

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Kommissarische Direktorin: PD. Dr. med. K. Neumann)

**Einfluss von BMP 4 in Kombination mit
NovaBone-C/MTM auf die Osteogenese
knöcherner Defekte**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
von Richard Markwart,
geboren am 17.03.1979 in Halle-Dölau

Gutachter: PD Dr.med. K. Neumann
Prof. Dr. med. M. Bloching

Datum der Verteidigung: 26.02.2009

Referat und bibliographische Beschreibung

Das Ziel der Arbeit war die Frage, ob der Zusatz von BMP 4 (Bone Morphogenetic Protein) zu dem Bioglass® NovaBone-C/M™ den Knochenheilungsprozess an ossären Defekten von Meerschweinchen zusätzlich beschleunigen kann. BMP 4 ist ein Zytokin aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren, die primär verantwortlich für die Entwicklung sowie Reifung von Knorpel- und Knochen22gewebe sind. Bioglass® ist eine bioaktive Substanz mit osteokonduktiven Eigenschaften. In dieser Studie wurde anhand von 24 Tieren aufgeteilt in drei Gruppen zu je acht Tieren, der Einfluss von BMP 4 dargestellt. Man implantierte den Tieren Bioglass® in vorher geschaffene Defekte der rechten und linken Bulla und Kalotte, dem Bioglass® der linken Seite wurde jeweils das Zytokin BMP 4 zugesetzt. Durch unterschiedliche Sitzzeiten der Gruppen (vier, acht und zwölf Wochen) wurde das Verhalten des Zytokins in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Im Bereich der Kalotte war es möglich, für die Gruppe 1 (vier Wochen; $p=0,057$) und 2 (acht Wochen; $0,077$) eine tendenziell beschleunigte Ossifikation zu ermitteln, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Im Bereich der Bulla wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Um eine optimale Wirkdauer des BMP 4 im Defekt zu erreichen, ist eine hohe Konzentration des Zytokins über einen längeren Zeitraum im Defekt notwendig. Die Ergebnisse im Bereich der Kalotte deuten an, dass die Kombination eines osteoinduktiven Zytokins (BMP 4) mit einem osteokonduktiven Material (NovaBone-C/M™) als Carriersystem eine viel versprechende Alternative zur konventionellen Behandlung von Knochendefekten ist. Weitere Untersuchungen sollten die Frage nach dem optimalen Carriersystem aufgreifen um eine maximale Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren (z.B. BMP 4) im ossären Defekt zu verwirklichen.

Markwart, Richard: Einfluss von BMP 4 in Kombination mit NovaBone-C/M™ auf die Osteogenese knöcherner Defekte. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Knochen	1
1.1.1.	Knochenaufbau	1
1.1.2.	Knochenentwicklung	1
1.1.4.	Fraktur und Frakturheilung	2
1.2	Bioglass®	5
1.2.1	Allgemein.....	5
1.2.2	Zusammensetzung und Wirkung von Bioglass®	6
1.2.3	Anwendungsgebiete von Bioglass®	7
1.3	Bone Morphogenetic Proteins	8
1.3.1	Geschichte	8
1.3.2	TGF-β-Superfamilie	9
1.3.3	BMP-Rezeptor und Signaltransduktion	13
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Bioglass®	16
2.1.2.	Bone Morphogenetic Protein 4	16
2.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	17
2.3	Operationstechniken.....	17
2.3.1	Implantation	17
2.3.2	Explantation	19
2.4	Schnitttechnik.....	19
2.5	Färbungen.....	21
2.5.1	Giemsa-Färbung.....	22
2.5.2	Reagenzienherstellung	22
2.5.3	Färbeverfahren	22
2.5.4	Masson-Goldner-Färbung	23
2.5.5	Reagenzienherstellung	23
2.5.6	Färbeverfahren.....	23
2.5.7	Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung nach Ehrlich	24

2.5.8	Färbetechnik	24
2.6	Flächenbestimmung	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Mikroskopische Ergebnisse	26
3.1.1	Kalotte	26
3.1.2	Bulla.....	30
3.2	Statistische Ergebnisse	33
3.2.1	Effekte an der Kalotte, t-Test	33
3.2.2	Effekte an der Kalotte, ANOVA	34
3.2.3	Effekte an der Bulla (Mittelohr), t-Test.....	35
3.2.4	Effekte an der Bulla (Mittelohr), ANOVA.....	36
4.	Diskussion	37
4.1	Einfluss von BMP 4	38
4.1.1	BMP 4 Wirkung in Abhängigkeit von der Defektlokalisierung-Kalotte	39
4.1.2	BMP 4 Wirkung in Abhängigkeit von der Defektlokalisierung-Bulla	41
4.3	BMP-Applikation.....	42
4.3.1	BMP-Carrier	43
4.3.2	Organische Carrier.....	45
4.3.3	Anorganische Carrier.....	47
4.3.4	Gentherapie.....	49
5.	Klinische Relevanz.....	51
	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	53
	Anhang	64
	Thesen.....	68
	Curriculum vitae	70
	Selbstständigkeitserklärung	73
	Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	Aqua destillata
ATP	Adenosintri-phosphat
β	Beta
β -TCP	β -Trikalziumphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
CSD	Critical-Size-Defekt
CTGF	Connective tissue growth factor
d.h.	das heißt
DBM	Demineralized Bone-Matrix
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
GDF	Growth and Differentiation Factor
HI-Virus	Human Immunodeficiency Virus
HAP	Hydroxylapatit
IGF	Insulin like growth factor
IP	isoelektrischer Punkt
MIS	Mullerian Inhibiting Substance
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NCP	nicht kollagene Proteine

OP	Osteogenic Protein
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGA	Polyglykolsäure
PGA	Polyglycolidsäure
PLA	Polylactidsäure
rh	rekombinant human
TBC	True Bone Ceramic
TCP	Trikalziumphosphat
TGF	Transforming Growth-Faktor
VGR	Vestigal gene related genes
z.B.	zum Beispiel
μ	Mikro
μm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1. Knochen

1.1.1. Knochenaufbau

Das Knochengewebe gehört dem passiven Bewegungsapparat an und erfüllt sowohl biomechanische als auch metabolische Aufgaben. Entwicklungsgeschichtlich entsteht das Knochengewebe aus dem Mesenchym, welches wiederum aus dem Mesoderm hervorgeht. Man unterscheidet im Wesentlichen lange Knochen, kurze Knochen, platte Knochen und als Sonderform pneumatisierte Knochen. Biochemisch macht der Anteil der anorganischen Matrix etwa 50 Prozent des Trockengewichts aus, Hauptbestandteil ist Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Diese nadelförmigen Kristalle liegen den Kollagenfibrillen längs an und sind von einem Hydratmantel umgeben, der den Ionenaustausch erleichtert und so die Einlagerung oder den Abbau von Kalzium und Phosphat (Löffler & Petrides, 1997). Ebenfalls enthalten sind Nitrat, Eisen, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelemente (Schiebler, 1996; Drenckhahn et al., 1994). Der organische Anteil besteht zu 95 Prozent aus Kollagenfasern vom Typ I, die restlichen 5 Prozent machen Glykosaminoglykane aus zum Beispiel Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat und spezifische Proteine wie Osteokalzin und Osteonektin, sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine (Löffler & Petrides, 1997).

1.1.2. Knochenentwicklung

Die Ossifikation bzw. Osteogenese beschreibt den Prozess der Neubildung von Knochengewebe z.B. im Rahmen des Entwicklungszyklus oder nach Frakturen (Bauer & Muschler, 2000; Lane, 1999), wobei man zwei Arten unterscheidet, die desmale Ossifikation und die chondrale Ossifikation. Die desmale Ossifikation bezeichnet man auch als direkte Knochenbildung, da Knochen direkt aus dem Mesenchym entsteht. Die chondrale Ossifikation dagegen verläuft über eine knorpelige Vorstufe und wird auch als indirekte Ossifikation bezeichnet.

Als Osteoinduktion bezeichnet man die Differenzierung von pluripotenten Mesenchymzellen zu Knorpel oder Knochen bildenden Zellen mit darauf folgender Ossifikation (Martinez & Walker, 1999; Rueger, 1998). Osteoinduktion wird durch osteoinduktive Zytokine, die so genannten Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gelenkt. Die Osteoinduktion ist nicht an das Vorhandensein von knöcherner Matrix gebunden, sondern kann Beobachtungen zufolge Knochenneubildung in ektopischen Lokalisationen z.B. der Muskulatur induzieren (Einhorn, 1995). Um die osteoinduktive Potenz des jeweiligen Zytokins zu bestimmen, bindet man es an eine Trägersubstanz und implantiert es subkutan in Ratten. Über zelluläre Mechanismen werden undifferenzierte mesenchymale Stammzellen in die Implantationsregion gelockt, die sich schließlich zu Chondroblasten und Osteoblasten ausdifferenzieren. Letztlich entsteht über den Mechanismus der enchondralen Ossifikation neuer Knochen in ektope Lage (Wozney & Rosen, 1998).

Die Osteokonduktion beschreibt einen Vorgang, bei dem ein Transplantat bzw. ein Knochenersatzmaterial in einen knöchernen Defekt implantiert wird, um als dreidimensionale Leitschiene für einwandernde mesenchymale Zellen und Osteoprogenitorzellen sowie für neu einsprießende Gefäße zu fungieren (DenBoer et al., 2002; Einhorn, 1995). Im Gegensatz zur Osteoinduktion wird der Knochen hier direkt (desmal) gebildet. Ein Knochenwachstum findet aber nur bei Biokompatibilität, geeigneter Oberflächenstruktur, zweckmäßiger Porosität und geeigneten chemischen Eigenschaften statt. Nachteilig wirkt sich der lange Zeitraum bis zur vollständigen Ossifikation aus, der je nach Biomaterial und Defektvolumen mehrere Monate betragen kann. Um den Vorgang zu beschleunigen mengt man autologen Knochen bei oder verwendet das implantierte Biomaterial als Träger für osteoinduktive Zytokine (BMPs).

1.1.4. Fraktur und Frakturheilung

Eine Fraktur liegt vor bei vollständiger Durchtrennung der Kontinuität des Knochens durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung. Als Fissur

(Knochenriss) oder Infraktion (Spaltbruch) werden Kontinuitätsunterbrechungen bezeichnet, die nicht vollständig sind. Zu unterscheiden ist die Ermüdungsfraktur in Folge chronischer Schwächung des Knochens durch Einwirkung von Mikrotraumata, die Fraktur nach Trauma durch direkte Gewalteinwirkung, die Fraktur durch indirekte frakturferne Gewalteinwirkung (Hebelwirkung) und die pathologische Fraktur, bei der vorgeschädigtes Knochengewebe durch ein inadäquates Trauma verursacht wird.

Die primäre Frakturheilung, auch als Kontaktheilung bezeichnet, geht ohne Bildung eines Kallus einher. Man versucht, die Knochenenden perfekt zu adaptieren, um einen physiologischen Knochenumbau zu imitieren. Voraussetzung dafür ist eine stabile Druckosteosynthese mit kleinstem Abstand der Frakturrenden und eine absolute Ruhigstellung über wenige Wochen. Bei der sekundären Frakturheilung kommt es zur Bildung eines Frakturhämatoms durch die eröffneten Gefäße des Knochens sowie zum Absterben von Knochenzellen. Anfangs wird der zu überbrückende Defekt durch ein knorpelartiges Bindegewebe, den Knorpelkallus, ausgefüllt. Parallel dazu erfolgt die enchondrale Ossifikation. Vorher kommt es zur Ausbildung von Granulationsgewebe mit einsprossenden Gefäßen und Bindegewebszellen. Schließlich kommt es zur Resorption des Hämatoms und des geschädigten Knochengewebes. Etwa zum selben Zeitpunkt erfolgt die Verknöcherung des bindegewebigen Kallus im Stile der oben beschriebenen enchondralen Ossifikation. Das Resultat ist Geflechtknochen, der unter zunehmender Belastung in Lamellenknochen umgebaut wird und als Knochen wieder eine geschlossene Einheit darstellt. Diese Form der Frakturheilung findet man häufig bei konservativer Therapie im Rahmen einer Ruhigstellung mit Gipsverband.

Die Säulen der optimalen Frakturheilung sind Ruhigstellung, eine intakte Blutversorgung des Gebietes, enger Kontakt der Enden nach Reposition sowie eine adäquate Schmerztherapie. Mikrobewegungen stellen eine Ausnahme dar, sie wirken sich günstig auf die Kallusbildung aus, da sie die Kalluselastizität

nicht übersteigen (Sarmiento et al., 1984). Sollte eine der Säulen fehlen bzw. im schlimmsten Fall eine Infektion im betroffenen Gebiet auftreten, ist die komplikationslose Heilung nicht gesichert. Verzögert sich diese oder bleibt sie aus, ist nach sechs Monaten oder längerer Zeit mit der Bildung eines falschen Gelenkes, einer Pseudarthrose, zu rechnen (de Gruyter, 2002; Mommsen & Schumpelick, 1999). Eine weitere mögliche Komplikation ist die Algodystrophie (Morbus Sudeck, Complex regional pain syndrom), deren Ursache noch nicht vollständig geklärt ist. Durch äußere Einwirkung, z.B. Trauma oder Operationen, kommt es zur Dystrophie und Atrophie von Gliedmaßenabschnitten. Symptome sind Ödeme, Durchblutungsstörungen, Schmerzen und Funktionsstörungen. Therapeutisch ist auf eine adäquate Analgesie als auch manuelle Therapie, sowie antiphlogistische Medikamente zu achten. Nicht selten ist die Prognose ungünstig, da die Diagnose in den meisten Fällen erst spät gestellt wird.

Ein verzögerter Heilungsprozess wird in der Literatur auch als „Delayed Union“ bezeichnet (Runkel & Rommens, 2000; Rüter & Mayr, 1999; Einhorn, 1998). Per definitionem laufen Osteoneogenese und Heilungsprozess zwar ab, aber die Fraktur ist nach einem Zeitraum von vier Monaten nicht durchgebaut. Davon unterscheidet man die Nonunion, bei der die Frakturheilung nach einem Zeitraum von sechs Monaten ausbleibt und der Knochen seine eigentliche Funktion nicht mehr ausüben kann (Runkel & Rommel, 2000; Rüter & Mayr, 1999; Einhorn, 1998).

