

Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und  
dem Institut für Arbeitsmedizin,  
Charité Centrum 1, Charité Universitätsmedizin Berlin

**Untersuchung der Wirkung eines auf Bioglas basierenden Knochenersatzmaterials mit  
einem wachstumsstimulierenden Protein (Bone Morphogenetic Protein) auf das  
Knochenwachstum beim Kaninchen**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

Doctor medicinae veterinariae

(Dr. med. vet.)

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Nora Abdin-Bey**

Tierärztin

aus Hannover

Berlin 2012

**Journal-Nr.: 3618**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Priv.-Doz. Dr. vet. med. C. Große- Siestrup  
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Müller- Mai  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
rabbits, bones, glass, coated glass, implantation, protein,  
scanning electron microscopy

Tag der Promotion: 29.09.2013

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

ISBN: 978-3-86387-383-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Meinen Eltern**

**Abkürzungsverzeichnis:**

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarabzol
am	amorph
AP	Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase)
Aqua dest	Aqua destillata
BMA	Butylmethacrylat
BMP	Bone Morphogenetic Proteins (knochenmorphogenetische Proteine)
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor (knochenmorphogenetischer Proteinrezeptor)
BPO	Dibenzoylperoxid
BSA	Bovine Serum Albumin (Bovines Serum Albumin)
BSE	Backscattered electrons (Rückstreuelektronen)
BSI	Backscattered images
BSP	Bone sialoprotein
c DNA	complementary Desoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonucleinsäure)
Col I	Collagen 1
d	Days (Tage)
DBM	Demineralized Bone Matrix (Demineralisierte Knochenmatrix)
DMT	N, N-Dimethyl-p-toluidin
EDTA	Ethylendiamin tetraessigsäure
FGF	Fibroblast Growth Factors (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
ggr.	geringgradig
G	Glas
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)

---

GK	Glaskeramik
HA	Hydroxylapatit
h BMP	human Bone Morphogenetic Protein (humanes Knochenbildungsanregendes Protein)
hgr.	hochgradig
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
ILGF	Insuline like Growth Factors (insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
K Da	Kilo Dalton
krist.	kristallin
LM	Lichtmikroskopie
MMA	Methylmethacrylat
µm	Mykrometer
mgr.	mittelgradig
Min Kn	mineralisierte Knochenmatrix
ng	Nanogramm
n.S.	nicht signifikant
OC	Osteocalcin
OGP	Osteogenic Growth Peptide
ON	Osteonectin
OP	Osteogenic Protein/ Osteopontin
PDGF	Platelet Derived Growth Factors (Blutplättchenwachstumsfaktor)
PEG	Polyethylenglycol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rh BMP	recombinant human Bone Morphogenetic Proteins

S.	signifikant
SE	Secondary electron mode (Sekundärelektronenmodus)
SEM	Scanning electron microscope
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalziumphosphat
TGF	Transforming Growth Factors (transformierender Wachstumsfaktor)

---

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Frage- und Zielstellung</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Knochen</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Knochenbildung und Knochenaufbau</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Biochemische Zusammensetzung des Knochens</b>	<b>14</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Knochenumbau (Bone remodeling)</b>	<b>14</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Knochenregeneration</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Gestörte Knochenheilung</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Beispiel Pseudarthrosen</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Beispiel Zahnheilkunde</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Knochenersatz</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Autologer Knochenersatzstoff</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Allogener Knochenersatzstoff</b>	<b>19</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Xenogener Knochenersatzstoff</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Alloplastische Knochenersatzstoffe</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Bone Morphogenetic Protein</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>21</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Quelle des BMP</b>	<b>22</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Identifikation des BMP</b>	<b>22</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Wirkung des BMP</b>	<b>23</b>

<b>2.5</b>	<b>Information über Immunhistochemie</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Tiere, Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Prüfmaterialien und Vorversuche</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuchsplan</b>	<b>26</b>
<b>3.3</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Produktion der Implantate</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>Tiere, Tierhaltung und Tiermodell</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Implantation</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Explantation</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Vorbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie</b>	<b>31</b>
<b>3.9</b>	<b>Vorbereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie</b>	<b>36</b>
<b>3.10</b>	<b>Statistische Methoden</b>	<b>37</b>
<b>3.11</b>	<b>Auswertung der Immunohistochemie</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Lichtmikroskopie</b>	<b>38</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Lichtmikroskopie und Histomorphometrie</b>	<b>38</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Immunhistochemie (IHC)</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie</b>	<b>57</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Sekundärelektronenmodus (Secondary Electron Mode)</b>	<b>57</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Rückstreuelektronenmodus (Backscatter Electron Mode)</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>100</b>

<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b>	<b>105</b>

## 1 Einleitung

Knochengewebe kann sich selbst regenerieren. Wenn allerdings die vaskuläre Versorgung insuffizient ist, die mechanische Stabilität unzureichend ist oder der Knochendefekt die „kritische Größe“ („critical size“) überschreitet, kommt die Regenerationspotenz des Knochengewebes nicht zum Tragen. Dies ist der Fall bei komplexen Frakturen, z.B. Sturz auf einen durch Osteoporose geschwächten Knochen, bei Tumoren, bei aseptischen Implantatlockerungen oder posttraumatischen Osteitiden [Mutschler, 2006]. Hier muss der Defekt mit Implantaten (Knochersatzstoffen) gefüllt werden, um zunächst ein Gerüst für das Einwachsen neuen Knochens zu schaffen. Der Knochenersatzstoff sollte danach durch belastungsadäquat gebildeten körpereigenen Knochen ersetzt werden können. Ein idealer Knochenersatzstoff sollte biokompatibel und bioaktiv sein, osteokonduktiv (erleichtert das Einwachsen von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen in den Defektraum) und osteoinduktiv (ermöglicht die Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitorzellen, der eine enchondrale Ossifikation folgt) wirken. Er muss mit dem körpereigenen Gewebe eine Verbundosteogenese mit direktem Knocheneinwuchs ohne Bindegewebszwischenschicht bilden, darf nicht immunogen oder kanzerogen sein und möglichst soll er noch einfach zu verarbeiten sein und ausreichend zur Verfügung stehen [Niedhart und Niethard, 1998].

Allein in Deutschland werden nach Schätzungen jährlich bis zu 200 000 plastische Eingriffe am Knochen vorgenommen [Müller-Mai, Voigt 2003]. In einer amerikanischen Studie wurde gezeigt, dass bezogen auf die Lebenszeit das Risiko einer Fraktur bei Männern und Frauen unter 65 bei 50% liegt und dass in etwa 10% aller jährlich auftretenden Frakturen weitere operative Vorgänge notwendig sind, insbesondere auch aufgrund von später entstehenden Pseudarthrosen. Die Gesamtkosten von verzögerten Frakturheilungen werden alleine in den USA auf 14,6 Millionen US Dollar geschätzt. Die hohe jährliche Inzidenz und das lebenslange Risiko von Knochenbrüchen zeigen, dass die richtige Behandlung dieser Frakturen eine wichtige Angelegenheit des Gesundheitswesens darstellt [Brinker, 2004] [Hannouche, 2001] [Zimmermann, 2009]. Behandlungskosten und Arbeitsausfall belasten das Gesundheitswesen und die Wirtschaft [Dahabreh, 2009]. Sollte es also gelingen, die knöcherne Reparatur in Bezug auf die Menge und die Qualität des neugebildeten Knochens zu fördern (Verbesserung der Knochenmasse und deren Reife am Defektort). So hätte dies

eine deutliche Reduktion der Behandlungskosten während der stationären und ambulanten Therapie zur Folge und somit eine individuelle und auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung [Rueger, 1998].

Der derzeitige Goldstandard, die autologe Spongiosaplastik, birgt sehr viele Nachteile, wie Entnahmemorbidität sowie begrenzte Menge und Lagerungsfähigkeit. Ebensoviele Nachteile gibt es bei Spenderknochen, bei denen die Gefahr einer Infektion oder einer Immunreaktion besteht. Daher ist es vor Allem in der Unfallchirurgie, der zahnärztlichen Chirurgie und der Implantologie das Ziel, Knochenersatzmaterialien zu generieren, die neben einer osteokonduktiven Matrix, osteoinduktive Signalstoffe (z.B. rekombinante BMPs) enthalten, um größere Knochendefekte erfolgreich regenerieren zu können, ohne autologen Knochen oder potentiell infektiösen Spenderknochen verwenden zu müssen [Glass 2008]. Es wurden bereits mehr als 340,000 Patienten weltweit mit Röhrenknochen- Pseudarthrosen, akuten Frakturen und Wirbelfusionen erfolgreich mit rh BMPs behandelt [Simic, 2007].

Eine Analyse der Kosten der Behandlung von Pseudarthrosen ergab, dass eine Behandlung mit BMP im Endeffekt effizienter als eine Knochen transplantation ist [Dahabreh, 2009]. Daher ist es sinnvoll und erforderlich, ein noch effizienteres Knochenersatzmaterial zu entwickeln. Insbesondere die hier untersuchten BMP Beschichtungen in Kombination mit den knochenbindenden Bioglas-artigen Implantaten erscheinen für eine solche Entwicklung geeignet.

## **1.1 Frage- und Zielstellung**

Wie verhält sich die rhBMP-2 Beschichtung auf den verschiedenen Implantaten im Tierversuch?

Ist die rhBMP-2 Beschichtung der Proben ein wichtiger Faktor für das Knochenwachstum?

Zielstellung dieser Arbeit ist:

Die Untersuchung des osteoinduktiven Effekts der BMP-Beschichtung von bioaktiven Gläsern und Glaskeramiken auf die Knochenheilung.

Ein Vergleich der verschiedenen Implantatarten mittels qualitativen (Lichtmikroskopie LM, Rasterelektronenmikroskopie REM sowie Immunhistochemie IHC) und quantitativen histologischen Methoden (Histomorphometrie)

Die Beschreibung der Gewebereaktion auf die Implantate (Bioverträglichkeit).

Die Beschreibung der Materialreaktion nach Implantation (Materialresorption).

## **1.2 Aufgabenstellung**

- Es sollen vier Modifikationen, insgesamt 96 Implantate im Rahmen eines genehmigten Tierversuches getestet werden.
- Es soll jeweils ein Implantat in die Femurknochen beidseits implantiert werden.
- Alle dazu notwendigen Vorbereitungen sollen getroffen werden.
- Weitere Aufgaben sind:
  - Durchführung der Narkosen
  - Mithilfe bei Operationen
  - Vor- und Nachsorge der Tiere.
  - Probennahme nach vier verschiedenen Zeitpunkten.
  - Probenaufbereitung und Einbettung sowie Anfertigung und Färbung der Schnitte.
  - Histologische, histomorphometrische und statistische Auswertung.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Knochen**

#### **2.1.1 Knochenbildung und Knochenaufbau**

Das pränatale hyalinknorpelige Primordialskelett wird bis auf wenige knorpelig bleibende Abschnitte (Gelenk- oder Rippenknorpel) durch Knochen ersetzt (Ersatzknochen).

Die desmale (direkte) Ossifikation ist die Bildung von Geflechtknochen direkt von embryonalem Bindegewebe (Mesenchym) wie vor allem bei der embryonalen Ausbildung der flachen Knochen [Bucher 1989].

Die chondrale (indirekte) Ossifikation hingegen beinhaltet die Bildung eines Knorpelgerüsts aus Mesenchymgewebe, welches dann durch den neuen Knochen ossifiziert wird. Dies geschieht vor allem bei der embryonalen Ausbildung der langen Knochen, bei der Frakturheilung und der Inkorporation von Knochentransplantaten [Bucher 1989].

Die Ablagerung der Knochensubstanz erfolgt durch die Osteoblasten. Diese entstehen beim Embryo aus osteogenetischen Stammzellen (die ihrerseits aus Mesenchymzellen hervorgehen). Sie haben die Pluripotenz der Mesenchymzellen verloren, sind aber noch stark teilungsfähig. Dagegen sind Osteoblasten und -zyten nicht mehr in der Lage, in die Mitose einzutreten. Die Stammzelle liegt an der Knochenoberfläche im Periost und Endost auch des Erwachsenen neben den Osteoblasten. Die Osteoblasten sezernieren die Interzellularsubstanz, das Osteoid. Mit zunehmender Grundsubstanzbildung werden die Osteoblasten, zusammen mit Blutgefäßen und Nervenfaserbündeln, eingemauert und damit zu den abgeplatteten, länglichen Osteozyten [Bucher 1989] [Yaszemski, 1996].

Reifer Knochen ist Lamellenknochen oder spongiöser Knochen. Neuer Knochen hingegen, ob während der Frakturheilung, bei Neoplasien oder als Resultat einer Knochentransplantatinkorporation, ist Geflechtknochen. Der Geflechtknochen wird zu Lamellenknochen durch den Prozess der Knochenremodellierung.

### **2.1.2 Biochemische Zusammensetzung des Knochens**

Biochemisch setzt sich Knochen aus einem organischen und einem anorganischen Anteil (Kalziumphosphat und Kalziumcarbonat) zusammen, wobei Wasser ca. 10% des Knochengewebes ausmacht. Der wasser- und mineralfreie organische Knochenanteil, die Knochenmatrix oder das Osteoid besteht im adulten Knochen mit 95% hauptsächlich aus Kollagen. Den restlichen Anteil der Knochenmatrix von 5% macht die sogenannte nichtkollagene Matrix (NCM) aus. Diese amorphe Grundsubstanz besteht aus Proteoglycanen, strukturellen Glykoproteinen (z.B. alkalische Phosphatase, Osteonektin, Osteopontin), verschiedenen Polypeptiden als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (u.a. Transforming growth factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Insulin like growth factors (IGF), Fibroblast growth factors (FGF), Platelet derived growth factors (PDGF), Osteogenic growth peptide (OGP) und Bone morphogenetic proteins (BMP)) [Glass, 2008].

### **2.1.3 Knochenumbau (Knochenremodellierung, Knochenremodeling)**

Durch das abgestimmte Zusammenspiel zwischen Aufbau- und Abbauvorgängen, von Osteoblasten und Osteoklasten, erfolgt ein Umbau des Knochenskelettes während des ganzen Lebens [Bucher 1989]. Bei spongiösem Knochen sind die Zellen nicht weit von den Blutgefäßen entfernt, und daher kann der Prozess der Knochenapposition an der Oberfläche der Trabekel stattfinden. Bei Kompaktknochen andererseits erfordern die tiefer gelegenen Zellen das Vorhandensein von Havers'schen Systemen und Volkmann Kanälen, die ersetzt werden. Die Osteoklasten treiben zunächst Tunnel in den toten Knochen, denen Blutgefäße und Osteoblasten folgen, die den Lamellenknochen des neuen Osteons festlegen [McKibbin, 1978].

### **2.1.4. Knochenregeneration**

Die Knochenregeneration oder -heilung ist im Prinzip eine Rekapitulation der embryonalen Knochenentwicklung, denn Knochen heilt durch die Generierung von neuem Knochen, anstatt durch die Bildung von Narbengewebe [Termaat, 2005] [Einhorn, 1995] [Einhorn, 1998].

Knochen kann primär (direkt) ohne Kallusbildung heilen. Die Vereinigung der Frakturrenden erfolgt durch direktes Vordringen Havers'scher Systeme von einem Fragment in das andere (Kontaktheilung) oder durch Auffüllung mit spongiösem Knochen, der später durch Osteone ersetzt wird (Spaltheilung). Es erfolgt keine Aktivierung der periostalen bzw. endostalen mesenchymalen Zellen [Bohndorf, 2006] [Küntschler, 1964].

Eine sekundäre (indirekte) Knochenbruchheilung setzt ein bei einem bestehenden Frakturspalt bzw. bei ungenügender mechanischer Fixation der Frakturrenden. Es bildet sich unreifes reparatives Gewebe (Kallus) welches sekundär auf dem Wege der desmalen oder chondralen Ossifikation in Knochengewebe umgewandelt wird [Bohndorf, 2006] [Küntschler, 1964].

## **2.2 Gestörte Knochenheilung**

Ursachen gestörter Knochenheilung können sein: eine fehlende Gefäßversorgung (Knochennekrosen), eine Instabilität zum falschen Zeitpunkt, mangelnder Kontakt der Fragmente, Infektion, und besonders auch das überschreiten der kritischen Größe des Knochendefektes (critical size defect) [Stürmer 1996] [Mutschler 2006].

Schmitz und Hollinger definierten einen Defekt mit kritischer Größe als die kleinste intraossäre Wunde, die während der Lebensspanne des Tieres durch Knochenformation nicht heilt. Ein „Critical Size“ Defekt heilt durch die Bildung von Bindegewebe, nicht durch Knochenwachstum [Schmitz, 1986] [Hollinger, 1990]. Eine Folge gestörter Heilung kann auch die Bildung einer Pseudarthrose sein.

### **2.2.1 Beispiel Pseudarthrosen**

Ist ein Knochenbruch nach vier bis sechs Monaten nicht verheilt, spricht man von einer verzögerten Frakturheilung (delayed union), nach sechs bis acht Monaten von einer Pseudarthrose (non-union). Eine Pseudarthrose entsteht, wenn alle Heilungs- und Reparationsprozesse abgeschlossen wurden, ohne dass es zur Wiederherstellung der ossären Kontinuität geführt hat [Runkel und Rommens 2000] [Griffon, 2011] [Marsh 1998].

Unter anderem unterscheidet man vaskuläre und avaskuläre Pseudarthrosen. Zur avaskulären gehören die dystrophische, die nekrotische (tritt häufig beim Pferd am Röhrlbein

auf, also in Gegenden geringer Vaskularisation), die atrophische (durch die Resorption von Knochen oder durch Osteoporose kommt es zu runden Frakturenden) und die Defektpseudarthrose (Fragmentverlust oder Resorption eines Fragmentes und Bildung einer kritischen Defektgröße).

Typische Beschwerden bei einer Pseudarthrose sind belastungsabhängige Schmerzen mit Schwellung im Frakturbereich. Die häufigste Stelle für Pseudarthrosen bei Hunden ist der distale Radius, denn die Vaskularisation ist in dieser Lokalisation gerade bei kleineren Hunderassen verringert. Hier kann falsche Behandlung schnell zu einer atrophischen Pseudarthrose und Weichgewebsverletzungen führen, die eine Amputation rechtfertigen, ebenso wie bei einer infizierten Pseudarthrose [Griffon, 2011] [Runkel und Rommens 2000].

### **2.2.2 Beispiel Zahnheilkunde**

Ein weiterer Einsatzort von Knochenimplantaten ist die Dentalchirurgie. Der natürliche resorptive Prozess im Anschluss an eine Zahnextraktion führt häufig zu einem Kieferkamm mit mangelhaftem Knochenvolumen. Folglich ist eine Augmentation des Kieferkammes vor einer Insertion eines Dentalimplantates häufig benötigt [Knabe, 2008].

Auch nach Entfernung von Zysten kann es zur Bildung eines großen Hohlraumes kommen, der einen Knochenaufbau erforderlich macht. Im Allgemeinen ist in der Zahnheilkunde das benötigte Ersatzvolumen aber gering.

### **2.3 Knochenersatz**

Eine wichtige Funktion von Knochen ist die Unterstützung der Körpergewebe und das Anbieten von Befestigungstellen für die Muskeln. Dazu muss jedoch die Skelettkontinuität gewährleistet sein [Yaszemski, 1996]. Seit der Zeit des Hippokrates wurde die Transplantation von Tiergewebe auf den Menschen versucht. Die erste dokumentierte Xenotransplantation geht entweder auf Job van Meekren zurück, der um 1600 versuchte, den Schädeldefekt eines Soldaten mit einem Teil von einem Hundeschädel zu füllen [Khan, 2005], oder möglicherweise auf Percy, der Anfang des 17. Jahrhunderts einen Teil der Tibia eines Ochsen in eine Knochenlücke bei einem Menschen verpflanzte [Macewen, 1881]. Der erste wissenschaftliche Ansatz, der sich mit der Osteogenese beschäftigte, wird Duhamel zugeschrieben. 1739 experimentierte dieser mit Silberdrähten, die er subperiostal platzierte. Nach einigen Wochen beobachtete er, dass die Drähte mit Knochen überzogen waren. Er

glaubte, dass dieser neue Knochen durch die osteogene Eigenschaft des Periosts gebildet wurde [Chase, 1955]. Im Jahre 1821 wurde in Deutschland erstmals ein autogenes Transplantat erfolgreich in einen experimentellen Defekt in einem Tierschädel verpflanzt [Khan, 2005]. Das erste erfolgreiche Allotransplantat stammt von Dr. W. Macewen, der im Jahr 1879 und 1880 zwei Drittel des Humerus eines Jungen mit zerkleinerten Knochenkeilen aus Spenderknochen ersetzte [Macewen, 1881].

Knochenersatzstoffe sind Biomaterialien. Biomaterialien sind laut Rueger „nicht körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ersetzen“ [Rueger 1998]. Gemäß den National Institutes of Health ist ein Biomaterial jede Substanz, außer Medikamenten, oder eine Kombination von Substanzen, synthetisch oder natürlich in ihrer Herkunft, welche für eine beliebige Zeit lang genutzt werden können, als Ganzes oder als Teil eines Systems, welches jedes Gewebe, Organ oder Funktion des Körpers behandelt, ergänzt oder ersetzt [Carter, 2007].

Materialien zur Auffüllung oder zum Verschluss knöcherner Defekte verfolgen zwei Ziele: Wiederherstellung der Knochenkontinuität und Belastbarkeit (Primärstabilität). Sie sollten eine Degradierbarkeit aufweisen und damit remodelierbar sein. Ist ein Knochenersatzstoff nicht degradierbar, so wird verlangt, dass das Einwachsen des umliegenden Knochengewebes zu dauerhafter Stabilität führt [Peters, 2010]. Aufgabe des Biomaterials ist es also, die Osteogenese zu unterstützen und zu beschleunigen [Urist 1965].

Die autologe Knochentransplantation kann bislang diese Anforderungen am besten erfüllen und ist daher die bevorzugte Methode. Ihre Nachteile sind jedoch zahlreich (siehe unten). Deshalb werden schon seit über 30 Jahren Alternativen erforscht. Ein besonders vielversprechender Aspekt ist die Benutzung osteoinduktiver Biomaterialien und Wachstumsfaktoren, hier vor allem das Bone Morphogenetic Protein [Hannouche, 2001] [Schieker, 2008].

Knochenersatz- und Aufbaumaterialien können gemäß ihrer Eigenschaften oder gemäß dem Materialursprung unterschieden werden. Osteogenetische Materialien beinhalten lebende Zellen, die zu Knochen differenzieren können. Osteoinduktive Substanzen stimulieren lokale oder applizierte Zellen zur Differenzierung zu Osteoblasten und somit zur

Knochenneubildung. Osteokonduktive Knochenersatzmaterialien dienen als Leitstruktur, wobei der neu gebildete Knochen an der Oberfläche der Ersatzmaterialien entsteht [Schieker, 2008].

Entsprechend dem Ursprung des Materials können autologe, allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien unterschieden werden [Glass 2008]. Allgemein gilt für alle biologischen Materialien, sowohl beim Menschen als auch beim Tier, dass die Gefahr einer Krankheitsübertragung und einer Antigenität besteht. Außerdem können sie nicht beliebig hergestellt werden und sind somit nur begrenzt verfügbar [Smeets, 2001], [Griffon, 2011(a)]. Laut Definition von einigen Autoren (u.a. Rueger 1998 und Schieker 2008) gehört die Spongiosaplastik nicht zu den Knochenersatzmaterialien.

### **2.3.1 Autologer Knochenersatzstoff**

Autologer (autogener) Knochenersatzstoff wird dem Patienten selbst entnommen. Autogener Knochen kann in Form von Bohrspänen, Spongiosachips, Knochengranula und avaskulärer oder vaskularisierter Blöcke gewonnen werden. Der autogene Knochen kann partiell osteogenetisch sein, soweit vitale Zellen im Empfängergebiet überleben. Die Mehrzahl der Zellen wird jedoch bei avaskulärer Transplantation einer Nekrose anheimfallen. Osteokonduktive Eigenschaften bestehen entlang der mineralisierten Oberflächen. Die Proteine der Knochenmatrix bewirken auch osteoinduktive Eigenschaften.

Zu den großen Nachteilen dieser Methode gehören die begrenzte Verfügbarkeit und die Notwendigkeit der zusätzliche Entnahmeoperation mit eventuellen entsprechenden postoperativen Komplikationen, Schmerzen oder auch Nervenverletzungen, vaskuläre Verletzungen, Beckenkammfrakturen, Verletzungen des Iliosakralgelenks, Hernien, Hämatome, Gangstörungen und Infektionen bei der Beckenkammernahme sowie neurovaskuläre Verletzungen sind möglich. Kompartiment Syndrom und Knöchelinstabilität bei der Entnahme an der Fibula können auftreten [Glass 2008] [Ebraheim, 2001] [Peters, 2010] [Griffon, 2011].

### **2.3.2 Allogener Knochenersatzstoff**

Knochenersatzmaterial humanen Ursprungs jedoch von einem anderen Spender bezeichnet man als allogen oder homolog. Allotransplantate werden durch die Aufbereitungsverfahren devitalisiert, sodass eine Knochenstimulation nur durch die osteoinduktive Wirkung der noch verbliebenen endogenen BMPs vermittelt werden kann. Durch das Autoklavieren können aber auch osteoinduktive Faktoren inaktiviert werden. Es gibt sie in mineralisierter und in unmineralisierter Form [Glass 2008].

Homologe Knochenersatzstoffe sind unverzichtbar bei Prothesenwechseloperation und ausgedehnter Knochentumorresektion. Nachteilig ist hier die Möglichkeit der Übertragung von Krankheitserregern, der hohe Aufwand bei der Auswahl der Spender (Anamnese, körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen) und bei der sachgerechten Aufbereitung der Implantate. Zusätzlich muss der Empfänger vor toxischen Stoffen und neoplastisch veränderten Zellen geschützt werden [Hoppe, 2001].

### **2.3.3 Xenogener Knochenersatzstoff**

Xenogene (heterologe) Transplantate stammen von artfremden Spendern und haben den Vorteil der unbegrenzten Verfügbarkeit, leichten Sterilisierbarkeit und einfachen Lagerung. Aktuell werden xenogene Knochenersatzmaterialien bovinen und korallinen Ursprungs angeboten, die in ihrer Mineralstruktur humanem Knochen ähneln. Im Gegensatz zu allogenen Materialien werden hier sämtliche Proteinstrukturen entfernt, sodass nur eine anorganische Matrix ohne zelluläre oder organische Bestandteile zurückbleibt. Sie wirken daher rein osteokonduktiv, bergen aber dafür kein Immun- bzw. Infektionsrisiko [Glass 2008].

### **2.3.4 Alloplastischer Knochenersatzstoff**

Alloplastische Knochenersatzstoffe werden vollsynthetisch oder durch ausgiebige physikalische oder chemische Bearbeitung xenogener Gewebearten bzw. Gerüstbausteine hergestellt [IMC]. Sie repräsentieren eine große Gruppe von auf Kalzium basierenden Biomaterialien synthetischen oder teilsynthetischen Ursprungs [Glass 2008].

Eine genaue Auflistung und Übersicht bislang verwendeter Materialien (von Rüger 1998) ist im Anhang zu finden.

## **2.4 Bone Morphogenetic Protein**

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wurden 1965 von Urist entdeckt. Er demonstrierte, dass die Implantation von demineralisiertem Knochen an extraskelettalen Orten eine Formation von Knochen und Knorpel induzierte, also dass diese osteoinduktive Eigenschaften haben [Urist, 1965] [Einhorn, 1995] [Hannouche, 2001].

In den späten 1980igern wurde festgestellt, dass nicht ein einzelnes sondern eine Gruppe von Proteinen verantwortlich ist für die Osteoinduktion. Diese BMPs (BMP-1 bis BMP-16) gehören, mit Ausnahme von BMP-1, zu der TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) Superfamilie. Dies ist eine Gruppe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die eine wichtige Rolle während der Embryogenese und während des postnatalen Lebens spielen [Termaat, 2005] [Wozney, 1988] [Celeste, 1990] [Chen, 2004] [Rosier, 1998]. BMP-2 beispielsweise ist wichtig für die Herzmorphogenese und BMP-7 ist essentiell für die Entwicklung der Nieren [Reddi, 2005]. Außerdem haben sie die Fähigkeit zur Knochenheilung. BMPs sind die einzigen Wachstumsfaktoren, die heterotopisch Knochenformation induzieren können, indem sie undifferenzierte mesenchymale Zellen induzieren, die sich zu Osteoblasten differenzieren.

BMPs wurden zunächst sequenziert, später dann geklont und werden inzwischen gentechnisch produziert (rhBMP (recombinant human BMP)) [Hannouche, 2001].

Der Terminus „Bone Morphogenetic Protein“ wurde zunächst benutzt, um die Substanzen in der demineralisierten Knochensubstanz zu beschreiben, die verantwortlich für die Knocheninduzierung sind. Jetzt allerdings werden BMPs als eine Serie von Faktoren gesehen, die die Knochendifferenzierung und das Knochenwachstum kontrollieren [Kirker-Head, 1995]. BMP-2 exprimiert als ein rekombinantes Protein ist das einzige Molekül, das bisher als fähig beschrieben wurde den gesamten Knorpel- und Knochenbildungsprozess zu induzieren, und zwar auf genau dieselbe Art wie das vom Knochen abgeleitete BMP [Wozney, 1989].

---

### 2.4.1 Stand der Forschung

Zu Beginn der achtziger Jahre wurden Versuche mit bovinem BMP durchgeführt. Urist fand dadurch heraus, dass dieses BMP die Differenzierung von perivaskulären mesenchymalen Zellen in Knorpel und Knochen von Mäusen, Ratten und Kaninchen induziert [Urist, 1982]. Bei einem Versuch mit Hunden 1986 stellten Nilsson und Urist die These auf, dass das BMP die Differenzierung von perivaskulären Bindegewebszellen in Chondroblasten und Osteoprogenitorzellen induziert und damit den Prozess der Knochenregeneration durch die schon vorhandenen Zellen des Endost und Periosts verstärkt [Nilsson, 1986]. Außerdem wurden mehrere Studien durchgeführt, bei denen entweder DBM oder BMPs verwendet wurden, um „Critical-Size“- Defekte in den langen Röhrenknochen von Tieren zu behandeln z.B. an Kaninchen [Bolander, 1986] oder an Ratten [Stevenson, 1994].

