19, 349-356
- TRESSLER M. A., RICHARDS J. E., SOFIANOS D., COMRIE F. K., KREGOR P. J., OBREMSKEY W. T.** (2011) Bone morphogenetic protein-2 compared to autologous iliac crest bone graft in the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics* 34, e877-884
- TULI S. M., SINGH A. D.** (1978) The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 60, 116-123
- TZIOUPIS C., GIANNOUDIS P. V.** (2007) Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 38 Suppl 2, S3-9
- UHTHOFF H., RAHN B.** (1981) Healing patterns of metaphyseal fractures. *Clin Orthop Relat Res* 160, 295-303
- URIST M. R.** (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899
- URIST M. R.** (1980) Bone transplants and implants. Lippincott Williams and Wilkins
- VAIDYA R., CARP J., SETHI A., BARTOL S., CRAIG J., LES C. M.** (2007) Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur Spine J* 16, 1257-1265
- WALDMAN B. J., HOSTIN E., MONT M. A., HUNGERFORD D. S.** (2000) Infected total knee arthroplasty treated by arthroscopic irrigation and debridement. *J Arthroplasty* 15, 430-436

- WANCKET L. M.** (2015) Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses. *Vet Pathol* 52, 842-850
- WANG Y., GRAINGER D. W.** (2010) siRNA knock-down of RANK signaling to control osteoclast-mediated bone resorption. *Pharm Res* 27, 1273-1284
- WEGMAN F., BIENHOF A., SCHUIJFF L., ONER F. C., DHERT W. J., ALBLAS J.** (2011) Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater* 21, 230-242; discussion 242
- WELCH R. D., ZHANG H., BRONSON D. G.** (2003) Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 222-231
- WEN C., YAN H., FU S., QIAN Y., WANG D., WANG C.** (2015) Allogeneic adipose-derived stem cells regenerate bone in a critical-sized ulna segmental defect. *Experimental Biology and Medicine*, 1535370215576298
- WHITEHOUSE J. D., FRIEDMAN N. D., KIRKLAND K. B., RICHARDSON W. J., SEXTON D. J.** (2002) The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23, 183-189
- WILDEMANN B., KADOW-ROMACKER A., HAAS N. P., SCHMIDMAIER G.** (2007) Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *J Biomed Mater Res A* 81, 437-442
- WILDEMANN B., KADOW-ROMACKER A., LUBBERSTEDT M., RASCHKE M., HAAS N. P., SCHMIDMAIER G.** (2005) Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polylactide carrier. *Calcif Tissue Int* 76, 50-55
- WOO E. J.** (2013) Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res* 471, 1707-1711
- WU P., GRAINGER D. W.** (2006) Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials* 27, 2450-2467
- WU Y. C., DUH C. Y., CHANG F. R., CHANG G. Y., WANG S. K., CHANG J. J., MCPHAIL D. R., MCPHAIL A. T., LEE K. H.** (1991) The crystal structure and cytotoxicity of goniodiol-7-monoacetate from *Goniothalamus amuyon*. *J Nat Prod* 54, 1077-1081
- XU M. T., SUN S., ZHANG L., XU F., DU S. L., ZHANG X. D., WANG D. W.** (2016) Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Braz J Med Biol Res* 49
- ZHANG B. G., MYERS D. E., WALLACE G. G., BRANDT M., CHOONG P. F.** (2014) Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci* 15, 11878-11921
- ZHANG M., POWERS R. M., JR., WOLFINBARGER L., JR.** (1997) Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol* 68, 1085-1092
- ZHANG Z., YANG W., CAO Y., SHI Y., LEI C., DU B., LI X., ZHANG Q.** (2015) The Functions of BMP3 in Rabbit Articular Cartilage Repair. *Int J Mol Sci* 16, 25934-25946
- ZHENG Y., WU G., LIU T., LIU Y., WISMEIJER D., LIU Y.** (2013) A Novel BMP2-Coprecipitated, Layer-by-Layer Assembled Biomimetic Calcium Phosphate Particle: A Biodegradable and Highly Efficient Osteoinducer. *Clin Implant Dent Relat Res*