Nonunions unterteilt man weiter in hypertrophe und atrophe Nonunions. Die hypertrophe Nonunion ist gekennzeichnet durch überschießende Kallusbildung beider Fraktarenden bei instabiler Lage der Fraktarenden zueinander. Durch Fixation der Enden zueinander mittels eines Fixateurs externe oder einer Verplattung wird versucht, diese Situation zu beherrschen. Die atrophe Nonunion wiederum ist durch eine Minderdurchblutung gekennzeichnet, wobei die Fraktarenden keinen oder nur wenig Kallus bilden und dadurch die knöcherne Verbindung ausbleibt. In diesem Fall versucht man,

die Vaskularisation im Frakturgebiet zu optimieren und, wenn möglich, sowohl osteogene als auch osteoinduktive Materialien zu verwenden (Runkel & Rommens, 2000; Einhorn, 1999; Rüter & Mayr, 1999).

Die Theorie des „Regional Acceleratory Phenomenon“ (RAP) wurde zur Erklärung des komplexen Netzwerks regulativer Kontrollmechanismen der Frakturheilung entwickelt. Sie besagt, dass Knochenheilung durch eine Abfolge von untereinander vergesellschafteten zellulären Ereignissen stattfindet. Durch Aktivierung und Induktion lokaler und blutgebundener Zellen, die im Verlauf proliferieren sowie interagieren wird die Frakturheilung gesteuert. (Klaushofer & Peterlik, 1994).

Endogen wird die Frakturheilung durch Zytokine und Mediatoren gesteuert. Prostaglandine werden beispielsweise vermehrt im Granulationsgewebe und im Kallusgewebe freigesetzt (Wittenberg & Wittenberg, 1992). BMP, TGF- β , FGF, PDGF, IGFs werden von Prä-Osteoblasten und Osteoblasten im Rahmen von Proliferationsvorgängen und Differenzierungsvorgängen auto- oder parakrin ausgeschüttet und sind somit an der Frakturheilung beteiligt (Andrew et al., 1993; Andrew et al., 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass BMP 4 in der frühen posttraumatischen Phase vermehrt von Osteoblasten freigesetzt wurde (Nomura et al., 1994). Als „Critical Size Defect“ (CSD) definiert man den kleinsten intraossären Defekt, der im Rahmen der Knochenneubildung während der Lebenszeit eines Tieres nicht heilen würde. Die Mindestgröße eines CSDs sollte den 1,5 fachen Durchmesser des Knochens überschreiten (Schmitz & Hollinger, 1986).

1.2 Bioglass[®]

1.2.1 Allgemein

Bioglass[®] als erste bioaktive Keramik wurde in ihren Grundzügen erstmals von Hench im Jahr 1971 beschrieben (Hench et al., 1971). Folge dessen waren Forschungsprojekte und Entwicklungen auf dem Gebiet der

Knochenersatzmaterialien (Gross et al., 1988). Die Besonderheit und der Vorteil von Bioglass[®] ist die Eigenschaft, sich an Knochen zu binden, um dort seine osteokonduktive Funktion zu entfalten. Dies ist die Grundlage der Weiterentwicklung des bioaktiven Granulates. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann davon ausgegangen werden, dass Bioglass[®] eine Alternative zu den konventionellen Knochenersatzstoffen darstellt.

1.2.2 Zusammensetzung und Wirkung von Bioglass[®]

In der vorliegenden Studie wurde das Bioglass[®] NovaBone-C/MTM der Firma US-Biomaterials, Alachua, Florida, USA verwendet. NovaBone-C/MTM, ein synthetisches Feingranulat, ist ein bioaktives Glas (Bioglass[®]) für den alloplastischen Knochenaufbau. Es setzt sich aus den Elementen Kalzium (Ca), Natrium (Na), Silizium (Si), Phosphor (P), Sauerstoff (O) in definierter Konzentration zusammen. Durch Experimente mit Block-Implantaten und verschiedenen Kompositen des Glases stellten Hench und Andersson (1993) die Bioaktivität des jeweiligen Glases in Abhängigkeit des relativen Verhältnisses der einzelnen Bestandteile zueinander dar.

Aufgrund unterschiedlich ausgefallener Studien sind die Partikelgröße sowie die Größenverteilung der Partikel innerhalb des Granulats immer noch ein strittiges Thema (MacNeill et al., 1999; Schepers & Ducheyne, 1997). Das verwendete Bioglass[®] hatte eine vom Hersteller vorgegebene Partikelgröße, die zwischen 90 und 710 Mikrometer (μm) liegt, die für die ossäre Regeneration ideal sein soll. Bergman & Litkowski (1995) haben experimentell gezeigt, dass Granulate mit Größen unter 310 μm ein Narbengewebe im knöchernen Defekt bilden. Nach Implantation bildet sich auf dem Granulat eine oberflächliche Kalziumphosphatschicht, die dem Hydroxylapatit des Knochens in Struktur und Zusammensetzung ähnelt. Schließlich bewirkt NovaBone-C/MTM die Attraktion von Osteoblasten und deren Proliferation (Hench et al., 1991). Auch der veränderte Metabolismus der Osteoblasten in einem aufbereiteten Bioglass[®]-Medium lässt auf die osteokonduktiven Eigenschaften des Granulates

schließen. Bioglass[®] regt die Glykolyse an und damit auch die zelluläre ATP-Produktion aufgrund einer internen und externen Alkalisierung. Des Weiteren wurde eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums festgestellt. Kalzium ist ein Second-Messenger, der im endoplasmatischen Retikulum gespeichert wird und unter anderem an der Aktivierung von Proteinkinasen und Enzymen beteiligt ist (Silver et al., 2001).

1.2.3 Anwendungsgebiete von Bioglass[®]

Verwendung findet dieses Knochenersatzmaterial unter anderem zur Behandlung von nichtstrukturellen kraniofazialen, maxillofazialen und oralen Knochendefekten (Oguntebi et al., 1993). Bisher ist die Gewinnung autologen Knochenmaterials weit verbreitet, wodurch Patient und Arzt Nachteile in Kauf nehmen müssen. Durch den operativen Eingriff besteht das Risiko einer Infektion oder einer Medikamentenunverträglichkeit sowie eines im ungünstigen Fall nicht unerheblichen Blutverlustes und im Normalfall postoperative Schmerzen. Als weitere Option gibt es die Möglichkeit, allogenen Knochen zu transplantieren. Hierbei ist es teilweise notwendig, Immunsuppressiva einzusetzen, da Abstoßungsreaktionen zu den Komplikationen gehören. Ein weiterer negativer Aspekt ist die Kostenfrage dieser Verfahrensweise. Metalle oder Zemente wiederum,- eine weitere Variante der Knochendefektbehandlung,- erfüllen nicht die physikalischen und physiologischen Ansprüche. Aufgrund weit reichender Nachteile herkömmlicher Methoden ist die Forschung mit bioaktiven, synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien und deren Weiterentwicklung von großer Bedeutsamkeit, um die oben beschriebenen Nachteile für den Patienten und dessen Organismus zu minimieren und nach Möglichkeit zu eliminieren.

1.3 Bone Morphogenetic Proteins

1.3.1 Geschichte

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) werden bereits während der Embryonalzeit gebildet und spielen eine wichtige Rolle bei der Knochenentwicklung und auch über die Geburt hinaus bei Umbau- und Heilungsprozessen (Reddi, 1994). Auch hier war und ist das Ziel, durch Studien Wiederherstellungs- und Regenerationsprozesse im Zusammenhang mit Knochendefekten zu erforschen, um neue therapeutische Ansätze und Methoden zu entwickeln und sie in den klinischen Alltag einzuführen.

1889 veröffentlichte der Amerikaner Senn seine Experimente mit einem durch Salzsäure demineralisierten Knochen, den er in Schädeldefekte bzw. in Knochenhöhlen einbrachte. Es zeigte sich, dass der vollkommen entkalkte Knochen zu einem Teil durch neue Knochenmatrix ersetzt wurde (Senn, 1889). Lacroix bestätigte 1945 die Ergebnisse durch ähnliche Versuche mit demineralisierten Knochen. Es gelang eine heterotrope Ossifikation in der Muskulatur von Kaninchen anzuregen (Lacroix, 1945). Er bezeichnete die von ihm verwendete Substanz als Osteogenin (Lacroix, 1951). 1965 implantierte Urist demineralisierten Knochen in Muskelgewebe von Nagern (Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen). Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen seiner beiden Vorgänger. Urist beobachtete ebenfalls eine heterotrope Knochenbildung im Weichgewebe der Tiere (Urist, 1965). Er nahm an, dass in der Knochenmatrix eine Art Knocheninduktionssubstanz existiert, die in der Lage ist, die Knochenneubildung zu induzieren. Er nannte sie Bone Induction Principle (BIP) (Urist et al., 1967). Vier Jahre später nannten sein Kollege Strateva und er diese Substanz Bone Morphogenetic Protein, BMP (Urist & Strateva, 1971).

Biochemische und biotechnologische Fortschritte ermöglichten die Identifikation und Aufreinigung der Faktoren, die osteoinduktive Wirkungen besitzen, wobei die Knochenmatrix das eigentliche BMP- Depot des Körpers darstellt, aus dem zu Umbau- und Regenerationszwecken BMPs freigesetzt

werden (Gitelman et al., 1994; Sampath et al., 1992; Wozney, 1989; Wang et al., 1988). Sampath und Reddi (1981) waren die ersten, die In-vivo-Methoden entwickelten, um die osteoinduktive Aktivität der einzelnen Faktoren zu quantifizieren. In den darauf folgenden Jahren konnte die Rolle der BMPs nicht nur in der Knochenphysiologie und in der adulten Knochenheilung, sondern auch ihr Einfluss auf die embryonale Entwicklung größtenteils aufgeklärt werden (Termaat et al., 2003). Bei Knock-out Mäusen führte das Fehlen von BMP 2 im Tierversuch zum frühen Tod des Feten durch Defekte in Herz- und Amnionaufbau, während eine Überexpression von BMP 2 zu Verformungen der Extremitätenknochen führt. Ein Mangel an BMP 4 bewirkt ebenfalls den Tod des Embryos durch schwerwiegende Veränderungen im Aufbau des Mesoderms, während ein Überschuss zu Fehlbildungen der Extremitäten führt (Wozney & Rosen, 1998). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass BMPs essentiell sind für die Ausdifferenzierung und Entwicklung von Skelett, Extremitäten und inneren Organen während der Embryonalzeit. Beim Erwachsenen beschränkt sich die Wirkung der BMPs fast ausschließlich auf die Osteogenese und Osteoneogenese, da die BMP-Rezeptoren nicht mehr auf allen Zellen vorhanden sind (Wozney & Rosen, 1998).

1.3.2 TGF- β -Superfamilie

BMPs gehören zur Transforming-Growth-Faktor- β -Superfamilie (TGF- β -Superfamilie). Zu dieser Familie gehören zahlreiche Signalmoleküle mit ganz unterschiedlichen Funktionen (Abbildung 1.1), wie zum Beispiel die Mullerian Inhibiting Substance (MIS), die zur Ausprägung des männlichen Geschlechts durch Rückbildung des Müllerschen Ganges führt. Die Activine und Inhibine, welche die Freisetzung von Follikel Stimulierendem Hormon (FSH) aus der Hypophyse regulieren oder Faktoren, die ganz wesentlich für die Gewebeentwicklung sind, zählen ebenfalls zu den Growth and Differentiation Factors (GDFs). Die BMPs werden entsprechend ihrer Funktion in Subfamilien gegliedert (Abbildung 1.1). BMP 2, 6 und 9 besitzen die größte osteoinduktive Aktivität. Für BMP 4 und 7 wurden geringere Aktivitäten nachgewiesen, wie Cheng et al. 2003 in einer vergleichenden Studie zeigten. Das Protein BMP 4

besteht aus 408 Aminosäuren, aufgliedert in drei Untereinheiten, die verschiedene Funktionen übernehmen. In ihrer C-terminalen Domäne sind sieben Zysteinreste konserviert (Rueger, 2002). Ein Zysteinrest bildet eine intermolekulare Disulfid-Brücke, während die anderen intramolekulare Disulfid-Brücken bilden, die man auch als „cysteine knot“ bezeichnet. BMPs sind dimere Moleküle, deren Polypeptidketten über Disulfid-Brücken verbunden sind. Ein Proteinstrang setzt sich aus bis zu 140 Aminosäuren zusammen (Reddi, 2001; Griffith et al., 1996).

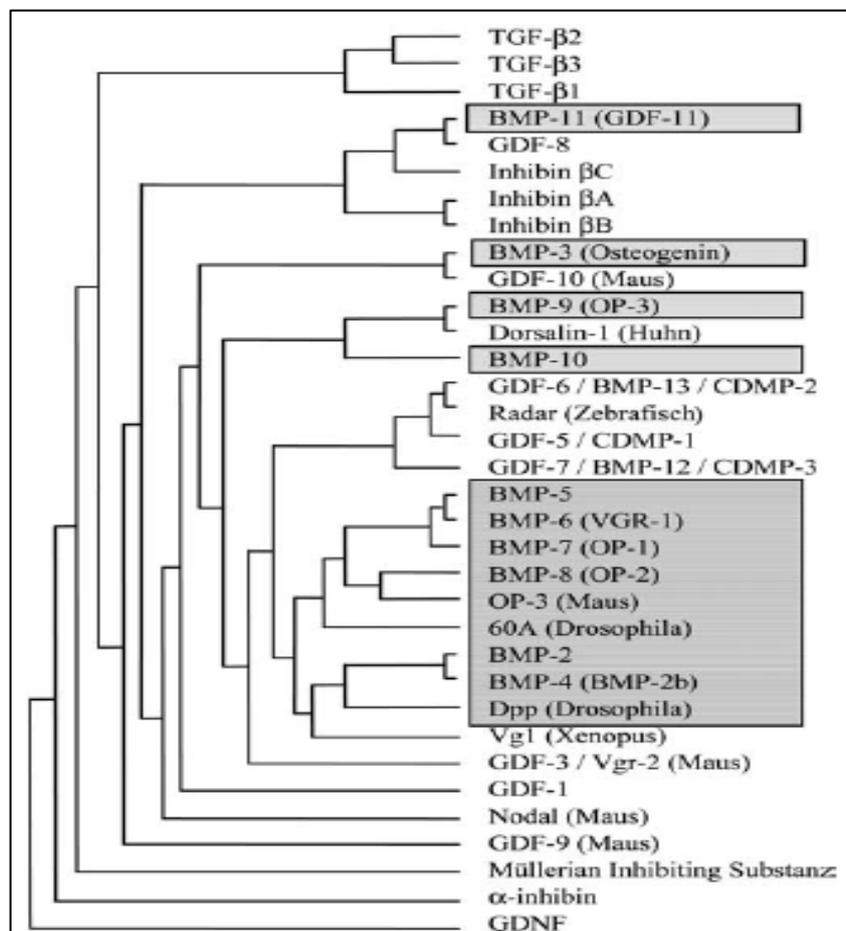


Abbildung 1.1: Mitglieder der TGF- β -Superfamilie mit Markierung der BMP-Subfamilien und Nennung ihrer Synonyme (VGR= Vestigal gene related genes; OP=Osteogenic Protein; GDF=Growth and Differentiation Factor) (Bramlage et al., 2005)

BMP 1 ist kein Mitglied der TGF- β -Superfamilie da es aufgrund seiner Struktur zu den anderen Mitgliedern Unterschiede aufweist. BMP 1 bzw. dessen Isoformen sind in der Lage BMPs zu aktivieren, oder als Prokollagen-C-Proteinase zu fungieren, um durch Spaltung von Prokollagen- 1, -2 und -3 zur Osteogenese beizutragen. Es differiert also in seinen Eigenschaften von den anderen BMPs und ist im Gegensatz zu den anderen am Aufbau extrazellulärer Substanz beteiligt (Janitz et al., 1998; Hofbauer & Heufelder, 1996).