Danach wandten sich die Forschungen dem humanen BMP (hBMP) zu. Es wurde gezeigt, dass durch das hBMP die Kapazität des Wirtslagers zur Knochenregeneration wiederhergestellt wurde [Johnson, 1988]. In einer weiteren Studie kam es auch bei Patienten mit stark deformierten Pseudarthrosen zur Wiederherstellung der richtigen Ausrichtung der Knochen und zur Fixierung der Bruchstelle [Johnson, 1990].

Das molekulare Klonen der BMPs Ende der achtziger Jahre mit der anschließenden Expression in rekombinierten Systemen ermöglichten die Herstellung größerer Mengen und somit viele weitere Studien [Wozney, 1988]. Özkaynak et al. isolierten beispielsweise das OP-1 (osteogenic Protein-1) (BMP-7) und beschrieben seine Aminosäuresequenz [Özkaynak, 1990] [Einhorn, 1995]. Wang pflanzte 1990 rhBMP-2 bei einer Ratte ein, und zeigte so, dass die komplette Sequenz der enchondralen Ossifikation induziert wird und dass die Zeit bis zur Knochenbildung abhängig von der Dosis des BMPs ist [Wang, 1990]. Sampath et al. produzierten rekombinantes humanes BMP-7 (früher osteogenic protein 1) und zeigten, dass es in der Lage war, Knochenbildung in vivo und in vitro zu induzieren [Sampath, 1992].

Wozney und Rosen zeigten, dass die Implantation sehr großer Mengen von rhBMP dazu führt, dass gleichzeitig Knorpel und Knochen gebildet werden. Dies impliziert, dass das Molekül sowohl die direkte Knochenbildung als auch die enchondrale Bildung beeinflussen kann [Einhorn, 1995].

Auch der klinische Nutzen des rhBMP wurde in Tiermodellen erforscht. Yasko et al. testeten die osteoinduktive Aktivität von rhBMP an Ratten, und zeigten, dass das rhBMP-2 enchondrale Knochenformation dosisabhängig induziert [Yasko, 1992]. Kirker-Head et al. behandelten erfolgreich Defekte in Schaffemora mit rh-BMP-2 [Kirker-Head, 1995]. Und 2001 wurde rhBMP-2 in alveoläre Knochendefekte in den Mandibeln von jungen Primaten eingesetzt [Marukawa, 2001].

Weitere Versuche ergaben, dass BMP lokal appliziert werden muss, da die systemische Clearance sehr hoch ist. Bisher müssen die Trägerstoffe mit hohen Dosen von BMP bestückt werden [Peel, 2003]. Deswegen wurde versucht, ein Gerüst zu bilden, welches die Freigabe von BMP kontrolliert, wie beispielsweise die kontrollierte Freisetzung aus einem Nano-Gerüst [Hosseinkhani, 2007] oder die anhaltende Freisetzung von BMP-2 von einer neuen, stabilen Collagen-Gel-Membran (Vitrigel) [Zhao, 2009].

Vor allem muss der Trägerstoff das BMP in einer Geschwindigkeit freisetzen, die dem Knochenneubau an der Frakturstelle entgegenkommt [Termaat, 2005]. Weitere Forschungen gehen in die Richtung der Gentechnik, wie eine Studie aus dem Jahr 2010 zeigt. Hier wurden Knochendefekte bei Ratten mit BMP-2 produzierenden Stammzellen aus Fettgewebe behandelt [Betz, 2010].

#### **2.4.2 Quelle des BMP**

Die klassische Quelle von BMP ist der Knochen. BMPs konnten aber auch von osteogenen Osteosarkomen extrahiert werden, und auch Übergangsepithelien und epitheliale Zelllinien scheinen knocheninduktive Komponente zu enthalten [Wozney, 1989]. BMPs werden durch Osteoblasten und andere Knochenzellen gebildet. Sie erlangen ihre Aktivität wieder, wenn sie von dem Knochen extrahiert werden [Linkhart, 1996].

#### **2.4.3 Identifikation von BMP Proteinen**

Resultierend aus Experimenten mit der Gelelektrophorese wird die Aktivität des BMP Proteinen von ca. 30 kDa zugeschrieben. Die Analyse der 30 kDa Region von gereinigtem bovinem BMP zeigt das Vorhandensein dieser 30 kDa Region auch noch nach exzessiver

Reinigung. Ungefähr 50 ng dieses Materials reichen aus um in vivo Aktivität zu ermöglichen. Mittels der tryptischen Peptidsequenz von der 30 kDa (nicht reduzierten) Region wurden 4 cDNAs geklont. Die korrespondierenden Polypeptide wurden BMP-1, BMP2 (früher BMP-2A), BMP-3 und BMP-4 (früher BMP-2B) genannt. Eine weitere Analyse des 30 kDa Proteins führte zum Klonen von weiteren BMPs: BMP-5, BMP-6 und BMP-7 [Wozney, 1989] [Wozney, 1988].

#### **2.4.4 Wirkung des BMPs**

BMPs gehören zusammen mit den IGFs (Insuline-like Growth Factor), und TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) zu den Wachstumsfaktoren, die die Knochenbildung beeinflussen, indem sie die Osteoblastenproliferation und –differenzierung beeinflussen [Linkhart, 1996].

Bei BMP-2 bis -7 sowie BMP-9 wurde gezeigt, dass sie die einzigartige Eigenschaft der Osteoinduktivität haben. Sie können die ursprünglichen (primordialen) Signale für die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Ostoblasten zur Verfügung stellen [Wozney, 1988] [Wozney, 1998] [Termaat, 2005] [Luther, 2011] [Einhorn, 1995] [Yamaguchi, 1996].

Außerdem stimuliert BMP-2 nicht nur die mesenchymalen Zellen zur Differenzierung zu Osteoblasten sondern auch die Chondrozyten zur Bildung des Kallus [Rasubala, 2003].

Die Sequenz der Ereignisse, welche durch die BMPs induziert wird, scheint der embryonalen enchondralen Knochenformation, die man auch bei Frakturheilung beobachten kann, sehr ähnlich zu sein [Wozney, 1989].

Die wichtigsten Wirkungen für die Klinik sind die Förderung der Frakturheilung, die Integration von Knochen auf Implantatoberflächen und die Knochenbildung bei Osteoporose [Linkhart, 1996].

#### **2.5 Information über Immunhistochemie**

Zur Auswertung von Schnitten wurde in einer Arbeit von Knabe et. al. ein semiquantitativer Score angewendet [Knabe, 2008]. Dieser Score unterscheidet zwischen generalisierter

Färbung (zwei oder mehr Bildpunkte (Fokusse) mit einer positiven Färbung) und lokalisierter Färbung (ein einzelner Bildpunkt). Die Färbungsintensität wird in drei Gruppen eingeteilt von geringgradig (mild) über mittelgradig (moderate) bis hochgradig (strong) gefärbt.

---

### **3 Tiere, Material und Methoden**

#### **3.1 Prüfmateriale und Vorversuche**

Die Vorversuche und die Herstellung der hier verwendeten Prüfkörper wurden in mehreren mehrmonatigen Teilprojekten durchgeführt. Teilprojekt 1 (Entwicklung) in Aachen in der biokeramischen Werkstoffentwicklung entwickelte, maßgeschneiderte, bioaktive, dem Bioglas von der Zusammensetzung her gleichende Implantate. Teilprojekt 2 (Untersuchung) in Dresden wurde die Variation der Proteinkonzentration der Oberfläche untersucht. Teilprojekt 3 (Funktionalisierung und Biologisierung) in Essen beschäftigte man sich mit der Funktionalisierung und Biologisierung der Oberflächen und der gentechnischen Herstellung von rekombinantem BMP-2. Außerdem wurden Proteinadsorptionsmessungen und kinetische Messungen durchgeführt. Die Vorversuche für die Tierexperimente und die Herstellung von biologisierten Proben für die Tierexperimente fanden ebenfalls hier statt. Erst nach diesen langwierigen Vorarbeiten kam Teilprojekt 4, das Thema dieser Dissertation. Hier geht es um die tierexperimentelle Evaluation, die Erstellung der Präparate, die Histomorphometrie sowie die Bewertung von Schnitten.

Das hier verwendete Material wurde ausgewählt, da es durch eine Variation der chemischen Anteile ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) leicht möglich ist, die Kopplungseigenschaften des BMPs an die mineralische Oberfläche zu untersuchen. Außerdem kann das Glas (amorpher Festkörper) durch eine Temperaturbehandlung in eine Glaskeramik (kristallinen Festkörper) umgewandelt werden. Das Bioglas hier entspricht bis auf zu vernachlässigende Verunreinigungen der Zusammensetzung des Bioglasses 45S5 (Glas mit 45 Gew. %  $\text{SiO}_2$  und einem 5:1 Verhältnis von  $\text{CaO}$  zu  $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Zur Fertigung der Probenkörper für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden diese Heißluft-sterilisiert und unter sterilen Bedingungen in Eppendorf-Gefäße verpackt.

Nach umfassenden werkstoffwissenschaftlichen Prüfungen kommen die für den klinischen Einsatz am ehesten zur Funktionalisierung mit BMP geeigneten Materialien zur weiteren Untersuchung. Es werden bioaktive, knochenbindende Implantate, die durch Kopplung von BMP funktionalisiert wurden, untersucht. Die Tierversuche sind nicht ersetzbar, da das Zusammenspiel von Degradation des Implantats und Stimulation der Knochenneubildung nicht vorhergesagt werden kann und keine Daten dazu existieren. Die Tierversuche können auf ein Minimum beschränkt werden, da bereits eine durch umfangreiche Versuche

begründete Vorauswahl erfolgt ist. Auf die abschließende Testung im Tierversuch kann nicht verzichtet werden, da es bisher nicht in ausreichendem Maß möglich ist, Knochen dreidimensional in der Zellkultur wachsen zu lassen und die Implantatdegradation bzw. das Knochenwachstum in einem Defekt zu simulieren.<sup>1</sup>

### 3.2 Versuchsplan

Die Versuche wurden an 48 Kaninchen in der Zeit vom 18.1. bis 6.7. 2010 durchgeführt. Beide Hinterläufe wurden operiert, bei den 7-Tage-Kaninchen und den 28-Tage-Kaninchen blieb jeweils bei zwei Kaninchen der rechte Defekt leer. Dies ergibt eine Anzahl von 92 Implantaten.

Tab. 1: Anzahl der Versuchstiere gemäß Materialgruppen und der Liegezeiten. G = amorphes 45S5 ähnliches Glas, GK = kristalline Glaskeramik mit der gleichen chemischen Zusammensetzung.

Tage \ Gruppe	7	28	84	168	N =
G	3	3	3	3	12
GK	3	3	3	3	12
G/BMP	3	3	3	3	12
GK/BMP	3	3	3	3	12

### 3.3 Material

Zwei verschiedene Arten Implantatmaterial wurden untersucht. Ersteres bestand aus einem Glas = G (amorpher Festkörper), dem 45S5 Bioglas ähnlich, das zweite Material aus einer Glaskeramik = GK (kristalliner Festkörper) mit der gleichen chemischen Zusammensetzung. In jeder Materialgruppe wurden mit BMP (Bone Morphogenetic Protein) beschichtete und unbeschichtete Implantate untersucht. Der Durchmesser der Implantate betrug 3,937 mm, die Länge 8 mm. Die Implantate waren leicht unterdimensioniert, um einen Verlust der

---

<sup>1</sup> Aus dem genehmigten Antrag des Versuchsvorhabens nach 58 Abs.1 des Tierschutzgesetzes.

Beschichtung beim Einsetzen der Implantate zu verhindern. Das Bohrloch hatte einen Durchmesser von 3,95 mm.

### 3.4 Produktion der Implantate

Die Produktion der Implantate umfasste das Wiegen und die Homogenisation gefolgt von der Schmelzung bei 1350°C. Danach wurden die Implantate in Wasser abgegossen, gemahlen und nochmals bei 1350°C geschmolzen. Im nächsten Schritt wurde das Material in eine zylindrische Graphitform gegossen. Die kristallinen Implantate wurden 1100°C ausgesetzt. Danach wurden sie mechanisch aufbereitet und mit heißer Luft (180°) sterilisiert. Die Hälfte aller Implantate wurde mit BMP beschichtet.

Tab. 2: Die Konzentration des rhBMP -2 auf den Implantaten betrug in µg/cm<sup>2</sup>:

Liegezeit (Tage)	Glas	Glaskeramik
7	2,95 ± 0,37	3,76 ± 0,38
28	4,68 ± 1,39	3,91 ± 0,85
84	1,20 ± 0,06	1,84 ± 0,28
168	2,95 ± 0,3	3,76 ± 0,38

Außerdem setzten die Glaskeramiken BMP schneller frei.

### 3.5 Tiere, Tierhaltung und Tiermodell

Die Labortiere<sup>2</sup> sind pathogenfreie Kaninchen der Rasse „New Zealand white rabbits“. Vor der Operation wogen die Kaninchen zwischen 2,94 und 3,5 kg. Sie wurden in standardisierten Einzelkäfigen gehalten, und zwar die Tiere mit einer Liegezeit von 168 Tagen in großen Drahtkäfigen (Abb.1), die restlichen Tiere in Plastikmägen. Alle Tiere hatten einen standardisierten - 12 Stunden Tag, 12 Stunden Nacht-Rhythmus, 17-19° C Raumtemperatur und eine Luftfeuchtigkeit von 65%. Das Futter bestand aus gepressten Pellets von der Firma Smith<sup>®</sup> sowie Wasser ad libitum.

Das Knochendefektmodell erfordert das Setzen eines Bohrloches hinter der Kniescheibe in den rechten und linken Oberschenkelknochen in einen nahezu trabekelfreien Ort der

<sup>2</sup> Charles River, Frankreich.

Epiphyse des Kaninchens (3,95 mm Durchmesser, 8 mm Länge). Dieses Modell ist in der wissenschaftlichen Literatur weit verbreitet und akzeptiert, so dass Vergleichsdaten von der Testung anderer Materialien in ausreichender Zahl vorliegen [Vogel, 2001] [Müller-Mai, 1990]. Kleinere Tierarten kommen nicht in Frage, da kein Defekt ausreichender Größe in einem ähnlichen Ort gesetzt werden kann und daher die Fragestellung des Versuchs nicht beantwortet werden kann.



Abb.1: Käfigregal mit erhöhter Liegemöglichkeit.

### **3.6 Implantation**

Die Tiere wurden mit einer Ketamin-Xylazin-Mischung i.m. anästhesiert (0,35 ml/kg), (0,17 ml/kg). Während der Operation wurde zusätzlich noch eine Isoflurananästhesie durch eine Narkosemaske gegeben. Zur Infektionsprophylaxe bekamen die Kaninchen 0,5 ml Gentamycin, und als Schmerzmittel wurde 0,3 ml Rimadyl verabreicht. Nach der Rasur der Läufe bis zur Hüfte und der Desinfektion der Region mit Braunoderm® wurde der erste Schnitt medial des Kniegelenkes durchgeführt (Abb. 2). Die Patella wurde nach lateral luxiert, nachdem durch das mediale Retinakulum geschnitten wurde. Dann wurde mit einer

diamantierten Hohlzylinderfräse (Außendurchmesser 3.95 mm, Abb. 3), in sagittaler Richtung ein Loch in den trabekulären Knochen der distalen Epiphyse des Femurs gebohrt. Die Hohlfräse wurde durch Applikation von NaCl-Lösung aus einer Spritze gekühlt. Nach Implantation wurde die Patella wieder in ihre normale Position gedrückt (Abb. 4). Für die Naht des Retinakulums wurde ein Dacron 0 Vicryl® Faden genutzt und für die Haut 3-0 Mersilene® (Abb. 5). Die Haut wurde mit einer fortlaufenden Naht und einem zusätzlichen sichernden Einzelheft verschlossen. Um die gleichwertige Belastung beider Kniegelenke sicherzustellen und eine Schonhaltung des Tieres zu vermeiden, wurden die Tiere an beiden Knien operiert. Nach der Operation bekamen die Tiere einen Halskragen um ein Aufknabbern der Nähte und ein Belecken der Wunden zu verhindern (Abb. 6). Postoperativ wurden die Kaninchen wieder in ihre Käfige verbracht. Die Wunde sowie das Allgemeinbefinden der Tiere wurde bis zum Ziehen der Fäden (7-10 Tage post operationem) täglich überprüft. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen. Es gab keine Verluste aufgrund von Infektionen oder anderen Problemen.



Abb. 2: Schnitt medial der Patella danach mediale parapatelläre Arthrotomie durch das mediale Retinakulum mit einem Skalpell bzw. einer Schere.



Abb. 3: Defektsetzung in der distalen Femurepiphyse mit einer diamantierten Hohlzylinderfräse.



Abb. 4: Eröffnetes Kniegelenk nach Reposition der Patella.



Abb. 5: Verschlossene Wunde.



Abb. 6: Kaninchen nach der Operation mit Halskragen.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Der Kragen wurde dem Kaninchen angepasst und zusätzlich noch etwas mit Watte gepolstert.

### 3.7 Explantation

Es wurden 2,5 ml Ketamin (100mg/ml), 1 ml Xylazin und 1,3 ml Fentanyl verabreicht, um die Tiere in eine tiefe Anästhesie zu bringen. Zusätzlich wurde, wie oben beschrieben, eine Isofluran Narkose durchgeführt. Zuerst wurde die Haut mit einer Schere durchgeschnitten, danach wurde das Kniegelenk freigelegt und die Kniebänder wurden durchgeschnitten. Die Patella wurde angehoben und das distale Femurende wurde von der Diaphyse des Knochens abgetrennt. Mit der Trennscheibe wurde das distale Stück des Femurs direkt unter dem Implantat abgeschnitten. Dann wurden die Kondylen beider Seiten abgetrennt, um den intertrabekulären Raum für die Fixierung zu öffnen. Der letzte Schritt war das Abtrennen des getrimmten Stückes von dem Rest des Femurs. Gekühlt wurde erneut mit physiologischer NaCl-Lösung, aufgezogen in einer Spritze. Die Tiere wurden dann in tiefer Narkose mit 2 ml T61 (Embutramid) i.v. eingeschläfert.

### 3.8 Vorbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie

Für die Untersuchung mittels der Lichtmikroskopie wurden die ca. 3 cm lang getrimmten Stücke des distalen Femurs, die das Implantat enthalten, zunächst eingebettet. Das Verfahren wird in Tab. 3 beschrieben.

Tab. 3: Einbettung<sup>4</sup> LM :

1. Immersionsfixierung mit Histochoice<sup>®</sup> für 7 Wochen, bei Raumtemperatur.  
(Histochoice<sup>®</sup> ist ein nicht toxisches, nicht vernetzendes Fixationsmittel hergestellt um Formaldehyd enthaltende Fixierungsprotokolle zu ersetzen)
2. Aceton 5% und Polyethylenglycol (PEG) für 14 Tage, im Gefrierschrank
3. Aceton und Methylbenzoat für 2 Tage im Kühlschrank, danach in Xylol für 2 Tage, Raumtemperatur
4. Methylmethacrylat- (MMA), Butylmethacrylat- (BMA) und PEG-Mischung für 14 Tage
5. Einbettung in einer Mischung von MMA, BMA, PEG, BPO und N, N, Dimethyl-p-toluidin (DMT) im Kühlschrank, bis zur Trocknung (Mischung besteht aus: 24 ml MMA + 480 mg BPO und 36 ml BMA + 720 µl PEG + 360 µl DMT)

<sup>4</sup> Nach Standardprotokoll Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie, Charité

Nach der Trocknung werden die nun eingebetteten Proben auf Objektträger geklebt (UHU<sup>®</sup> plus 2-Komponenten Epoxidharzkleber) und dann mit einer Säge (Leica sp 1600) geschnitten. Die Schnitte waren ca. 30 µm dick. Danach wurden sie noch abgeschliffen und poliert. Jedes Exemplar für die konventionelle LM wurde mit dem umgebenden Knochen geschnitten und es wurde von ventral nach dorsal geschnitten. Die Schnitte wurden nummeriert, und jeder Schnittnummer wurde eine Untersuchungsmethode fest zugeordnet (Abb. 7).

Nach dem Sägen konnten die Schnitte gefärbt werden. Die ersten 6 Schnitte von insgesamt 12 bekamen eine immunhistochemische (IHC) Färbung<sup>5</sup>. Ein Schnitt wurde für die REM (BSE-Bilder) Untersuchungen belassen, zwei wurden mit Giemsa gefärbt und zwei weitere mit von Kossa. Der letzte Schnitt wurde als Reserve aufgehoben (Abb. 7). Die detaillierte Färbemethode wird in Tab. 4 beschrieben.

Tab. 4: Entplasten (A) sowie Durchführung der Färbung (B) für IHC und konventionelle LM (C,D)<sup>6</sup>

A: Die oberflächliche Entplastung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. 2 x 20 Minuten in Toluol
2. 2 x 20 Minuten in Xylol
3. 1 x 10 Minuten in Aceton
4. In Aqua dest stellen
5. Lagerung in Tris Puffer pH 7,4
6. Trockenwischen der Objektträger mit Kim Wipes
7. Umranden der Schnitte mit einem Spezialstift: DAKO Pen (Cat# S2002), um sicherzustellen, dass die Substanzen innerhalb der Markierung bleiben und nicht auslaufen
8. Auftragen von Tris Puffer bis zum Beginn des Färbens weil die Schnitte nicht austrocknen dürfen

B: Färbeverfahren für IHC<sup>7</sup>:

---

<sup>5</sup> Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Bone sialoprotein, Alkaline Phosphatase und Collagen

<sup>6</sup> Nach Standardprotokoll Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie, Charité

1. Blockieren mit 2% BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma No. A 7030) in DAKO Antikörperverdünnung (antibody diluent (No. S 2022, DAKO)) oder in Tris Puffer für 20 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, um Hintergrundfärbung zu vermindern. Bovines serum albumin (BSA) wird genutzt, um nicht spezifische Bindung der Antikörper zu blocken, und um Antikörper und andere Proteine in Verdünnungslösung zu stabilisieren
2. 3 x 2 Minuten in Tris Puffer spülen
3. Auftragen der Peroxidase Enzym Blockierungslösung (Dual Endogenous Enzyme Block, No. S 2003, DAKO, Komponente 1 von dem DAKO- Kit) für 10 Minuten. Diese verhindert die Aktivität der endogenen Peroxidase und der AP, welche sonst die spezifische Färbung des Zielantigens verdecken könnten. Dieses Produkt unterdrückt eine nicht-spezifische Färbung infolge der endogenen Peroxidase und die Pseudoperoxidasenaktivität in Peroxidasehaltigen IHC Färbemethoden. Außerdem unterdrückt es die nicht-spezifische Färbung infolge von endogener AP-Aktivität in AP-haltigen IHC Färbungen
4. 3 x 2 Minuten mit Tris Puffer spülen
5. Primären Antikörper in DAKO Antikörperverdünnungsmittel (DAKO antibody diluent (Cat# s 2022, DAKO)) aufbringen. 150 µl pro Schnitt auftragen, 30 Minuten einwirken lassen
  - Col 1 (M- 38) 1:10 (monoclonal, mouse)
  - AP (B4-78) 1:10 ((monoclonal, mouse)
  - AP (TRA-2-5472J) 1:10 (monoclonal, mouse)
  - OP (MPIII B10) 1:10 (monoclonal, mouse)
  - ON (AON-1) 1:10 (monoclonal, mouse)
  - BSP (WVld 1 (9c5)) 1:10 (monoclonal, mouse)
  - OC ([OCG3] ab 13420) 1:100 (monoclonal, mouse)

Kontrollen: Mouse IgG (Cat# PP 54 Chemicon, 25mg/ml) 1:12500  
(zunächst 100fach Stammlösung herstellen, danach 2 µl IgG (100x) Stammlösung zu 248 µl antibody diluent hinzufügen (Antikörperverdünnung)).  
Rabbit IgG (Cat# PP64, Chemicon, 10, 3 mg/ml)

---

<sup>7</sup> Nach Standardprotokoll Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie, Charité

(zunächst 100fach Stammlösung herstellen, dann 4 µl IgG ((100x) Stammlösung) zu 206 µl antibody diluent (Antikörperverdünnung) hinzufügen)

6. 3 x 2 Minuten Spülen mit Tris Puffer
7. Das Labeled Polymer (Dako Cytomation Envision + Dual link System Peroxidase, No. K 4063, DAKO) enthält goat anti-mouse und anti-rabbit Immunglobuline (Ig), conjugated peroxidase labeled polymer in Tris-HCL buffer concentrating carrier protein and antimicrobial agent; (Komponente 2 des DAKO Kits) für 30 Minuten einwirken lassen
8. 3 x 2 Minuten Spülen in Tris Puffer
9. AEC+ (3-Amino-9-ethylcarbazole) Ready to use Substrate chromagen solution (AEC Plus Substrate-Solution No. K3461, DAKO; Komponente 3 des DAKO- Kits) für 10 Minuten. Dieses Substratchromogen ist sehr sensitiv, und eignet sich für IHC Färbemethoden. Bei Oxidation bildet AEC ein rotes Endprodukt am Ort des Zielantigens
10. 3 x 2 Spülen in Aqua dest.
11. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalun (gefiltert, 2-3 Minuten) hier kurz Bläuen in Leitungswasser und in Aqua dest. einstellen
12. In Kaiser's Glyceringelantine (No. C1.09242.0100 Merck) eindecken

C: Giemsa-Färbung, LM<sup>8</sup>:

1. 25 ml Giemsalösung+ 25 ml Sörensen-Phosphat-Puffer für 5 Minuten
2. Filtern der Giemsa/Sörensen-Phosphat-Puffer Mixtur [Filter: Schleicher & Schnell; Type 595 ½;Ø 125 mm]
3. Schnitte unter mikroskopischer Kontrolle in das Filtrat einstellen
4. Mit Aqua dest. und Sörensen-Phosphat-Puffer Mixtur spülen
5. Trockenreiben

D: Von Kossa Reaktion:

1. Mit Aqua dest. Spülen und Trockenwischen
2. 5% ige Silbernitrat für 5 Minuten einwirken lassen
3. 3 x 5 Minuten Aqua dest.

---

<sup>8</sup> Nach Standardprotokoll Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie, Charité

4. Soda formol Mixtur für 3 Minuten einwirken lassen
5. Unter laufendes Leitungswasser stellen für 10 Minuten
6. 5 % Natriumthiosulfat für 5 Minuten einwirken lassen
7. Unter laufendes Leitungswasser stellen für 10 Minuten
8. Paragonlösung für 10 Minuten auf die Schnitte auftragen

Die gefärbten Implantate (Giemsa, von Kossa) wurden für die Lichtmikroskopie und Histomorphometrie genutzt. Abb. 7 zeigt die Methoden, die für die Untersuchung der Gewebereaktion auf die Implantate und die Materialreaktion auf die Implantation durchgeführt wurden.

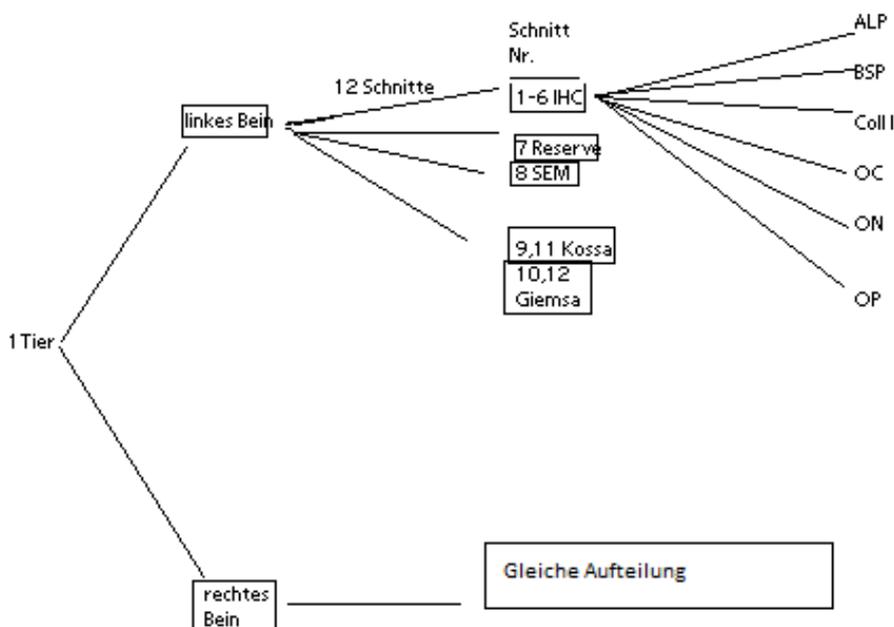


Abb. 7: Dieses Schema zeigt die Verteilung der Methoden, die für die Untersuchung der Gewebereaktion auf die Implantate und die Materialreaktion auf die Implantation durchgeführt wurden. Jedes Implantat wurde von ventral nach dorsal geschnitten. Die ventralen Schnitte wurden für IHC, die dorsalen für die konventionelle Lichtmikroskopie verwendet. Der achte Schnitt wurde für REM verwendet, um Veränderungen der Implantatdichte mit Hilfe von BSI (backscattered images) zu untersuchen. ALP = Alkalische Phosphatase, BSP = Bone Sialoprotein, Coll I = Collagen I, OC = Osteocalcin, ON = Osteonectin, OP = Osteopontin.

### 3.9 Vorbereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie

Ein Implantat jeder Materialart und jeder Liegezeit wurde für die REM Analyse der Implantatoberfläche verwendet. Das Implantat mit dem distalen Femur wurde mit einer diamantbeschichteten Trennscheibe von der Diaphyse des Knochens getrennt. Danach wurden 3 Schnitte von distal, medial und lateral durchgeführt, bis das Implantat erreicht wurde. Das umgebende Gewebe wurde von der Implantatoberfläche getrennt. Ein Teil des Implantates und ein Teil des Gewebes wurden dann für REM weiterverarbeitet. Die Aufbereitung für REM Oberflächenanalyse wird in Tab. 5 beschrieben. Für die REM Rückstreuелеktronenmodus wurden in Plastik eingebettete Schnitte (Reserve) verwendet.

Tab. 5: Fixierung und Präparation für REM Untersuchung Sekundärelektronenmodus<sup>9</sup>:

1. Fixierung in 4% Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylat Puffer für 3 Std, 4° C
2. Spülen mit 0,1 Cacodylatpuffer, 3 x 30 Minuten
3. Entwässerung in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe (unvergällter, reiner Alkohol 30, 50, 70, 80, 90, 96, 100, 100%) für je 30 Minuten
4. Hexamethyldisilazane (HMDS), 2 x 60 Minuten
5. Lufttrocknen lassen über Nacht

Weitere Verarbeitung der in Plastik eingebetteten Schnitte für REM Rückstreuелеktronenmodus:

1. Polieren der Schnitte
2. Trocknen der Schnitte

Für die Untersuchung im Rückstreuелеktronenmodus (Backscattered electron modus) werden die ungefärbten Schnitte besputtert (mit Gold ummantelt, in einem "Balzers union SCD040). Danach wurden sie im Rückstreuелеktronenmodus im REM untersucht. In diesem Modus werden dichteabhängige Bilder hergestellt, und somit können mögliche Oberflächenänderungen, wie z.B. Auslaugungen oder Änderungen der Oberflächenstruktur durch partikulären Zerfall nach Implantation ermittelt werden.