9 ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTR	actin related protein	GA	Gauge
ANOVA	analysis of variance	GDF	Growth differentiation factor
AP	Alkaline Phosphatase	HIV	Humane Immundefizienz-Virus
Aqua dest.	destilliertes Wasser	HSC	hematopoetic stem cell
aS	Autologe Spongiosa	HU	Hounsfield
Autol. Spong.	Autologe Spongiosa	I-Smad	Antagonistic/inhibitory Smad
BG	Bindegewebe	IGF	Insulin-like growth factor
BMP	bone morphogenetic protein	IR	innerer Ring
BMPR	bone morphogenetic protein receptor	KG	Körpergewicht
BO	Bohrloch	KIMS	kinetic interactions of microparticles in a solution
BV	bone volume	KN	Knochen
CHO	chinese hamster ovary	kV	Kilovolt
co-Smad	common mediator Smad	Leer	Leerdeft(e)
DBM	Demineralisierte Knochenmatrix	LZ	Leukozyten
DBM+ BMP-2	DBM angereichert mit BMP-2	MAUDE	manufacturer and user facility device experience
DBM+ Gentamicin	DBM angereichert mit Gentamicin	MDRO	multi-drug resistant organisms
DBMp	DBM <i>pastös</i>	MEA	Methoxyethylacetat
DIZG	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz	MR	mittlerer Ring
FDA	US food and drug administration	MRSA	Methicillin resistente Staphylococcus aureus
FGF	Fibroblast growth factor	MRT	Magnetresonanztomographie
FSD	functionally secretory domain	MSC	mesenchymal stem cells

N ₂ O	Distickstoffmonoxid	Safranin O	Safranin Orange
O ₂	Sauerstoffdioxid	SF	sealing zone
OP	Operation	siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
OR	äußerer (outer) Ring	SMAD	SMA and mothers against decapentaplegic
p	Signifikanzwert	SurR1	surrounding ROI 1
PDGF	Platelet derived growth factor	SurR2	surrounding ROI 2
PDLLA	Poly(D,L-Lactid)	TGF-β	Transforming growth factor-beta
PMMA	Polymethylmetacrylat	TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
PWS	Phosphorwolframsäure	TV	total volume
R-Smad	receptor-regulated Smad	V.	Vena
RB	ruffled border	μA	Mikroampere
rhBMP	rekombinantes humanes BMP	μCT	Mikro-Computertomographie
ROI	Region of Interest		

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Bone Remodelling.....	13
Abb. 2 BMP Signalling.....	20
Abb. 3 Schematische Darstellung der Lokalisationen der Bohrlochdefekte.....	26
Abb. 4 DBMpastös des Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz	28
Abb. 5 Materialanmischung in der Mischspritze.....	29
Abb. 6 Chirurgischer Zugang der metaphysären Bohrlochdefekte	35
Abb. 7 Defektsetzung	36
Abb. 8 Füllung des Bohrlochdefektes.....	36
Abb. 9 Kontrollröntgenaufnahme im Anschluss an die Operation.....	37
Abb. 10 Vorbereitung der Proben für den μ CT-Scan	40
Abb. 11 Markierung der ROI (Scanco Medical Evaluationsprogramm).....	41
Abb. 12 Dreidimensionale Darstellung der ROI der μ CT Auswertung	41
Abb. 13 Geschliffener PMMA-Block für die Anfertigung der Dünnschnitte	44
Abb. 14 Regions of Interest der deskriptiven und histomorphometrischen Auswertung	48
Abb. 15 Schnittebenen der metaphysären Bohrlochdefekte	49
Abb. 16 Auswertung TRAP-Färbung.....	52
Abb. 17 Röntgenaufnahme ex vivo	57
Abb. 18 Dreidimensionale Rekonstruktion der μ CT Scans	58
Abb. 19 μ CT-Schnittbilder zur deskriptiven Auswertung.....	59
Abb. 20 Knochenvolumen der diaphysären Bohrlochdefekte (μ CT).....	60
Abb. 21 Knochenvolumen der metaphysären Bohrlochdefekte (μ CT).....	61
Abb. 22 Knochenbildung im Bohrloch (Safranin O / von Kossa).....	62
Abb. 23 Histologische Beispiele der diaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa).....	63
Abb. 24 Histologische Beispiele der metaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa).....	64
Abb. 25 Histologische Beispiele der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom).....	65
Abb. 26 Histologische Beispiele der metaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)	65
Abb. 27 DBM-Bruchstücke (Movat Pentachrom)	66
Abb. 28 Autologe Spongiosa (Movat Pentachrom)	67
Abb. 29 Einbau der DBM in neugebildete Trabekel (Movat Pentachrom).....	68
Abb. 30 Osteoklast (Movat Pentachrom)	69
Abb. 31 Einbau der autologen Spongiosa in neugebildete Trabekel (Movat Pentachrom).....	70
Abb. 32 Auflockerung in der Bohrlochumgebung (Movat Pentachrom)	71