Sequenzhomologie

In Abbildung 1.2 ist der Sequenzvergleich für die in ihrer primären Struktur sehr ähnlichen BMP-Moleküle 2, 4, 5, 6 und 7 dargestellt. Aufgrund der guten Übereinstimmung werden BMP 2 und BMP 4 in eine Subfamilie eingeordnet. BMP 5, 6 und 7 werden ebenfalls zu einer Subfamilie zusammengefasst (Abbildung 1.1, 1.2). Im Tierversuch wurden gleiche Mengen an BMP 2, 4, 6 und 7 benutzt, um denselben qualitativen Effekt auf die Osteogenese bzw. die Chondrogenese zu erzielen. Als Ausnahme ist BMP 5 zu erwähnen, hier benötigten Wozney und Rosen vielfach höhere Mengen an Protein, um den gewünschten Effekt zu erzielen (Wozney & Rosen, 1998). Im Rahmen dieser Tierversuchsstudie sollte das im Gegensatz zu BMP 2 und 7 bisher weniger erforschte Protein BMP 4 verwendet werden, um den Vorteil einer kombinierten Behandlung von Zytokin und Träger darzustellen. Aufgrund der Sequenzhomologie mit BMP 2 sind gute Resultate zu erwarten.

THEORETISCHER HINTERGRUND

BMP4	MIPGNRMLMVLLCQVLLGGASHASLIPETGKKKVAEIQGHAGGRRSGQ-SHELLRDFEA
BMP2	MVAGTRCLLALLLPQVLLGGA--AGLVPELGRRKFAAA---SSGRPSSQPSDEVLSEFEL
BMP2A	MVAGTRCLLALLLPQVLLGGA--AGLVPELGRRKFAAA---SSGRPSSQPSDEVLSEFEL
BMP7	REMQR
BMP6	
BMP5	RNHER-REIQR
	60 115
BMP4	TLIQMFGRLRRRQPSKSAVIPDYMRDLYRLQSGEEEEQIHSTGLEYP----ERPASRAN
BMP2	RLLSMFGLKQRPTPSRDAVVPYMLDLYRRHSGQP-----GSPADHRLERAASRAN
BMP2A	RLLSMFGLKQRPTPSRDAVVPYMLDLYRRHSGQP-----GSPADHRLERAASRAN
BMP7	EILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFLDLYNAMAVEEGGGP-GGQGFSYPKAVFSTQ-
BMP6	
BMP5	EILSILGLPHRPRPFSPGKQASSAPLFMLDLYNAMTNEENPEESEYSVR---ASPNGYPR
	116 175
BMP4	TVRSFHHEEHLNIPGTSSENSAFRFLFNLSIPENEAISSAELRFLFREQVDQDPDWERGF
BMP2	TVRSFHHEESLEELPETS GKTRRRFFNLSSIPTEEFITSAELQVFREQM QDALGNSSSF
BMP2A	TVRSFHHEESLEELPETS GKTRRRFFNLSSIPTEEFITSAELQVFREQM QDALGNSSSF
BMP7	SFVNLVEHDK-EFFHPRYHHRFRF----DLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNET
BMP6	FKFNLSQIPEGEVVTAAEFRIYKDCVMGFSFKNQTF
BMP5	PLASLHDTNFINLVERDKDFS HQFRFDLTQIPHGEAVTAAEFRIYKDRSNNR---FENET
	176 234
BMP4	H-RINIYEVMPPAE VVPGHLITRLLDTRLVHHNVTRWETF DVSPAVLRWTRKQPNYGL
BMP2	HHRINIYEIIK PATANSKFPV-TRLLDTRLVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHGF
BMP2A	HHRINIYEIIK PATANSKFPV-TRLLDTRLVNQNASRWESFDVTPAVMRWTAQGHANHGF
BMP7	-FRISVYQVLQ---EHLGRESDFLLDSRTLWASEEGWLVFDITATSNHVVNPRHNLGL
BMP6	--LISITYQVLQ---EHQHRSDFLFLDTRVWVASEEGWLEFDITATSNLWVVTPQHNMGL
BMP5	I-KISIYQIIK---EYTRDADFLFLDTRKAQALDVGWLVFDITVTSNHVVINPQNNLGL
	235 294
BMP4	AIEVTHLHQTRTHQGHVRI SRSLPQSGNWAQLRPLLVTFGHDGRGHALTRRRRAKRSP
BMP2	VVEVAHLEEKQVSKRHVRI SRSLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPL--HKREKRQA
BMP2A	VVEVAHLEEKQ-VSKRHVRI SRSLHQDEHSWSQIRPLLVTFGHDGKGHPL--HKREKRQA
BMP7	QLSVETLDGQSINPKLAGLIGRHGPQNK-----QPFMVAFFKATEVHFRSIRSTGSKQR
BMP6	QLSVV-----TRDGVHVHPRAAGLVGRDGPYDKQFKVSEVHVTRTRSASSPFMVAFRRR
BMP5	QL----CAETGDGRSINVKSAGLVGRGQPSKQPFMVAFFKASE--RAANKRKNQNRNKS
	295 354
BMP4	KHHSQRARKKNKNCRRHSLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLADHLNSTNH
BMP2	KH-KQRKRLKS-SCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNH
BMP2A	KH-KQRKRLKS-SCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNH
BMP7	TPKNQEALRQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYCEGECAFPLNSYMNATNH
BMP6	TQSQDVARVSSASDYNSSLYVSFQDLGWQDWIIAPKGYAANYCDGECSPFLNAHMNATNH
BMP5	SSHQDSSREQQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAFYCDGECSPFLNAHMNATNH
	355 408
BMP4	AIVQTLVNSVNSIIPKACCVPELSAISMLYLDEYDKVVLKKNYQEMVVEGCGCR
BMP2	AIVQTLVNSVNSKIPKACCVPELSAISMLYLDENEKVVVLKKNYQDMVVEGCGCR
BMP2A	AIVQTLVNSVNSKIPKACCVPELSAISMLYLDENEKVVVLKKNYQDMVVEGCGCR
BMP7	AIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGC
BMP6	AIVQTLVHLMNPEYVPKPCCAPTKLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGC
BMP5	AIVQTLVHLMFPDHPKPCCAPTKLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRSCGC

Abbildung 1.2: Auflistung verschiedener BMPs mit Strukturhomologie, die einzelnen Buchstaben kodieren für je eine Aminosäure des Proteinstrangs. Die Schattierungen kennzeichnen Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zu BMP 4.

1.3.3 BMP-Rezeptor und Signaltransduktion

Man unterscheidet zwei transmembrane Serin/Threonin-Kinase- Rezeptoren, Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren. Bisher hat man zwölf Typ-I- und sieben Typ-II-Rezeptoren entdeckt, mit denen die TGF- β - Superfamilienmitglieder interagieren können. An den einzelnen Rezeptorkomplex binden die BMPs mit nur geringer Affinität, während sie an einen kombinierten Komplex aus Typ I und II mit höherer Affinität binden (ten Dijke et al., 1994, Abb.1.3). Es wird angenommen, dass aufgrund der Affinität zuerst an den Typ-I-Rezeptor gebunden wird und danach an Typ II (Gilboa et al., 2000). Durch Anlagerung des Glykoproteins Noggin an BMP wird die Bindung an die Rezeptoren inhibiert und so über einen Feedback-Mechanismus, vergleichbar mit der Regulation der Hormone im menschlichen Körper, der BMP-Spiegel kontrolliert. Als weitere BMP-Antagonisten identifizierte man Chordin und Gremlin (Hsu et al., 1998).

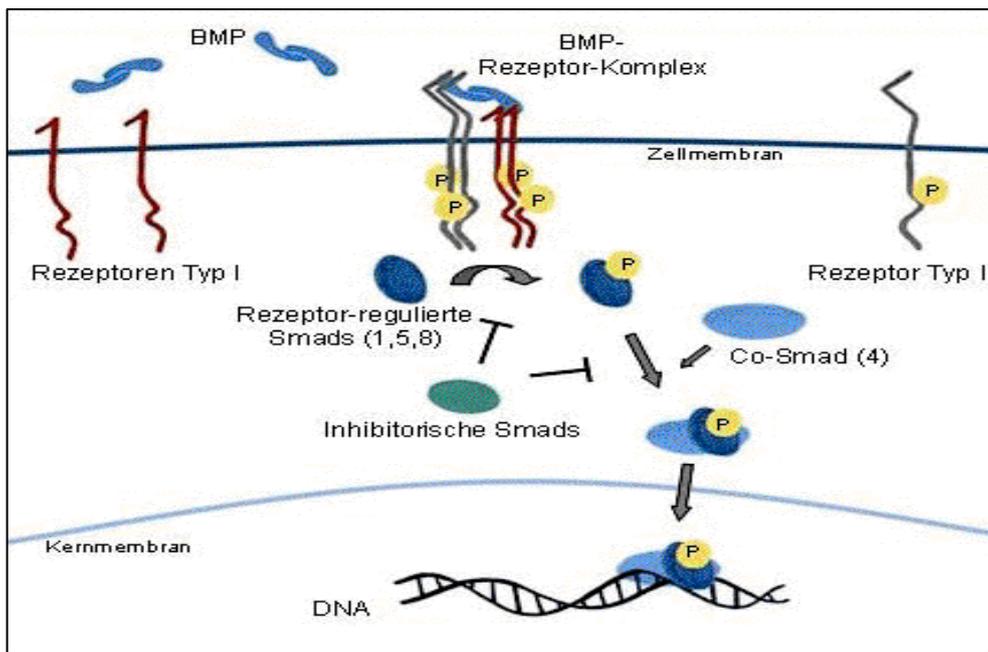


Abbildung 1.3 :Schematische Darstellung der BMP-Siganalkaskade. Daten aus Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf/2002. Norbert R. Kübler, Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (http://www.physik.uni-duesseldorf.de/Jahrbuch/2002/Kuebler/index_html) Download: 11.11.2006

Nach der Bindung der BMPs an den extrazellulären Rezeptorenkomplex (Abb.1.3) dimerisieren beide Rezeptoruntereinheiten. Die Untereinheit vom Rezeptortyp -II phosphoryliert die Untereinheit des Typ-I-Rezeptors und aktiviert dadurch dessen Serin/Threonin-Kinase, die eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird. Die intrazelluläre Kaskade erfolgt über phosphorylierte Smads (Korchynsky & ten Dijke, 2002). Smad ist eine zusammengesetzte Bezeichnung für intrazelluläre Proteine, die für die intrazelluläre Signalübertragung zuständig sind, indem sie nach der Aktivierung durch die Kinasen zunächst zum Kern der Zelle translozieren (Termaat et al. 2003; Reddi, 2001). Dort aktivieren oder unterdrücken sie Gene, die in Knorpel- und Knochenbildung involviert sind. Dieser Einfluss auf die transkriptionale Regulation der Genexpression führt schließlich zum Wachstum, zur Differenzierung sowie zur extrazellulären Matrixsynthese in der betroffenen Zelle (Reddi, 2001; Itoh et al., 2000; Kawabata et al., 1999).

Sma wurde erstmals in *C.elegans* (Savage et al., 1996) und Mad in *D.melanogaster* (Sekelsky et al., 1995) beschrieben. Beide Gene waren an Signalübertragungen mit BMPs beteiligt. Vergleichbare Gene wurden in Wirbeltieren gefunden. Alle intrazellulär liegenden Proteine, die durch die TGF- β -Superfamilie aktiviert werden, bezeichnet man als Smad (Korchynsky & ten Dijke, 2002). Es werden drei Gruppen von Smads unterschieden: (1) R-Smads (receptor activated smads), (2) Co-Smads (common partner smads) und (3) I-Smads (inhibitory smads) (Reddi, 2001). Nach Rezeptoraktivierung durch BMP werden die zytoplasmatisch liegenden R-Smads durch Phosphorylierung aktiviert. Im Zytoplasma bildet der aktivierte R-Smad mit einem Co-Smad einen trimeren Komplex, der schließlich in den Zellkern eindringt und dort direkt oder mit anderen Faktoren die Transkription von Zielgenen initiiert (Korchynsky & ten Dijke, 2001).

I-Smads sind inhibitorische Komplexe, die mit den R-Smads um die phosphorylierte Rezeptorstelle des Typ-I-Rezeptors konkurrieren, und somit als eine Art Kontrollinstanz im Sinne eines negativen Feedbacks fungieren (Nakao

et al., 1997). Die durch die BMP-Signalkaskade angesprochenen Gene kodieren für die folgenden Proteine: (1) Connective tissue growth factor (CTGF), ein Zytokin, das die Chondrozytenproliferation und -differenzierung wie auch die Expression osteoblastenspezifischer Gene steuert und (2) Osteoprotegrin, welches von Osteoblasten sezerniert wird und die Osteoklastenausreifung hemmt (Wan et al., 2001). Die inhibitorischen Smads werden ebenfalls kodiert. Zusammengefasst steuern BMPs die Expression von Enzymen, Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren sowie Transkriptionsfaktoren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bioglass[®]

Das hier verwandte Bioglass[®] trägt den Produktnamen NovaBone-C/M[™] und wird von der Firma US-Biomaterials, Alachua, Florida, USA hergestellt. Die chemische Zusammensetzung des Granulates ist: 45% Siliziumdioxid (SiO₂); 24,5% Natriumoxid (Na₂O); 24,5% Kalziumoxid (CaO); 6% Phosphorpentoxid (P₂O₅). Der Gehalt an SiO₂ bestimmt letztlich die Zuordnung, d.h. zu welcher Gruppe von Bioglass[®] das jeweilige Glas zählt. Es wurde für diese Studie 45S5 Bioglass[®] verwendet. In Kugelmøhlen wird im Herstellungsprozess Rohglas zerkleinert und schließlich ausgesiebt (Hench & Andersson, 1993). Das entstandene Granulat hat nach Aussiebung einen Durchmesser von 90 bis 710 µm ($M = 507 \mu\text{m}$, $SD = 180 \mu\text{m}$), ergaben Messungen an über 160 Partikeln nach Vorlagen der American Society for Testing and Materials. In ihrer Struktur sind die Partikel irregulär gewinkelt.