---

<sup>9</sup> Nach Standardprotokoll Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie, Charité

### 3.10 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Proben wurde durch den Student-t-Test mit Excel durchgeführt. Der p-Wert wird errechnet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  gilt als signifikant. Sind die Unterschiede zwischen den Messgrößen signifikant, bedeutet dies, dass die Wahrscheinlichkeit einer Entstehung durch Zufall unwahrscheinlich ist.

### 3.11 Auswertung der Immunhistochemie

Das in der vorliegenden Arbeit angewendete Verfahren entspricht den Standardfärbungen in der Charité. Die Auswertung erfolgte nach dem oben erwähnten semiquantitativen Score nach Knabe et. al. [Knabe, 2008]. Dieser Score wird wie folgt bewertet:

+	= ggr –lokalisiert	=1	+	= <b>ggr –generalisiert =2</b>
++	= mgr –lokalisiert	=3	++	= <b>mgr –generalisiert =4</b>
+++	= hgr –lokalisiert	=4	+++	= <b>hgr –generalisiert =5</b>

Durchschnittliche Bewertung:

1 - 2,2                    ggr expression

2,3 - 3,4                mgr expression

3,5 - 5                    hgr expression

[Knabe, 2008]

## **4 Ergebnisse**

Bei insgesamt 48 Tieren wurden 96 Implantate implantiert. Die Operationen und Explantationen verliefen nach Plan und es gab während der gesamten Liegezeit keine Verluste aufgrund von Infektionen oder anderen Komplikationen. Klinisch konnte eine stetige und komplikationslose Wundheilung beobachtet werden.

### **4.1 Lichtmikroskopie**

#### **4.1.1 Lichtmikroskopie und Histomorphometrie**

Sieben Tage nach Implantation zeigten alle geschnittenen Exemplare ein Spalt zwischen dem Implantat und dem umgebenden Knochen (Abb. 8-11). Der Grund hierfür ist der leicht größere Durchmesser des Bohrloches im Vergleich zum Durchmesser des Implantates. Diese Vorgehensweise wurde benutzt, um ein Abscheren der BMP-Beschichtung zu verhindern. Die Lücke zwischen dem alten präexistierenden Knochen und dem Implantat war durchschnittlich 101,7 µm breit (n= 36 Schnitte, jeder mit 4 Messpunkten). Diese Lücken waren bei einigen Schnitten mit Weichgewebe gefüllt und bei anderen komplett frei, aufgrund eines Artefaktes, der auf Schrumpfen und Schneiden zurückzuführen ist. Im Bohrloch wurden keine neuen Knochen trabekel beobachtet, was auf die kurze Liegezeit zurückzuführen ist. Knochen-Implantatkontakte wurden nur sehr selten beobachtet. Diese traten nur dort auf, wo altes Knochengewebe die Implantatoberfläche berührte. Deutliche Unterschiede der Gewebereaktion zwischen Glas und Glaskeramik Implantaten oder zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten wurden nicht beobachtet.

Bei Betrachtung des Querschnittes scheinen die Glaskeramiken dichter als die Gläser (Abb. 10,11). Sowohl bei den beschichteten als auch bei den unbeschichteten Proben gab es beim Sägen Materialverluste aufgrund der spröden Eigenschaften. Eindeutige Dichteunterschiede der Oberfläche und des Zentrums der Implantate konnten nicht beobachtet werden.

Nach 28 Tagen Liegezeit wurden an der Oberfläche der Implantate einige Knochen trabekel aufgebaut. Bei den G/BMP wurde der höchste Knochen-Implantatkontakt gemessen (18%)

---

(Abb.12), gefolgt von den GK/BMP (10,2 %) (Abb.14). Die G hatten ebenfalls Knochen-Implantatkontakt (9, 2%) (Abb.13) Der geringste Kontakt bestand bei den GK (Abb.15).

Die leeren Defekte zeigten nur sehr wenig neue Knochenbildung (Tab.6)

Nach 84 Tagen Liegezeit konnte beobachtet werden, dass der Knochen-Implantatkontakt zugenommen hatte. Den höchsten Kontakt hatten abermals die G/BMP (62,19%) (Abb.16), gefolgt von den G (33,95%) (Abb.17), danach kamen die GK (19,79%) (Abb.19) und am Schluss folgten die GK/BMP (5,43%) (Abb.18).

Nach 168 Tagen Liegezeit (Abb. 20-23) nahm der Knochen-Implantatkontakt zu, mit Ausnahme der G/BMP welche mit Von Kossa und Giemsa gefärbt wurden, die im Vergleich zu 84d einen geringen Abfall des Knochenkontaktes aufweisen. Die höchste Prozentzahl wurde bei der Gruppe G/BMP erzielt, welche die IHC-Färbung bekamen (73,42%).

Tab. 6: Histomorphometrie des Knochen- Implantatkontaktes der verschiedenen Implantatmaterialien und der verschiedenen Liegezeiten. Zum Vergleich wurde bei 7 und 28 Tagen der Bereich des neugebildeten Knochens in leeren Defekten in % demonstriert. G = Glas GK = Glaskeramik.

7d		Knochen- Implantat Kontakt (%)			
Färb	Impl	v.Kossa	Giemsa	IHC	Gesamt
G/	BMP	1,1	1,8	7,5	4,2
G		3	3,1	3,3	3,1
GK/	BMP	1,7	2,0	6,1	4,1
GK		0,7	2,6	3,7	3,2
Leer		1,3	0,5	0	0,4

28d		Knochen- Implantat Kontakt (%)			
Färb	Impl	v.Kossa	Giemsa	IHC	Gesamt
G/	BMP	12,1	18,3	22,1	18,6
G		3,5	5,9	13,7	9,2
GK/	BMP	10,8	11,4	8,4	10,2
GK		3,9	6,6	10,3	7,7
Leer		3,5	8,6	13,5	10,3

84d		Knochen- Implantat Kontakt (%)			
Färb	Impl	v.Kossa	Giemsa	IHC	Gesamt
G/	BMP	62,1	62,5	62,1	62,2
G		25,3	30,4	42,1	34
GK/	BMP	2,8	4	7	5,4
GK		18,5	16,9	22,7	19,8

168d		Knochen- Implantat Kontakt (%)			
Färb	Impl	v.Kossa	Giemsa	IHC	Gesamt
G/	BMP	38,6	40,8	73,4	54,7
G		56,4	30,4	58,2	49,7
GK/	BMP	21,2	19,3	22,3	21
GK		26,7	12,1	28,6	25,2

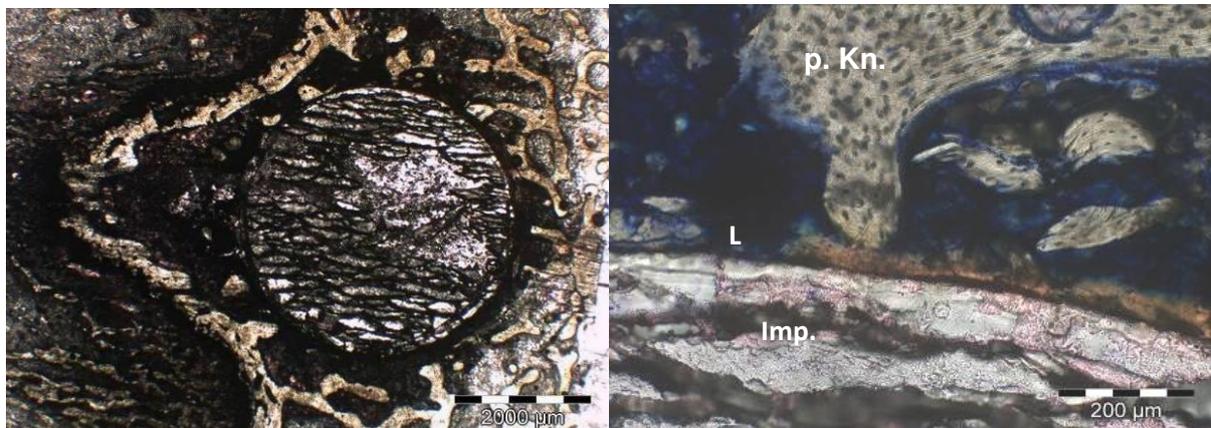


Abb. 8: LM, Querschnitt, G/BMP, Giemsa, 7 Tage (links). In höherer Vergrößerung (rechts) ist die Lücke (L) zwischen Implantat (Imp.) und präexistierendem Knochen (p.Kn.) (obere Mitte und rechts), die mit Weichgewebe gefüllt ist, sichtbar.

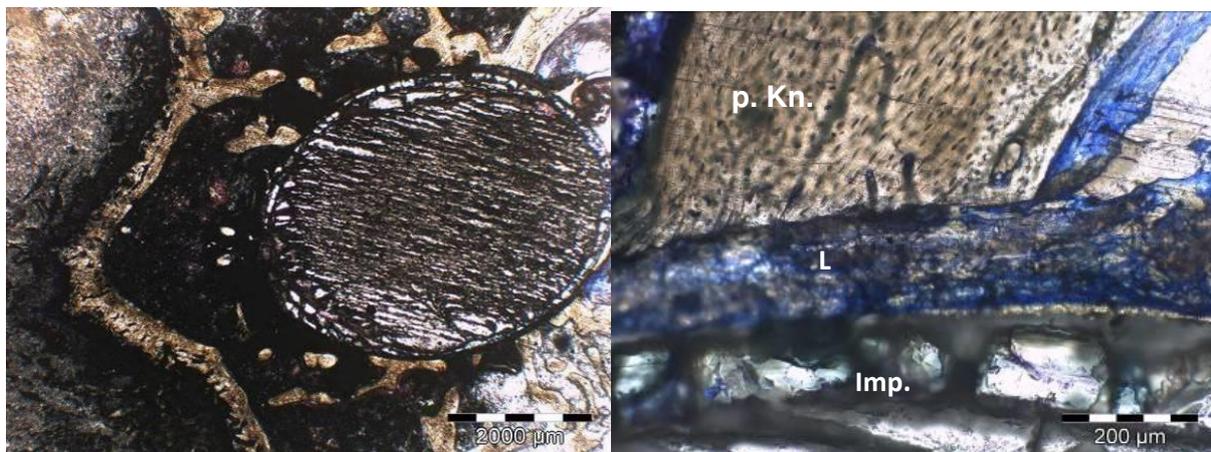


Abb. 9: LM, Querschnitt, G, Giemsa, 7 Tage (links). In höherer Vergrößerung (rechts) ist die mit Weichgewebe angefüllte Lücke (L) zwischen Implantat (Imp.) und präexistierendem Knochen (p.Kn.) (obere Mitte) sichtbar. Am Knochen ist die Schnittebene der Hohlzylinderfräse erkennbar.

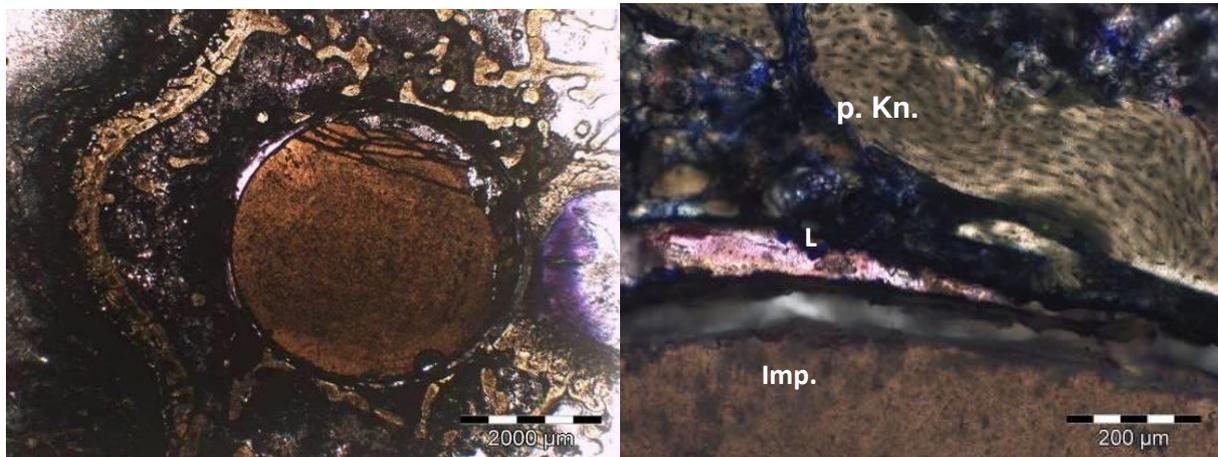


Abb. 10: LM, Querschnitt, GK/BMP, Giemsa-Färbung, 7 Tage (links). In höherer Vergrößerung (rechts) ist die mit Weichgewebe angefüllte Lücke (L) zwischen Implantat (Imp.) und präexistierendem Knochen (p.Kn.) (obere Mitte und rechts im Bild) sichtbar. Die Dichte des Implantates scheint im Vergleich höher zu sein als die der amorphen Implantate.

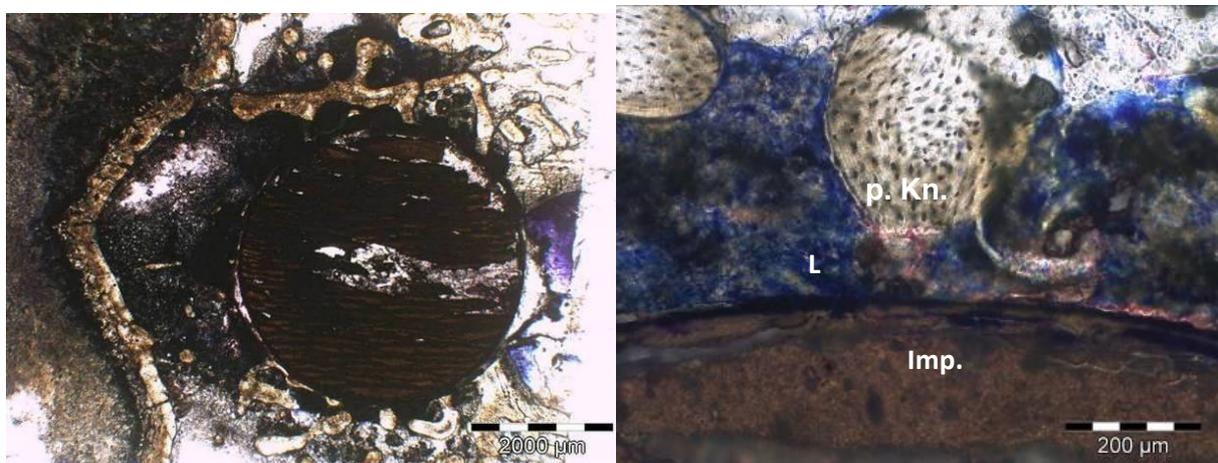


Abb. 11: LM, Querschnitt, GK, Giemsa, 7 Tage (links). Teile des kristallinen Implantates gingen infolge des Sägeprozesses verloren. In höherer Vergrößerung (rechts) ist die mit Weichgewebe angefüllte Lücke (L) zwischen Implantat (Imp.) und präexistierendem Knochen (p.Kn.) (obere Mitte im Bild) sichtbar.

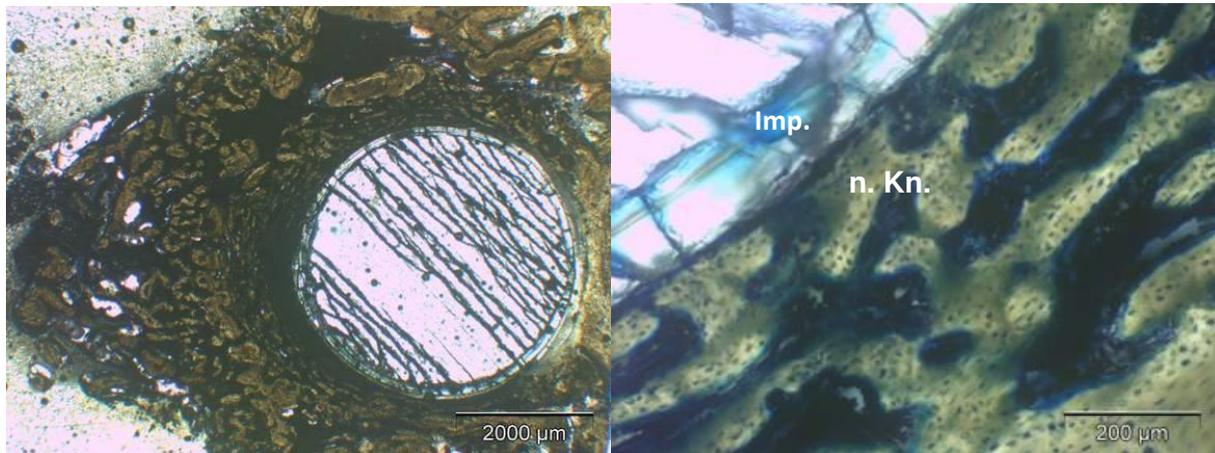


Abb. 12: LM, Querschnitt, G/BMP (Imp.), Giemsa, 28 Tage. Im rechten Bild sind neugeformte Knochen trabekel (n.Kn.) in der Nähe der Implantatoberfläche sichtbar.

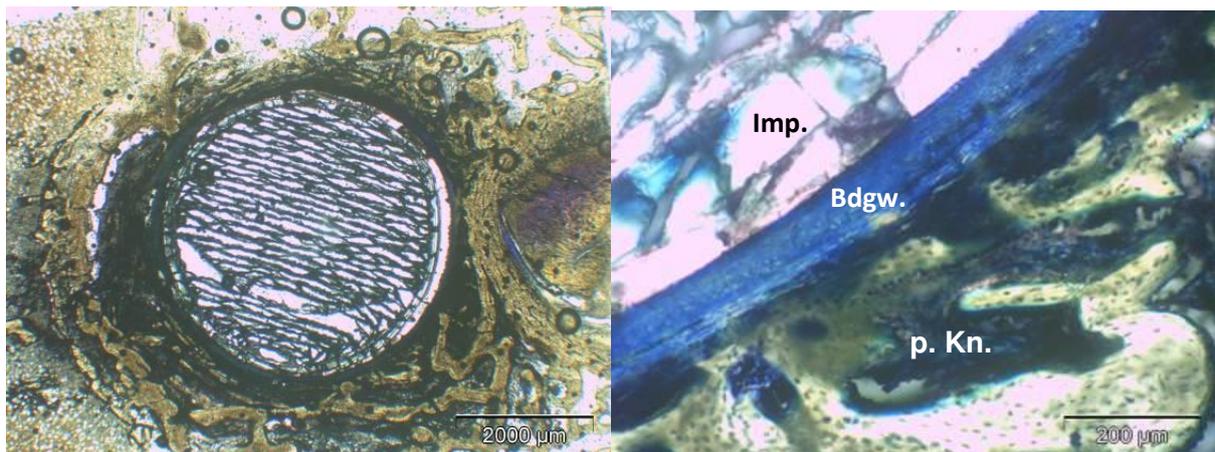


Abb. 13: LM, Querschnitt, G, Giemsa 28 Tage. Im rechten Bild ist das Bindegewebe (Bdgw.) zwischen Implantat (Imp.) und präexistierendem Knochen (p.Kn.) sichtbar.

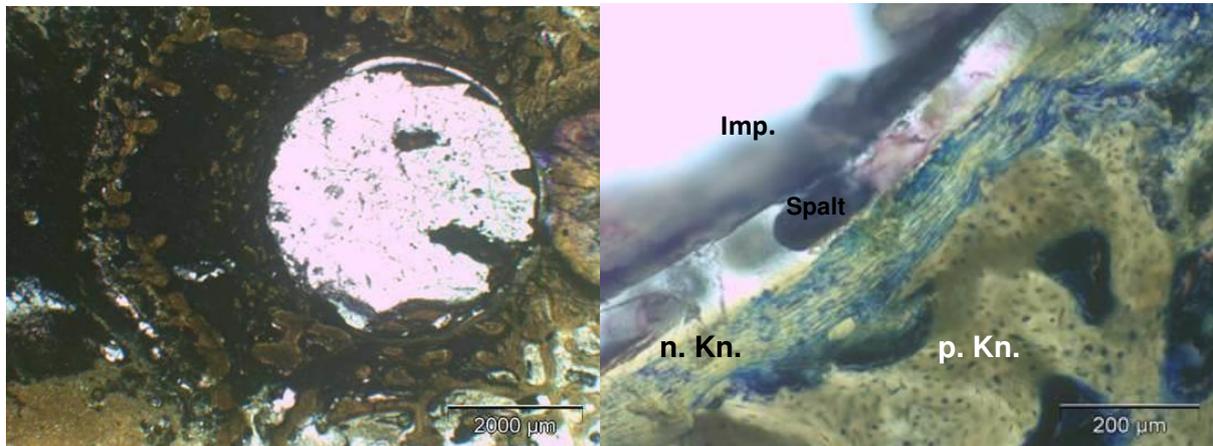


Abb. 14: LM, Querschnitt, GK/BMP (Imp.). Giemsa, 28 Tage. Im rechten Bild sind neugeformte Knochen trabekel (n.Kn.) sichtbar. Der künstliche Spalt entstand aufgrund des Produktionsprozesses. Rechts unten im Bild ist präexistierender Knochen (p.Kn.)

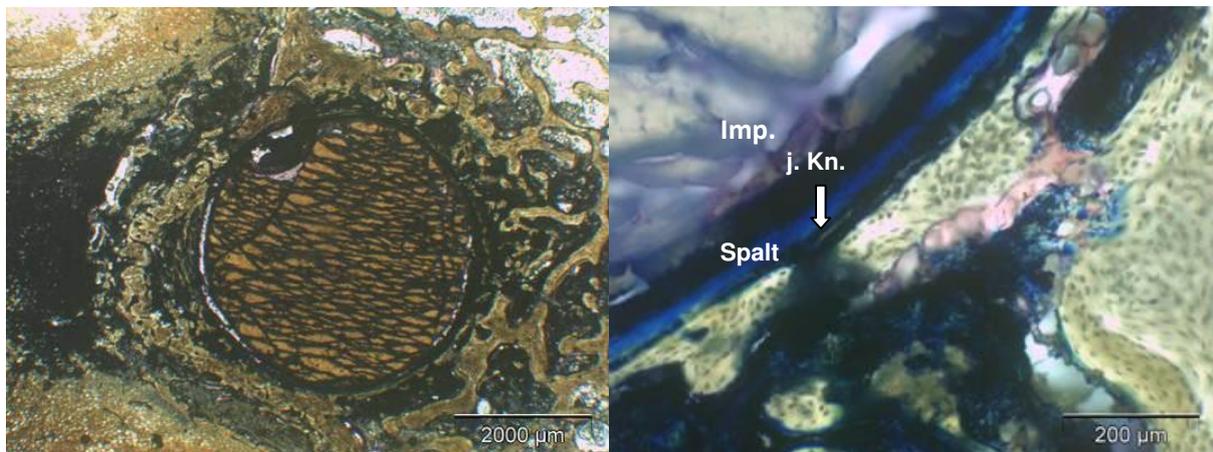


Abb. 15: LM, Querschnitt, GK, Giemsa, 28 Tage. Im rechten Bild sieht man jungen Knochen (j.Kn.), der sich in der Nähe des Implantates (Imp.) gebildet hat. Der künstliche Spalt entstand aufgrund des Produktionsprozesses.

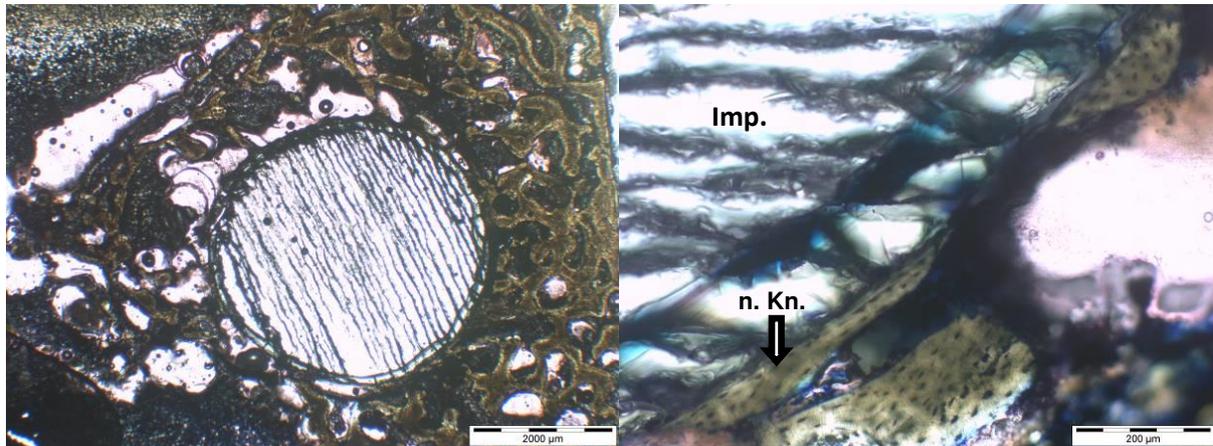


Abb.16: LM, Querschnitt, G/BMP, Giemsa, 84 Tage. Im rechten Bild sind neue Knochen trabekel (n.Kn.) in Kontakt mit der Oberfläche des Implantates (Imp.) sichtbar.

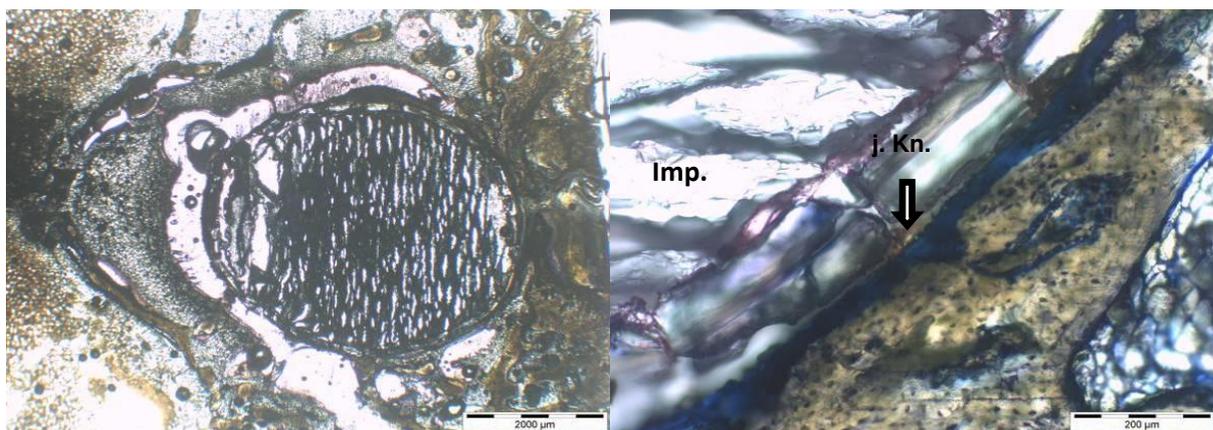


Abb. 17: LM, Querschnitt, G, Giemsa, 84 Tage. Im rechten Bild sieht man jungen Knochen (j.Kn.), der sich auf der Oberfläche des Implantates (Imp.) ausgebildet hat.

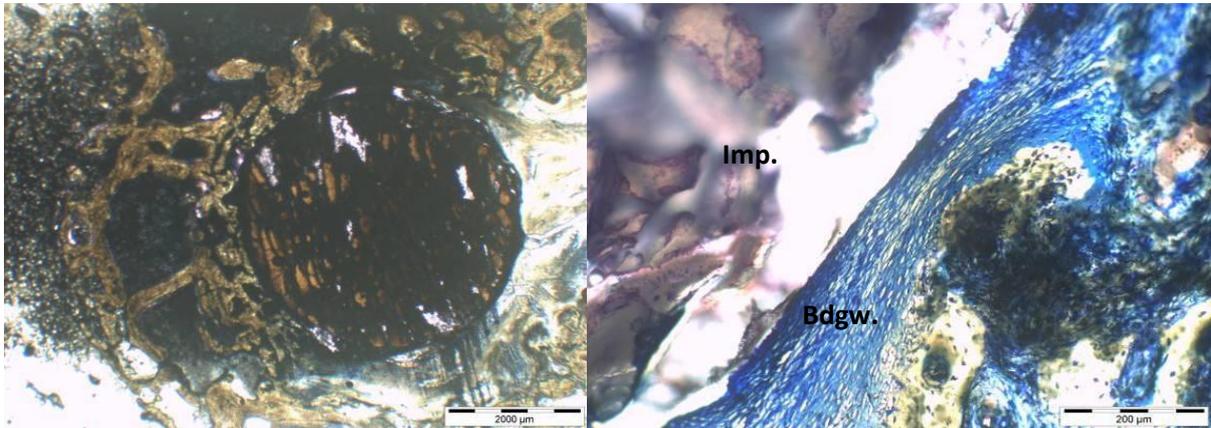


Abb. 18: LM, Querschnitt, GK/BMP, Giemsa, 84 Tage. Im rechten Bild ist das Bindegewebe (Bdgw.) zwischen Implantat (Imp.) und Knochen sichtbar.

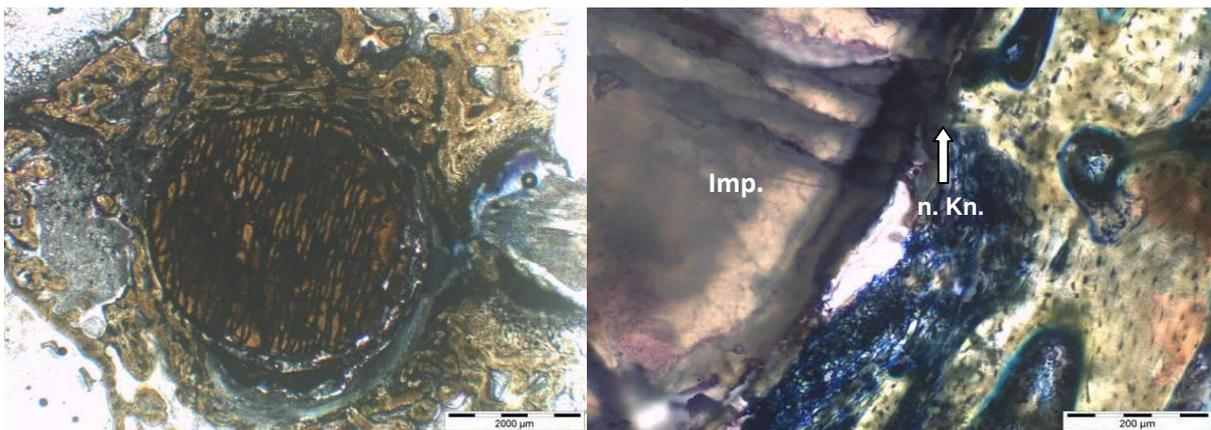


Abb. 19: LM, Querschnitt, GK, Giemsa 84 Tage. Im rechten Bild sind neue Knochentrabekel (n.Kn) punktuell in Kontakt mit der Oberfläche des Implantates (Imp.) sichtbar.