Abb. 33 Erhöhte Vaskularisierung (Movat Pentachrom) 72

Abb. 34 Leukozyten im Detail (Movat Pentachrom) 73

Abb. 35 Mehrkernige Riesenzelle an Knochenstück (Movat Pentachrom) 74

Abb. 36 Enchondrale Knochenbildung (Movat Pentachrom) 75

Abb. 37 Vergleich proximaler und distaler Anteil der ROI (Safranin O / von Kossa)..... 76

Abb. 38 Zentripetale Knochenheilung (Safranin O / von Kossa)..... 78

Abb. 39 Prozentualer Knochenanteil der diaphysären Bohrlochdefekte (Safranin O / von Kossa)..... 79

Abb. 40 Prozentualer Knochenanteil der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Safranin O / von Kossa) 80

Abb. 41 Gewebekomponenten im Bohrloch der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom) 82

Abb. 42 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, demineralisierter Knochenmatrix und Bindegewebe der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom)..... 83

Abb. 43 Gewebekomponenten im Bohrloch der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom) 84

Abb. 44 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, demineralisierter Knochenmatrix und Bindegewebe der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom) 85

Abb. 45 Bohrlochumgebung der diaphysären Bohrlochdefekte (Movat Pentachrom) 86

Abb. 46 Bohrlochumgebung der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, Movat Pentachrom)..... 87

Abb. 47 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der diaphysären Bohrlochdefekte (TRAP-Färbung)..... 88

Abb. 48 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung) 89

Abb. 49 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der diaphysären Bohrlochdefekte (TRAP-Färbung)..... 90

Abb. 50 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung) 91

Abb. 51 Ein- und Abbau der eingebrachten DBM im Verlauf der Knochenneubildung 100

Abb. 52 Prozentualer Knochenanteil der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Safranin O / von Kossa) 133

Abb. 53 Gewebekomponenten im Bohrloch der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom) 133

Abb. 54 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, DBM und Bindegewebe der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom)..... 134

Abb. 55 Bohrlochumgebung der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom)..... 135

Abb. 56 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung) 136

Abb. 57 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, TRAP-Färbung) 136

9.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Begriffserklärung Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion	14
Tab. 2 Kriterien für die Wahl eines Knochenersatzmaterials (Brydone et al. 2010)	15
Tab. 3 Materialverteilung pro Tier und operiertem Knochen	27
Tab. 4 Materialmenge und Konzentration pro Mischspritze	30
Tab. 5 Intraoperative Überwachung der Narkose	31
Tab. 6 Medikamentenanwendung mit Indikation vor, während und nach der Operation	32
Tab. 7 Zugang und Positionierung der Bohrlochdefekte	34
Tab. 8 Nähte und Nahtmaterialien Wundverschluss	37
Tab. 9 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen für die Kunststoffeinbettung	43
Tab. 10 Fixierung, Entwässerung und Kunststoffeinbettung	43
Tab. 11 Entplasten und Rehydrierung	45
Tab. 12 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen für die kombinierte Safranin O / von Kossa – Färbung	45
Tab. 13 Färbeprotokoll Safranin O / von Kossa - Färbung	45
Tab. 14 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen der Movat Pentachrom Färbung	46
Tab. 15 Färbeprotokoll Movat Pentachrom	47
Tab. 16 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen der TRAP-Färbung	47
Tab. 17 Färbeprotokoll TRAP-Färbung	48
Tab. 18 Probenanzahl (n) pro Auswertmethode, Lokalisation und Material	52
Tab. 19 Signifikante Unterschiede zwischen proximalem und distalem Anteil einer ROI getrennt nach Lokalisation und Heilungszeitpunkt	77