2.1.2. Bone Morphogenetic Protein 4

Das verwendete BMP 4 (rekombinantes humanes BMP 4) (rh BMP 4) wurde von der Firma R & D Systems Inc, Minneapolis, Minnesota, USA hergestellt. Es wurden zehn Mikrogramm (µg) BMP 4 in einem Milliliter (ml) Volumen gelöst. Als Lösungsmittel diente 4-millimolare (mM) Salzsäure (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland) mit 0,1 prozentigem (%) „Bovine Serum Albumin“ (BSA)-Zusatz (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), (d.h. 0,1 Gramm (g) BSA wurden pro 100 ml Salzsäure (HCl) der angegebenen Konzentration (4mM) zugesetzt). Das Gemisch wurde aliquotiert, um wiederholtes Einfrieren zu vermeiden.

2.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden weibliche Auszuchtmeerschweinchen Shoe: DH Dunkin-Hartley aus der Tierzucht Schönwalde GmbH verwendet. Das präoperative Gewicht lag zwischen 580 und 780 Gramm (g) und betrug im Mittel 675 g. Die Tiere wurden prä- und postoperativ unter standardisierten Bedingungen gehalten, d.h. die Raumtemperatur lag bei 20° Celsius mit maximaler Abweichung von einem Grad. Die Tiere wurden zu zweit im Käfig gehalten und hatten eine Zwölf-Stunden-Tag-Nacht-Periodik. Als Nahrung erhielten sie Trockenfutter als Pellets, trockenes Brot und Wasser ad libitum. Es wurden 24 Meerschweinchen in drei Gruppen zu jeweils acht Tieren untersucht, dabei wurden jedem Tier zwei Defekte mit BMP 4 und NovaBone befüllt und zwei Defekte ausschliesslich mit NovaBone.

2.3 Operationstechniken

2.3.1 Implantation

Vor der jeweiligen Implantation erhielt jedes Tier eine Vollnarkose. Es wurde eine Mischung aus Ketavet® 100 mg/kg Körpergewicht (Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Rompun® 5 mg/kg Körpergewicht (Bayer, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär in den rechten Oberschenkel der Tiere verabreicht. Nach Anästhesie wurden die Meerschweinchen gewogen und das Eingriffsgebiet rasiert. Zur Hautdesinfektion des rasierten Gebietes wurde Cutasept (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) verwendet. Das Operationsfeld wurde steril abgedeckt und mit einem Hautschnitt auf der Kalotte begonnen. Die Inzision erfolgte entlang der Kopf-Schwanz-Achse, beschränkte sich jedoch nur auf die Haut über der Sutura sagittalis. Danach wurde das Periost zur Seite präpariert, um dann die Haut mittels Haken nach lateral zu ziehen, einmal nach links und einmal nach rechts, da dort jeweils ein Defekt gesetzt wurde. Für die Bohrung wurde ein Rosenkopfböhrer mit einem Durchmesser von fünf Millimetern (mm) verwendet. Unter Spülung mit Kochsalzlösung, um eventuelle Hitzeschäden zu vermeiden, wurde durch das

knöchernen Schädeldach gebohrt, ohne dabei die Meningen zu verletzen. Im Anschluss wurde sowohl in den linksseitig, als auch in den rechtsseitig entstandenen Defekt ungefähr 0,1g NovaBone-C/M™ eingebracht. 10 µl der BMP-Lösung wurden mit 10 µl 0,9 % NaCl verdünnt und mit dem Bioglass® vermischt, so dass pro OP-Gebiet eine Menge von 100 Nanogramm (ng) BMP 4 linksseitig appliziert wurde. Das Operationsfeld wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial zugenäht.

Als nächstes wurde jeweils ein Schnitt hinter beide Ohren der Meerschweinchen gesetzt, um die Bulla, die beim Menschen dem Mittelohr entspricht, von außen frei zu präparieren. Dort injizierte man 0,1 ml Xylocain einprozentig (%) (Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland), da die Narkose teilweise flach wirkte, um den Stress für die Tiere auf einem niedrigen Level zu halten. Nach dem Hautschnitt und anschließender partieller Durchtrennung der Nackenmuskulatur, bohrte man auch hier unter Kühlung mit Natriumchlorid (NaCl) beidseits einen Defekt, um die Gewebetraumatisierung möglichst zu minimieren. Die Defekte, dienten als Zugang zum Mittelohr (Bulla) der Versuchstiere. Die Bullae wurden mit NovaBone-C/M™ aufgefüllt, wobei auf der linken Seite wieder BMP 4 (100 ng) zugesetzt wurde, entsprechend der Anleitung für die Kalottendefekte. Der Hautschnitt wurde anschließend wiederum durch resorbierbares Nahtmaterial versorgt. In Gruppe 3 (Sitzzeit 12 Wochen) wurde allen acht Probanden zusätzlich eine subkutane Dosis von circa 14 mg Tetrazyklin (Dr. August Wolff Arzneimittel GmbH & Co, Bielfeld, Germany) injiziert, um immunfluoreszenzmikroskopisch den Einbau von Tetrazyklinen in neu gebildeten Knochen zu beurteilen. Durch diese Auswahl der Defekte standen nun drei Gruppen mit jeweils acht Tieren zur Verfügung, mit je vier Bioglass®-Implantaten, wovon der linken Seite (Bulla/ Kalotte) eines jeden Tieres das Zytokin BMP 4 zugesetzt war.

2.3.2 Explantation

Nach 28, 56 und 84 Tagen wurden die acht Meerschweinchen pro Gruppe nach dem Schema der Implantation narkotisiert und durch einen Schnitt, der beide Arteriae carotis communis durchtrennte, euthanasiert. Die Implantatgebiete wurden freipräpariert und die gefüllten Defekte aufgesucht. Durch Bohrung wurde dann jeweils ein Block, der den ursprünglichen Defekt enthielt, explantiert und in einem beschrifteten Röhrchen fixiert, das neutral gepufferte zehn-prozentige Formaldehydlösung (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland) enthielt.

2.4 Schnitttechnik

In der vorliegenden Studie wurde zur Herstellung der Präparate aus den Knochenblöcken, die zuvor aus den Versuchstieren gewonnen wurden, das K-PLAST-System der Firma MEDIS-Weber (Buseck, Deutschland) verwendet. Die wesentlichen Schritte der Aufbereitung der Präparate sind im folgenden Text dargestellt und wurden durch laboreigene Erfahrungswerte über Jahre optimiert und weichen deshalb zum Teil von der vorgegebenen Arbeitsanleitung der Firma MEDIS-Weber ab.

Fixierung

- Fixierung des Knochenblocks in Formalin für mindestens zwölf Stunden

Entwässerung

- Block in Becherglas mit Methanol geben, über 24 Stunden entwässern

Infiltration

- Herstellung der K-Plast-Infiltrationslösung
- 81 ml K-Plast-Lösung A + 9 ml Lösung B

- Gewebeprobe wird in ein Becherglas mit Infiltrationslösung gelegt
- Becherglas wird nun in den K-VAC-Vakuum-Infiltrator (MEDIM) gegeben
- Aufsetzen der Glasglocke und Aufbau eines Vakuums
- Infiltration der Proben über zwei Tage im K-Vac-Vakuum

Polymerisation

- K-Plast-Infiltrationslösung mit 1% K-Plast-Initiatorpulver versetzen
- mit Parafilm abdecken und zehn Minuten auf Magnetrührer rühren lassen
- durch Zugabe des Initiators wird die Polymerisation gestartet

Einbettung

- Gießen dieser Lösung in Teflonformen
- Proben werden mit Vaseline beschichtete Deckel aufgesetzt und luftdicht verschraubt
- Teflonform über Nacht in einen Brutschrank bei 37° Celsius polymerisieren lassen

Probenfestigung

- Proben aus Brutschrank entnehmen und Abdeckung entfernen
- Zumischung von K-Mount-Pulver und K-Mount-Flüssigkeit
- Gemisch circa 15 Minuten aushärten lassen
- Block aus der Teflonform entfernen

Schneiden

- Block einspannen in HS-Rotationsmikrotom (JUNG SUPER CUT 2065)
- mit speziellen Hartschnittmessern wird der Block grob angeschnitten
- Block wird mit einer Dicke von 3,5 µm geschnitten
- Abnahme des Schnittes mit Pinsel und spitzer Pinzette
- Aufziehen der Schnitte auf silanisierte Objektträger
- Strecken der Schnitte mit 96%-igem Ethanol

- Abdecken der Schnitte mit Polyethylenfolie
- Einlegen der Objektträger in einen Trockenblock und Anwalzen mit einer Andruckrolle
- Objektträger über Nacht bei 37° Grad pressen

Entplasten

- Entfernung der Polyethylenfolie
- Objektträger in eine Lösung mit 100%-igem Aceton geben für zehn Minuten, Lösung wechseln und anschließend für 20 Minuten
- Lösung wechseln, für 20 Minuten einlegen, Lösung wechseln, für zehn Minuten einlegen
- Objektträger in eine Lösung mit 70%-igem Aceton geben für fünf Minuten
- Objektträger anschließend in Aqua destillata spülen

2.5 Färbungen

Zur besseren Beurteilung der Präparate wurden in dieser Studie zusätzlich zum nativen Knochenpräparat noch drei weitere Objektträger mit Knochenschnitten des jeweiligen Defekts gefertigt und schließlich gefärbt, so dass pro Defekt vier Präparate zur endgültigen Beurteilung zur Verfügung standen. Es wurde gefärbt nach Giemsa, nach Masson-Goldner und Hämatoxylin-Eosin nach Ehrlich. Zu jeder der verschiedenen Färbemethoden wurde eine Tabelle zur besseren Orientierung und zu Zwecken der Vollständigkeit erstellt, die einer Einleitung der jeweiligen Färbung folgt. Jeder Färbung ging der Arbeitsschritt des Entplastens voraus.

2.5.1 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist eine nach der Romanowski-Färbung modifizierte Färbung, die dazu dient, verschiedene Zelltypen voneinander zu unterscheiden (siehe Tabelle 3.5.1). Sie wurde nach dem Hamburger Chemiker Gustav Giemsa benannt. Die Giemsa-Lösung (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Germany) besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator. Sie wird deshalb auch kurz als Azur-Eosin-Methylenblaulösung bezeichnet. Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der Giemsa-Lösung ab. Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt. Das Färberesultat kann jedoch deutliche Unterschiede aufweisen. Es wird unter anderem durch den pH-Wert der Lösung und der Pufferlösung, die Puffersubstanzen, die Färbezeit sowie die Art der Fixierung beeinflusst (siehe Tabelle 2.5.1).

2.5.2 Reagenzienherstellung

- Giemsa-Lösung:
- Mischen von 6 ml gebrauchsfertiger Giemsa-Stammlösung mit 240 ml Aqua destillata

2.5.2 Färbeverfahren

- Einstellen in Giemsa-Lösung für drei Stunden
- Abspülen mit Aqua destillata
- Einstellen in angesäuertes Bidest bis zum Farbumschlag ins Rötliche
- Einstellen in Rotisol bis zum Farbumschlag ins Bläuliche
- Einstellen in Isopropanol I für fünf Sekunden
- Einstellen in Isopropanol II für eine Minute
- Einstellen in Xylol I für eine Minute
- Einstellen in Xylol II für eine Minute
- Eindecken mit Eukitt

2.5.4 Masson-Goldner-Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Germany) ist eine mikroskopische Färbemethode, bei der die Dispersität (Farbstoffmolekülgröße) ausschlaggebend für die Färbung ist. Es werden nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert im Normalfall drei oder mehr verschiedene disperse Farbstoffe simultan und sukzedan angewendet (siehe Tabelle 2.5.2).

2.5.5 Reagenzienherstellung

- Masson I (gebrauchsfertig)
- Masson II (gebrauchsfertig)
- Masson III (gebrauchsfertig)
- 1%-ige Essigsäure
- Mischen von 10 ml 10%-iger Essigsäure in 90 ml Aqua destillata
- Weigerts Eisenlack (gebrauchsfertig)

2.5.6 Färbeverfahren

- Einlegen in Weigerts Eisenlack für 60 Minuten
- Spülen mit Aqua destillata für zehn Minuten
- Einstellen in Masson I für 45 Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Einstellen in Masson II für acht Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Einstellen in Masson III für 45 Minuten
- Eintauchen in 1%-ige Essigsäure
- Spülen mit Aqua destillata für eine Minute
- Einstellen in 96%-igen Ethanol für eine Minute
- Einstellen in 96%-igen Ethanol für eine Minute
- Einstellen in Rotisol
- Einstellen in Xylol I für eine Minute
- Einstellen in Xylol II für eine Minute
- Eindecken mit Eukitt

2.5.7 Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung nach Ehrlich

Die H.E.-Färbung (Morphisto-Evolutionsforschung & Anwendung GmbH, Frankfurt a. M., Germany) ist eine Sukzedanfärbung, d.h. es wird nacheinander gefärbt. Sie basiert auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption (siehe Tabelle 2.5.3). Mit Hämatoxylin (Hämalaun) wird progressiv gefärbt und beim Erreichen des gewünschten Färbegrades wird die Färbung abgebrochen. Hämalaun ist positiv geladen und bindet sich an die sauren Bestandteile der DNS und bewirkt eine Kernfärbung. Eosin dagegen wird regressiv gefärbt, es wird demzufolge erst überfärbt und anschließend differenziert. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiven geladenen Gewebebestandteile wie zum Beispiel Eiweiße und bewirkt eine Plasmaanfärbung.