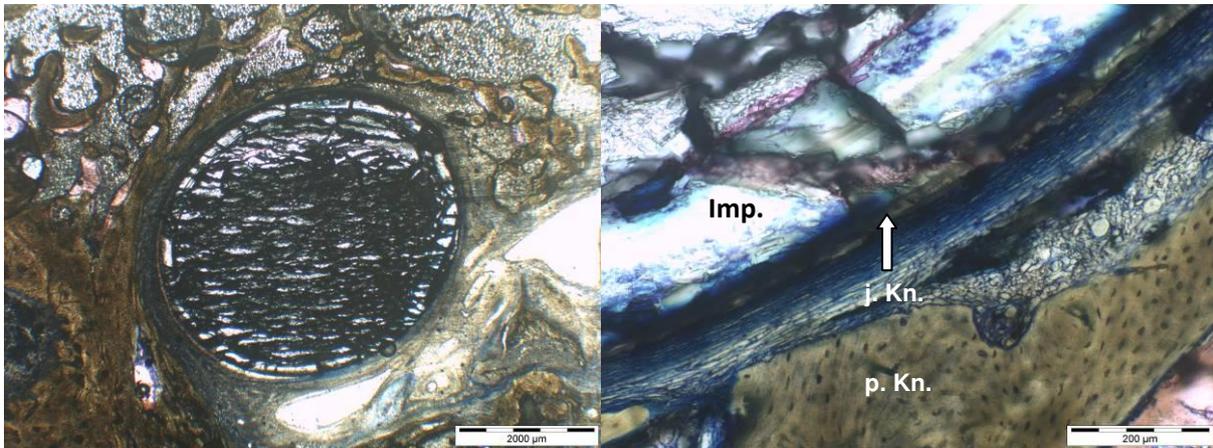


Abb. 20: LM, Querschnitt, G/BMP, Giemsa 168 Tage. Im rechten Bild wurde junger Knochen (j.Kn.) in der Nähe des Implantates (Imp.) gebildet. Rechts unten im Bild ist präexistierender Knochen (p.Kn.).

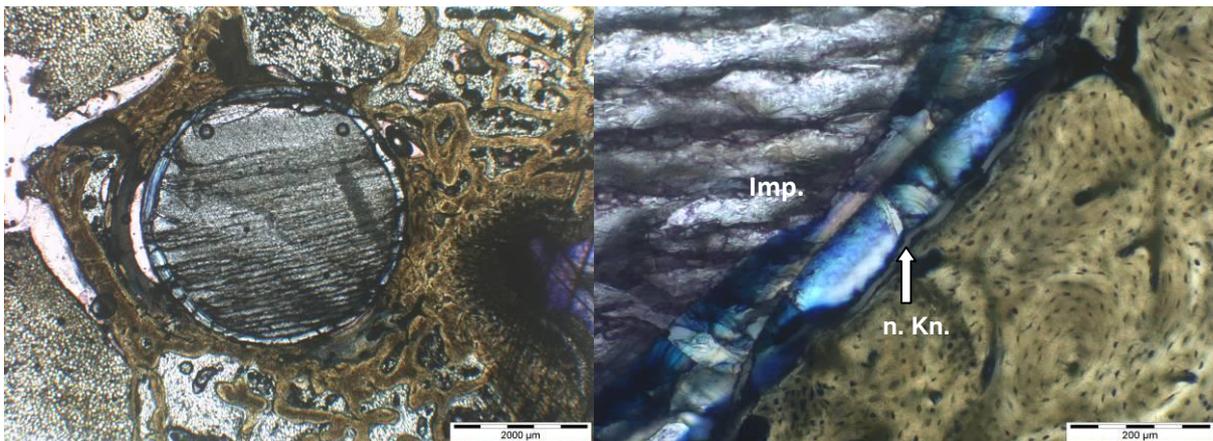


Abb. 21: LM, Querschnitt, G, Giemsa 168 Tage. Auf dem rechten Bild sind neu geformte Knochen trabekel (n.Kn.) in Kontakt mit der Oberfläche des Implantates (Imp.) sichtbar.

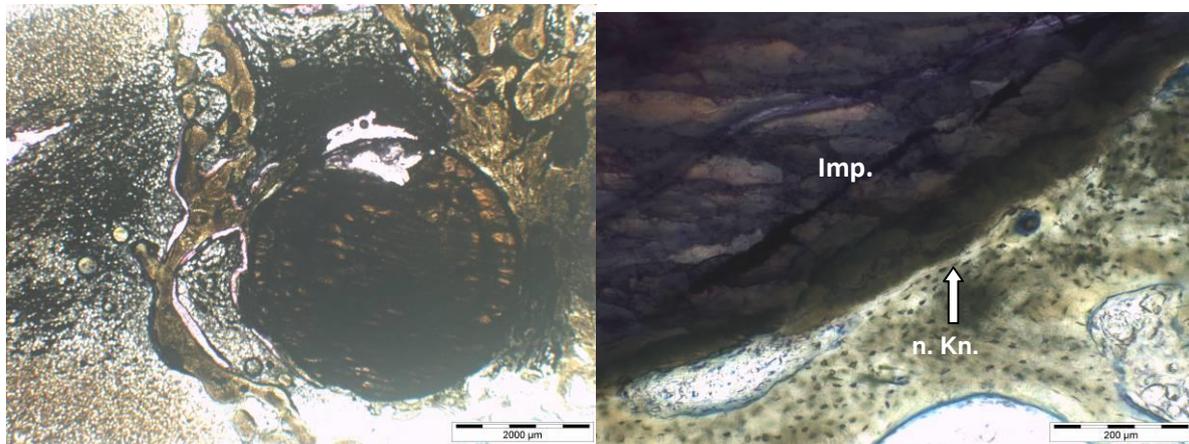


Abb. 22: LM, Querschnitt, GK/BMP, Giemsa 168 Tage. Im rechten Bild sind neugeformte Knochen trabekel (n.Kn.) in Kontakt mit der Oberfläche des Implantates (Imp.) sichtbar.

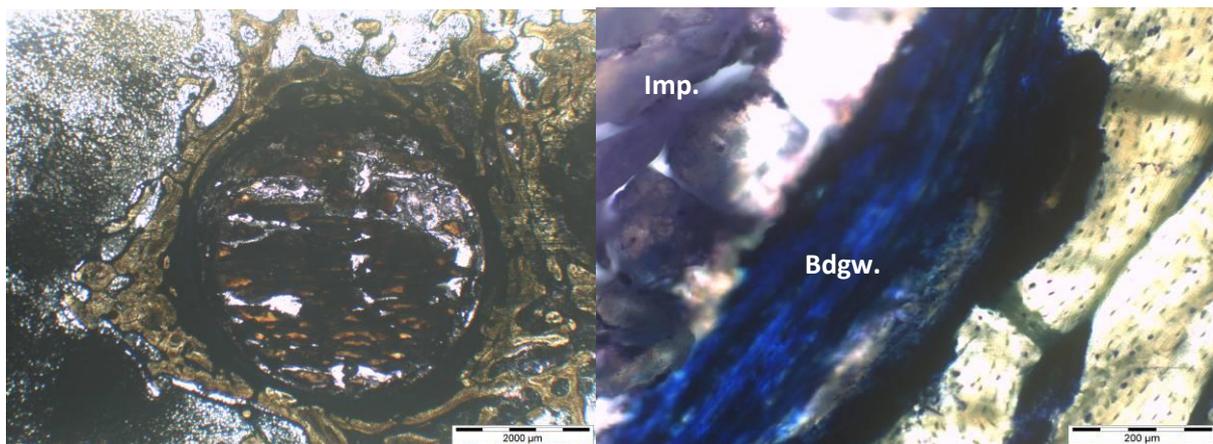


Abb. 23: LM, Querschnitt, GK, Giemsa 168 Tage. Im rechten Bild ist das Bindegewebe (Bdgw.) zwischen dem Implantat (Imp.) und dem Knochen sichtbar.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Glasimplantate wurden die folgenden statistischen Werte zusammengefasst und Ihre entsprechenden Signifikanzniveaus berechnet (Tab.7) (Abb. 24):

#### Statistische Auswertung der Histomorphometrie:

Tab. 7: Vergleich der Glasimplantate mit BMP der unterschiedlichen Liegezeiten und der Glasimplantate ohne BMP der unterschiedlichen Liegezeiten (t-test) n.S.= nicht signifikant S.= Signifikant:

G+	P-Wert	Signifikanz
7d 28d	0,152459455	n.S.
7d 84d	3,37272E-06	S.
7d 168d	0,027797993	S.
28d 84d	0,003822987	S.
28d168d	0,09425095	n.S.
84d168d	0,428606366	n.S.

G-	P-Wert	Signifikanz
7d 28d	0,21318398	n.S.
7d 84d	0,02785599	S.
7d 168d	0,00553182	S.
28d 84d	0,0504088	S.
28d168d	0,00167514	S.
84d168d	0,2163989	n.S.

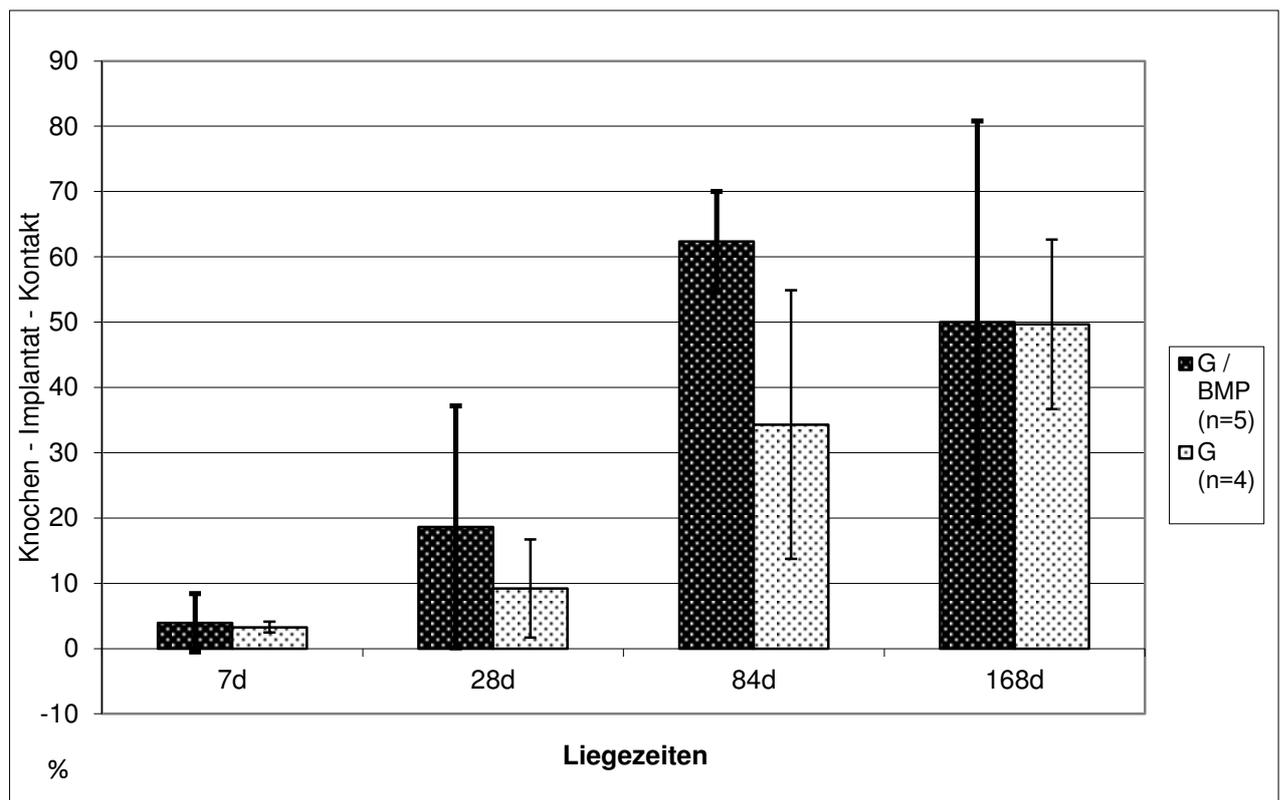


Abb. 24: Knochen-Implantat-Kontakt in % mit Standardabweichung und Fehlerbalken. Vergleich der 4 Liegezeiten (7, 28, 84, 168d) aufgeteilt in Glasimplantate mit und ohne BMP Beschichtung.

Beide Gruppen (G/BMP, G) zeigten einen kontinuierlichen Anstieg des Knochenkontaktes über die Zeit. Der Anstieg von 28 zu 84 Tagen war signifikant bei den Implantaten mit BMP Beschichtung ( $p < 0,0038$ , ohne BMP  $p < 0,055$ ) (Tab.8). Bei den beschichteten Proben wurde eine Verringerung des Knochen-Implantat-Kontaktes von 84 d (62%) zu 168 d (50%) beobachtet, was durch die schrittweise Remodellierung des Knochens erklärt werden kann. Dieser Rückgang konnte auch bei vorherigen Untersuchungen festgestellt werden. Der Vergleich beider Gruppen zeigte, dass es bei allen Liegezeiten bei den Proben mit BMP Beschichtung zu einem höheren Knochenkontakt kam, insbesondere aber bei den mittleren Liegezeiten (28 d:  $18,6\% \pm 8,3$  und  $9,2\% \pm 3,8$ ; 84 d:  $62,4\% \pm 3,4$  bzw.  $34\% \pm 9,2$ , Signifikant,  $p < 0,034$ ; 168 d:  $50\% \pm 13,8$  und  $49,7\% \pm 6,5$ ) (Abb.24).

#### **4.1.2 Immunhistochemie**

Als Marker wurden ALP, BSP, COL I, OC, ON und OP genutzt. Ihre Exprimierungszeitpunkte und ihre Verteilung im Knochen unterscheiden sich. ALP und Col I werden in der frühen proliferativen Phase, ON und OP in der späten, und BSP sowie OC in der terminalen Phase der osteoblastischen Zelldifferenzierung exprimiert. In der späten und terminalen Phase ist der Osteoblast in die Matrixreifung und –mineralisation involviert.

Sieben Tage nach der Implantation konnten nur minimale Unterschiede der Antikörperreaktionen zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (G/BMP, G beziehungsweise GK/BMP, GK). Der am häufigsten stark gefärbte Marker war OC (Osteokalzin). Es konnten nur leichte Unterschiede zwischen Glas- und Glaskeramik-Implantaten beobachtet werden. Innerhalb der Glas und der Glaskeramik Gruppe gab es jedoch Unterschiede zwischen den beschichteten und den unbeschichteten Proben. Bei allen Gruppen war die mineralisierte Knochenmatrix rot gefärbt; dies deutet auf einen hohen Aktivitätsgrad des OC in diesem Bereich hin.

Zur Analyse der Färbung der unterschiedlichen Antikörper wurde die zuvor bereits erwähnte, semiquantitative Wertung (Score) genutzt [Knabe, 2008].

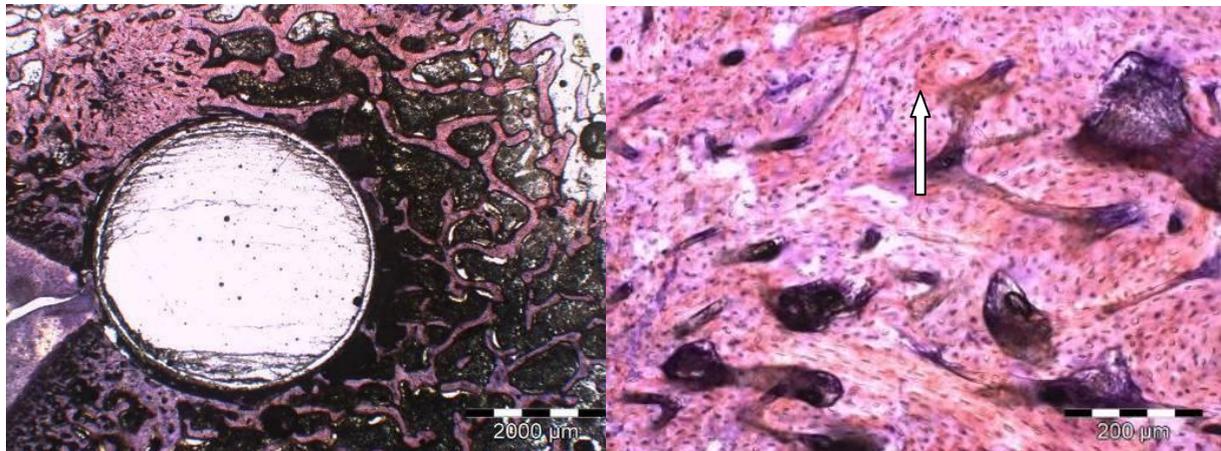


Abb. 25: IHC, Querschnitt, G/BMP, OC mit hochgradiger (strong) und generalisierter Färbung der mineralisierten Knochenmatrix, 7 Tage (links). Teile des Glas - Implantates sind infolge des Sägeprozesses verloren gegangen. In höherer Vergrößerung (rechts) ist die Färbung (das rote Reaktionsprodukt, Pfeil) der Knochentrabekel sichtbar.

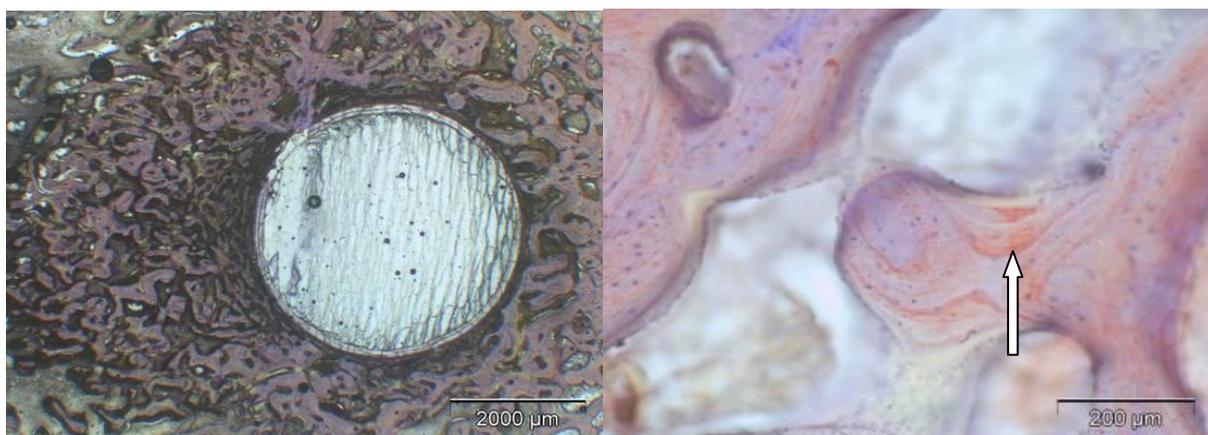


Abb. 26: IHC, Querschnitt, G/BMP, OC mit mittelgradiger (moderate), generalisierter Färbung der mineralisierten Knochenmatrix (Pfeil) und geringgradig (mild) generalisierter Färbung der fibrösen Matrix, 28 Tage.

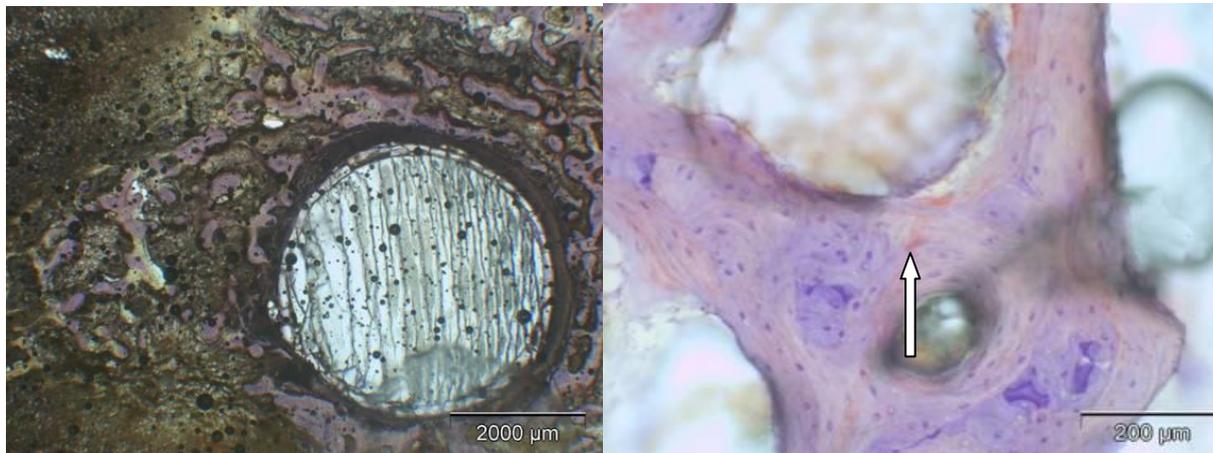


Abb. 27: IHC, Querschnitt, G, OC mit generalisierter, geringgradiger (mild) Färbung der fibrösen Matrix und der mineralisierten Knochenmatrix (Pfeil), 28 Tage.

Tab. 8: Immunhistologische Bewertung der 7 -Tage Proben. <sup>10</sup>

Marker Implantat	ALP			BSP	Col1		OC		ON		OP
	Fibröse Matrix	Min Kn.	Osteoblasten	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix	Osteozyten	Fibröse Matrix	Min Kn	Fibröse Matrix	Osteoblasten	Fibröse Matrix
G/BMP n=5	1,2	0,2	1	1,2	1,4	0	0,6	1,8	1,4	0	0,8
G n=4	1,3	0,3	0	1	1	0	0,8	2,8	1	0	1
GK/BMP n=5	1,8	0	0	0,6	1,2	0,6	1	2,4	1	1	1,2
GK n=4	0,3	0	0	1	1,5	0	1	2,3	1	0	1,3
Leer n=2	2,5	0	0	3	4	0	4	0,5	1,5	0	3

Nach 7 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten eine Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Färbung. Osteoblasten sind nur bei den Implantaten mit BMP bei einzelnen Schnitten geringgradig angefärbt. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine mittelgradige Färbung.

<sup>10</sup> Min Kn = mineralisierte Knochenmatrix

Tab. 9: Immunohistologische Bewertung der 28 -Tage Proben

Marker Implantat	ALP		BSP	Col1	OC		ON	OP
	Fibröse Matrix	Osteozyten	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix	Min Kn	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix
G/BMP n=5	0,8	0	0,4	0,2	0,6	3,2	1,2	1
G n=4	1,8	0	2,3	1,5	1,5	1,8	1,5	0,5
GK/BMP n=5	1	0,2	1,6	1,6	1	2,6	1,8	2,4
GK n=4	1,5	0	2	0,8	0,8	2,8	1,3	1,3
Leer n=2	2	0	1,5	1,5	0	3	2	0,5

Nach 28 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Anfärbung. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine mittelgradige Färbung außer bei den Glasimplantaten dort war die Färbung geringgradig.

Tab. 10: Immunhistologische Bewertung der 84 -Tage Proben

Marker Implantat	ALP		BSP		Col1	OC			ON			OP
	Fibröse Matrix	Osteozyten	Fibröse Matrix	Osteozyten	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix	Min Kn	Osteozyten	Fibröse Matrix	Min Kn	Osteozyten	Fibröse Matrix
G/BMP n=5	1,8	0	1	0	1,2	3,4	2,6	0	1,2	0	0,8	1,2
G n=5	1,2	0	1,2	0	0,4	4	2,6	0,8	2,4	0	0	2,2
GK/BMP n=4	1,3	0,3	1,5	0,8	1,5	2,8	1,8	0,8	1,8	0,5	0	1,5
GK n=5	1,4	0	1,8	0,2	1,8	3,6	2	1,6	1,4	0,2	0	1,2

Nach 84 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis hochgradigen Anfärbung. Die hochgradige Anfärbung zeigte sich bei den Schnitten mit OC Antikörpern. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine gering- bis mittelgradige Färbung .

Tab. 11: Immunohistologische Bewertung der 168 -Tage Proben

Marker Implantat	ALP	BSP			Col1		OC			ON		OP	
	Fibröse Matrix	Fibröse Matrix	Osteozyten	Fibrozyten	Fibröse Matrix	Fibroblasten	Fibröse Matrix	Min Kn	Osteozyten	Fibröse Matrix	Min Kn	Fibröse Matrix	Osteozyten
G/BMP n=5	1	1,8	0	0	2,8	0	3	3,6	0	2,8	0,4	1,8	0
G n=4	3	3,3	0,3	0	2,8	0,8	2,5	3,5	0,8	1,8	0	3,3	0,8
GK/BMP n=5	2,6	2,2	0	0,6	2,4	0	2,6	4,4	0,6	3,2	0,2	3	0
GK n=4	2,5	2,3	0	0	2,5	0	2,3	3,5	1	2,8	0,5	3,3	0
Leer n=2	0,5	1,5	0	0	2	0	1,5	4	0	1	0	2	0

Nach 168 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Anfärbung. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine hochgradige Färbung .

Um die in den Tabelle vorhandenen Werte zu ermitteln, wird das Präparat unter dem Mikroskop mit Hilfe des oben erwähnten Scores beurteilt, die Zahlenwerte werden zugeordnet und danach durch die Anzahl der Proben gemittelt.

## 4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

### 4.2.1 Sekundärelektronenmodus (Secondary electron mode)

Um angegliederte Zellen und Gewebe, sowie die Veränderungen der Implantatoberfläche, wie z.B. die Struktur oder die Porosität, zu entdecken, wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder im Sekundärelektronenmodus (SE) angefertigt. Ein Implantat jeder der 4 Gruppen wurde vor der Implantation evaluiert. Zusätzlich wurde ein Implantat von jeder Gruppe und jeder Implantationszeit untersucht. Vor der Implantation zeigte die Oberfläche aller Glasimplantate sowohl der beschichteten als auch der unbeschichteten, seichte Vertiefungen (ca. 10 bis 20  $\mu\text{m}$  weit) und parallele Furchen aufgrund des Polierprozesses des Herstellers (Abb. 28). Einige Oberflächen zeigten Risse. Die Oberfläche bleibt nach 28 und 84 Tagen unverändert mit ihren Vertiefungen und parallelen Furchen wie vor Implantation. Bei manchen wurden Risse in der Oberfläche entdeckt. Die Risse wurden als Zeichen der anfänglichen Glaskorrosion interpretiert. Nach 168 Tagen sind die Vertiefungen und die Furchen immer noch sichtbar, dies indiziert eine eher schwache Oberflächenreaktion nach Implantation und kaum Oberflächendegradation (Abb.29).

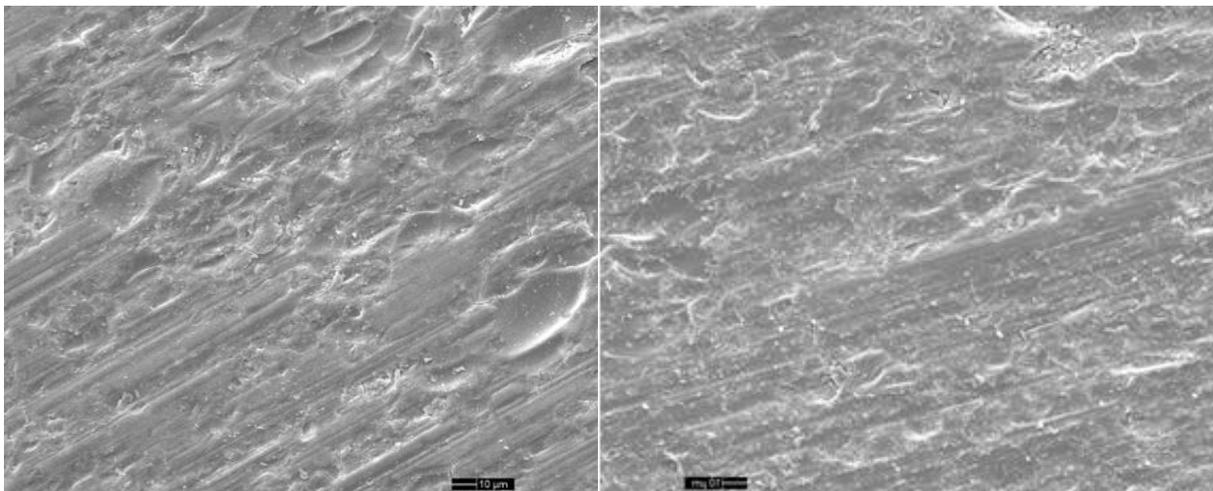


Abb. 28: REM Aufnahme der Oberfläche des G/BMP (links) und G (rechts) vor der Implantation. Oberfläche mit seichten Vertiefungen und parallelen Furchen bei beiden Implantatarten.