9.4 DATEN

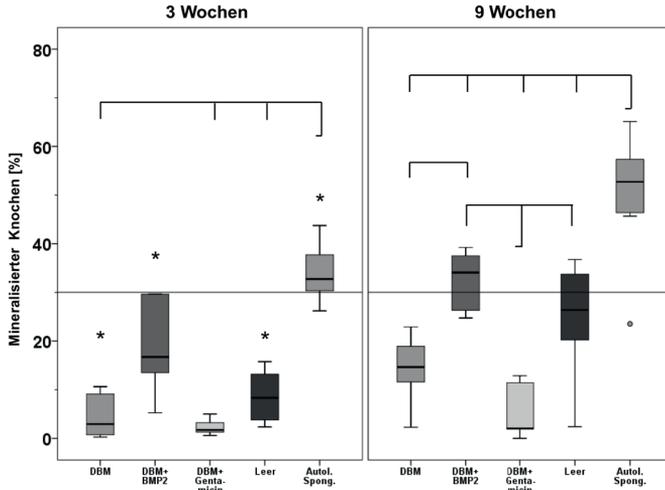


Abb. 52 Prozentualer Knochenanteil der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Safranin O / von Kossa)

Prozentualer Anteil des mineralisierten Knochens des gesamten Bohrloches der verschiedenen Materialgruppen zu drei (links) und neun Wochen (rechts) Heilungszeit. Zu beiden Zeitpunkten zeigte die Gruppe autologe Spongiosa den signifikant höchsten Knochenanteil (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$). In den Gruppen DBM, DBM+BMP-2, den Leerdefekten und den Gruppen behandelt mit autologer Spongiosa kam es zu einer signifikanten Knochenzunahme von drei zu neun Wochen (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$).

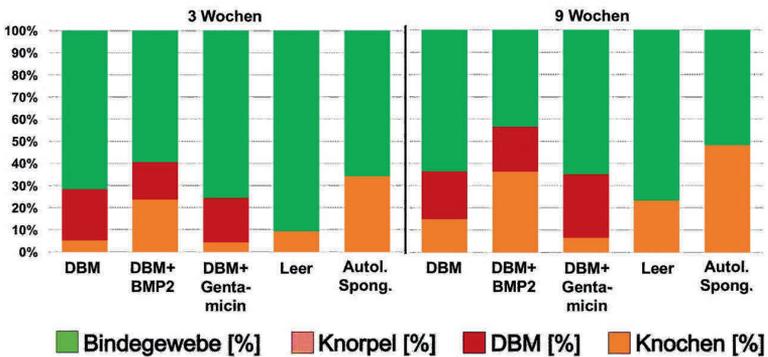


Abb. 53 Gewebekomponenten im Bohrloch der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom)

Prozentualer Anteil des Gewebes im gesamten Bohrloch zu drei (links) und neun Wochen (rechts). Bindegewebe wird grün, Knorpel grau, DBM rot und Knochengewebe gelb dargestellt.

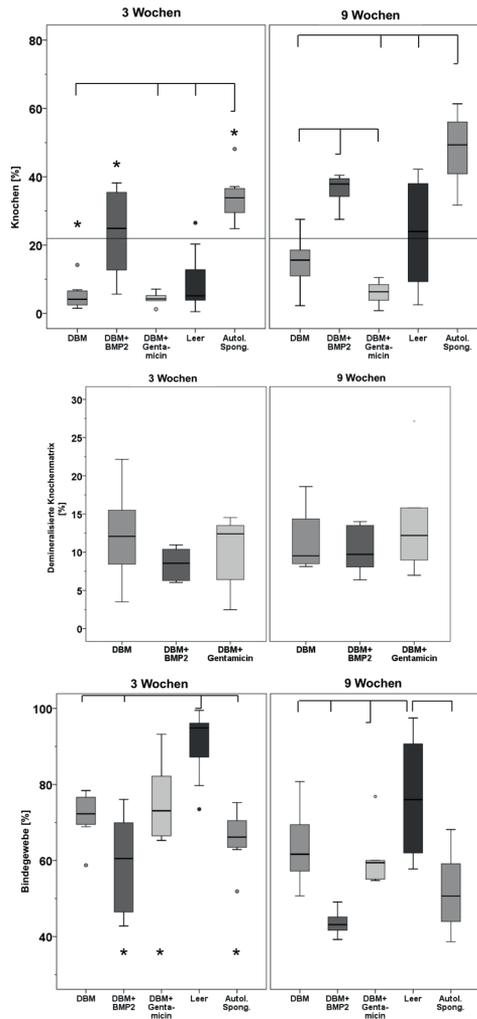


Abb. 54 Prozentualer Anteil an Knochengewebe, DBM und Bindegewebe der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom)