2.5.8 Färbetechnik

- Einstellen in Hämalaun für drei Stunden
- Spülen mit Leitungswasser für 30 Minuten
- Einstellen in Eosin für eine Stunde
- kurz abspülen mit Leitungswasser für ca. fünf Sekunden
- Einstellen in 70%-igem Ethanol für fünf Sekunden
- Einstellen in 80%-igem Ethanol für fünf Sekunden
- Einstellen in 96%-igem Ethanol für fünf Sekunden
- Einstellen in Isopropanol I für fünf Sekunden
- Einstellen in Isopropanol II für eine Minute
- Einstellen in Xylol I für fünf Minuten
- Einstellen in Xylol II für fünf Minuten
- Einstellen in Xylol III für fünf Minuten
- Eindecken mit Eukitt

2.6 Flächenbestimmung

Die hergestellten Präparate wurden nach mikroskopischer Darstellung mit einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop durch systematisches Abfotografieren mit einer Megapixelcamera (PixeLINK 1394 Camera) digitalisiert und abgespeichert. Aufgrund der hohen Auflösung wurde jedes Präparat in mehrere Teile gesplittet, so dass sich das Gesamtbild eines Defektes aus fünf bis neun einzelnen Teilbildern zusammensetzt. Im Anschluss daran wurde die Verknöcherung der einzelnen Bilder mit dem Programm Analysis 3.0 (Soft Imagine Systems) ausgemessen. Die einzelnen Teilflächen wurden summiert und tabellarisch als Ganzes dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Ergebnisse

3.1.1 Kalotte

Gruppe 1: Die acht Tiere, die nach vier Wochen euthanasiert wurden, wiesen rein mikroskopisch Unterschiede zwischen der Kalotte links (mit BMP 4) und der Kalotte rechts (ohne BMP) auf. Im überwiegenden Teil der Bilder war zu erkennen, dass den Defekten, denen BMP zugesetzt war, eine wesentlich bessere Heilungstendenz zuzuschreiben war als den Defekten ohne BMP. Die Präparate der linken Kalotte, denen zum Bioglass[®] NovaBone BMP 4 zugemischt wurde, unterschieden sich von den Vergleichspräparaten der rechten Seite durch ein weitaus homogenere Neubildung von Knochensubstanz, die durch eine Frakturlinie von der ursprünglichen Knochenmasse im Allgemeinen gut abzugrenzen war. Im Gegensatz dazu stellte sich der Heilungsprozess in den Defekten, die nicht mit BMP 4 befüllt waren, eine weniger gute Heilungstendenz dar. Die Osteoneogenese der rechten Seite (ohne BMP 4) war im Vergleich mit der linken Seite (mit BMP 4) verzögert. Im Bereich des rechten Defektes (ohne BMP) fand sich ein wesentlich unorganisierteres Bild der Knochenneubildung (Bild 1, 2). Außerdem lässt sich in den Lakunen eine kristallartige Substanz abgrenzen, die dem Bioglass[®] NovaBone-C/MTM entspricht, was auf eine unvollständige Resorption hinweist. In den histologischen Präparaten der Bioglass[®]-BMP-Kombination war diese Substanz wenig oder gar nicht zu finden. Statistisch konnte diese Beobachtung nicht untermauert werden, dennoch ist zumindest ein tendenzieller Vorteil bei mit BMP 4 befüllten Defekten erkennbar. Darauf wird unter dem folgenden Punkt 3.2 (Statistik) genauer eingegangen.

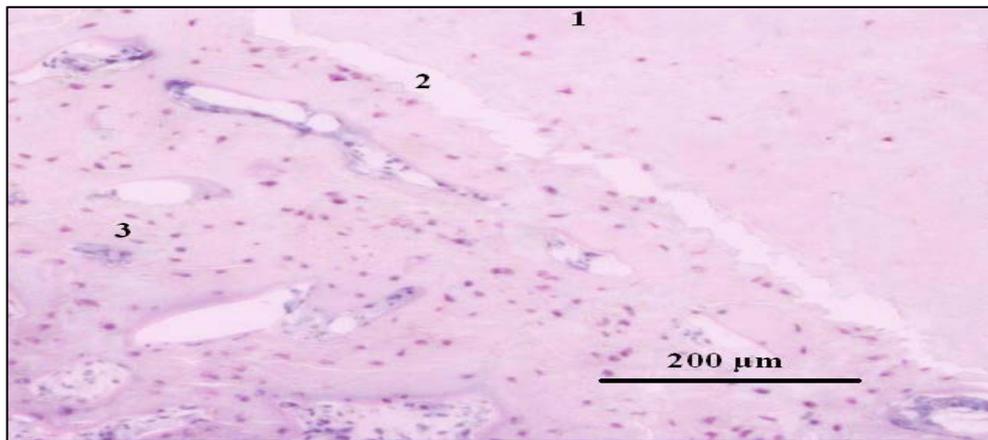


Bild 1- Kalotte links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen.

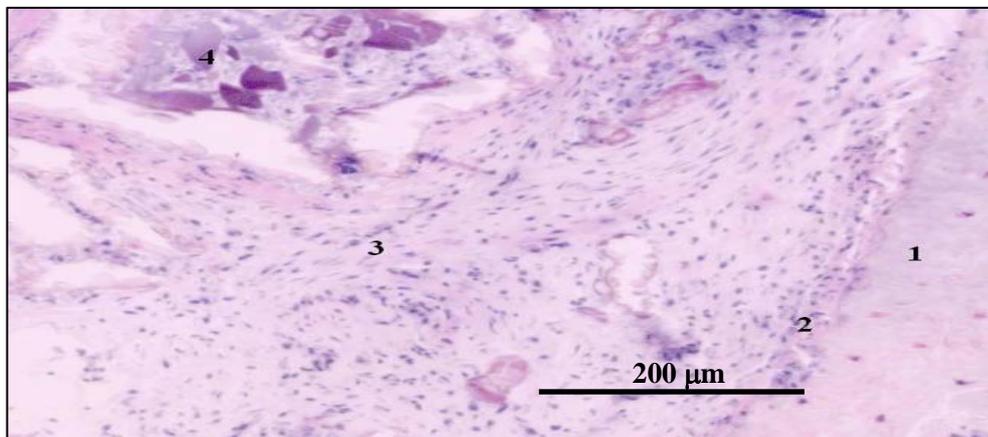


Bild 2- Kalotte rechts (ohne BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen, 4: NovaBone-Ablagerung.

Gruppe 2: Die Probandengruppe, die nach acht Wochen euthanasiert worden war, wies histologisch weniger Unterschiede auf. Dennoch vermuteten wir auch hier einen positiven Einfluss des BMP auf die Ossifikation. Es ergab sich der Eindruck, dass die mit BMP 4 befüllte Seite mit dem Heilungsprozess weiter vorangeschritten war als die reine Bioglass-Seite (ohne BMP). So wirkte die „BMP-Seite“ organisierter. Die neue Knochensubstanz enthielt vergleichsweise weniger Knochenzellen und die gebildete Matrix füllte fast den ganzen Defekt aus (Bild 3, 4). Statistisch konnte auch diese Beobachtung nicht bewiesen werden, dennoch ist zumindest eine positive Tendenz der mit BMP 4 befüllten Defekte erkennbar. Darauf wird unter Punkt 3.2 (Statistik) eingegangen.

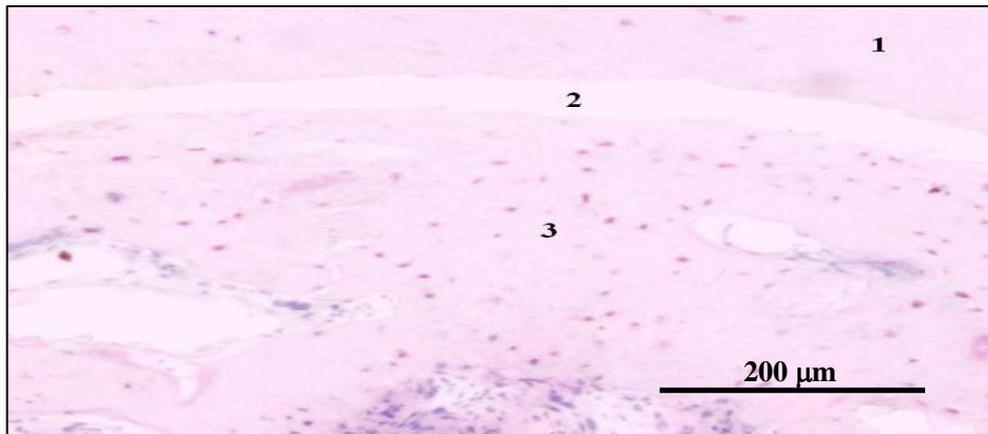


Bild 3- Kalotte links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspace, 3: neu gebildeter Knochen.

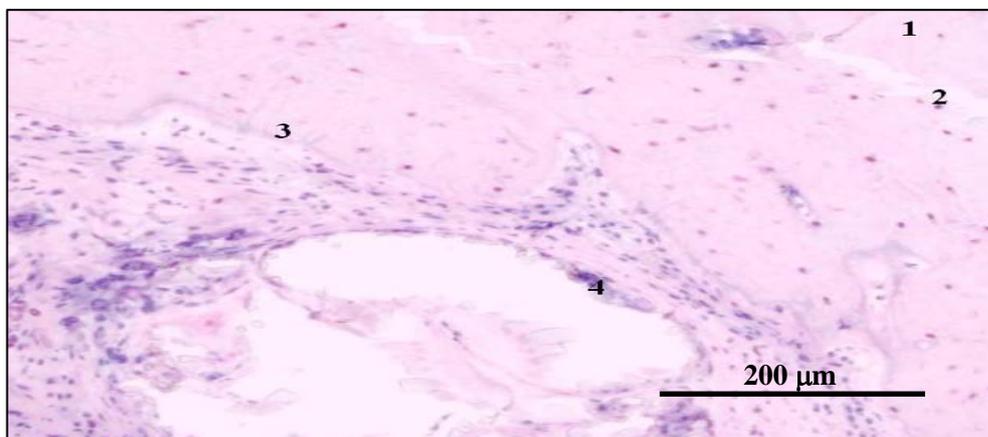


Bild 4- Kalotte rechts (ohne BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspace, 3: neu gebildeter Knochen, 4: NovaBone-Ablagerung.

Gruppe 3: Bei den Tieren, mit einer Sitzzeit von zwölf Wochen, ließen sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch keine wesentlichen Differenzen zwischen Kalotte links und der Kalotte rechts darstellen, so das BMP bei längerer Sitzzeit rein histologisch keinen positiven Effekt auf das Verknöcherungsverhalten vermuten lässt. Die Bilder beider Defektlokalisationen waren weitestgehend homogen und wiesen keine beachtlichen Unterschiede auf (Bild 5, 6).

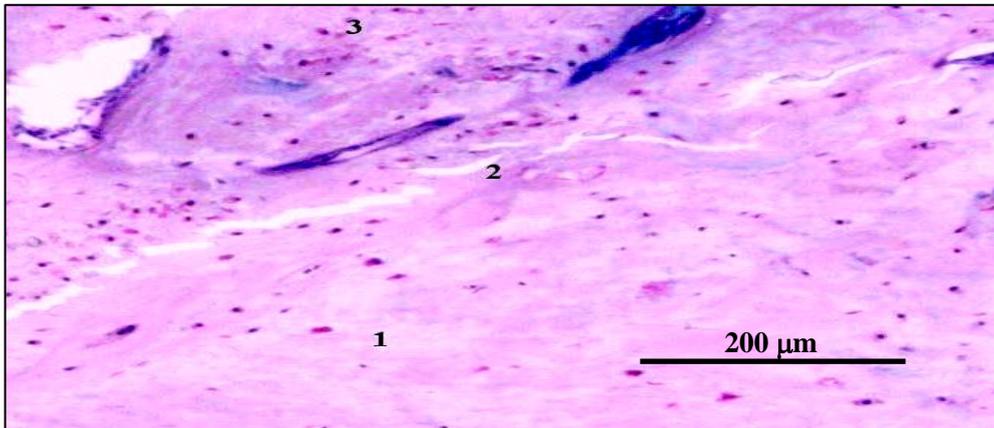


Bild 5- Kalotte links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen.

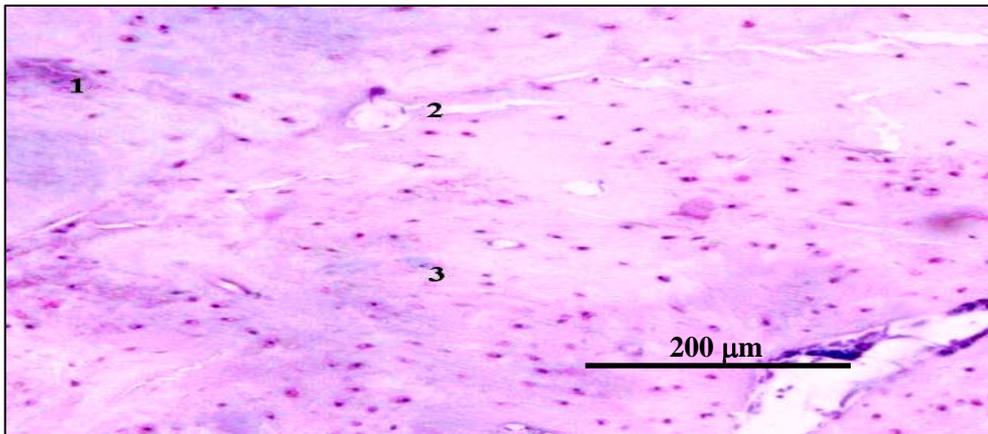


Bild 6- Kalotte rechts (ohne BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen.

Gruppe 3 injizierte man nach erfolgreicher Implantation jeweils Tetrazyklin, um den Anbau von neugebildeten Knochen zu quantifizieren. Der Einbau der Substanz erfolgte weitestgehend problemlos, dennoch wurde auf floureszenzmikroskopische Datenerhebung verzichtet da die Einbaugrenzen nicht eindeutig verifizierbar waren.

3.1.2 Bulla

Gruppe 1: Die acht Tiere, die nach vier Wochen euthanasiert wurden, wiesen mikroskopisch keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Bulla links, (mit BMP 4) und der Bulla rechts (ohne BMP) auf. Auf beiden Seiten erkennbar ist ein wenig vorangeschrittener Prozess der Knochenneubildung. Zum großen Teil liegt das Bioglass[®] noch unresorbiert im Defekt und neu gebildeter Knochen ist nur spärlich oder gar nicht vorhanden. Erkennbar sind trabekuläre Knorpel/Knochen-Formationen, die das mikroskopische Bild der Defekte der rechten und der linken Bulla in Gruppe 1 dominieren (Bild 7, 8).