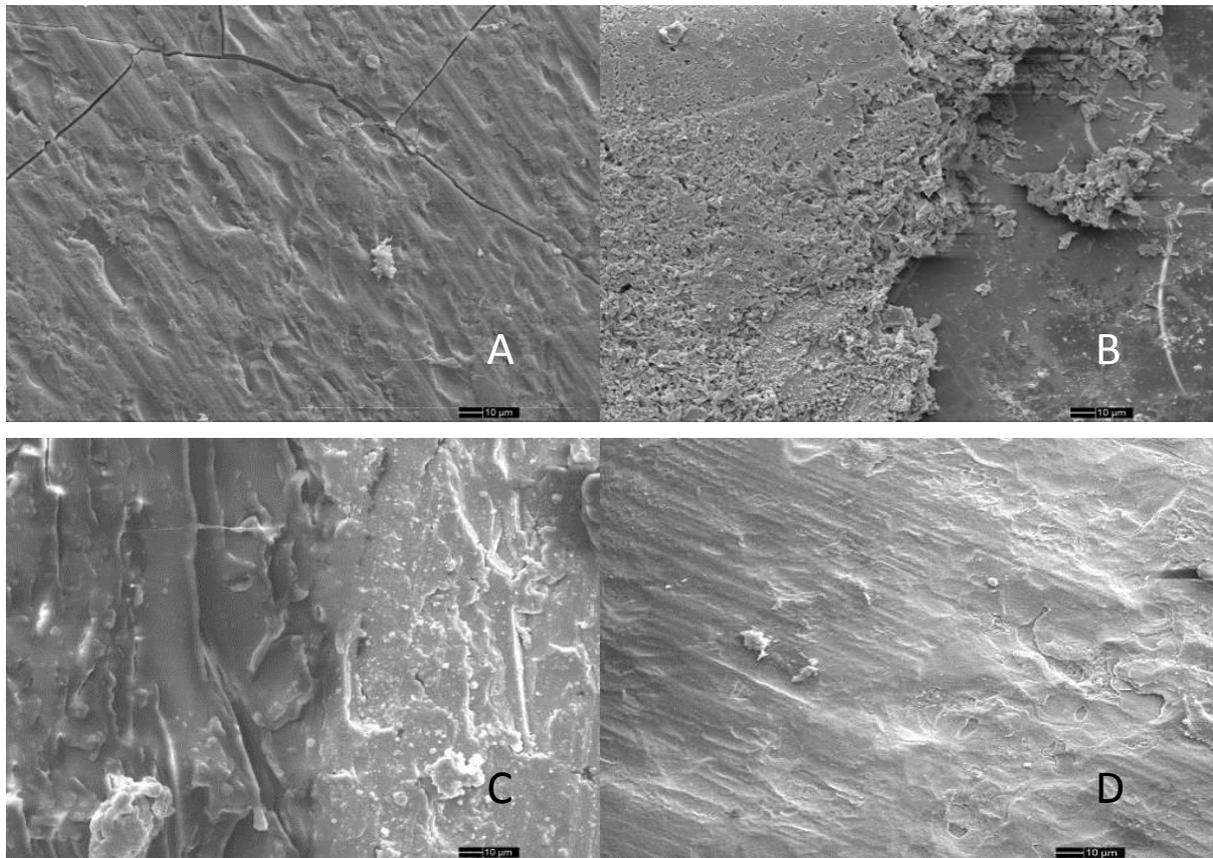


Abb. 29: REM Aufnahme der Oberfläche des G/BMP nach 7(A), 28(B), 84(C) und 168(D) Tagen.

Die Oberfläche zeigt Vertiefungen und parallele Furchen wie auch vor der Implantation. Bei manchen Proben wurden Risse in der Oberfläche beobachtet. Bei (B) zeigt das Bild auch einen Teil Gewebereste. Auch nach 168 Tagen sind noch Vertiefungen und parallele Furchen sichtbar, die auf eine eher geringe Oberflächendegradation hinweisen (Abb.29).

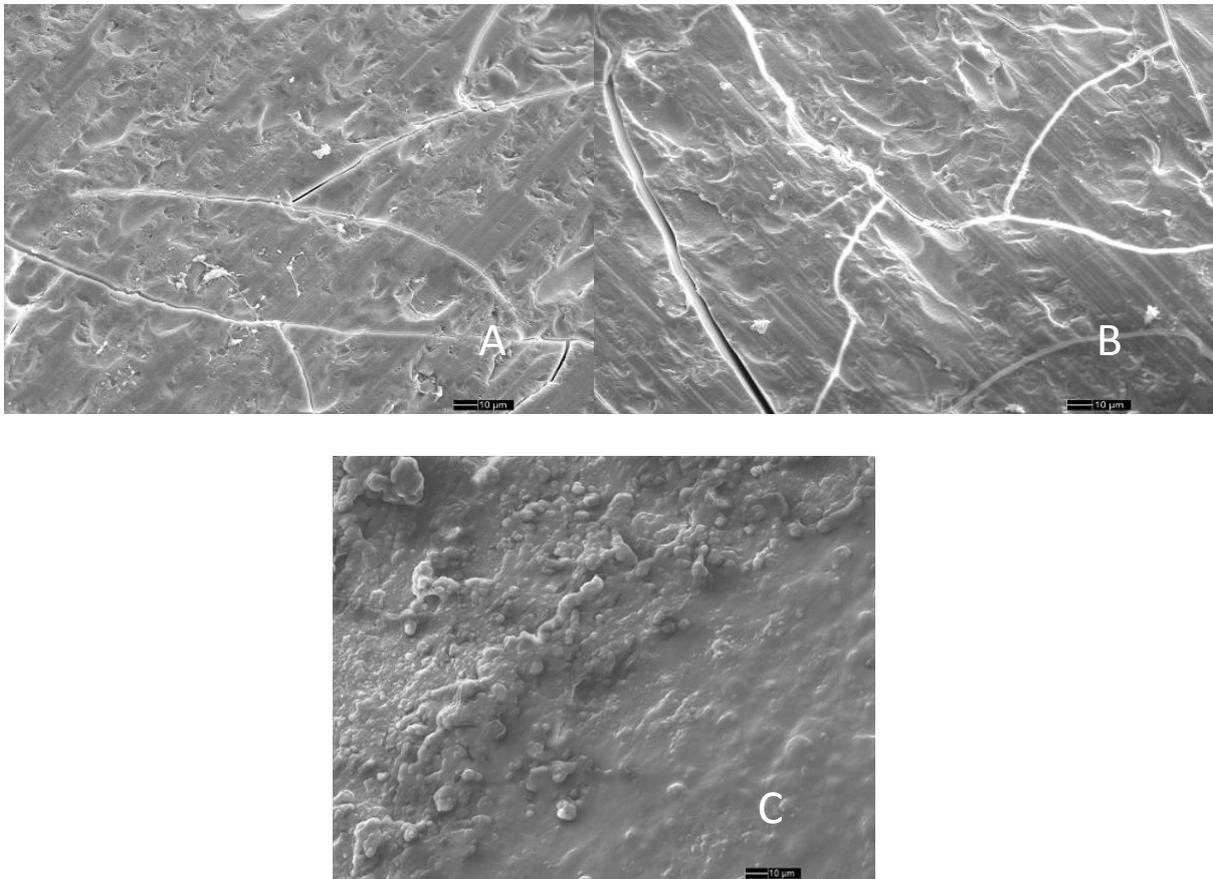


Abb. 30 : REM Aufnahme der Oberfläche des G nach 7(A), 28(B) und 84(C) Tagen.

Die Oberfläche bleibt mit ihren Vertiefungen und parallelen Furchen, die auch schon vor Implantation beobachtet wurden, unverändert. Das Bild von 84 Tagen zeigt eine Bruchfläche innerhalb des Implantates. Die Aufnahme nach 168 Tagen zeigt ebenfalls eine glatte Bruchfläche innerhalb des Implantates und wurde daher nicht abgebildet (Abb. 30).

Glaskeramikimplantate zeigen eine vergleichbare Oberflächentopografie wie die Glas - Implantate. Die Oberflächenstrukturen mit und ohne BMP-Beschichtung vor Implantation zeigten keine deutlichen Unterschiede. Die Oberfläche zeigt parallele Furchen und Oberflächenstrukturen mit einer Höhe von wenigen  $\mu\text{m}$  (Abb. 31).

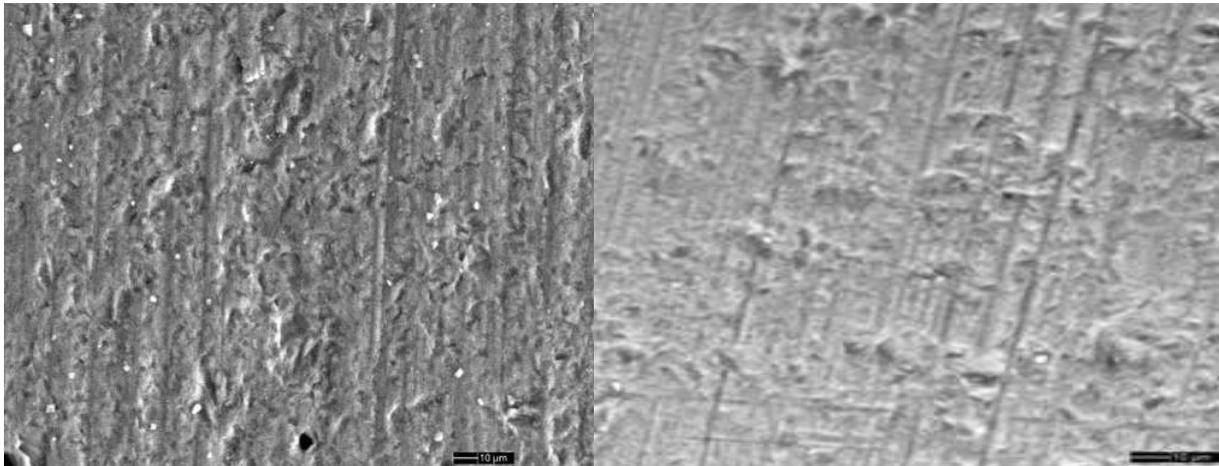


Abb. 31: REM Aufnahme der Oberfläche des GK/BMP (links) und GK (rechts) vor Implantation.

Die Oberfläche zeigt parallele Furchen und Oberflächenstrukturen mit einer Höhe von wenigen  $\mu\text{m}$  (Abb. 31).

Nach 7 Tagen bleibt die Oberfläche unverändert mit parallelen Furchen und Rissen, die auch vor der Implantation bis zu einer Liegezeit von 28 Tagen beobachtet wurden. Nach 28 Tagen war der Großteil der Oberfläche mit anhaftendem Gewebe, Netze aus Fasern und neugeformtem Knochen, bedeckt. Nach 84 Tagen zeigte die Oberfläche deutliche Veränderungen. Eine neu erzeugte Mikrostruktur mit einer Rauigkeit von  $1 \mu\text{m}$  wurde beobachtet. Da die Implantate kristallin waren, scheint es eine Folge von unterschiedlichen Kristallausrichtungen sein, die sich wahrscheinlich aufgrund des Kühlprozesses entwickeln. (Abb. 32).

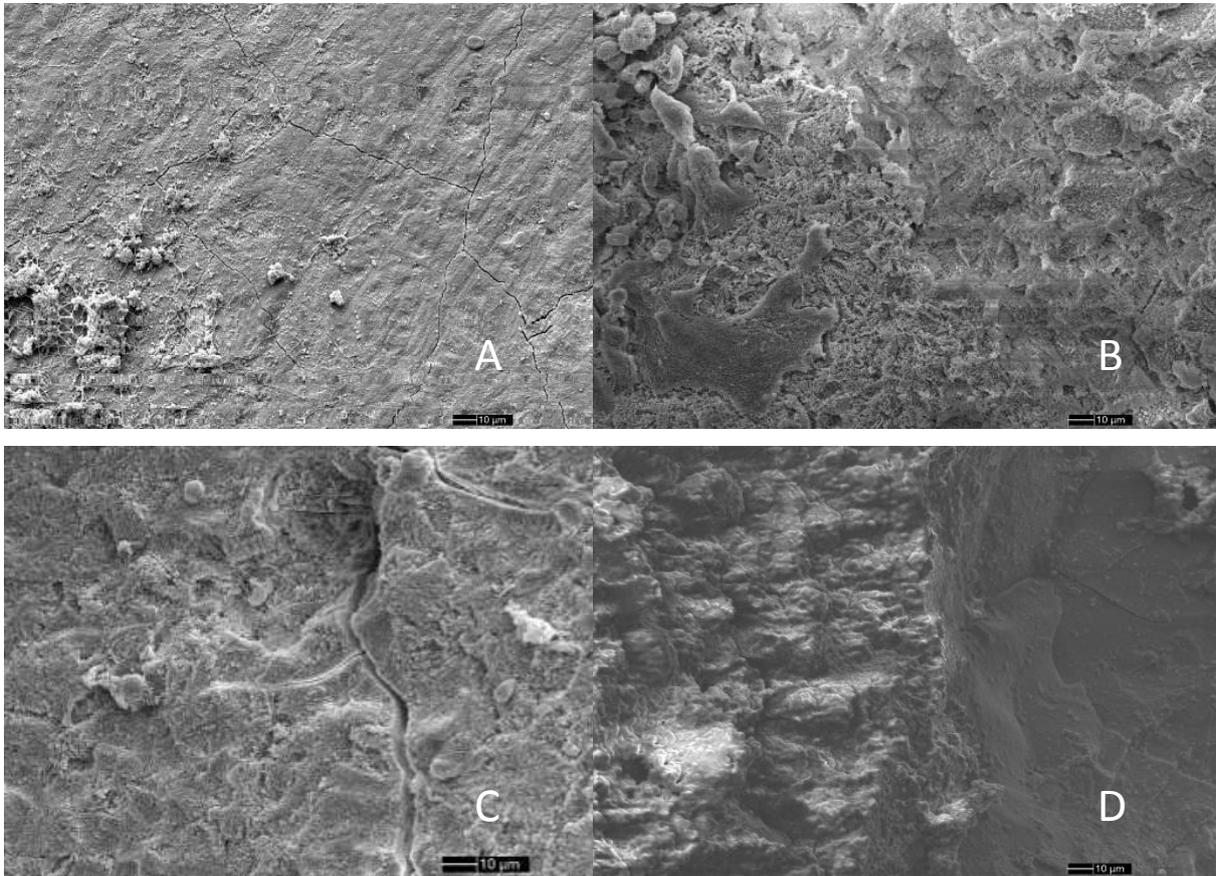


Abb. 32: REM Aufnahme der Oberfläche von GK/BMP 7(A), 28(B), 84(C) und 168(D) Tagen.

Die Oberfläche bleibt unverändert (wie vor Implantation), mit Vertiefungen und parallelen Furchen sowie Rissen, bis 28 Tage. Nach 28 Tagen war der Großteil der Oberfläche mit einem anhaftenden Gewebe, welches neugeformten Knochen enthielt, bedeckt. Nach 84 Tagen zeigte die Oberfläche deutlich sichtbare Veränderungen. Eine neu erzeugte Mikrostruktur mit einer Rauigkeit von  $1\ \mu\text{m}$  wurde beobachtet (C). (D) zeigt eine Bruchfläche (Abb.32).

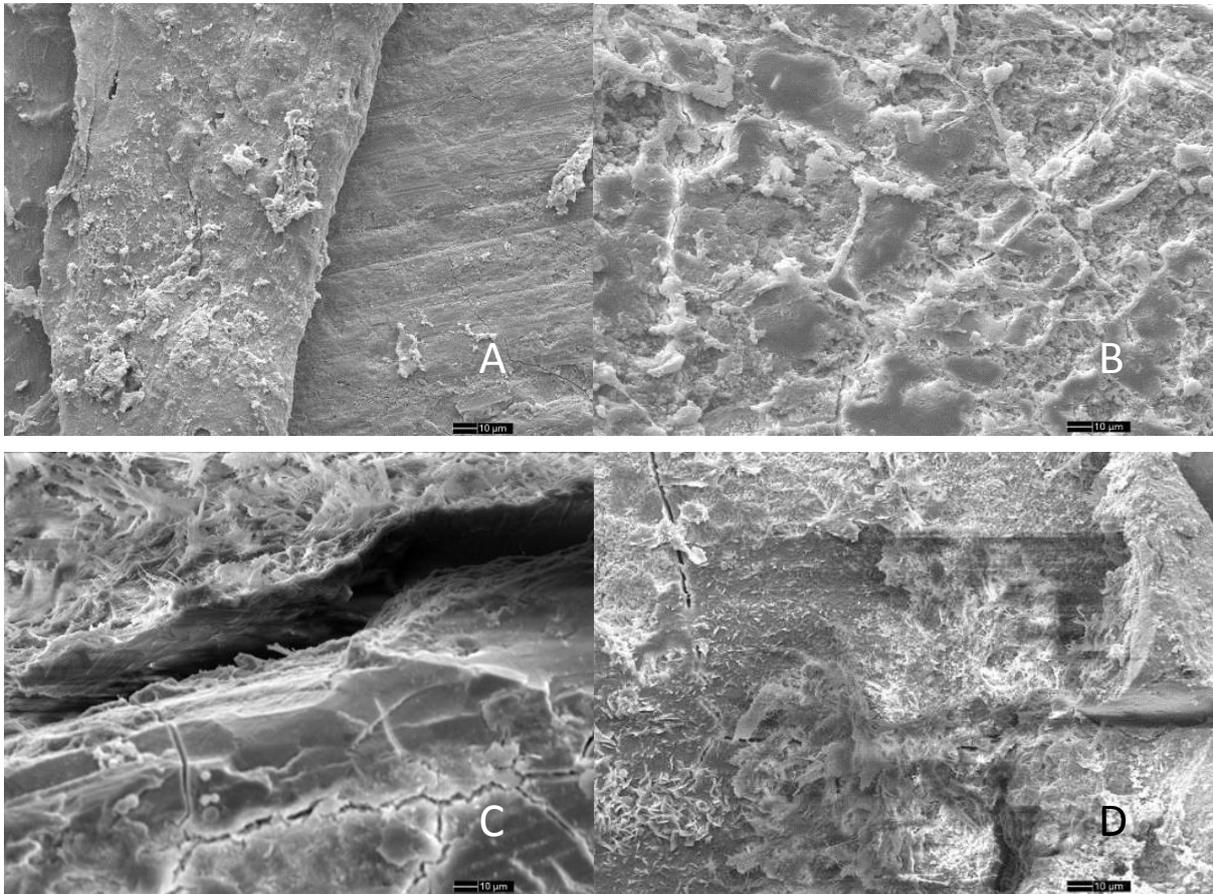


Abb. 33: REM Aufnahme der Oberfläche der Glaskeramik - Implantate ohne BMP nach 7(A), 28(B), 84(C) und 168(D) Tagen.

Nach 28 Tagen war der Großteil der Oberfläche mit einem anhaftenden Gewebe und einem Fasernetzwerk bedeckt. Nach 84 Tagen konnten keine weiteren Veränderungen gefunden werden. Und nach 168 Tagen war das anhaftende Gewebe dichter als zuvor (Abb.33).

#### 4.2.2 Rückstreuelektronenmodus (Backscattered electron mode)

Hier wird die Oberfläche der dünnen Schnitte auf dem Objektträger nach besputtern mit Gold untersucht. Vor allem wird auf Dichteveränderungen der dem Gewebe anliegenden Oberfläche mit Auslaugungen und Auswaschungen sowie Einlagerungen in diese Oberfläche geachtet.

Glas mit BMP: Der Knochenkontakt sowie die Breite der Auslaugungszone steigen mit der Liegezeit, lediglich bei 168 Tagen ist der Knochenkontakt wieder gefallen. Die Auslaugungszone ist jedoch vorhanden.

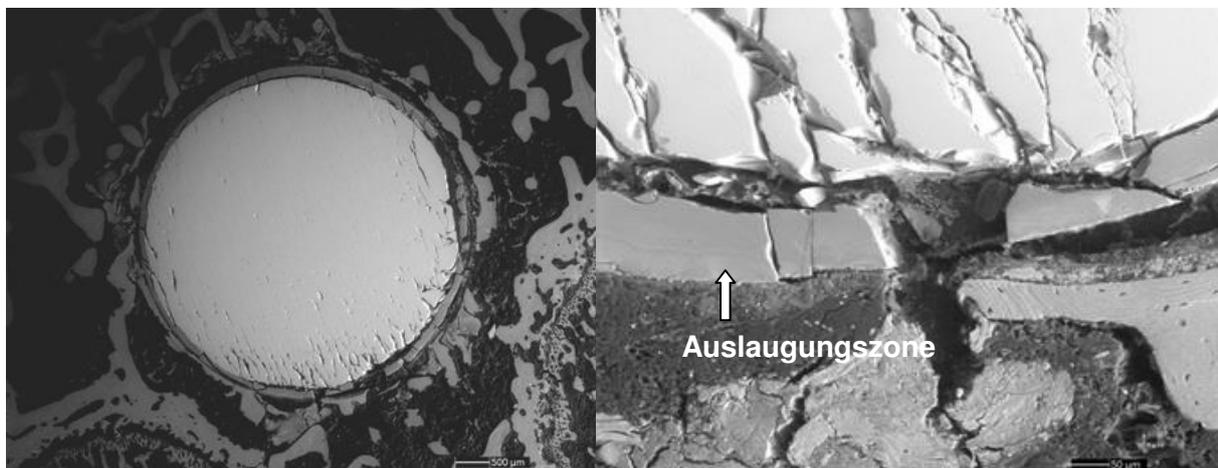


Abb. 34: G/BMP Implantat (7 Tage), breite, graue Auslaugungszone, wenig Implantat-Knochen-Kontakt. Die graue Farbe der Auslaugungszone deutet auf einen Dichteverlust im Vergleich zum Zentrum im Sinne einer Auslaugung hin.

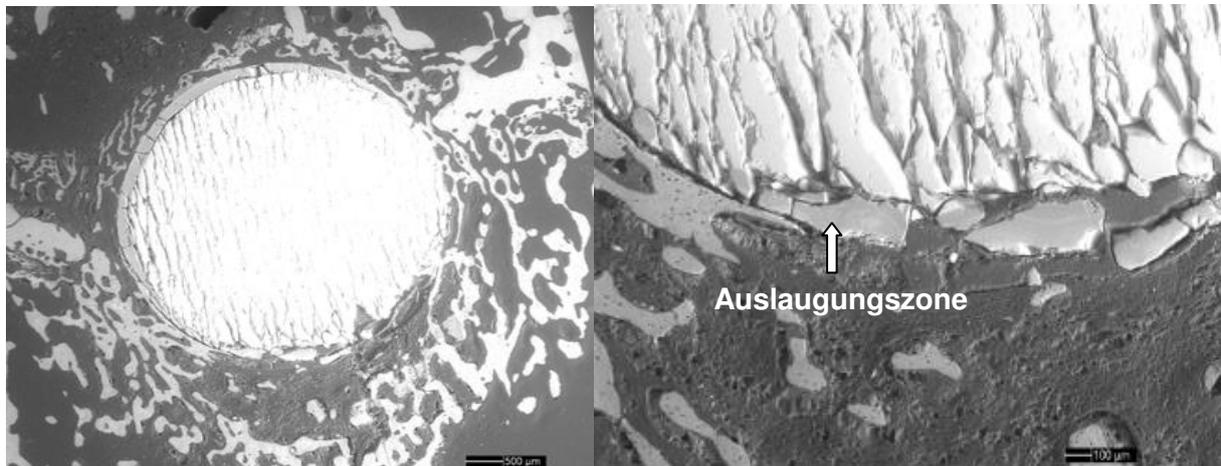


Abb. 35: G/BMP Implantat (28 Tage) mit größerem Implantat-Knochen-Kontakt als in Abb.34, geringere Auslaugungszone.

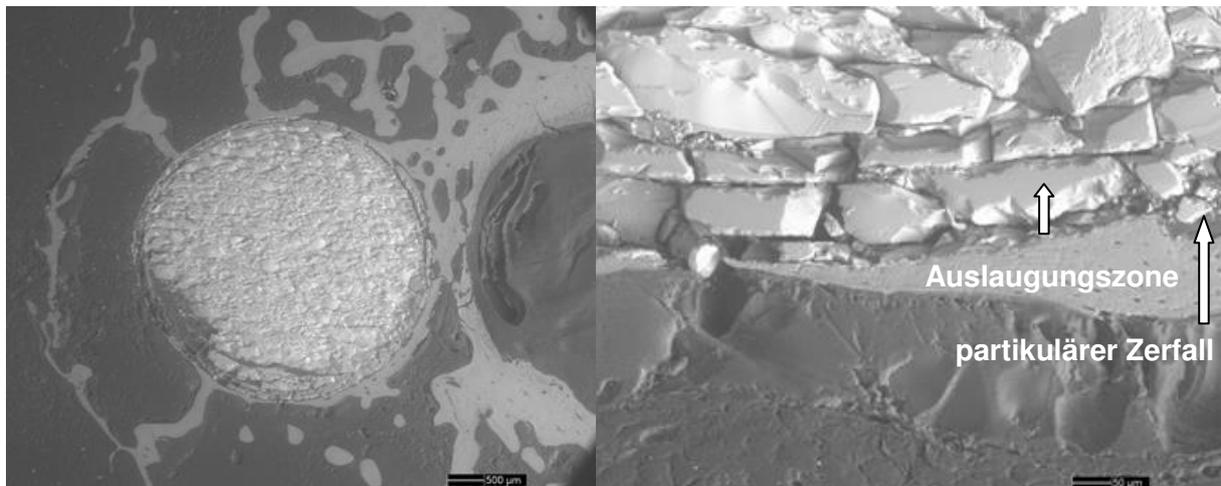


Abb. 35: Das G/BMP Implantat (84 Tage) zeigt einen höheren Implantat-Knochen-Kontakt sowie eine erhöhte Auslaugungszone.

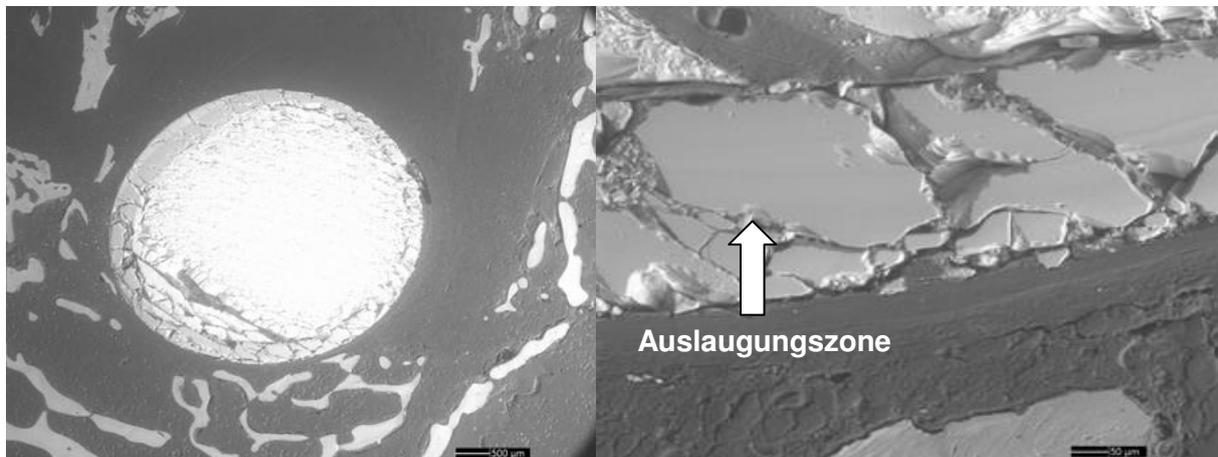


Abb. 36: Implantat G/BMP (168 Tage) Es gibt keinen Implantat-Knochen-Kontakt in dieser Schnittebene, demzufolge ist die Auslaugungszone sehr breit.

Glas ohne BMP: Der Implantat-Knochen-Kontakt steigt im Verlauf der Liegezeit, lediglich nach 84d kommt es zu einer Abnahme. Die Breite der Auslaugungszone steigt mit der Liegezeit. Nach 168d können weiße Anteile in der Auslaugungszone beobachtet werden, welche auf eine Einlagerung hindeuten.

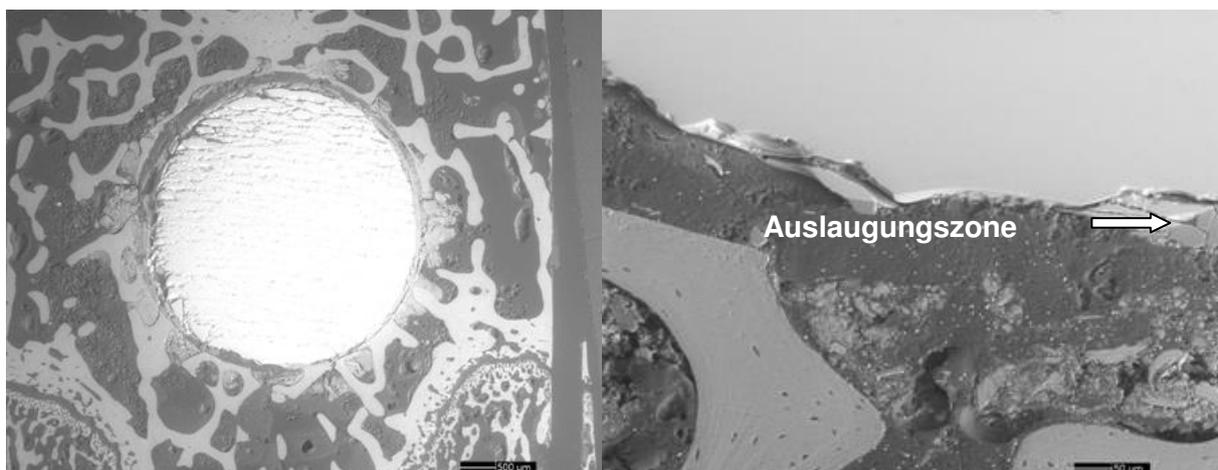


Abb. 37: Implantat G (7 Tage). Wenig Implantat- Knochen- Kontakt, dünne Auslaugungszone.

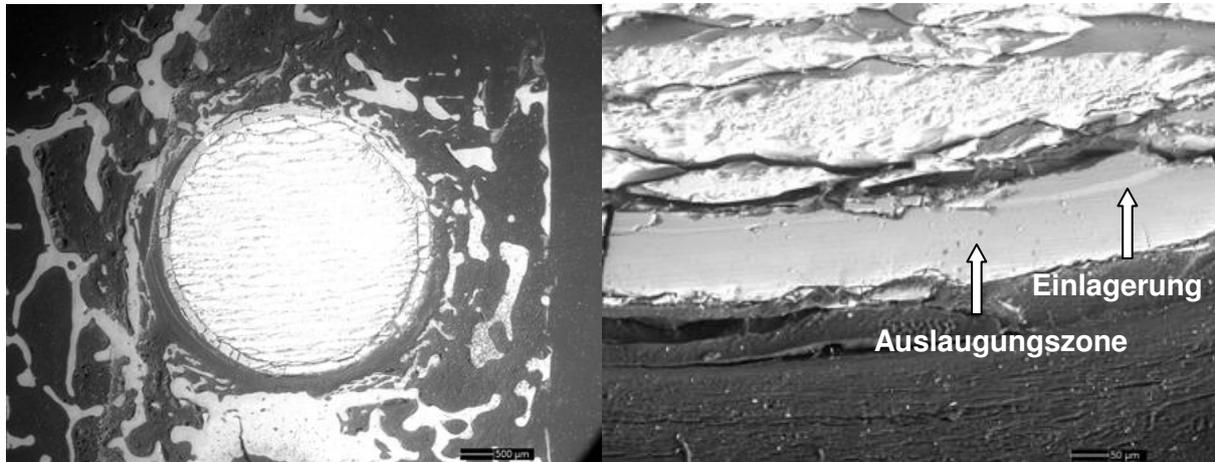


Abb. 38: Implantat G (28 Tage). Erhöhter Implantat-Knochen-Kontakt und breitere Auslaugungszone im Vergleich zu 7 Tage Implantat. Die helleren Anteile deuten auf Einlagerungen hin.