Prozentualer Anteil der Gewebe im gesamten Bohrloch zu drei und neun Wochen. Die horizontale Linie in der Graphik zum prozentualen Knochengehalt markiert den Knochengehalt von Nativproben. Von drei zu neun Wochen kam es zu einer signifikanten Abnahme des Bindegewebes in der Gruppe DBM+BMP-2, DBM+Gentamicin und der Gruppe behandelt mit autologer Spongiosa (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,038$). Die Gruppe autologe Spongiosa zeigte zu beiden Zeitpunkten den

signifikant höchsten Knochengehalt im Vergleich zu DBM, DBM+Gentamicin und den Leerdefekten auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$). Bei dem Gehalt der DBM konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Zu drei Wochen zeigten die Leerdefekte den signifikant höchsten Bindegewebsanteil auf (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,01$).

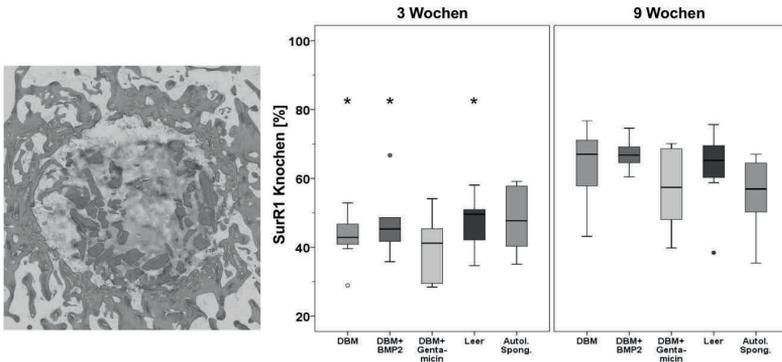


Abb. 55 Bohrlochumgebung der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, Movat Pentachrom)

(links) Histologisches Beispiel der Verdichtung der Knochen trabekel in der Bohrlochumgebung. Schaf Nr. 2, DBM, metaphysär, 9 Wochen, Objektiv 2,5x

(rechts) Prozentualer Knochenanteil in der Bohrlochumgebung (SurR1) der verschiedenen Materialgruppen zu den zwei Heilungszeitpunkten. Signifikante Erhöhung des Knochenanteils konnte in den Materialgruppen DBM, DBM+BMP-2 und den Leerdefekten gezeigt werden (Mann-Whitney-U, $p \leq 0,026$).

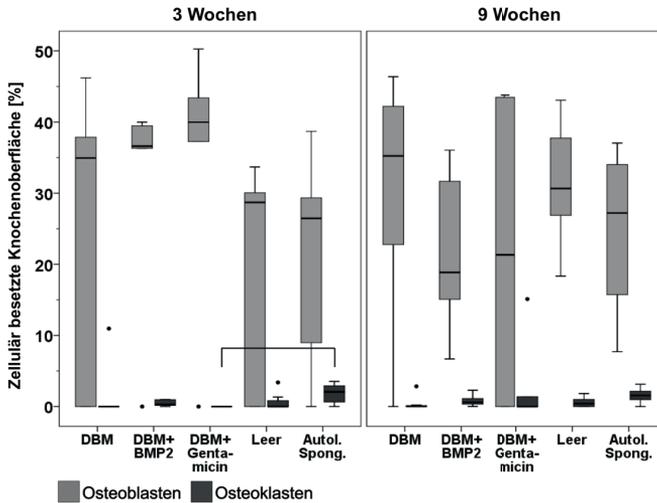


Abb. 56 Prozentualer Flächenbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 1, TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz der Knochenoberfläche mit Osteoblasten (hellgrau) und Osteoklasten (dunkelgrau) der verschiedenen Materialien zu drei (links) und neun Wochen (rechts). Signifikant höherer Besatz der Knochenoberfläche mit Osteoklasten in der Gruppe autologe Spongiosa im Vergleich zu DBM+Gentamicin (ANOVA, Dunnett's T3, $p \leq 0,05$)