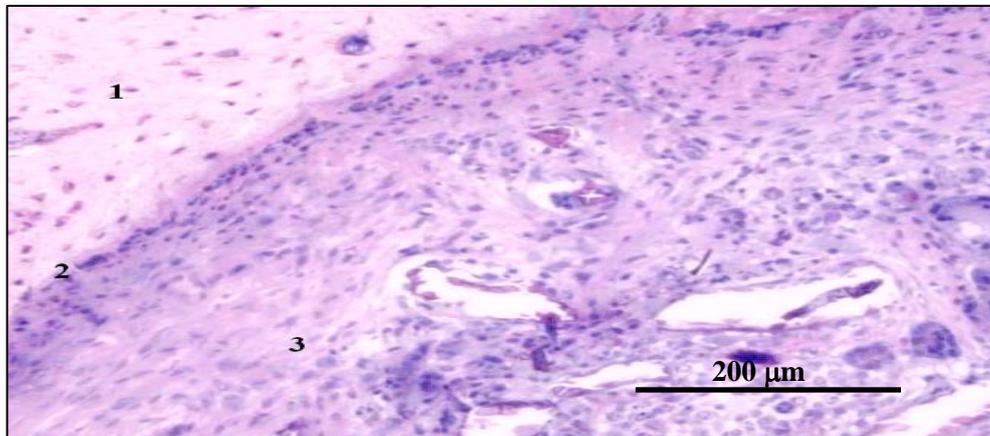


Bild 7- Bulla links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen

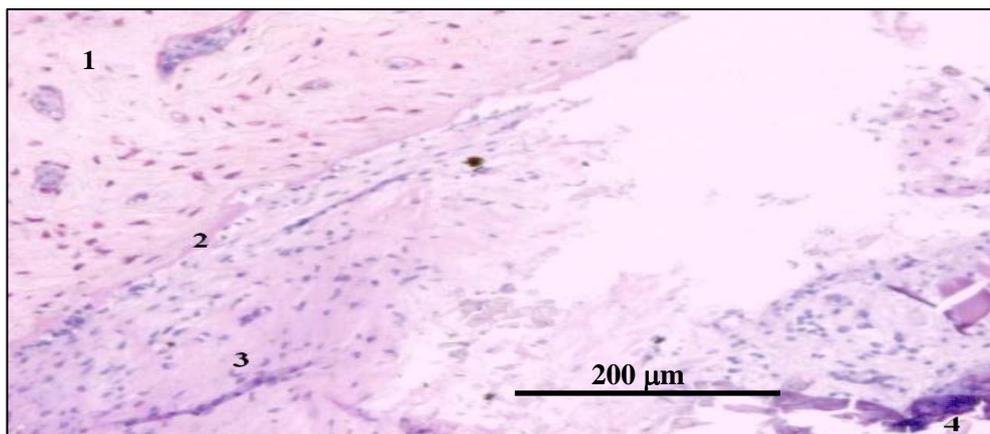


Bild 8- Bulla rechts (ohne BMP), 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen, 4: NovaBone- Ablagerung.

ERGEBNISSE

Gruppe 2: Probandengruppe 2, die nach acht Wochen euthanasiert wurde, ließ mikroskopisch ebenfalls keine Schlüsse auf einen Vorteil des BMP-4- Zusatzes zu. Zu erkennen war ein im Gegensatz zu Probandengruppe 1 (Bulla) vorangeschrittener Heilungsprozess, der aber im Vergleich zu Gruppe 2 (Kalotte) wiederum nicht so weit entwickelt war. Die spätere Knochenmatrix füllte die Defekte zwar mehr oder minder aus, erschien aber immer noch unorganisiert und auch hier waren die Bioglass[®]-Partikel noch nicht resorbiert (Bild 9, 10).

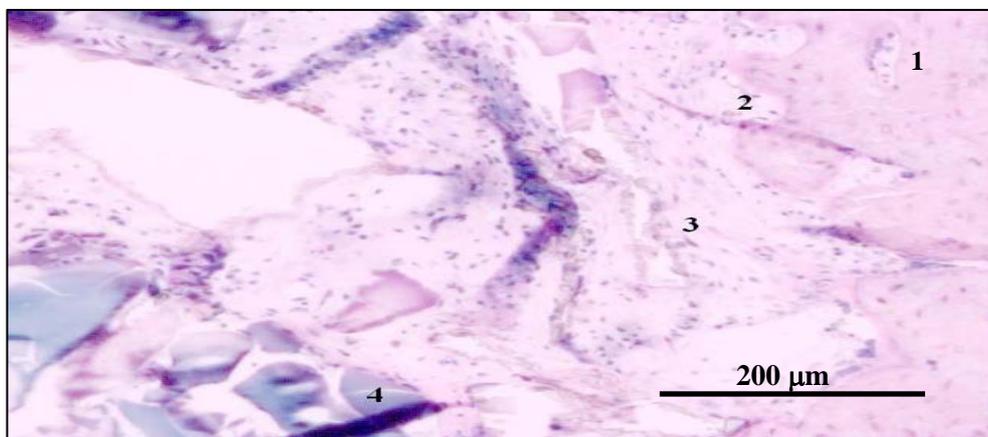


Bild 9- Bulla links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen, 4: NovaBone- Ablagerung.

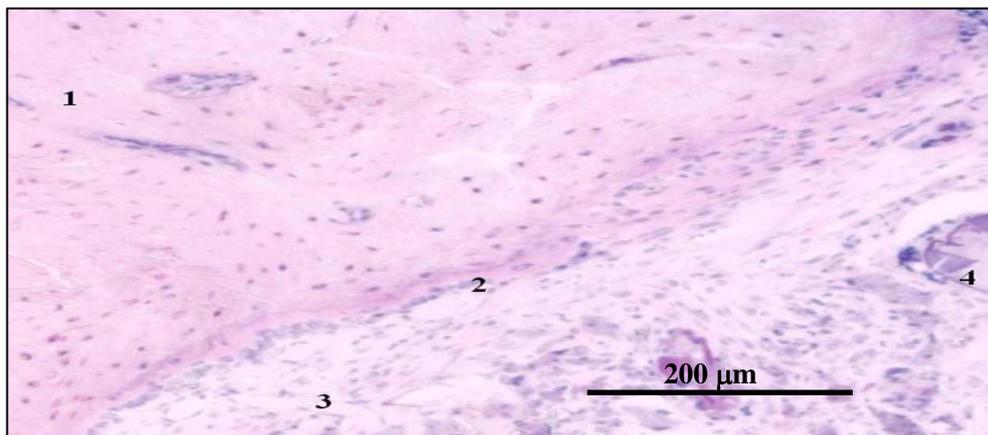


Bild 10- Bulla rechts (ohne BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: Defektspalt, 3: neu gebildeter Knochen, 4: NovaBone- Ablagerung.

Gruppe 3: In Gruppe 3 (Sitzzeit zwölf Wochen) waren Unterschiede bei der Knochenneogenese unmerklich. Die mikroskopischen Bilder wurden dominiert von gut strukturierten Knochen, der im Gegensatz zu Gruppe 1 und 2 der Bulla keine Bioglass[®]-Kristalle mehr enthielt. Die einzigen Differenzen ließen sich im Hinblick auf die Gesamtverknöcherung der Fläche vermuten (Bild 11, 12), die letztlich auch als statistisch signifikant befunden wurde (siehe Punkt 3.2.3).

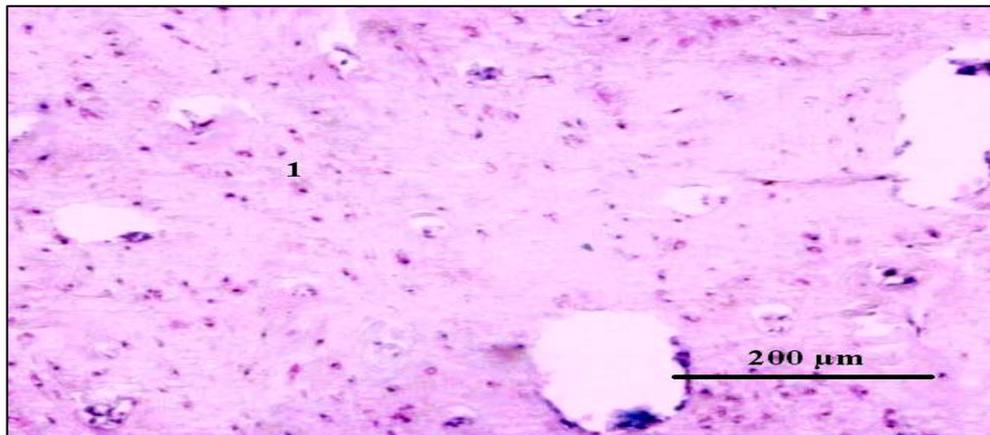


Bild 11- Bulla links (mit BMP) 1: ursprünglicher Knochen

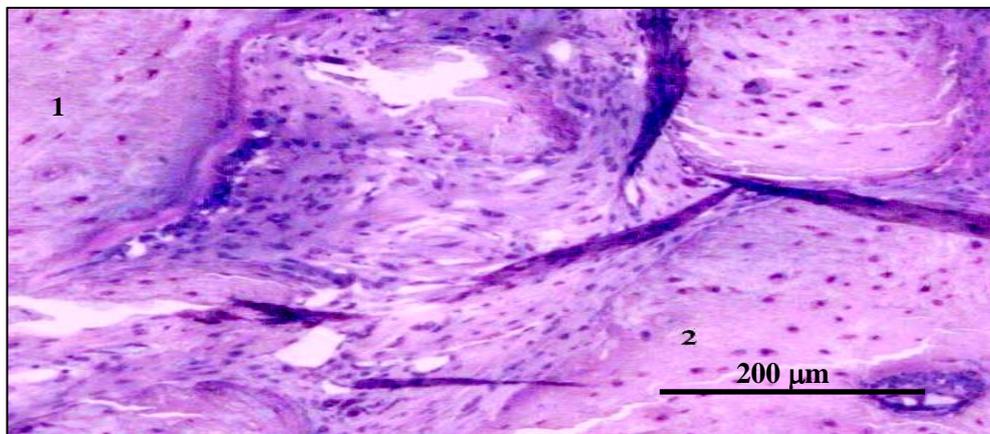


Bild 12- Bulla rechts (ohne BMP) 1: ursprünglicher Knochen, 2: neu gebildeter Knochen.

3.2 Statistische Ergebnisse

Zur zusammenfassenden statistischen Beschreibung von Daten der Versuchstiere dienten vornehmlich Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM), außerdem Median, Minimalwert, Maximalwert und Konfidenzintervall. Die Werte wurden tabellarisch zusammengefasst und schließlich miteinander verglichen. Zur Untersuchung der Signifikanz wurden die Daten zunächst mit einem t-Test bei gepaarten Stichproben und letztlich mit einer univariaten einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Als signifikant wurde ein α -Niveau von 5 % ($p < 0.05$) festgelegt. Zur Erfassung der Statistik wurden folgende Computerprogramme verwendet: Microsoft Word, Microsoft Excel, Statsoft Statistica Version 6, SPSS 8.0.

3.2.1 Effekte an der Kalotte, t-Test

In Gruppe 1 (vier Wochen) erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % ($p < 0.05$) mit $p=0.057$ nicht (Tabelle 3.1). In Gruppe 2 (acht Wochen) erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % mit $p=0.077$ nicht (Tabelle 3.2). Beide Gruppen verfehlten das Signifikanzniveau im t-Test bei gepaarten Stichproben knapp, lassen jedoch einen positiven Einfluss von BMP 4 auf das Knochenwachstum vermuten. In Gruppe 3 (zwölf Wochen) erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % mit $p=0.962$ nicht (Tabelle 3.3). In Tabelle 3.11 sind die p-Werte zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 3.11 t-Test bei gepaarten Stichproben (Kalotte)

Gruppe	1	2	3
Sitzdauer	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
p =	0.057	0.077	0.096

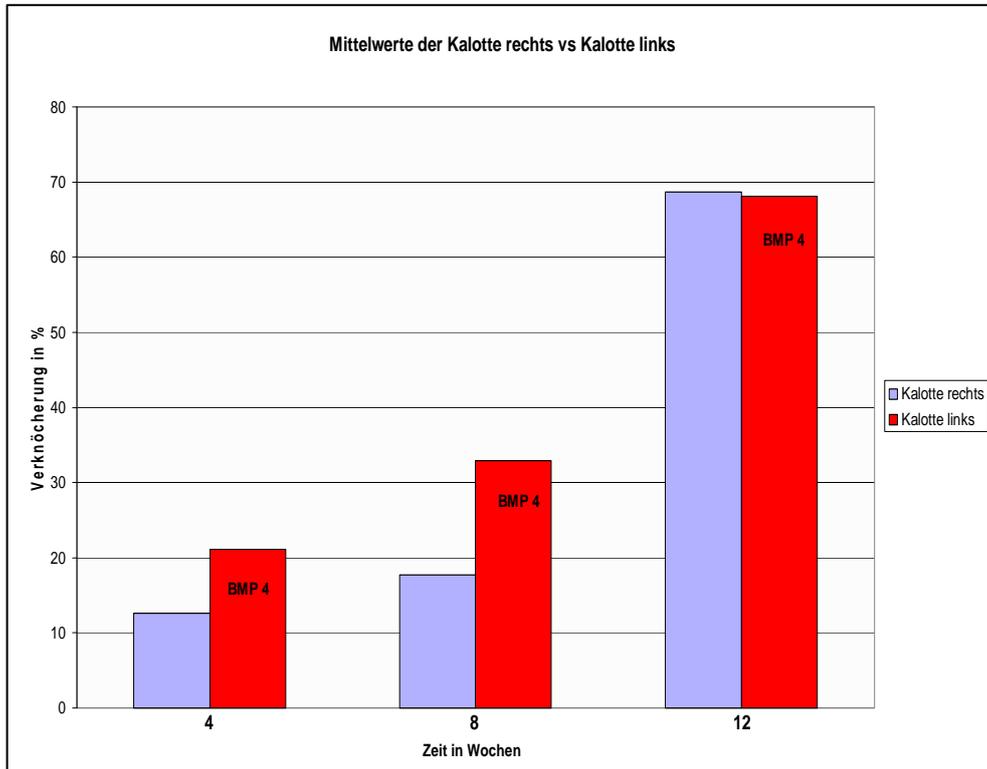


Abbildung 3.1: mittlere prozentuale Verknöcherung Kalotte rechts versus Kalotte links
 Darstellung der prozentualen Verknöcherung (y-Achse) der Kalotte nach Gruppen in Abhängigkeit der Zeit (x-Achse), der blaue Balken entspricht dem Defekt ohne BMP 4 (Kalotte rechts), der rote Balken entspricht dem Defekt mit BMP 4 (Kalotte links). 4 Wochen = Gruppe 1, 8 Wochen = Gruppe 2, 12 Wochen = Gruppe 3

3.2.2 Effekte an der Kalotte, ANOVA

Im Vergleich der mittleren prozentuale Verknöcherung einer Seite aller drei Gruppen (Kalotte links), nimmt diese in Abhängigkeit von der Zeit signifikant zu, $p < 0.001$ (Tabelle 3.7 a, b). Dieser Effekt ist erwartungsgemäß auch im Bereich der rechten Kalotte zu beobachten, $p < 0.001$ (Tabelle 3.8 a, b).

Im Vergleich der drei Gruppen untereinander konnte festgestellt werden, dass signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Zeit auf die mittlere prozentuale Verknöcherung bestehen. Dabei wurde jede Defektlokalisierung im Einzelnen betrachtet.