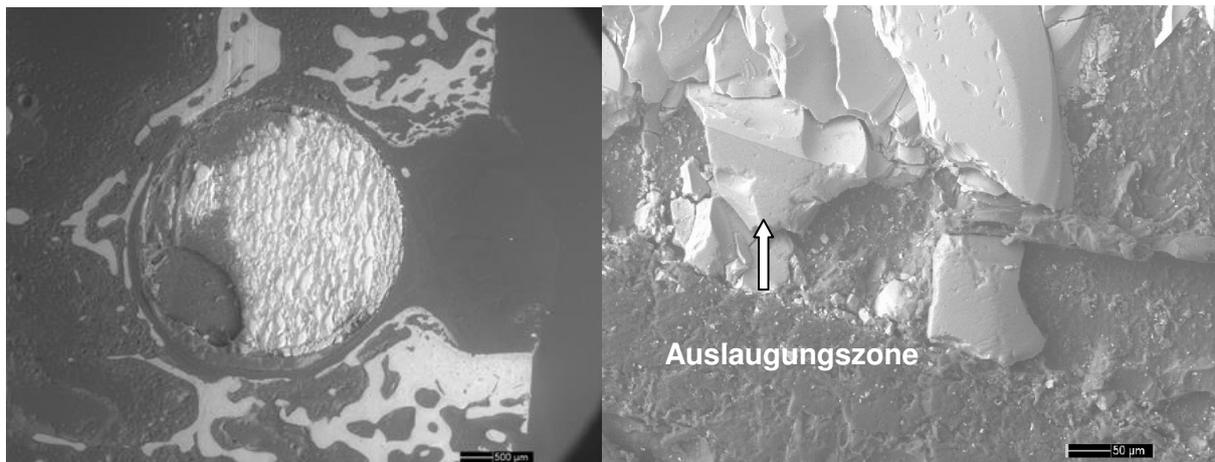


Abb. 39: Implantat G (84 Tage). Vergrößerte Auslaugungszone im Vergleich zum 28 Tage Implantat.

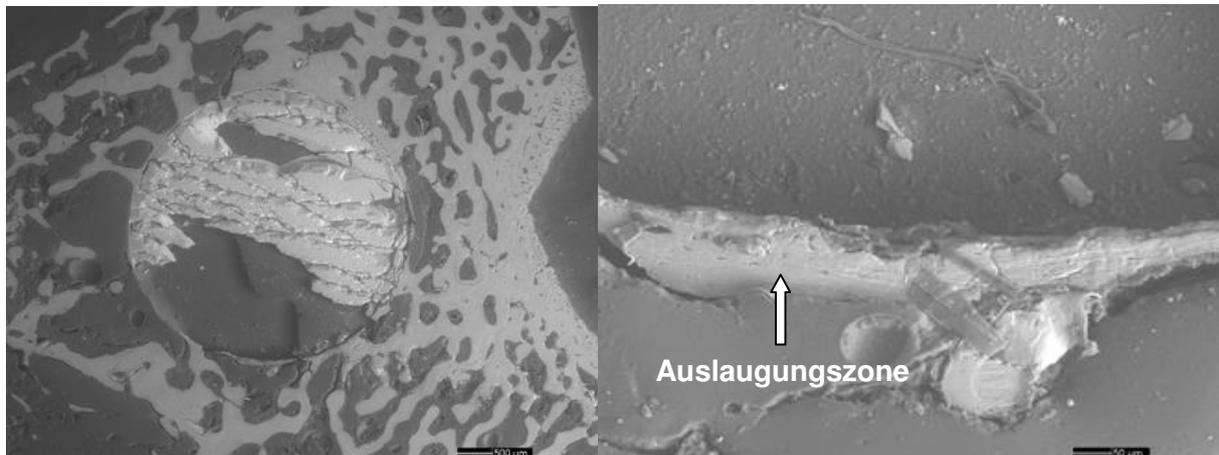


Abb. 40: Implantat G (168 Tage). Höchster Implantat-Knochen-Kontakt, und breiteste Auslaugungszone nach 168 Tagen.

Glaskeramik mit BMP: Der Implantat-Knochen-Kontakt steigt im Verlauf der Liegezeit, lediglich nach 84d kommt es zu einer Abnahme. Am höchsten ist der Implantat-Knochen-Kontakt nach 28d. Die Breite der Auslaugungszone steigt mit der Liegezeit.

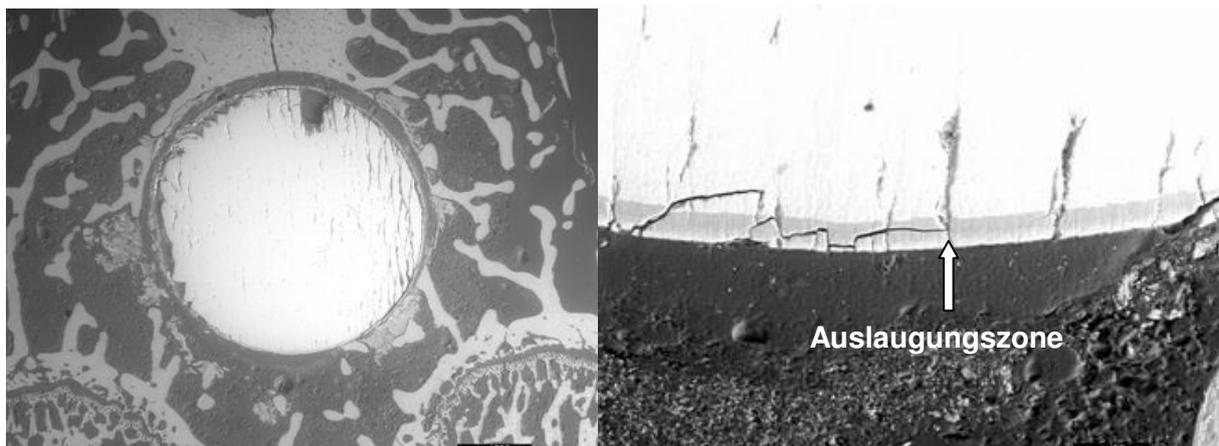


Abb. 41: Implantat GK/BMP (7 Tage). Minimaler Implantat-Knochen-Kontakt, beginnende Dichteverminderung der Implantatoberfläche im Sinne einer Auslaugungszone vorhanden.

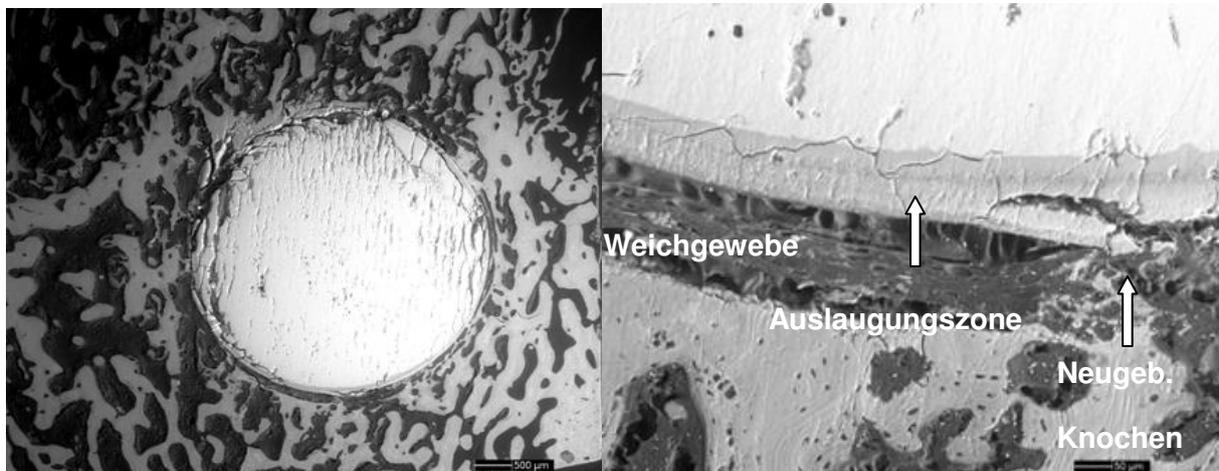


Abb. 42: Implantat GK/BMP (28 Tage). Erhöhung des Implantat-Knochen-Kontaktes sowie Verbreiterung der Auslaugungszone.

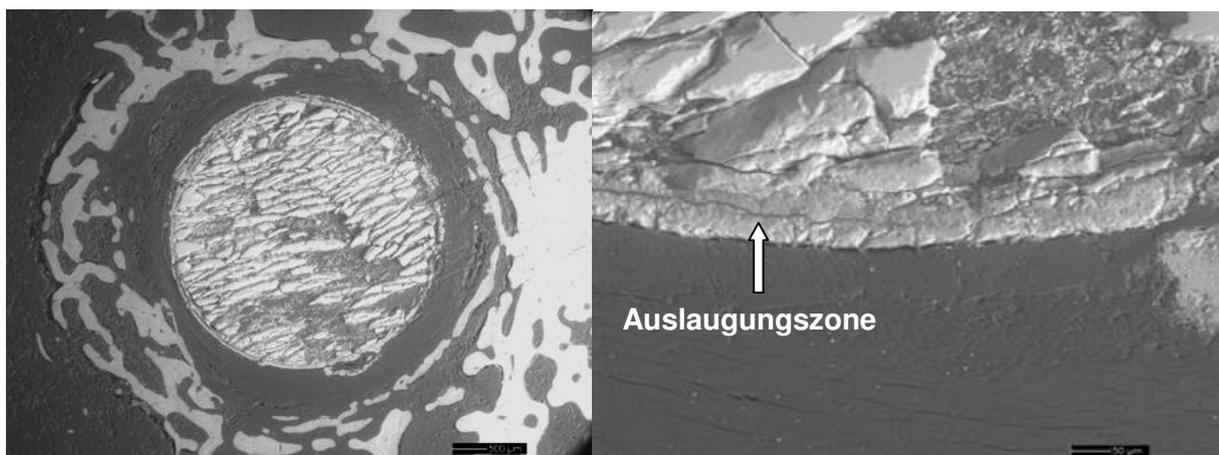


Abb. 43: Implantat GK/BMP (84 Tage). In diesem Schnitt kein Implantat-Knochen-Kontakt messbar, Ursache unklar, verbreiterte Auslaugungszone.

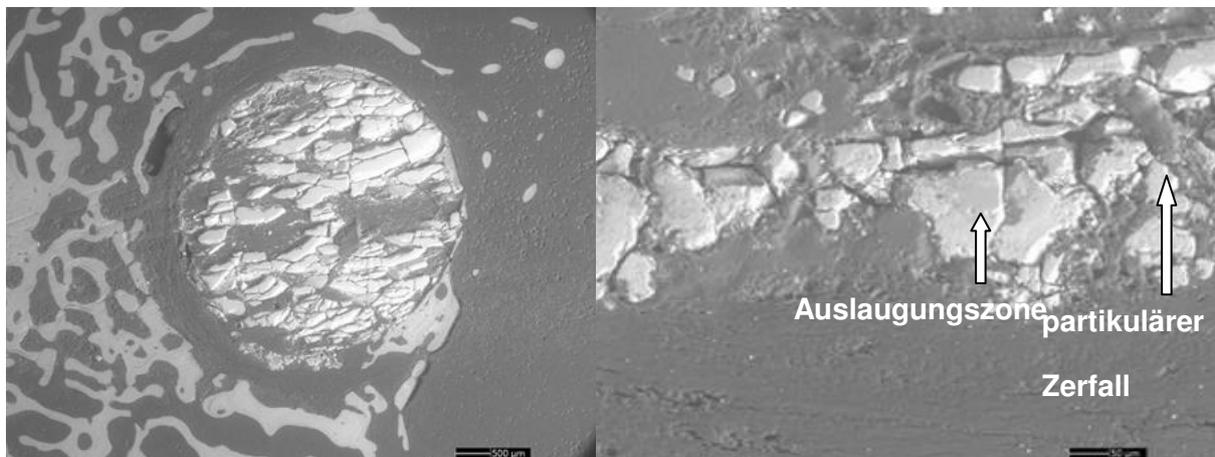


Abb. 44: Implantat GK/BMP (168 Tage). Geringer Implantat-Knochen-Kontakt, Auslaugungszone etwas verbreitert. Diese Zone erscheint aufgelockert, es könnte sich um partikulären Zerfall handeln.

Glaskeramik ohne BMP: Die Breite der Auslaugungszone steigt mit der Liegezeit, und eine Dichtezunahme kann nach 28d beobachtet werden. Es könnte sich hierbei um eine Calciumphosphat-Einlagerung handeln.

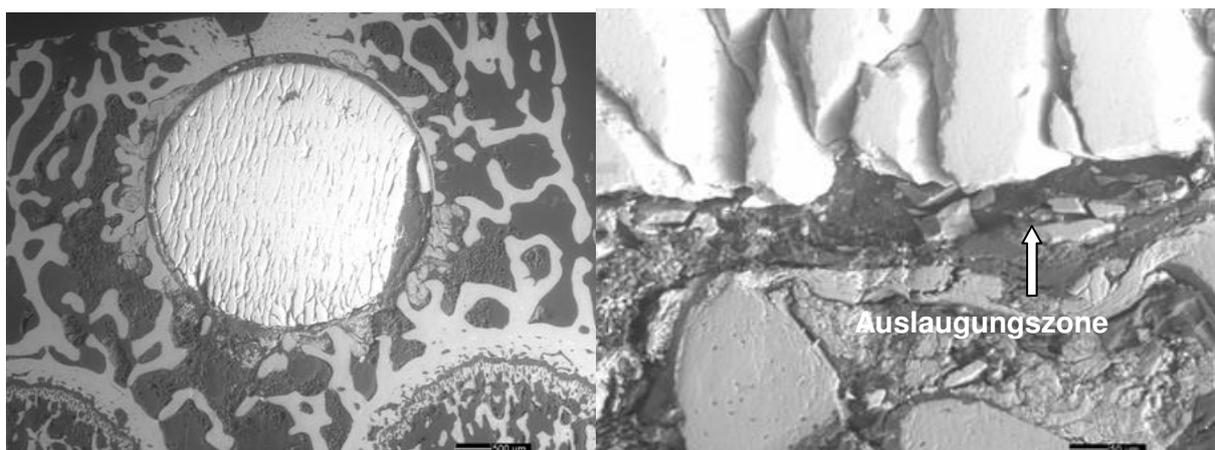


Abb. 45: Implantat GK (7 Tage). Geringer Implantat-Knochen-Kontakt, partikulärer Zerfall der Oberfläche punktuell, einzelne Partikel mit Dichteverminderung vorhanden (grau).

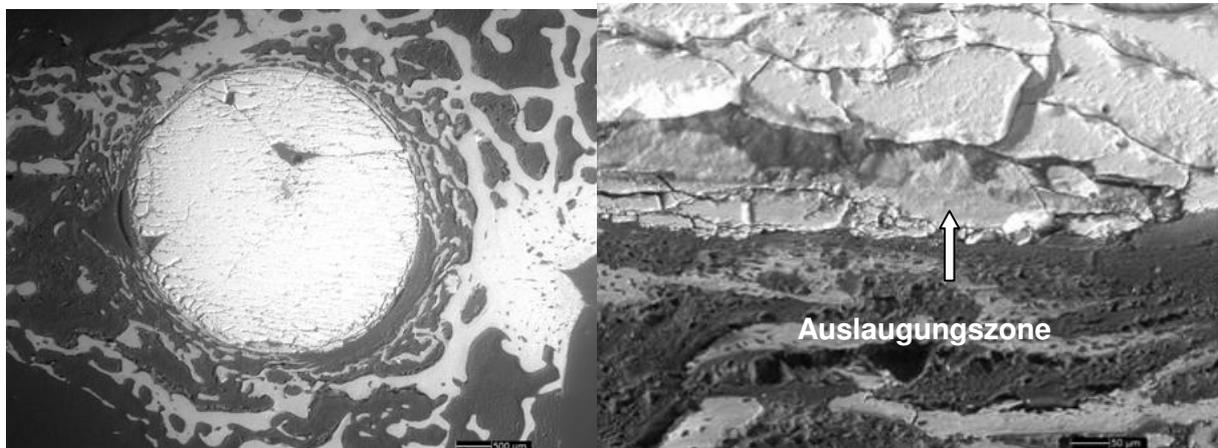


Abb. 46: Implantat GK (28 Tage). Erhöhung des Implantat-Knochen-Kontaktes sowie Verbreiterung der Auslaugungszone. Auslaugungszone besteht aus einzelnen Partikeln, hierbei könnte es sich um partikulären Zerfall handeln.

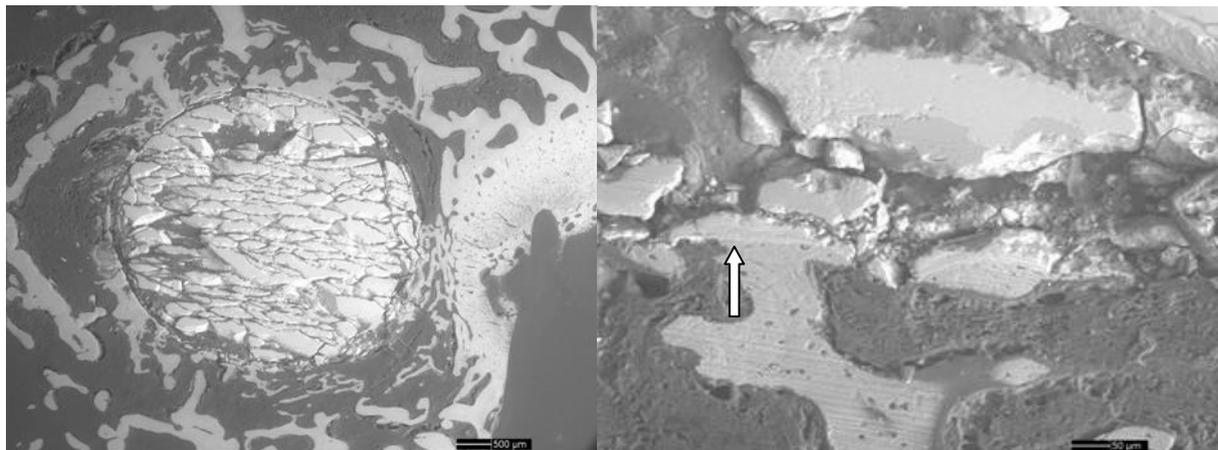


Abb. 47: Implantat GK (84 Tage). Fast zirkulärer Implantat-Knochen-Kontakt, eine abgrenzbare Auslaugungszone ist sichtbar. Partikulärer Zerfall der Oberfläche. Punktuell Knochenkontakt zu diesen Partikeln vorhanden (Pfeil).

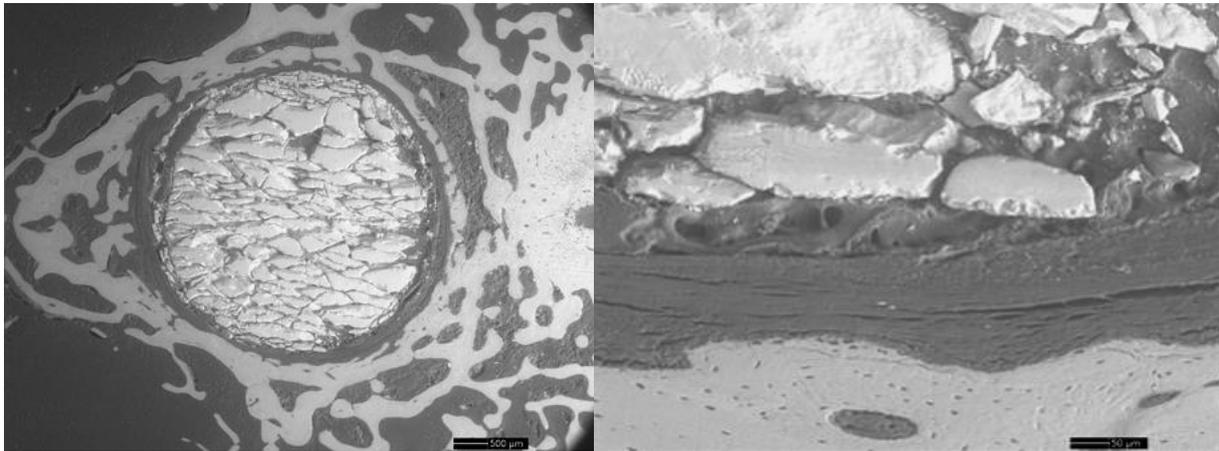


Abb. 48: Implantat GK (168 Tage). Kein Implantat-Knochen-Kontakt, die Auslaugungszone ist nicht sicher abgrenzbar. Es findet sich ein Zerfall einzelner Oberflächenabschnitte in kleine Partikel (rechts).

Die Auslaugungszone war am höchsten nach 168 Tagen bei den Glasimplantaten mit BMP. Es zeigte sich die Tendenz der Erhöhung mit der Liegezeit. Die Auslaugungszonen waren tendenziell breiter bei den Proben mit BMP, und teilweise kam es zur Dichtezunahme in dieser Auslaugungszone.

Tab. 12: Messung der Auslaugungszone der Implantate im  $\mu\text{m}$ . Dichtezunahme innerhalb der Auslaugungszone bei (\*)

Liegezeit Implantat	Auslaugungszone in $\mu\text{m}$			
	7d	28d	84d	168d
G/BMP	117,5	123	145,8	308*
G	72	126	137,8	166,5
GK/BMP	45	61,3*	115,5	139
GK	44,5	90	Konnte nicht ausgemessen werden	Konnte nicht ausgemessen werden

Um festzustellen, ob es durch die Einbettung oder die Färbung mit Giemsa oder von Kossa einen Effekt auf das Implantat gibt, wurden einige der nicht implantierten Implantate eingebettet und mit Giemsa oder von Kossa gefärbt. Außerdem wurden einige Bilder von nicht implantierten und nicht eingebetteten Implantaten zum Vergleich angefertigt.

Es konnte Lichtmikroskopisch kein Effekt der Färbung auf die Proben festgestellt werden.

Es wurden für jede Implantatart und jede Färbung Bilder angefertigt, hier am Beispiel eines G/BMP:

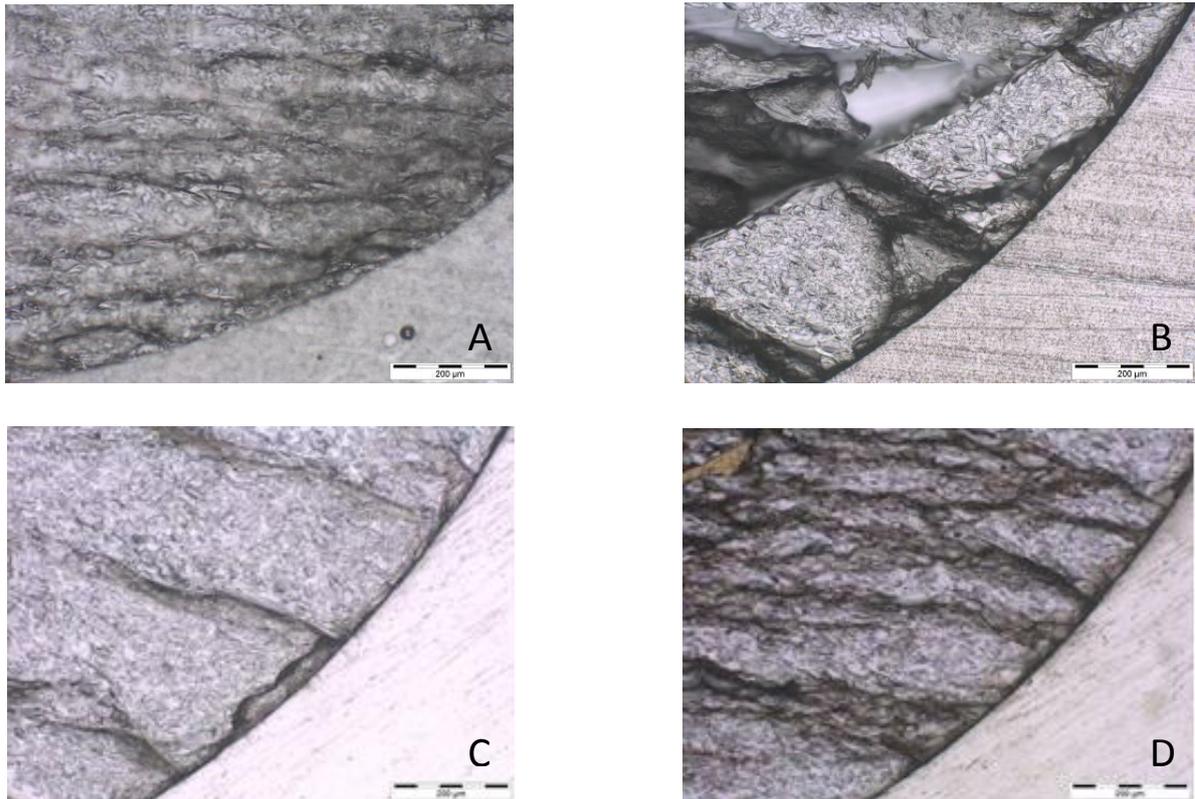


Abb. 49: G/BMP. A = nicht eingebettet, ungefärbt, B = eingebettet, ungefärbt, C = eingebettet, Giemsa-Färbung, D = eingebettet, von Kossa Färbung.

---

## 5 Diskussion

Die Therapie von Knochendefekten sowie von Pseudarthrosen ist schwierig und langwierig. Die dabei entstehenden Kosten sind hoch und belasten somit das Gesundheitssystem. Außerdem stellen diese andauernden und schmerzhaften Behandlungen eine starke psychische und physische Belastung für den Patienten dar, die mit der Dauer der Erkrankung stark ansteigt. Daher müssen weiterhin Materialien und Methoden erforscht werden, die die Knochenheilung verbessern und die Heilungszeit verkürzen, ohne die Nachteile des heutigen Goldstandards, der Spongiosaplastik, zu besitzen.

Für eine beschleunigte Knochenheilung ist eine Stimulation des Knochenwachstums zu gewährleisten. Einen besonders vielversprechenden Ansatz hierfür bietet das rhBMP-2 [Yasko, 1992], [Kirker- Head, 1995], [Kessler, 2003], [Seeherman, 2006]. In der hier vorliegenden Studie werden Glas – (amorphe) und Glaskeramik – (kristalline) Implantate eingesetzt (beide gehören zu den synthetischen anorganischen Knochenersatzmaterialien), die mit rhBMP-2 beschichtet wurden, und der Einfluss dieser rhBMP-2 Beschichtung auf das Knochenwachstum im Kaninchenfemur wurde im Vergleich mit unbeschichteten Implantaten untersucht. Es wurde in einen nahezu trabekelfreien Teil des Femurs implantiert, um mechanische Einflüsse zu minimieren.

Die hier ausgewählten Liegezeiten haben sich bereits für diese Fragestellung bewährt [Müller- Mai, 2001] [Vogel, 2001]. Nach 7 Tagen beginnt die Mineralisation, nach 28 Tagen liegt bereits eine gewisse Knochenneubildung in einem Defekt vor und Anzeichen der Degradation werden erkennbar. Die Untersuchungspunkte 84 und 168 Tage werden benötigt, um die Degradation des Implantates bzw. die Auffüllung des Defektes (Remodeling) mit neuem Knochen zu untersuchen und zu quantifizieren. Nur so ist gewährleistet, dass eine Aussage über den Ersatz des Implantates durch Knochen und über die Kinetik der Knochenneubildung mit BMP im Vergleich zu ohne BMP möglich ist.

Bei den hier verwendeten Materialien handelt es sich um zwei synthetische, anorganische Materialien. Um bioaktives Glas (G) (45S5 Bioglas) und um eine Glaskeramik (GK). Bioaktive Gläser wie z.B. Bioglass® oder das in dieser Studie verwendete Glas, bestehen aus Si, Ca, P und Na [Müller- Mai, Voigt, 2003]. Dass Knochen chemisch an bestimmte bioaktive Glaskompositionen binden kann, wurde 1969 von Hench und Kollegen entdeckt. Laut Hench ist ein Material bioaktiv wenn es eine spezifische biologische Reaktion an der

Schnittstelle des Materials zum Gewebe (Interface) hervorruft, was zu einer Bindung zwischen dem Gewebe und dem Material führt [Hench, 1993]. Besteht Kontakt zur Körperflüssigkeit kommt es zu verschiedenen Degradationsprozessen und zur schnellen Ausbildung einer reaktiven Oberflächenschicht. Es wird angenommen, dass durch diese neugebildete Schicht die Adsorption und die Konzentration von Proteinen und extrazellulärer Knochenmatrix (also die Gewebebindung) gefördert und die Knochenneubildung (tritt bei Bioglass® Partikeln in einer zentripetalen Weise auf) positiv beeinflusst wird [Glass, 2008] [Carter, 2007] [Vogel, 2001]. Allerdings sind Bioaktive Gläser relativ gering mechanisch belastbar. Deshalb kamen in dieser Studie auch die Glaskeramiken zum Einsatz, die durch die Keramisierung von Glas hergestellt werden. Die Keramiken ähneln in ihren Eigenschaften dem Glas, werden allerdings langsamer abgebaut und wirken somit langzeitstabil [Carter, 2007].

Um Glaskeramiken herzustellen werden Gläser erhitzt und dann kontrolliert zum Kristallisieren gebracht. Allerdings können nicht alle Gläser zu einer Glaskeramik kristallisiert werden. Manche Gläser sind zu stabil, andere wiederum kristallisieren zu unkontrolliert, was zu einer unerwünschten Mikrostruktur führt.

Eine Glaskeramik ist nicht komplett kristallin sondern besteht auch aus einem Rest Glas, der sich allerdings von dem Ausgangsglas unterscheidet [Rawlings, 1992].