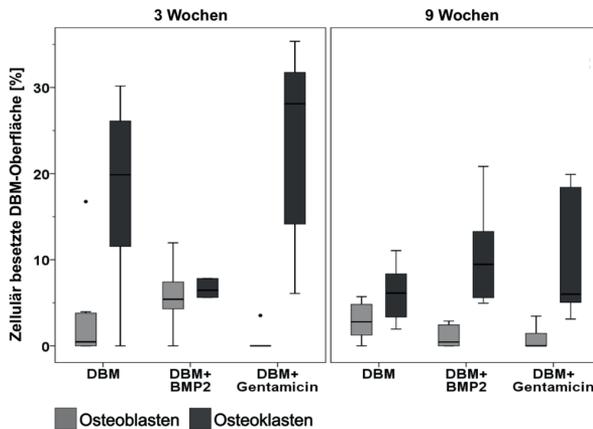


Abb. 57 Prozentualer Flächenbesatz der DBM-Oberfläche mit Osteoblasten und Osteoklasten der metaphysären Bohrlochdefekte (Ebene 2, TRAP-Färbung)

Prozentualer Zellbesatz der Oberfläche der DBM der verschiedenen Materialgruppen mit Osteoblasten (hellgrau) und Osteoklasten (dunkelgrau) zu den zwei Heilungszeitpunkten drei (links) und neun Wochen (rechts). Zu drei Wochen ist die DBM- Oberfläche der Gruppe DBM+BMP-2 zu gleichen Teilen mit Osteoblasten und -klasten besetzt.

9.5 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

- 2015 Abstract und Poster „Enrichment of DBM with BMP2: Burst Release Combined with Long Term Binding – an in vitro and in vivo study”
– International Symposium on Bone Regeneration, Berlin
- 2016 Abstract und Vortrag „DBM as an alternative carrier for BMP2: Burst Release Combined with Long Term Binding (in vitro and in vivo study)”
– International Society for fracture repair, München
- 2016 Abstract und Vortrag “In vitro and in vivo study of DBM enriched with BMP2: Burst Release Combined with Long Term Binding”
– Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin

9.6 DANKSAGUNG

Ich möchte Prof. Dr. med. vet. Robert Klopffleisch für die Betreuung und Durchsicht meiner Doktorarbeit als Erstgutachter danken. Ebenso danke ich Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnerberg für die Durchsicht meiner Doktorarbeit als Drittgutachter.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann, in deren Team ich diese Arbeit erstellen durfte, für die großartige Betreuung und die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und die Durchsicht der Doktorarbeit als Zweitgutachterin.

Ich möchte mich bei Dr. med. vet. Anne-Marie Poblth für die Organisation und Durchführung der Operationen und Hilfe bei tiermedizinischen Belangen bedanken und Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek und Dr. med. vet. Hannah Schell für die Hilfe während der Operationen.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Mitdoktoranden Nicolai Kolarczik für die Hilfe bei der tiermedizinischen Betreuung der Versuchstiere bei den Operationen, für den Austausch wissenschaftlicher Ideen und die gemeinsame Nutzung der Kontrollproben.

Bedanken möchte ich mich beim Team AG Wildemann für die herzliche Aufnahme und die andauernde Unterstützung während dem Entstehen der Arbeit. Dr. ing. Susann Minkwitz danke ich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts, die seelische Unterstützung und die unterhaltsamen Stunden im Büro. Frau Nicole Bormann möchte ich für die Durchführung der *in vitro* Versuche, die perioperative Vorbereitung der Materialien und viel Spaß im Büro danken.

Frau Marzenna Princ, Sabine Stumpp und Gabriela Korus danke ich für die gute Atmosphäre und die tatkräftige Hilfe im Labor. Mario Thiele danke ich für die Betreuung bei der μ CT Auswertung, Schreiben der Markos, der immer zeitnahen Hilfe bei Computerproblemen und den fröhlichen Stunden gemeinsam vor dem Computer.

Des Weiteren gilt mein Dank den Tierpflegern und Tierärzten der tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums für Rat und Tat bei tiermedizinischen Problemen und der guten Pflege der Tiere.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Karl Heinz und Adelheid und meinem Bruder Sebastian, die mich in jeder Lage sowohl moralisch als auch finanziell unterstützten und so in großem Maße zum Entstehen dieser Arbeit betrogen.

Ganz besonders zu danken habe ich meinem Lebenspartner Bastian, der immer an mich und das Entstehen dieser Arbeit glaubte, mich in allen stressigen und arbeitsreichen Phasen unterstützt hat und mich durch eine großartige Hundebetreuung entlastet hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden für die vielen Gespräche, das miteinander Lachen und eure Unterstützung die nicht zuletzt diese Arbeit mit möglich gemacht haben.

9.7 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 12.März 2016

Elisabeth Huber