3.2.3 Effekte an der Bulla (Mittelohr), t-Test

In Gruppe 1 erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % mit $p=0.214$ nicht (Tabelle 3.4). In Gruppe 2 erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % mit $p=0.765$ nicht (Tabelle 3.5). Beide Gruppen verfehlten das Signifikanzniveau im t-Test bei gepaarten Stichproben und zeigten keinen positiven Einfluss von BMP 4 auf das Knochenwachstum. In Gruppe 3 erreichte die mittlere prozentuale Verknöcherung das α -Niveau von 5 % mit $p=0.019$ (Tabelle 3.6). Es besteht somit ein signifikanter Unterschied auf die Verknöcherung. In Tabelle 3.12 sind die p-Werte zusammengefasst dargestellt.

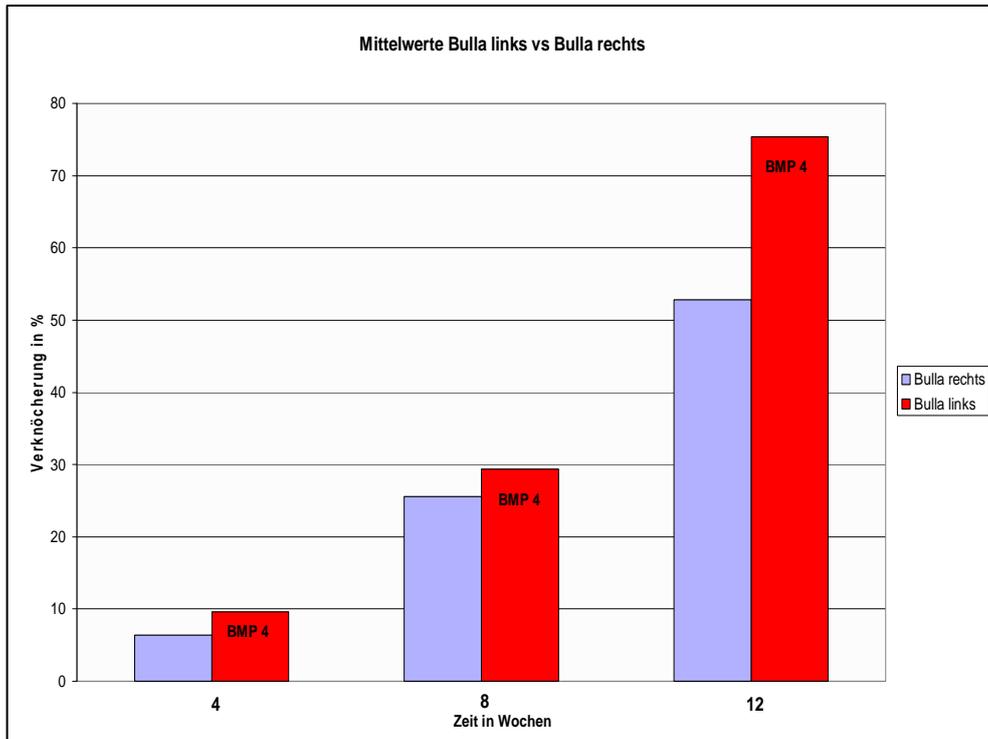


Abbildung 3.2: mittlere prozentuale Verknöcherung Bulla links versus Bulla rechts
Darstellung der prozentualen Verknöcherung (y-Achse) der Bulla nach Gruppen in Abhängigkeit der Zeit (x-Achse), der blaue Balken entspricht dem Defekt ohne BMP 4 (Bulla rechts), der rote Balken entspricht dem Defekt mit BMP 4 (Bulla links). 4 Wochen = Gruppe 1, 8 Wochen = Gruppe 2, 12 Wochen = Gruppe 3

Tabelle 3.12 t-Test bei gepaarten Stichproben (Bulla)

Gruppe	1	2	3
Sitzdauer	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
p =	0.214	0.765	0.019

3.2.4 Effekte an der Bulla (Mittelohr), ANOVA

Vergleicht man die mittlere prozentuale Verknöcherung einer Seite aller drei Gruppen (Bulla links), nimmt diese in Abhängigkeit von der Zeit signifikant zu, $p < 0.003$ (Tabelle 3.9 a, b). Dieser Effekt ist erwartungsgemäß auch im Bereich der rechten Bulla zu beobachten, $p < 0.001$ (Tabelle 3.10 a, b). Im Vergleich der drei Gruppen untereinander wurde festgestellt, dass signifikante Unterschiede in Abhängigkeit der Zeit auf die mittlere prozentuale Verknöcherung bestehen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung des Wachstumsfaktors BMP 4 auf die Osteogenese und Osteoneogenese in Kombination mit einem bioaktiven Glas am Tiermodell Meerschweinchen. Im Versuch wurde sowohl die Kalotte als auch das Mittelohr (Bulla) der 24 Versuchstiere beidseits geöffnet und mit Bioglass[®] befüllt. Auf der jeweils linken Seite der Tiere wurde in die Bulla als auch die Kalotte zusätzlich zum Bioglass[®] NovaBone-C/M[™] rhBMP 4 in definierter Menge zugesetzt, während die rechte Seite der Tiere als Vergleichs- und Kontrollparameter diente. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen zu je acht Tieren unterteilt Gruppe 1 wurde nach vier, Gruppe 2 nach acht und Gruppe 3 nach zwölf Wochen post operationem euthanasiert und die entsprechenden Knochenproben entnommen. Das Knochenwachstum in der Bulla sowie die Knochenheilung des Kalottentrepanationsdefektes wurden anhand von lichtmikroskopischen Bildern vermessen und statistisch ausgewertet. In der vorliegenden experimentellen Studie wurde der Kalottentrepanationsdefekt als auch der Mittelohrdefekt (Bulla) beim adulten Meerschweinchen als geeignete Orte angesehen, um so mit angemessenem Aufwand die Effektivität des verwendeten Zytokins zu analysieren. Es wurde ein entsprechend großer Kalottentrepanationsdefekt gewählt, um den Voraussetzungen für den CSD zu entsprechen. Die verwendeten Bohrer hatten einen Durchmesser von fünf Millimetern, während das knöcherne Schädeldach der Versuchstiere zirka drei Millimeter dick war. Ziel der Untersuchung war die unterschiedliche Heilungsgeschwindigkeit der Defekte. In einem Teilversuch wurden die Substanzen außerdem noch in eine natürlich präformierte Körperhöhle, die Bulla, implantiert, um die Effekte des Zytokins auf die Osteoneogenese in einer anderen Lokalisation zu beurteilen. Im Gegensatz zu dem Defekt der Kalotte findet man im Mittelohr der Tiere ein anderes Umgebungsmilieu vor, da die Bulla mit einer Schleimhaut ausgekleidet und durch Kommunikation zur Nase mit Keimen besiedelt ist, die lokale Entzündungen verursachen und ein Knochenwachstum erschweren.

Meerschweinchen als Versuchstiere bieten den Vorteil, dass sie unkompliziert zu halten sind, eine wenig aufwendige Narkose erfordern und die Ergebnisse ohne größere Schwierigkeiten evaluiert werden können. Die klinische Übertragbarkeit der im Kleintierversuch gewonnenen Ergebnisse wird dadurch gemindert, dass bei den meisten Spezies hinsichtlich der Knochenbildung ein Zeitraffereffekt auftritt, andererseits können dadurch Untersuchungen innerhalb eines kürzeren Zeitraumes durchgeführt werden. Je größer der Zeitraffereffekt, desto größer ist der Unterschied zum menschlichen Stoffwechsel. So ist der metabolische Aktivitätsindex (MAI) des Hundes mit 1,58 dem des Menschen mit 1,0 deutlich näher als der von Kleinsäugetieren, bei Ratten beträgt er beispielsweise 5,15 (Sato & Urist, 1985). Trotz des großen Unterschiedes zum Menschen werden in tierexperimentellen Studien, welche die Regeneration von Knochengewebe durch unterschiedliche Ersatzmaterialien evaluieren, an erster Stelle Ratten, in diesem Versuch Meerschweinchen eingesetzt.

4.1 Einfluss von BMP 4

Zu den Bone Morphogenetic Proteins, die durch osteoinduktive Fähigkeiten zur direkten Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen in Chondroblasten und Osteoblasten beitragen, zählt man BMP 1, 2, 4, 5, 6 und 7, wobei BMP 1 kein Mitglied der TGF- β -Superfamilie ist. Die meisten BMPs sind essentieller Bestandteil der embryonalen Entwicklung von Skelettsystem, inneren Organen und Organsystemen (Termaat et al., 2003; Wozney & Rosen, 1998). Im klinischen Einsatz befinden sich bereits BMP 2 und BMP 7, die z.B. bei therapieresistenten Schienbeinfrakturen eingesetzt werden (Giltaij, 2002). Mit dieser Studie wurde aufgezeigt das BMP 4 die Osteoneogenese günstig beeinflusst, dieser Effekt ist auf die Strukturverwandtschaft zu den anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie zurück zu führen (Abbildung 1.2). Am deutlichsten stellt sich der Vorteil von BMP 4 in Abbildung 3.1 dar.

Das ideale Knochenersatzmaterial steht noch nicht zur Verfügung. Dabei liegt die wohl größte Herausforderung beim Trägermaterial, das das BMP verzögert

freisetzen soll um über einen konstanten Zeitraum eine relevante Menge an Protein im Defekt zu haben. Viele Autoren beanspruchen für sich das optimale Trägersystem experimentell ermittelt zu haben, bisher konnte sich aber noch kein Standard Medium durchsetzen.

Bei Verwendung von BMP 7 klagten Probanden über Erytheme, Druckempfindlichkeit und Schwellungen über der Implantationsstelle, auch eine Myositis ossificans wurde beobachtet (Giltaij, 2002). Eine zu hohe Proteinkonzentration könnte eine Immunantwort auslösen. Es wird ein Vielfaches der Menge an BMP benötigt, als natürlicherweise im Knochen vorkommt. Aus einem Kilogramm Knochen werden ca 1µg BMP isoliert. Eine Alternative stellt die Gewinnung von rekombinaten BMPs durch gentechnische Verfahren dar. Fehlende Langzeiterfahrung in Hinsicht auf die lokalen und systemischen Wirkungen limitiert bislang den klinischen Einsatz von rekombinant hergestellten BMPs. Bisher wurden sämtliche BMPs gegeneinander verglichen wobei jedes die Osteogenese induziert, in unterschiedlicher Konzentration. Ziel neuer Studien sollte es sein eine Kombination verschiedener Wachstumszytokine zu erproben. Geht man davon aus dass BMPs wie z.B. BMP 2, 4 oder 7 zur Organo- und Osteogenese wesentlich beitragen, ist eine Kombination derer zur optimalen Defektheilung denkbar. Der Effekt könnte summiert werden und die Konzentration der einzelnen BMPs im nicht-toxischen Bereich gehalten werden. Doch das sollte Ziel zukünftiger Versuche bleiben.

4.1.1 BMP 4 Wirkung in Abhängigkeit von der Defektlokalisierung-Kalotte

Am Beispiel der Kalotte lies sich gut, wenn auch nicht statistisch signifikant, darstellen, dass der Zusatz einer osteoinduktiven Substanz (BMP 4) zu einem osteokonduktiven Material- im Vergleich zu einem osteokonduktiven Material ohne Zytokinzusatz- die Ossifikation beschleunigt. Anhand des t-Tests bei gepaarten Stichproben war es möglich, diesen deutlich positiven Effekt darzustellen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt des BMP-4-Zusatzes innerhalb des ersten Monats am größten ist, da der Wert nach vier Wochen mit $p=0.057$ nur knapp über der Signifikanzschwelle liegt. Die mittlere prozentuale

Verknöcherung der Seite mit BMP-Zusatz lag bei 21,1 %, während die Seite ohne BMP-Zusatz nur zu 12,65 % verknöchert war (Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Nach acht Wochen erreicht der Wert mit $p=0.077$ das α -Niveau nicht, dennoch ist ein deutlicher Trend erkennbar. Die mittlere prozentuale Verknöcherung der Seite mit BMP-Zusatz lag bei 32,93 %, während die Seite ohne BMP-Zusatz nur zu 17,7 % verknöchert war (Abbildung 3.1, Tabelle 3.2). Es wurde experimentell bewiesen, dass BMP 4 in der Lage ist, mit einem geeigneten Trägersystem die Osteoneogenese während der ersten Wochen nach einem Strukturdefekt positiv zu beeinflussen, da es durch seine osteoinduktiven Eigenschaften den Effekt des Bioglasses[®] verstärkt und umgekehrt. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erzielen, sollten in künftigen Studien größere Versuchsgruppen gewählt werden um den Vorteil des mit BMP 4 und Bioglass[®] befüllten Defektes darzustellen. Das Ergebnis von Gruppe 3 ($p=0.962$) zeigt, dass der Einfluss des Zytokins auf die Proliferationsgeschwindigkeit über einen Zeitraum von drei Monaten keinen relevanten Effekt mehr darstellt. Prozentual war die mittlere Verknöcherung nach drei Monaten in gleichem Maße voran geschritten (Abbildung 3.1, Tabelle 3.3). Mikroskopisch waren nach drei Monaten keine Bioglass[®]-Partikel in den Präparaten mehr nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass das BMP-4-Level im Defekt schon nach sehr kurzer Zeit absinkt und deshalb im weiteren Verlauf keine signifikante Wirkung auf die Osteogenese hat (Park et al., 2003). Ausgehend davon, dass das Bioglass[®] beidseits gleichmäßig resorbiert wird, das osteokonduktive Potenzial gleichmäßig verringert wird und der osteoinduktive Effekt des Zytokins schnell nachlässt, ist zu erwarten, dass die Osteogenese ab einem gewissen Zeitpunkt gleich schnell abläuft und keine signifikanten Unterschiede im Heilungsprozess bestehen. Damit lässt sich die deutliche Verfehlung des α -Niveaus in Gruppe 3 erklären (Abbildung 3.1, Tabelle 3.3). Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass die kurze osteoinduktive Triggerung ausreicht um die Osteoneogenese gegenüber dem Vergleichdefekt vorteilig zu initiieren. Um den BMP-Effekt deutlicher darzulegen muss der Studienaufbau kritisch betrachtet werden. Eine Raffung der Sitzzeiten und damit eine Verkürzung der Beobachtungsintervalle könnte das Ergebnis in

Folgeversuchen günstig beeinflussen. So sind z.B. fünftägige In-vivo-Beobachtungsintervalle denkbar. Nach Abdiffusion des BMPs und längeren Beobachtungszeiten ist der initiale Vorteil der BMP-Gabe nicht mehr nachzuweisen. Die Erhöhung der BMP-Konzentration im jeweiligen Defekt stellt eine weitere Grundlage zur Diskussion dar, wobei unklar ist, ob es ausreicht mit einer hohen Anfangskonzentration an BMP zu beginnen, die dann schnell abfällt- um so die Osteoneogenese kurzfristig aber intensiv zu triggern oder ob die kontinuierliche Freisetzung von Wachstumszytokinen über einen längeren Zeitraum von Vorteil ist. Als weitere Variante, ist die bereits oben genannte Kombination mehrerer BMPs denkbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass BMP 4 in den ersten Tagen der Heilungsphase eine entscheidende Rolle spielt. Weiterführende Untersuchungen sollten eine zu schnelle Resorption durch Wahl eines geeigneten Carriers verhindern (Friedlaender et al., 2001; Winn et al., 1999; Hollinger et al., 1998).