Die hier verwendeten Gläser und Glaskeramiken wurden sowohl mit als auch ohne eine rhBMP-2 Beschichtung implantiert. Um ein Abscheren der Beschichtung (Coating) zu verhindern, wurde auf Press-fit verzichtet. Der Bohrlochdurchmesser wurde also etwas größer angelegt als die Durchmesser der Implantate, dadurch konnten diese leichter in das Implantatlager verbracht werden ohne dass BMP abgeschert wurde.

Dieses Tiermodell ist in der Literatur weit verbreitet und akzeptiert, so dass Vergleichsdaten von der Testung anderer Materialien in ausreichender Zahl vorliegen [Vogel, 2001] [Müller-Mai, 1990]. Das Kaninchen als Versuchstier zur Testung der Glas- und Glaskeramikimplantate erwies sich als gut geeignet, da eine ausreichende Defektgröße („critical size“) gesetzt werden konnte. Um Implantate testen zu können, muss ein „Critical Size Defect“ angelegt werden. Dieser wird nach Hollinger definiert als ein Defekt, der weniger als 10 % Knochenregeneration während der Lebensspanne des Tieres erlangt.

---

Wenn dieser Zustand nach einem Jahr ohne Implantation von Knochen oder Implantaten noch nicht erreicht wurde wird angenommen, dass in der Restlebensspanne des Probanden der Defekt nur mit Bindegewebe überbrückt wird [Hollinger, 1990].

Um den Einfluss eines Implantates auf die Knochenheilung zu testen müssen viele Kriterien erfüllt sein. Zunächst muss die notwendige Mindestgröße des Defektes ermittelt werden, die wiederum von einigen Faktoren wie z.B. der Spezies, dem Alter des Versuchstieres und der Lokalisation abhängig ist. Der Defekt muss außerdem von biomechanischen Einflüssen weitgehend unabhängig sein. Werden die biomechanischen Einflüsse nicht weitgehend ausgeschlossen, können sie die Heilung je nach Einwirkung stimulieren oder behindern. Zudem muss beachtet werden, dass bei jugendlichen Tieren die Knochenheilung besser als bei erwachsenen Tieren ist, und somit das Ergebnis verfälscht werden würde.

In dem Modell dieser Studie sind die oben angeführten Kriterien erfüllt. Die Implantation erfolgte im distalen Femur der Kaninchen in sagittaler Richtung, in einen Ort zwischen die Femurkondylen, der physiologisch weitgehend frei von Trabekeln ist. Damit erfolgte die Implantation also an einem Ort der weitestgehend von biomechanischen Einflüssen frei ist und ohne Implantat nicht durchbaut und somit die Kriterien eines „Critical Size Defects“ erfüllt [Müller-Mai, 2003(b)].

An einem solchen Tiermodell wurde auch 1998 von Günther et. al. ein Versuch durchgeführt bei dem unterschiedliche Knochenersatzstoffe in Granulatform histomorphologisch untersucht wurden. Auch hier kam es schon nach 2 Wochen zur Bildung von erstem Geflechtknochen bei allen Implantaten [Günther, 1998].

Auch Oonishi et. al. benutzte 1999 ein ähnliches Tiermodell für die Testung von verschiedenen Biokeramiken. Allerdings wurden die Implantate hier in den belasteten trabekulären Knochen eingesetzt, und somit entsprach dieses Modell nicht den oben genannten Kriterien und die Ergebnisse können nicht direkt verglichen werden [Oonishi, 1999].

Die Einheilung und die Knochenbildung wurden hier mittels Lichtmikroskopie, Histomorphometrie, Immunhistochemie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Mittels

Lichtmikroskopie und Histomorphometrie wurde nach 7 Tagen sowohl bei dem Glas als auch bei den Glaskeramiken nur wenig Implantat-Knochen-Kontakt gesehen. Knochen fand sich nur an Stellen, wo altes Knochengewebe die Implantatoberfläche berührte. Die Lücke, die nach einer Liegezeit von 7 Tagen beobachtet wurde, könnte möglicherweise durch den Verzicht auf „Press-fit“ also aufgrund des leicht größeren Durchmessers des Bohrloches im Vergleich zum Durchmesser des Implantates zustande gekommen sein. Diese Vorgehensweise wurde, wie oben erwähnt, benutzt um ein Abscheren der BMP-Beschichtung zu verhindern. Die Lücke zwischen dem alten präexistierenden Knochen und dem Implantat war durchschnittlich 101,7 µm breit. Diese Lücken waren bei einigen Schnitten mit Weichgewebe gefüllt und bei anderen komplett frei, wahrscheinlich aufgrund eines Artefaktes, der auf Schrumpfen und/oder Schneiden zurückzuführen ist. Um den Knochenkontakt herzustellen, muss dieser Spalt überbrückt werden. Im Bohrloch wurden keine neuen Knochen trabekel beobachtet, was auf die kurze Liegezeit zurückzuführen ist. Deutliche Unterschiede der Gewebereaktion zwischen Glas und Glaskeramik Implantaten oder zwischen beschichteten und unbeschichteten Implantaten wurden nicht beobachtet (Abb. 8-11). Die Leerdefekte nach 7 Tagen zeigten nur wenig neugebildeten Knochen.

Nach 28 Tagen waren einige Knochen trabekel zu sehen, der höchste Implantat-Knochen-Kontakt war vorhanden bei den Gläsern mit BMP Beschichtung, an zweiter Stelle kamen die Glaskeramiken mit BMP Beschichtung, dann die Gläser ohne BMP und am wenigsten Kontakt bestand bei Glaskeramiken ohne BMP (Abb. 12-15). Die Leerdefekte nach 28 Tagen zeigten nur wenig neugebildeten Knochen.

Nach 84 Tagen bestand immer noch der höchste Implantat-Knochen-Kontakt bei den Gläsern mit BMP Beschichtung, an zweiter Stelle kamen nun aber die Glas-Implantate ohne BMP Beschichtung, dann die Glaskeramiken ohne BMP und zuletzt die Glaskeramiken mit BMP (Abb. 16-19).

Auch nach 168 Tagen lag der höchste Implantat-Knochen-Kontakt bei den Gläsern mit BMP Beschichtung (Abb. 20-23).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zunächst bei den Implantaten mit BMP Beschichtung mehr Implantat-Knochen-Kontakt entstand. Nach 84 bis 168 Tagen jedoch gibt

---

es vergleichbar viel oder sogar erhöhten Knochenkontakt bei den jeweiligen Implantaten ohne BMP.

Weiter ist festzustellen, dass der höchste Implantat-Knochen-Kontakt immer bei den Gläsern vorliegt (Tab. 7). Die Gläser verhalten sich wie erwartet und wachsen schnell ein, während die Glaskeramiken eher unvorhersehbare Ergebnisse liefern.

In einer Studie von Oonishi et. al. wurde ebenfalls im Kaninchenmodell in den Femurkondylen die Knochenproliferation bei Implantation von bioaktivem Glas, synthetischem Hydroxylapatit sowie bioaktiven Glaskeramiken verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass das Bioglas schneller als die anderen Implantate Knochen produzierte [Oonishi, 2000]. Auch molekularbiologisch wurde festgestellt, dass bioaktives Glas eine hohe Knochen-bildungs- und -resorptionsrate induziert [Välimäki, 2006]. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Beobachtungen dieser Studie überein.

Da auch nach Einbau von beispielsweise einem künstlichen Gelenk Spalten zwischen Implantat und Knochen verbleiben, spielt die Spaltüberbrückungsleistung des Knochens eine wichtige Rolle. Im Jahre 2001 wurde eine Studie von Lichtinger et. al. durchgeführt, bei der der Effekt von rhBMP-2 bei einer solchen Spaltüberbrückung mikroradiografisch und histologisch untersucht wurde. Es wurden nicht belastete Titanimplantate in die Femurkondylen von Schafen eingesetzt. Die mit rhBMP-2 behandelten Implantate zeigten eine erhöhte Knochenbildung und eine bessere Integration als die Implantate ohne Beschichtung. Nach 4 Wochen gab es bei den Implantaten mit rhBMP-2 eine kräftige zirkumferente Knochenbildung; allerdings erreichte der neugebildete Knochen noch nicht das Implantat und auch Knochenbrücken fehlten. Bei den Implantaten ohne rhBMP-2 gab es nur wenig neugebildeten Knochen, eine deutliche Lücke und keinen Kontakt zwischen Knochen und Implantat. Nach 9 Wochen war die Lücke um die mit rhBMP-2 beschichteten Implantate mit Knochen aufgefüllt und das Implantat knöchern integriert, während bei den Implantaten ohne BMP nur kleine Knochenfüßchen den Spalt überbrücken und eine dünne Knochenschicht das Implantat weitgehend umschließt [Lichtinger, 2001]. Diese Erkenntnisse stimmen mit denen in dieser Studie erhobenen Resultaten überein. Hier waren nach 28 Tagen bei den Gläsern mit der BMP Beschichtung die höchsten Knochenkontakte zu erkennen.

Die Heilung von 3 mm Spalten zwischen Knochen und Implantat wurde auch in einer Arbeit von Sumner et. al. untersucht. Hier wurden die Testimplantate mit unterschiedlichen rhBMP-2 Dosen (100, 400 und 800 µg/Implantat) beschichtet und mit Implantaten ohne BMP Beschichtung verglichen. Die Implantate mit BMP wurden in den linken Humerus, diejenigen ohne Beschichtung wurden in den rechten Humerus der Tiere implantiert. Nach 4 Wochen wurden die Proben entnommen. Das Einwachsen des Knochens in die Implantate war signifikant erhöht bei den Implantaten mit BMP, am höchsten bei der 100µg/Implantat Gruppe. Alle drei Dosisgruppen zeigten signifikant mehr Knochen im Spalt um die Implantate als die Kontrollgruppe ohne BMP Beschichtung. Der stärkste Effekt hinsichtlich der Knochenbildung konnte in der 800 µg Gruppe beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Applikation von BMP-2 auf Implantate die Spaltheilung und das Knocheneinwachsen stimuliert [Sumner, 2004]. Auch in unserer Studie konnte nach 28 Tagen festgestellt werden, dass die Implantate mit BMP Beschichtung mehr Knochen-Implantat Kontakt aufwiesen als diejenigen ohne.

In den immunhistochemischen Proben konnte bereits nach 7 Tagen in der fibrösen Matrix bei allen 4 Implantatarten eine Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Färbung gesehen werden. Osteoblasten waren nur bei den Implantaten mit BMP bei einzelnen Schnitten geringgradig angefärbt. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine mittelgradige Färbung.

Auch nach 28 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Anfärbung. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine mittelgradige Färbung außer bei den Gläsern, dort war die Färbung geringgradig.

Nach 84 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis hochgradigen Anfärbung, wobei sich die hochgradige Anfärbung bei den Schnitten mit OC Antikörper fand. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine gering- bis mittelgradige Färbung.

Nach 168 Tagen zeigte die fibröse Matrix bei allen 4 Implantatarten die Tendenz zur gering- bis mittelgradigen Anfärbung. Die mineralisierte Knochenmatrix zeigte in der Färbung mit dem Antikörper OC bei allen Implantatarten eine hochgradige Färbung.

---

Bei der immunhistochemischen Auswertung der Proben konnte kein quantifizierbarer Einfluss von BMP beobachtet werden. Es konnten aber auch keine negativen, im Sinne von knochenwachstumsstörenden Einflüsse festgestellt werden. Die Anfärbung von Osteoblasten auch bei den langen Liegezeiten war gering- bis mittelgradig.

In einer Studie von Knabe et. al. aus dem Jahr 2005 wurde der Einfluss von Glaskeramiken auf die Ausscheidung von Knochenspezifischen Genen und Proteinen aus von menschlichen Knochenzellen gezüchteten Zellen (HBDC<sup>11</sup>) untersucht und verglichen mit dem Einfluss von Tricalciumphosphat (TCP). Man ließ die HBDC 3,5,7,14 und 21 Tage auf den verschiedenen Substraten wachsen und untersuchte sie auf verschiedene knochenspezifische mRNAs und Proteine: Col 1, OC, OP, ON, AP und BSP. Bis zum 3. Tag bewirkte die Glaskeramik mit einer kristallinen Phase eine signifikante Steigerung der mRNA Ausscheidung von Col1, ALP, OP, OC und ON. Bis Tag 7 und Tag 14 war eine Steigerung der mRNA und der Proteinausscheidung für OP, OC und ON zu erkennen und bis zum 21. Tag eine Erhöhung der mRNA Ausscheidung für ALP, OP und OC [Knabe, 2005].

Die Ergebnisse am Tag 7 in der von uns durchgeführten Studie zeigten eine gering- bis mittelgradige Aktivität aller Proteine in der fibrösen Matrix des Knochens, Auch die Osteoblasten zeigten bei den G/BMP eine geringgradige Aktivität der ALP und bei den GK/BMP eine geringgradige Aktivität des ONs. Die Aktivität von OC war in der mineralisierten Knochenmatrix von den G, den GK und GK/BMP mittelgradig und geringgradig bei den G/BMP.

Bei der REM gab es zwei Arten von Untersuchungen zum einen die Oberflächenanalyse der Struktur im Sekundärelektronenmodus (SE) und zum anderen eine Oberflächenanalyse der Dichte im Rückstreuелеktronenmodus (BSE). Durch die REM Untersuchung im Sekundärelektronenmodus konnte eine leicht veränderte Oberflächenstruktur der kristallinen Proben festgestellt werden.

Im Sekundärelektronenmodus wurden die Oberflächenstruktur sowie die Porosität des Implantates beurteilt. Vor der Implantation konnten an den Oberflächen der Gläser und der

---

<sup>11</sup> HBDC= Human bone derived cells

Glaskeramiken keine Unterschiede festgestellt werden. Die Gläser zeigten auch nach den verschiedenen Liegezeiten eine eher geringe Oberflächenreaktion und kaum eine Oberflächendegradation. Die Glaskeramiken zeigten nach 7 Tagen noch keine Veränderungen, nach 28 Tagen war anhaftendes Gewebe sowie neugebildeter Knochen erkennbar. Nach 84 Tagen zeigte die Oberfläche deutliche Veränderungen und zwar eine Rauigkeit, die wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Kristallausrichtungen der Glaskeramiken zustande kommt, die wiederum auf den Kühlprozess zurückzuführen ist.

Im Rückstreuелеktronenmodus wird die Dichte des Implantates untersucht. Hierbei wird eine weiße Fläche als dichte, unveränderte (meist im Zentrum des Implantates) Oberfläche interpretiert. Eine graue Fläche weist auf einen weniger dichten Teil hin. Weichgewebe (z.B. Bindegewebe) wird schwarz dargestellt. Bei der Untersuchung der Proben konnte eine zunehmende Auslaugungszone am Implantatrand und ein partikulärer Zerfall, sowie abschnittsweise linienförmige Einlagerungen in die Auslaugungszone mit höherer Dichte in dieser Auslaugungszone festgestellt werden. Die Auslaugungszone nimmt mit der Zeit an Breite zu und ist bei den Gläsern allgemein breiter und ist am breitesten bei Implantaten mit BMP Beschichtung.

Bei dieser Auslaugungszone mit der Einlagerung (evtl. Calciumphosphat) handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Apatitschicht, die bei oberflächenaktiven Gläsern und Glaskeramiken auftritt, und die auf eine chemische Bindung an den Knochen hindeutet. Die Bildung dieser Apatitschicht ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, dass Gläser und auch Glaskeramiken an Knochen binden.

Diese Auslaugungszone konnte auch in einer Studie von Gross 1990 mit REM Untersuchungen beobachtet werden. Sieben Tage postoperativ konnte die beginnende Auslaugung und Korrosion der Implantate gezeigt werden. Allerdings wurden in seiner Studie nur Glaskeramiken und Hydroxylapatite untersucht [Gross, 1990].

Ebenfalls ausgemessen wurde der Knochenkontakt. Dieser war bei den Gläsern höher als bei den Glaskeramiken, zudem war er höher bei den Proben mit BMP Beschichtung. Allerdings wurde hier nur ein Schnitt ausgemessen.

---

Die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop im Rückstreuелеktronenmodus wurde auch in einer früheren Arbeit von Boyde et. al. genutzt, um Oberflächenveränderungen von Gläsern und Glaskeramiken im Knochen zu untersuchen. Er zeigte die Vorteile dieser Untersuchung auf, die in der einfachen Interpretation der erlangten Bilder liegen. Außerdem kann alter und neuer Knochen einfach voneinander unterschieden werden, und die sequenziellen Veränderungen der implantierten Materialien können verglichen werden. Er konnte bei den Glaskeramiken nach 7 Tagen deutliche kristalline Strukturen erkennen. Diese konnten bei unseren Untersuchungen nicht festgestellt werden [Boyde, 1990].

Das Knochenbildungsverhalten ist je nach Material unterschiedlich. Bei den hier untersuchten oberflächenaktiven Gläsern und Glaskeramiken, wie beim 45S5-Bioglas, kommt es zur Knochenbindung mittels einer zwischen Implantat und Knochen liegenden Apatitschicht, was auf eine chemische Bindung hindeutet. Im Gegensatz dazu kommt es bei resorbierbaren Keramiken (z.B.  $\beta$ -TCP und Calcit) zu einem direktem Knochenkontakt, was auf eine mechanische Bindung durch Ineinandergreifen hindeutet: die Implantate werden aufgrund von Degradation rau und Knochen wächst in diese kleinsten Oberflächenunregelmäßigkeiten. HA, welches als oberflächenaktive Keramik eingeordnet wird, zeigt Charakteristika, die zwischen den beiden oberflächenaktiven und den resorbierbaren einzuordnen sind, d.h. es bindet manchmal direkt und manchmal durch eine sehr dünne undeutliche Apatit-Zwischenschicht an den Knochen [Neo, 1992(a)] [Neo, 1992 (b)] [Neo, 1993] [Kokubo, 1991]. Die Knochenbindung von Hydroxylapatit ist bewiesen [Jarcho, 1981] [Müller- Mai, 2001].

In der vorher beschriebenen Arbeit von Oonishi et. al. im Jahre 2000 konnte, durch Untersuchungen im Rückstreuелеktronenmodus, festgestellt werden das Bioglas® schneller als die anderen Materialien degradiert wurde. Der Degradationsvorgang fand durch lösungsvermittelte Auflösung oder Auslaugung statt, was eine chemische Veränderung in den Materialien verursachte. Oonishi kam zu dem Schluss, dass die Knochenwachstumsrate mit der Auflösungs geschwindigkeit korrelierte [Oonishi, 2000].

Die Einzelschritte bei dieser Degradation von Gläsern laufen nach Hench chemisch folgendermaßen ab:

- Zunächst kommt es zu einem schnellen Austausch von  $\text{Na}^+$  aus dem Implantat mit  $\text{H}^+$  oder  $\text{H}_3\text{O}^+$  aus dem Gewebe.
- Dann kommt es zum Verlust von  $\text{Si}(\text{OH})_4$  aus dem Implantat, zum Bruch von Si-O-Si Bindungen und zur Ausbildung von Si-OH Bindungen an der Glas-Gewebe Schnittstelle.
- Es kommt zur Kondensation und Repolymerisation einer  $\text{SiO}_2$  reichen Schicht an der Oberfläche
- $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  Gruppen migrieren durch die  $\text{SiO}_2$  reiche Schicht und bilden einen  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  reichen Film auf dieser Schicht danach kommt es zu einem Wachstum der amorphen,  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  reichen Schicht durch Aufnahme von löslichem Calcium und Phosphat aus der Umgebung.
- Danach kommt es zur Kristallisation des amorphen  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  Filmes durch Aufnahme von  $\text{OH}^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$  oder  $\text{F}^-$  Ionen vom Gewebe und es bildet sich eine Hydroxyl-Karbonat-Apatit-Schicht aus (HCA).
- Die chemische Bindung von biologischen Anteilen innerhalb der wachsenden HCA Schicht führt zur Inkorporation von Collagenfibrillen die durch Osteoblasten oder Fibroblasten produziert werden [Hench, 1993].

Die Bildung dieser Apatitschicht kann bei nicht – bioaktiven Gläsern nicht beobachtet werden. Daher scheint sie für eine feste Bindung an den Knochen notwendig zu sein [Rawlings, 1992].

Davies beschreibt die Mechanismen der Knochenbindung (z.B. am Knochen-Implantat-Interface) folgendermaßen:

- Nach der Implantation kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung und es bildet sich ein Blutkoagel um das Implantat. Osteogene Zellen werden dadurch angelockt und wandern hindurch bis an die Implantatoberfläche. Dies ist die erste Phase.
- In der zweiten Phase wird eine mineralisierte Matrix gebildet, ein Äquivalent zu der kollagenfreien Schicht (Zementlinie) in natürlichem Knochen. Diese zwei Phasen resultieren in einer Kontaktosteogenese, und je nach Oberfläche des Implantates in einer Knochenbindung.
- In der dritten Phase kommt es zu einer Remodelierung des Knochens [Davies,1996] [Davies, 2003].

---

Die Degradation von Glaskeramiken verläuft anders:

Glaskeramiken bestehen aus verschiedenen Phasen (Glasphase und kristalline Keramikphase). Die Degradation verläuft deswegen etwas komplexer als bei Gläsern. Nach Herauslösung der Glasphase (durch die oben beschriebenen Prozesse) kommt es zur Freisetzung der kristallinen Phase. Dort entstehen Poren, und es kommt zu einem partikulären Zerfall. Makrophagen und andere Zellen phagozytieren die dann frei im Gewebe liegenden Reste der kristallinen Phase. Sie werden dann intrazellulär abgebaut oder in regionale Lymphknoten transportiert [Müller- Mai, 2003](c).

Ducheyne et. al. fasste 1990 die Ereignisse zusammen, die an der Keramik- Gewebe-Schnittstelle auftreten. Ohne durch die folgende Aufzählung eine Reihenfolge oder Gewichtung der einzelnen Ereignisse implizieren zu wollen, kommt es zu:

- einer Lösung aus der Keramik
- zu einer Präzipitation aus der Lösung auf die Keramik
- einem Ionen Austausch und zu einer strukturellen Umordnung der Keramik- Gewebe-Schnittstelle
- einer Diffusion von der Oberfläche der Grenzschicht in die Keramik
- lösungsvermittelten Effekten auf die zelluläre Aktivität
- Ablagerung entweder der mineralischen Phase oder der organischen Phase ohne Integrierung in die Keramikoberfläche
- Ablagerung mit einer Integrierung in die Keramikoberfläche
- Chemotaxis zu der Keramikoberfläche
- Zellbefestigung und Proliferation, Zelldifferenzierung (Osteoprogenitorzelle zu Osteoblast) und Bildung einer extrazellulären Matrix [Ducheyne, 1999].

Wie bei den bioaktiven Gläsern kommt es auch bei den Glaskeramiken zur Ausbildung einer Apatitschicht. Es wird angenommen dass das restliche Glas in der Glaskeramik eine große Rolle bei der Bildung dieser Schicht spielt [Rawlings, 1992].

Der zelluläre Mechanismus, mit dem das bioaktive Glas Zellen anlockt, wurde von Välimäki 2006 zusammengefasst.

- Das Bioglas stimuliert Wachstum und Reifung der Osteoblasten.
- Es fördert Expression und Erhaltung des osteoblastischen Phänotyps.
- Bioglas stimuliert die Funktionen der multipotenten Stromazellen des Knochenmarks.

- Es bildet sich eine Si-reiche Schicht, an der sich Calciumphosphat ablagert, welches wiederum, zusammen mit absorbierenden Proteinen, die Bildung von neuem Knochen steuert.
- Extrazelluläre Proteine (besonders Fibronectin) ziehen Makrophagen, mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitorzellen an.
- Anschließend proliferieren die Osteoprogenitorzellen und differenzieren zu Matrixproduzierenden Osteoblasten [Välimäki, 2006].

Durch die statistische Auswertung der Glas–Implantat-Proben wurde auch gezeigt, dass der Knochen-Implantatkontakt in der Gruppe mit der BMP Beschichtung zum Zeitpunkt 28d und 84d höher war (zum Zeitpunkt 7 d hatte noch keine Knochenbindung stattgefunden). Diese Ergebnisse implizieren, dass die BMP- Beschichtung ein wichtiger Faktor für das Knochenwachstum ist.

Die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse stimmen in ihrer Tendenz mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein.

In einer Studie von Santos et. al von 1998 wurde festgestellt, dass es einen synergistischen Effekt in Hinsicht auf die osteoblastische Zelldifferenzierung bei der Kombination von Glas (hier Xerogel - Glasplatten) und BMP-2 gab, und dass Glas somit als Träger von BMP dienen kann [Santos, 1998] [Ducheyne, 1999].

In einer Studie von Wang et al. wurde gezeigt, dass eine Implantation von einer Einzeldosis 0,5 bis 115 µg BMP 2 (subcutan) zu einer Anregung der Knorpelbildung (Ergebnis an Tag 7) und der Knochenbildung (Tag 14) führt. Außerdem wurde gezeigt, dass der Zeitpunkt des Auftretens der Knochenneubildung mit der Dosis des implantierten rh BMP-2 zusammenhängt, u.z. konnte Knochenformation bei hohen Dosen schon nach 5 Tagen beobachtet werden [Wang, 1990]. Allerdings handelte es sich hierbei um eine subkutane Injektion, also um ein ektopisches Model.

Auch nur subkutan wurden bei Vehof et. al. mit BMP überzogene Titangitter bei Ratten eingesetzt. Diese Kombination induzierte bei den Versuchstieren eine ektopische Knochenbildung [Vehof, 2001].

---

Eine Studie von Yasko et al. untersuchte auch den Effekt der Konzentration des rh BMP-2 auf die osteoinduktive Aktivität. Hier wurden 5 mm große, segmentale Defekte in Rattenfemora mit 1,4 bzw. 11,0 µg BMP (gemischt mit 10 mg demineralisierter Rattenmatrix) behandelt. Die hohe Dosis rh BMP-2 induzierte Knochenneubildung (nach 7 Tagen) und -bindung, während die geringe Dosis zwar eine Knochenneubildung (nach 28 Tagen) aber keine -bindung verursachte [Yasko, 1992]. Auch bei diesem Einsatz konnte die Wirksamkeit von BMP gezeigt werden. Im Unterschied zu unserer Studie wurde bei Yasko et al. aber die Überbrückungs-Heilung zwischen zwei Defektflächen eines Knochens untersucht; es war nicht die Einheilung eines Implantats das gestellte Ziel.

In einer späteren Studie von Kirker-Head et. al. zeigte ein 2,5 cm langer (halbseitiger) Defekt in Schafs femora nach 2–4 Wochen die erste Knochenneubildung. Allerdings konnte hier die Heilung des großen Defektes erst nach 12 bis 14 Wochen erfolgen. Auch hier wurde das BMP (1,5 mg rh-BMP2) mit einer Trägersubstanz gemischt (mit einer inaktivierten bovinen Knochenmatrix) [Kirker Head, 1995].

Der Einfluss einer BMP-2 Beschichtung auf die Osteointegration und Degradation eines Knochenersatzstoffes wurde in einer Studie von Kessler et. al. 2003 an der Tibia von Merinoschafen untersucht. Die Studie kam zu dem Schluss, dass die neu gebildete Knochenmasse nach 4 Wochen Implantationszeit in der Gruppe mit der BMP-2 Beschichtung eine signifikante Zunahme der Knochenmasse und eine signifikante Reduktion der verbliebenen Ersatzstoffmenge zeigte. Allerdings sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar, da bei Kessler et. al. das Implantat bis zu 40 % der Kräfte, die auf das mediale Tibiaplateau einwirken, aufnimmt und die Implantate passgenau („press fit“) eingesetzt wurden [Kessler, 2003].

Auch im Kaninchenmodell wurde 2001 von Hassan et. al. der Einfluss von rhBMP-2 auf das Knochenwachstum getestet. Es wurden sogenannte „Onplants“, die zur Verankerung in der Zahnmedizin verwendet werden, im Schädel der Kaninchen implantiert. Die histologischen und histomorphometrischen Resultate demonstrierten eine signifikante Knochenbildung an der Knochen- „Onplant“ - Schnittstelle in den Gruppen mit rhBMP-2 im Vergleich zu den Kontrollgruppen [Hassan, 2003].

Auch am Menschen wurde rhBMP-2 schon mit Erfolg eingesetzt, wie z.B. bei einer Studie von Govender et. al. 2002. In dieser Studie bekamen Patienten mit offenen Tibiafrakturen rhBMP-2 Implantate zusätzlich zur Standardbehandlung und dadurch wurde die Frequenz von sekundären Eingriffen reduziert, die Knochen- und Wundheilung beschleunigt und die Infektionsrate reduziert [Govender, 2002].

In einer neueren Studie von Seeherman et. al. (2006) wurden 20 mm große Defekte in den Radii von Kaninchen mit 0,166 bzw. 0,33 mg/ml rhBMP-2 behandelt und die Kaninchen, die die geringere Dosis erhalten hatten, zeigten histomorphometrisch schon nach 28 Tagen eine erhöhte Trabekelbildung. In dieser Studie wurde das Calcium-phosphat basierende Trägermaterial mit dem rhBMP-2 an der Defektstelle injiziert [Seeherman, 2006].

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie eindeutig, wie auch andere Studien, dass das Vorhandensein vom rhBMP-2 das Knochenwachstum positiv beeinflusst. Während bei einer Verwendung von Autografts BMP in einer natürlichen Konzentration von nur ca. 0,06 µg [Wang, zitiert nach Kirker-Head,1995] vorhanden ist, können die supranatürlichen Konzentrationen von BMP die für das Knochenwachstum benötigten Faktoren und Osteoprogenitor-Zellen vermehrt aus der nahen und fernerer Umgebung heranziehen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen auch, dass die Immobilisierung von rhBMP-2 an der Oberfläche vom Bioglass und somit die Funktionalisierung des Bioglass erfolgreich war. Träger wie Bioglass erlauben auch die Anlagerung in den vorhandenen Poren, und ermöglichen so, eine größere Biomasse aufzutragen und schützen gleichzeitig vor Abscherung und Auswaschungen. Außerdem ist die Porosität auch hilfreich für die Resorption und die Bioaktivität: Bioglass entlässt Ionen, die sich in einer knochenähnlichen Apatit-Schicht an der Oberfläche ablagern, und diese Schicht wiederum beeinflusst die Adhäsion und Proliferation von osteogenetischen Zellen [Guéhenec, 2004].

Zusammenfassend haben die rhBMP-2 Adsorptionsbeschichtungen auf Bioglas® ähnlichen Implantaten das Knochenwachstum im distalen Femur des Kaninchens stimuliert. Die Versuche zeigten signifikant höhere Werte für beschichtete Implantate nach 84 Tagen und somit auch eine schnellere Integration der Implantate.

## **6 Zusammenfassung**

Knochenbindende bioaktive Implantate spielen eine wichtige Rolle bei der Knochenrekonstruktion. In dieser Untersuchung wurde der Versuch unternommen, den Prozess der Knochenheilung weiter zu verbessern. Es wurden zwei verschiedene Arten bioaktiven Implantatmaterials (amorphe Glasphase, kristalline Glaskeramik) mit BMP (Bone Morphogenetic Protein) beschichtet und unbeschichtet benutzt. Die Implantate wurden ohne „press fit“ (zur Vermeidung des Ablösens der Beschichtung) in den Femur von Kaninchen implantiert. Nach 7, 28, 84 oder 168 Tagen wurden sie explantiert und mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Insgesamt betrug die Anzahl der Implantate 96. Die Einheilung verlief komplikationsfrei.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Defekten im Kaninchenfemur mit BMP Adsorptionsbeschichtung auf Bioglas® ähnlichen Implantaten das Knochenwachstum stimuliert. Bereits nach 28 Tagen konnte bei den Implantaten mit BMP Beschichtung eine Spaltüberwindung festgestellt werden. Der höchste Implantat-Knochenkontakt zeigte sich bei den Gläsern mit BMP. Auch nach 84 Tagen lag der höchste Knochenkontakt bei den Gläsern mit BMP.

Nach der hier vorliegenden Untersuchung zeigen Gläser durchweg bessere Ergebnisse als Glaskeramiken unabhängig von einer Beschichtung. Wie oben schon erwähnt, eignen sich die hier angewendeten Glasimplantate mit Beschichtung am besten um schnell einzuwachsen. Bei den Glaskeramiken gab es allerdings einige nicht vorhersehbare Ergebnisse, wie beispielsweise den geringeren Knochen- Implantat- Kontakt bei GK mit BMP gegenüber GK ohne BMP ab 84 Tagen.

Die hier gefundenen Ergebnisse sind wichtig für die mögliche Einführung der hier untersuchten Implantate und ihre Zulassung für die klinische Anwendung in der Rekonstruktion von Knochendefekten insbesondere in der Orthopädie und für die Verankerung von Endoprothesen unter anderem in der Zahnheilkunde. Besonders vielversprechend sind hier Implantate mit BMP- Beschichtung.

Summary:

“Effect of a bioglass based bone substitute material with a growth-stimulating protein (bone morphogenetic protein) on bone growth in rabbits”.

Bone binding bioactive implants play an important role in bone reconstruction. In this study, an attempt was made to further improve the process of bone healing. Two different types of bioactive implant material were coated with BMP (bone morphogenetic protein). One material consists of an amorphous glass phase, and the other is composed of a crystalline glass-ceramic. Each group of material was used uncoated as well as coated with BMP. The implants were implanted without "press fit" (to prevent the detachment of the coating) into the femur of rabbits. After 7, 28, 84 or 168 days, they were explanted and analyzed by different methods. In a total 96 implants were used. Healing occurred without any complications.

It could be shown that the treatment of defects in the femur of rabbits with BMP Adsorption-surface-coating on bioglass ® like implants stimulates bone growth. The implants with BMP coating showed an bridging of the gap already after 28 days. The highest implant-bone-contact could be observed in the glasses with BMP and after 84 days the glasses with BMP still had the highest implant-bone-contact.

As a result of this study it was shown, that glasses consistently showed better results than glass-ceramics, independent of a coating. As mentioned above, the coated glass implants qualify to be incorporated faster than uncoated samples. In the glass-ceramics however, there were some unpredictable results, for example the lower implant-bone-contact in the glass-ceramics with BMP starting from 84 days in comparison to the glass-ceramics without BMP.

The results found here are important for the possible introduction and approval for clinical application of the studied implants in the reconstruction of bone defects in orthopedics and for anchoring of endoprotheses for example in dentistry. Particularly promising are the implants with the BMP- coating. These could possibly replace the current gold standard in the future.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Betz OB, Betz VM, Abdulazim A, Penzkofer R, Schmitt B, Schröder C, Mayer-Wagner S, Augat P, Jansson V, Müller P: The Repair of Critical-Sized Bone Defects, Using Expedited Autologous BMP-2 Gene-Activated Fat Implants. (2010) Tissue Eng. Part A 16, pp.1093-10.
2. Bohndorf, Imhof, Fischer: Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke (2006), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 22-30.
3. Bolander ME, Balian G: The Use of Demineralized Bone Matrix in the Repair of Segmental Defects, Augmentation with Extracted Matrix Proteins and a Comparison with Autologous Grafts. (1986) J. Bone Joint Surg. 68-A, pp. 1264-74.
4. Boyde A, Maconnachie E, Müller- Mai C, Gross U: SEM study of surface alterations of bioactive glasses and glass--ceramics in a bony implantation bed. (1990) Clin. Mater. 5, pp.73-88.
5. Brinker MR, O'Connor DP: The Incidence of Fractures And Dislocations Referred For Orthopaedic Services in a Capitated Population. (2004) J. Bone Joint Surg. 86-A, pp. 290-297.
6. Bucher O, Wartenberg H: Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. (1989) Hans Huber Bern pp.183-200.
7. Carter CB, Norton MG: Ceramic Materials, Science and Engineering. (2007) Springer Berlin. Kapitel: Ceramics in Biology and Medicine pp.635-651.
8. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM: Identification of transforming growth factor  $\beta$  family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87, pp. 9843-9847.
9. Chase SW, Herndon CH: The Fate of Autogenous and Homogenous Bone Grafts, A historical review. (1955) J. Bone Joint Surg.37-A, pp. 809-41.

10. Chen D, Zhao M, Mundy GR: Bone Morphogenetic Proteins. (2004) *Growth Factors*. 22 (4), pp. 233-241.
11. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS: The Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Large Segmental Bone Defects. (1994) *J. Bone Joint Surg.* 76-A, pp. 827-38.
12. Dahabreh Z, Calori GM, Kanakaris NK, Nikolaou VS, Giannoudis PV: A cost analysis of treatment of tibial fracture non-union by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. (2009) *I. Orthopaedics* 33, pp. 1407-1414.
13. Davies JE: In vitro modeling of the bone/implant interface. (1996) *Anat. Rec.* 245, pp. 426-45.
14. Davies JE: Understanding peri-implant endosseous healing. (2003) *J. Dent. Educ.* 67(8), pp. 932-49.
15. Ducheyne P, Qui Q: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. (1999) *Biomaterials*. 20, pp. 2287-303.
16. Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R: Bone-Graft Harvesting From Iliac and Fibular Donor Sites: Techniques and Complications. (2001) *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 9, pp. 210-8.
17. Einhorn TA: Enhancement Fracture-Healing. (1995) *J. Bone Joint Surg.* 77-A, pp. 940-56.
18. Einhorn TA: The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. (1998) *Clin. Orthop. Relat. Res.* 355S, pp. 7-S21.
19. Gauthier O, Stimulation of bone healing. Latest developments; (2011) *European College of Veterinary Surgeons (ECVS) proceedings*, pp.123-6.
20. Glass Y, Eickholz P, Nentwig GH, Dannewitz B: Glossar der Grundbegriffe für die Praxis. (2008) *Parodontologie*; 19/4/, pp. 465-474.
21. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Börner MG, 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 RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Rüter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T; BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. (2002) *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A, pp. 2123-34.
22. Griffon DJ: Enhancing Bone Healing in Practice. (2011) (a) European College of Veterinary Surgeons (ECVS) proceedings, pp. 131-3.
23. Griffon DJ: Delayed Union and Nonunion. (2011) (b) European College of Veterinary Surgeons (ECVS) proceedings, pp.127-9.
24. Gross UM, Müller-Mai CM, Voigt C: The interface of calcium-phosphate and glass-ceramic in bone, a structural analysis. (1990) *Biomaterials* 11, pp. 83-5.
25. Guéhenec, LL, Layrolle P, Daculsi G: A Review of Bioceramics and Fibrin Sealant. (2004) *Eur. Cell Mater.* 8, pp.1-11.
26. Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W: Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen, Tierexperimentelle Untersuchung. (1998) *Der Orthopäde* 27, pp. 105-117.
27. Hannouche D, Petite H, Sedel L: Current Trends in the Enhancement of Fracture Healing. (2001) *J Bone Joint Surg.* 83-B, pp. 157-64.
28. Hashin Z: Analysis of Composite Materials- A Survey. (1983) *J. Appl. Mech.* 50, pp.481-505.
29. Hassan AH, Evans CA, Zaki AM, George A: Use of Bone Morphogenetic Protein-2 and Dentin Matrix Protein-1 to Enhance the Osteointegration of the Onplant System. (2003) *Connect. Tissue Res.* 44, pp.30-41.
30. Hench LL, Wilson J: An Introduction to Bioceramics (1993), World Scientific Singapore. 1 pp. 41-62.

31. Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The Critical Size Defect as an Experimental Model to Test Bone Repair Materials, (1990) J. Craniofac. Surg. 1, pp. 60-8.
32. Hoppe JD, Sewing KF: Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. (2001) Dt. Ärztebl. pp.1011-1016.
33. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, Kobayashi H: Bone Regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold. (2007) Journal of Controlled Release 117, pp. 380-386.
34. IMC WIKI ®, International medical college, <http://med-college.hu/de/wiki/artikel.php?id=85&lan=1>, Suchwort: Knochenersatz, Abfragedatum: 20.03.2012.
35. Jarcho M: Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. (1981) Clin. Orthop. Relat. Res.157, pp. 259-78.
36. Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Repair of Segmental Defects of the Tibia with Cancellous Bone Grafts Augmented with Human Bone Morphogenetic Protein, A Preliminary Report. (1988) Clin. Orthop. & Rel. Res. No. 236, pp.249-257.
37. Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Distal Metaphyseal Tibial Nonunion: Deformity and Bone Loss Treated by Open Reduction, Internal Fixation and Human Bone Morphogenetic Protein (hBMP). (1990) Clin. Orthop. & Rel. Res. 250, pp. 234-240.
38. Kessler S, Mayr Wohlfahrt U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Günther KP: Der Einfluss von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (b-FGF) auf Osteointegration, Degradation und biomechanische Eigenschaften eines synthetischen Knochenersatzstoffes. (2003) Z. Orthop. 141, pp. 472-80.
39. Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM: The Biology of Bone Grafting. (2005) J. Am. Acad. Orthop. Surg. 13, pp. 77-86.

- 
40. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Henning G, Wang E, Holtrop ME: Long-Term Healing of Bone Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. (1995) Clin. Orthop. & Rel. Res. 318, pp. 222-230.
  41. Knabe C, Stiller M, Berger G, Reif D, Gildenhaar, Howlett CR, Zreiqat H: The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone related genes and proteins in vitro. (2005) Clin. Oral Implants Res. 16, pp. 119-27.
  42. Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M: Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. (2008) Biomaterials 29, pp. 2249-58.
  43. Kokubo T: Bioactive glass ceramics: properties and applications. (1991) Biomaterials 12, pp.155-63.
  44. Küntscher G: Primäre Knochenheilung. (1964) Tagung der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Langenbeck's Archive of Surgery, 308, pp. 440-452.
  45. Leeuwenburgh SC, Jansen JA, Malda J, Dhert WA, Rouwkema J, van Blitterswijk CA, Kirkpatrick CJ, Williams DF: Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress. (2008) Biomaterials 29, pp. 3047-3052.
  46. Lichtinger TK, Müller RT, Schürmann N, Oldenburg M, Wiemann M, Chatzinikolaidou M, Rumpf HM, Jennissen HP: Osseointegration of Titanium Implants by Addition of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2). (2001) Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 32, pp. 937-941.
  47. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ: Growth Factors for Bone Growth and Repair: IGF, TGF $\beta$  and BMP. (1996) Bone 19, Supplement 1S-12S.
  48. Luther G, Wagner ER, Zhu G, Kang Q, Luo Q, Lamplot J, Bi Y, Luo X, Luo J, Teven C, Shi Q, Kim SH, Gao J, Huang E, Yang K, Rames R, Liu Y, Li M, Hu N, Liu H, Su Y, Chen L, He B, Zuo G, Deng Z, Reid RR, Luu HH, Hydon RC, He T: BMP-9 Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Molecular Mechanism and Therapeutic Potential. (2011) Curr. Gene Ther. 11, pp. 229-40.

49. Lütkehermöller W, Behrens P, Burch S, Horst M: Biomaterialien für die Knochenregeneration. E. Wintermantel S.-W. Ha Medizintechnik- Life Science Engineering (2008) Springer Berlin. pp.1365-78.
50. Macewen W: Observations concerning Transplantation of Bone. Illustrated by a Case of Inter-human Osseous Transplantation, whereby over two-thirds of the Shaft of a Humerus was restored; By Macewen, M.D. Communicated by Professor Huxley (1881). Proceedings of the Royal Society of London.
51. Marsh David: Concepts of Fracture Union, Delayed Union, and Nonunion; (1998) Clin. Orthop.& Relat. Res. 355s, pp. 22-30.
52. Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam I, Enomoto S: Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. (2001) Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 39, pp.452-9.
53. McKibbin B: The Biology of Fracture Healing in Long Bones. (1978) J. Bone Joint Surg. 60-B, pp.150-62.
54. Mutschler W: Die Überbrückung von Knochendefekten, Alte und neue Therapieoptionen. (2006) Unfallchirurg 109, pp. 713-714.
55. Müller- Mai CM, Schmitz HJ, Strunz V, Fuhrmann G, Firtz Th, Gross M: Tissues at the surface of new composite material titanium/glass-ceramic for replacement of bone and teeth. (1989) J. Biomed. Mater. Res. 23, pp. 1149-1168.
56. Müller-Mai CM, Voigt C, Gross U: Incorporation and Degradation of Hydroxyapatite Implants of Different Surface Roughness and Surface Structure in Bone (1990) Scanning Microsc. 4, pp. 613-624.
57. Müller-Mai CM, Voigt C, Knarse W, Sela J, Gross UM: The early host and material response of bone bonding and non-bonding glass-ceramic implants as revealed by scanning electron microscopy and histochemistry. (1991) Biomaterials 12, pp. 865-871.
58. Müller-Mai CM, Voigt C, Hering A, Ramanzadeh R, Gross U: Madreporische Hydroxylapatitgranulate zur Füllung ossärer Defekte. (2001) Unfallchirurg 104, pp. 221-229.

- 
59. Müller-Mai CM, Voigt C: Klinische Anwendung bioaktiver Implantate, Anforderungen an Implantatlager und Materialien, in: Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie, experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. Hrsg. Müller- Mai, C. (2003) VNM Science München. pp.153-57
60. Müller-Mai CM, Voigt C: Implantationsmodell, in: Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie, experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. Hrsg. Müller- Mai, C. (2003) (b)VNM Science München. pp. 77-78.
61. Müller-Mai CM, Voigt C: Degradation der Glaskeramiken, in: Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie, experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung. Hrsg. Müller- Mai, C. (2003) (c)VNM Science München. pp. 98-99.
62. Neo M, Kotani S, Fujita Y, Nakamura T, Yamamuro T, Bando Y, Ohtsuki C, Kokubo T: Differences in ceramic-bone interface between surface-active ceramics and resorbable ceramics: A study by scanning and transmission electron microscopy. (1992) (a) J. Biomed. Mater. Res. 26, pp. 255-267.
63. Neo M, Kotani S, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kobkubo T, Bando Y: A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone. (1992) (b) J. Biomed. Mater. Res. 26, pp. 1419-1432.
64. Neo M, Nakamura T, Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T: Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: A comparative study by transmission electron microscopy. (1993) J. Biomed. Mater. Res. 27, pp. 999-1006.
65. Niedhart C, Niethard FU: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg) (1998) Bioceramics in Orthopaedics- New Application, Ferdinand Enke Stuttgart, pp.46-50.
66. Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, Finerman GAM: Bone Repair Induced by Bone Morphogenetic Protein in Ulnar Defects in Dogs. (1986) J. Bone Joint Surg. 68-B, pp. 635-42.
67. Özkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H: OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- $\beta$  family. (1990) EMBO Journal 9, pp. 2085-2093.

68. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H: Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. (1999) *J. Biomed. Mater. Res.* 44(1), pp. 31-43.
69. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, Kin S, Yamamoto T, Mizokawa S: Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass®, A-W glass- ceramic and Hydroxyapatite. (2000) *J. Biomed. Mater. Res.* 51, pp. 37-46.
70. Peel Sean AF, Zhen Ming Hu, Clokie Cameron ML: In Search of the Ideal Bone Morphogenetic Protein Delivery System: In Vitro Studies on Demineralized Bone Matrix, Purified, and Recombinant Bone Morphogenetic Protein. (2003) *J. Craniofac. Surg.* 14, pp. 284-291.
71. Peters KM, König DP: Fortbildung Osteologie Volume 3, Kapitel 4 Knochentransplantation: autolog, homolog, Knochenersatzmaterialien. (2010) Springer Berlin pp.78-115.
72. Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M: Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. (2003) *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 41, pp. 173-178.
73. Rawlings RD: Bioactive glasses and glass-ceramics. (1992) *Clin. Mater.* 14, pp. 155-79.
74. Reddi AH: From Bone Morphogenetic Proteins to Body Morphogenetic Proteins. (2005) *Cytokine & Growth Factor Rev.* 16, pp. 249-250.
75. Rosier RN, O'Keefe JO, Hicks DG: The Potential Role of Transforming Growth Factor Beta in Fracture Healing. (1998) *Clin. Orthop. Relat. Res.* 355S, S294-S300.
76. Rueger JM: Knochenersatzmittel Heutiger Stand und Ausblick, (1998) *Orthopäde* 27, pp. 72-79.
77. Runkel M, Rommens PM: Pseudarthrosen (2000) *Unfallchirurg* 103, pp.51-63.
78. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RHL, Corbett C, Özkaynak E, Oppermann H, Rueger DC: Recombinant Human Osteogenic Protein-1 (hOP-1) Induces New Bone

- Formation in Vivo with a Specific Activity Comparable with Natural Bovine Osteogenic Protein and Stimulates Osteoblast Proliferation and Differentiation in Vitro. (1992) J. Biol. Chem. 267,pp. 20352-20362.
79. Santos EM, Radin S, Shenker BJ, Shapiro IM, Ducheyne P: Si-Ca-P xerogels and bone morphogenetic protein act synergistically on rat stromal marrow cell differentiation in vitro. (1998) J. Biomed. Mater. Res. 41, pp. 87-94.
80. Schieker M, Heiss C, Mutschler W: Knochenersatzmaterialien. (2008) Unfallchirurg 111, pp. 613-620.
81. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. (1986) Clin. Orthop. Relat. Res. 205, pp. 299-308.
82. Seeherman HJ, Azari K, Bidic S, Rogers L, Li XJ, Hollinger JO, Wozney JM: rhBMP-2 Delivered in a Calcium Phosphate Cement Accelerates Bridging of Critical-Sized Defects in Rabbit Radii. (2006) J. Bone Joint Surg Am. 88-A, pp. 1553-65.
83. Simic P, Vukicevic S: Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. Conference on Bone Morphogenetic Proteins. (2007) EMBO Rep. 8, pp. 327-31.
84. Smeets Ralf, Kolk Andreas: Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien ZMK, Jg26; Ausgabe 6 (2001). <http://www.zmk-aktuell.de/zahnheilkunde/implantologie/story/osteokonduktive-und-induktive-knochenersatzmaterialien-teil-1.html>, Abfragedatum: 02.02.2012.
85. Stevenson S, Cunningham N, Toth J, Davy D, Reddi H: The Effect of Osteogening (a Bone Morphogenetic Protein) on the Formation of Bone in Orthotopic Segmental Defects in Rats. (1994) J. Bone Joint Surg. 76-A, pp. 1676-87.
86. Stürmer KM: Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. (1996) Orthopäde 25, pp. 386-393.
87. Sumner DR, Turner TM, Urban RM, Turek T, Seeherman H, Wozney JM: Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. (2004) 22, pp. 58-65.

88. Termaat Mf, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarmann HJTM: Current Concepts Review Bone Morphogenetic Proteins, Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. (2005) *J. Bone Joint Surg.* 87/6/, pp. 1367-78.
89. Urist M R: Bone: Formation by Autoinduction. (1965) *Science* 150, pp. 893-899.
90. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, Takagi K, Triffitt JT, Amstutz J, DeLange R, Termine J, Finerman GA: A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. (1982) *Clin. Orthop.& Relat. Res.* 162, pp. 219-32.
91. Välimäki VV, Aro HT: Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. (2006) *Scand. J. Surg.* 95, pp. 95-102.
92. Vehof JW, Mahmood J, Takita H, van't Hof MA, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA: Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with bone morphogenetic protein and coated with calcium phosphate. (2001) *Plast. Resonstr. Surg.* 108, pp. 434-43.
93. Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM: In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. (2001) *Biomaterials* 22, pp. 357-362.
94. Wang EA, Rosen V, D'Allesandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney J: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87, pp. 2220-2224.
95. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA: Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities. (1988) *Science* 242, pp.1528-1534.
96. Wozney JM: Bone Morphogenetic Proteins. (1989) *Progress in Growth Factor Research* 1, pp.267-280.
97. Wozney John M, Rosen Vicki: Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein Gene Family in Bone Formation and Repair. (1998) *Clin. Orthop. Relat. Res.* 346, pp. 26-37.
98. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S: Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on Osteoblastic Differentiation of

- Bone Marrow- Derived Stromal Cell Lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, pp. 366-371.
99. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA: The Healing of Segmental Bone Defects, Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2). (1992) J. Bone Joint Surg. 74-5, pp.659-70.
100. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG: Evolution of bone transplantation: molecular. Cellular and tissue strategies to engineer human bone. (1996) Biomaterials 17, pp. 175-185.
101. Zhao J, Shinkai M, Takezawa T, Ohba S, Chung U, Nagamune T: Bone regeneration using collagen type I vitrigel with bone morphogenetic protein-2. (2009) J. Biosci. Bioeng. 107, pp. 318-323.
102. Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, Wentzensen A, Moghaddam A: Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. (2009) Injury. 40 S3, S50-S53.

8. Anhang

<b>Einteilung (nach den Ausgangsverbindungen) [Rueger 1998]:</b>	
<b>1. biologische, organische Substanzen</b>	<p>1.1. Knochenmatrixen: mineralisiert oder demineralisiert</p> <p>Entfernung der organischen Knochenbestandteile unter Erhaltung der anorganischen Mineralstruktur oder Herstellung demineralisierter Knochenmatrix durch Säure/Basenbehandlung [Lüthkehermöller, 2008]. Die demineralisierte Knochenmatrix (DBM) kann osteoinduktiv wirken, denn einige Proteinfaktoren sind noch erhalten, die eine Knochenformation stimulieren können; hauptsächlich sind dies BMPs und TGF-<math>\alpha</math>. Kanines DBM wird zurzeit in der Veterinärorthopädie genutzt [Gauthier, 2001].</p>
	<p>1.2. Knochenmatrixextrakte</p> <p>Hochgereinigte Knochenmatrixextrakte lassen sich durch eine Demineralisierung von Knochen, unter Erhaltung der organischen Substanz herstellen. Der am besten untersuchte, aus hochgereinigten Matrixextrakten hergestellte Faktor ist das BMP [Lüthkehermöller, 2008].</p>
	<p>1.3. Extrahierte Knochenwachstumsfaktoren</p> <p>Ein Beispiel hierfür ist das bovine BMP, oder nach Proteinsequenzanalyse und DNA-mapping gentechnologisch hergestellte, rekombinante Knochenwachstumsfaktoren wie das rhBMP [Urist 1982].</p>
	<p>1.4. chemotaktische, proliferative, induktive, differenzierende, z.T. zirkulierende bzw. nur auto- und parakrin wirkende, nicht knochenspezifische Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören die Gruppe der BMP inklusive BMP3, TGF<math>\beta</math>1, 2 und 3, b FGF, PDGF, die Prostaglandine, IL1 (Interleukin 1) und 6, ILGF( Insulin like Growth Factors) und GH (Growth Hormone) [Rueger 1998].</p>

<p><b>2. synthetische, anorganische Materialien</b></p>	<p>2.1. Monophasische, synthetische Verbindungen, aus pulverförmigen Ausgangsmaterialien hergestellt (Ceros (Tricalciumphosphat) 80/82)</p> <p>Hydroxylapatit (HA) - <math>\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2</math> - ist beispielsweise eine Kalziumphosphatkeramik. Bei diesem Material ist ein begrenzter Abbau nur durch zelluläre Resorption möglich [Glass 2008]. Die biologischen Apatite unterscheiden sich von purem, synthetischem HA durch ihre Stöchiometrie, Komposition, Kristallinität und Kristallgröße. Auf dem Markt angeboten werden viele unterschiedliche HA, die phykogenen, xenogenen, korallinen und synthetischen Ursprungs sein können [Müller- Mai, Voigt, 2003].</p> <p>Trikalziumphosphat (TCP)-<math>\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2</math>- hingegen gehört zu den löslichen Kalziumphosphatkeramiken und unterliegt in wässrigem Milieu einem chemisch physikalischen Zerfallsprozess, wobei die dabei entstehenden Partikel anschließend durch Phagozytose abgebaut werden [Glass 2008]. Hierbei gibt es zwei Kristallstrukturen <math>\alpha</math>-TCP und <math>\beta</math>-TCP [Müller-Mai, Voigt, 2003].</p> <p>2.2. Hydrothermal aus Korallen bzw. Algen über einen Umwandlungsprozess produzierte Hydroxylapatitkeramikanaloga (z.B. Biocoral, Interpore).</p> <p>Die aus Korallen oder Algen gewonnenen Materialien, die aufgrund ihrer Herkunft Bestandteile der biologischen, organischen Knochenersatzmaterialien wären, werden aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihrer Wirkmechanismen der Klasse der synthetischen, anorganischen Biomaterialien zugeordnet [Lüthkehermöller, 2008].</p> <p>2.3. Aus bovinem Knochen durch einen thermischen Sinterungs- (z.B. Endobon, Pyrost) oder Elutionsprozess (z.B. Bio-Oss) gewonnene Hydroxylapatitkeramiken.</p> <p>2.4. Mehrphasische Kalziumphosphatkeramiken</p>
---	---

	<p>(osteokonduktiv), Biogläser oder mehrphasige Glaskeramiken. Kalziumphosphatkeramiken wie z.B. biphasisches Calciumphosphat sind häufig gebrauchte Rohmaterialien für den Knochenersatz. Diese Keramiken haben eine chemische Zusammensetzung, die der des Knochenminerals sehr ähnlich ist. Sie enthalten eine Mischung von Hydroxylapatit (HA) und Beta Tricalciumphosphat (<math>\beta</math>-TCP). Sie sind biokompatibel und osteokonduktiv [Gauthier, 2011].</p>
	2.5. Kalziumphosphathaltige Knochenzemente (NORIAN SRS)
<b>3. synthetische, organische Verbindungen</b> <sup>12</sup>	3.1. Polyester
	3.2. Polyanhydride
	3.3. Polyaminosäuren
	3.4. Polyorthoester
	3.5. Polyphosphazene
<b>4. Komposite</b>	<p>Komposite sind Verbundwerkstoffe bestehend aus zwei oder mehreren Materialien, die Regionen formen, die groß genug sind, um als Kontinua betrachtet zu werden, und üblicherweise fest zusammen an der Schnittstelle verbunden sind [Hashin 1983]. Eine andere Definition besagt, dass diese Substanzen durch Addition zweier verschiedener Knochenersatzmaterialien oder durch Kombination mit einer nicht vorbehandelten biologischen Substanz, wie z.B. autologe Spongiosa, hergestellt werden. [Lüthkehermöller, 2008].</p>

<sup>12</sup> Werden unterteilt nach der chemischen Zusammensetzung der in ihnen enthaltenden polymeren Verbindungen

---

	<p>Die Forschung konzentrierte sich in den letzten Jahren mehr auf Komposite, da realisiert wurde, dass ein einzelnes Material eventuell nicht der Komplexität des hochstrukturierten humanen Gewebes gerecht wird [Leeuwenburgh, 2008] und da man versuchen musste, die mechanischen Eigenschaften wie z.B. die mechanische Festigkeit zu verbessern [Carter, 2007].</p> <p>Die Verbindung von Titan und Glaskeramik beispielsweise, kombiniert die Vorteile beider Materialien: die Glaskeramik ist mechanisch relativ schwach, bindet aber direkt physikochemisch an Knochen, das Titan ist mechanisch stabil aber fast inert. Bei dieser Kombination kommt es zu einer Knochenbindung zur Glaskeramikkomponente und zu einem Knochenkontakt zur Titanmatrix [Müller- Mai, 1989].</p> <p>Auch eine Art der Komposition ist das Anbringen von Coatings. Das Ummanteln von Implantaten kann verschiedene Ziele haben, z.B. das Substrat gegen Korrosion schützen, das Implantat biokompatibel machen oder eine nicht bioaktive Oberfläche in eine bioaktive umwandeln [Carter, 2007].</p>
--	--

## 9. Danksagung

Herr Priv.-Doz. Dr. Christian Müller Mai möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die gute Zusammenarbeit ganz herzlich danken. Besonders hilfreich und sehr lehrreich für mich waren auch die zusammen durchgeführten Operationen. Seine Kompetenz und die Erfahrung kamen mir bei zahlreichen Gelegenheiten sehr zugute.

Besonderer Dank gilt Priv. -Doz. Dr. Christian Große-Siestrup, insbesondere für die aufgebrachte Geduld, die zahlreichen Ermutigungen und für die Freiheit die er mir während des gesamten Zeitraumes gewährte.

Auch Frau Prof. Knabe habe ich zu danken, da sie immer schnell und präzise meine Fragen beantwortete, besonders im Bereich der Immunhistochemie, aber auch in allen anderen Bereichen.

Der gesamten Abteilung der oralen Struktur- und Entwicklungsbiologie an der Charité möchte ich für die freundliche Beantwortung meiner Fragen und die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Hier gilt mein Dank vor Allem Dr. Herbert Renz für die interessante Einführung in die Welt der Elektronenmikroskopie und die Hilfe bei allerlei Fragen rund um die Mikroskopie und den ausführlichen Erklärungen.

Frau Annekathrin Kopp möchte ich für die sehr freundliche Erklärung der Arbeitsweise an den Geräten, der Färbemethoden und für die Hilfe bei der Bearbeitung der Proben bedanken.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben.

**10. Eidesstattliche Erklärung**

“ Ich, Nora Abdin-Bey, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung der Wirkung eines auf Bioglas basierenden Knochenersatzmaterials mit einem wachstumsstimulierenden Protein (Bone Morphogenetic Protein) auf das Knochenwachstum beim Kaninchen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum: Berlin, 05.11.2012

Name: Nora Abdin-Bey