4.1.2 BMP 4 Wirkung in Abhängigkeit von der Defektlokalisierung-Bulla

Anhand der Implantation von Bioglass[®] und Zytokin in die Bulla der Versuchstiere konnten keine signifikanten Differenzen terminiert werden. Hierbei wurde vor allem die Knochenneubildung der Versuchsgruppen 1 und 2 betrachtet, da auch hier davon auszugehen ist, dass das BMP in dieser Zeitperiode seine größte Wirkung entfaltet und letztlich keine Wirkung auf Gruppe 3 zeigt (Tabelle 3.6). Nach vier Wochen war die mit BMP befüllte Seite erst zu 9,61 % verknöchert, im Gegensatz zu der reinen Bioglass-Seite die nur 6,42 % Verknöcherung aufwies (Abbildung 3.2, Tabelle 3.4). Auch nach acht Wochen konnte im Bereich der Bulla kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Die prozentuale Verknöcherung beider Seiten war ähnlich weit voran geschritten, mit BMP 29,35 % und ohne BMP 25,55 % (Abbildung 3.2, Tabelle 3.5). Die Ergebnisse dieses Teilexperiments konnten im Vorfeld nicht prognostiziert werden, da das Implantationsgebiet einen relativ großen natürlichen Defekt darstellt, der kein Verknöcherungspotenzial besitzt. Des Weiteren ist das Mittelohr bei allen Säugern eine potenzielle Infektquelle, so

auch die Bulla der Meerschweinchen. Es ist mit Schleimhaut überzogen und stellt somit ein ideales Milieu für die Besiedlung mit Keimen dar. Das Auftreten einer Infektion ist somit eine wahrscheinliche Komplikation und beeinflusst die Ossifikation wesentlich (Runkel & Rommens, 2000; DenBoer et al., 2002). Es wird vermutet, dass es aufgrund von lokal begrenzter Infektion und aufgrund der Größe des aufgefüllten Implantationsgebietes, die Osteogenese in den ersten Wochen nur sehr langsam vorangeschritten ist und ein Effekt von BMP 4 nicht nachweisbar war (Abbildung 3.2). Als weitere Ursache ist in diesem Zusammenhang die schnell sinkende Konzentration an BMP zu erwähnen, die wahrscheinlich einen der Hauptgründe der verzögerten Ossifikation darstellt. Ein Bioglass ohne Zytokinzusatz ist zwar auch in der Lage die Osteogenese positiv zu beeinflussen, der Prozeß dauert über die Osteokonduktion viele Wochen länger als ein BMP induzierter Aufbau von Knochenmatrix.

4.3 BMP-Applikation

Die osteoinduktiven Eigenschaften der BMPs im Sinne einer verbesserten Frakturheilung wurden bereits durch mehrere Studien belegt (Bostrom et al., 1996; Gerhart et al., 1993). Obwohl diese Untersuchungen eine potenzielle Wirksamkeit der verschiedenen BMPs nachwiesen, ist die klinische Verwendung durch eine kurze Halbwertszeit der Proteine begrenzt. Um eine optimale Freisetzung der Zytokine über einen bestimmten Zeitraum zu gewährleisten, haben sich die Bemühungen nach einem optimalen Trägermedium in den letzten Jahren intensiviert, da die Herstellung von rekombinanten BMPs teuer ist und eine erfolgreiche Knochenheilung große Mengen an Protein erfordert (Park et al., 2003; Chen et al., 2002).

Die Notwendigkeit eines Carriers – eingesetzt, um eine optimale Applikation des osteoinduktiven Zytokins zu gewährleisten – wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren sind der Meinung, dass ein Carrier keine biologische Notwendigkeit ist, um eine effektive Wirkung zu erzielen (Woszney & Rosen, 1998). Andere wiederum vertreten den Standpunkt, dass Wachstumsfaktoren wie BMP für einen effizienten Einsatz

auf die Verwendung von Carriern angewiesen sind, um ihre biologische Wirkung optimal zu entfalten (Lindholm & Gao, 1993). Ein Problem stellte die Applikation des Zytokins dar. Durch einfaches Vermischen des Bioglasses mit der BMP-haltigen Lösung, wird das Zytokin nur kurzzeitig an das Bioglass gebunden und diffundiert nach kurzer Zeit ab. NovaBone als Carrier ist zwar geeignet, macht aber aufgrund seiner mikrokristallinen Struktur Probleme beim Ausfüllen größerer Defekte. Alternativ dazu stehen der Einsatz von Micropumpen oder die unten beschriebenen Techniken der Gentherapie dar.

4.3.1 BMP-Carrier

Carrier sollten in der Lage sein, Wachstumsfaktoren reversibel zu binden und sie langsam und kontinuierlich freizusetzen. Sie sollten ein osteokonduktives Potenzial besitzen und somit eine Minimierung der Wachstumsfaktorkonzentration bewirken. Des Weiteren sollten sie resorbierbar sein und kein antigenes Potenzial besitzen. Freie Verfügbarkeit und einfache Handhabung sind zwei weitere Voraussetzungen eines Carriers (Friedlaender et al., 2001; Winn et al., 1999; Hollinger et al., 1998; Itoh et al., 1998; Kuboki et al., 1998; Schwartz et al., 1998; Winn et al., 1998; Gao et al., 1993; Kawamura & Urist, 1988).

In der Literatur sind verschiedene Aspekte beschrieben, nach denen die Carrier eingeordnet, beurteilt und eingesetzt werden. Von Interesse ist zum Beispiel die Ladung, Resorptionsrate, Porengröße, Leervolumen, Hydrophilie, Freisetzungskinetik sowie Zusammensetzung und Struktur ihrer Oberfläche (Lane et al., 1999; Winn et al., 1998). Die Porengröße beeinflusst beispielsweise die Art der Knochenneubildung. So ist beschrieben, dass Porengrößen über 60 μm die direkte Ossifikation fördern, während Porengrößen kleiner als 60 μm die enchondrale Ossifikation fördern (Kuboki et al., 1998; Ripamonti & Reddi, 1992). Die Sauerstoffversorgung des Defektes zu gewährleisten beziehungsweise sie zu fördern, ist ein weiterer Punkt, den Trägermaterialien erfüllen sollten. So sollten sie die Angiogenese und Angioneogenese fördern, da bei zu schmalen Zwischenräumen und zu wenigen interkonnektierenden Poren das Einwachsen von Gefäßen verhindert wird. Bei

niedriger Sauerstoffkonzentration beobachteten Kuboki und Mitarbeiter, dass das BMP 4 die Differenzierung der eingewanderten Mesenchymzellen zu Chondroblasten anstatt zu Osteoblasten förderte und damit die Knochenheilung verzögerte (Kuboki et al., 1998).

Die Resorption des Carriers sollte zeitlich in etwa der Rate des Knochenaufbaus entsprechen, um keinen gegenteiligen Effekt zu produzieren, da ein verzögert resorbierter Carrier die Knochenneubildung hemmt (Bax et al., 1999). Langsam resorbierbare Carrier sind vorteilhaft, da sie in mechanisch stark beanspruchten Defekten zum Einsatz kommen können und die Stabilität erhöhen. Die osteokonduktive Gerüstfunktion, die Anhaftung mesenchymaler Stammzellen und Osteoprogenitorzellen sowie deren Differenzierung verlängert sich bei langsamer Resorption (Johnson & Urist, 2000). Die Freisetzung von BMP lässt sich in zwei Phasen unterteilen, eine initiale Phase, bei der innerhalb weniger Stunden große Mengen an BMP freigesetzt werden, und eine kontinuierliche Phase, bei der BMP langsam über Tage freigesetzt wird (Uludag et al., 2000; Winn et al., 1998). Der isoelektrische Punkt (IP) des verwendeten BMPs ist entscheidend für die Bindung an das Trägermaterial. Je niedriger der IP, desto höher ist die Freisetzungsrates in der initialen Phase. In der kontinuierlichen Phase spielt der isoelektrische Punkt bei der BMP-Freisetzung keine Rolle (Uludag et al., 2000). Ist die initiale Bindung von BMP an den Carrier sehr hoch, rekrutiert es vergleichsweise mehr Stammzellen und differenziert diese letztlich zu Osteoblasten, die osteoinduktive Potenz erhöht sich (Uludag et al., 2000).

Im Allgemeinen gibt die Art und die Lokalisation des Defektes die Klasse des jeweiligen BMP-Trägers vor (Wozney & Rosen, 1998). In nicht belasteten Implantatlagern wie dem Schädeldach oder der Mandibula eignen sich vor allem resorbierbare Polymere, Kollagen-Composites und allogene Knochenmatrizen (Kübler, 1997). In mechanisch beanspruchten Defekten sind langsam oder nicht resorbierbare BMP-Träger vorzuziehen. Dazu zählen Hydroxylapatite und Kalzium-Sulfate, die auch bei rekonstruktiven Verfahren

zur Anwendung kommen (Johnston & Urist, 2000). In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde das Trägermaterial mit einer definierten Menge an BMP gemischt und in den Defekt eingebracht. Probleme verursachte vor allem die Applikation des Bioglasses, da es in seiner Konsistenz sehr bröselig war. Unklar war auch, wie lange Bioglass[®] in der Lage ist, BMP zu binden. Dieses Problem wurde in aktuelleren Studien profan gelöst. So kombinierten Bergeron und Mitarbeiter Bioglass[®] und BMP mit einem selbst hergestellten Kollagen-Typ I-Gel (Bergeron et al., 2007). Das BMP wurde so länger an den Carrier gebunden und durch die veränderte gelige Konsistenz des Trägers wurde die Handhabung benutzerfreundlicher. Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Verwendung viraler Vektoren (siehe unten). Ob dieses Carriersystem jedoch wirtschaftlich tragbar ist, wird die Zukunft zeigen. Im Folgenden sind die gängigen Trägersubstanzen zur Implantation von Wachstumszytokinen dargestellt.

4.3.2 Organische Carrier

Demineralisierte Knochenmatrix (DBM=Demineralized Bone-Matrix) besteht aus löslichem, quervernetztem Kollagen Typ 1, geringen Anteilen anderer Kollagene und nicht kollagener Proteoglykane. Es wird in der Literatur als ideales Grundgerüst für die Anhaftung und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen beschrieben. Verwendet wird zum einen inaktivierte DBM, die keine aktiven Wachstumsfaktoren enthält, und zum anderen aktive DBM, mit aktiven Wachstumsfaktoren. Aufgrund einer unterschiedlichen Freisetzungskinetik konnte gezeigt werden, dass inaktivierte DBM als Trägersubstanz von BMP deutlich mehr Knochen bildet als die aktive Form (Winn et al., 1998).

Kollagene sind ein weiterer Bestandteil der großen Gruppe der organischen Carrier. Es sind 27 verschiedene Kollagentypen bekannt (Typ I bis XXVIII). Alle Kollagene sind aus drei Polypeptidketten aufgebaut, die man als α -Ketten bezeichnet und die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind. Jede α -Kette kann in Abhängigkeit des Kollagentyps aus 600 bis 3000

Aminosäuren zusammengesetzt sein und ist mit großen Domänen ausgestattet, die aus sich repetitiven G-x-y-Sequenzen aufgebaut sind. Laut Definition werden nur tripelhelikale Moleküle der extrazellulären Matrix als Kollagene bezeichnet. Kollagen Typ I, welches zu den fibrillären Kollagenen gerechnet wird, kommt in allen Geweben vor, am häufigsten in Haut und Knochen, aber auch in Sehnen und in der Cornea. Kollagen Typ I wird unter anderem von Fibroblasten, Myofibroblasten und Osteoblasten produziert. In Studien verwendete man Kollagen aufgrund seiner guten Formbarkeit, seiner Affinität zu Bindegewebe und wegen des graduellen Abbaus (Horisaka et al., 1994). Kollagencarrier in Kombination mit BMP wurden am Tiermodell bereits erfolgreich getestet. So gelang es nach intramuskulärer Implantation eines Kollagencarriers mit BMP, in Mäusen ein Knochen- und Knorpelwachstum hervorzurufen. Es wurde auch bewiesen, dass mit Zunahme der BMP-Konzentration signifikant mehr Knorpel gebildet wurde (Gao et al., 1993). In einer Studie am Rattenmodell zeigte sich eine signifikant schnellere Knochenbildung bei Kollagenträgern mit BMP als bei Carriern ohne BMP-Zusatz (King et al., 1998). Die Induktion direkter (intramembranöser) Ossifikation durch einen Kollagencarrier in Kombination mit BMP an Mandibula und Kalotte sehen die meisten Autoren als erwiesen an (Hosokawa et al., 1999; King et al., 1998; Wozney & Rosen, 1998).

Ergänzend dazu sind nicht-kollagene Proteine (NCP = Noncollagenous Proteins) als eine weitere Stoffklasse von Bedeutung. Zu den nicht-kollagenen Carriern gehören beispielsweise Fibrin und Hyaluronsäurederivate, die wegen ihrer Biokompatibilität und ihres Degradationsverhaltens als Träger eingesetzt werden (Kawamura & Urist, 1988). Bei Kalottendefekten von Schafen wurden NCP mit BMP implantiert und es wurde eine Osteoneogenese beobachtet, die ihren Ursprung von der Dura mater nahm (Lindholm et al., 1988).

Als synthetische Polymere werden Biomaterialien wie Polylactidsäure (PLA) und Polyglycolidsäure (PGA) bezeichnet, die seit Jahren auf dem Gebiet der Orthopädie als auch der Kiefer- und Gesichtschirurgie zur

Knochenrekonstruktion verwendet werden und in osteosynthetischen Experimenten ein hohes Maß an Effektivität bewiesen haben (Miettinen et al., 1992; Hollinger & Schmitz, 1987).

Als Nahtmaterial und als resorbierbare Membranen standen Materialien aus PGA und PLA schon lange zur Verfügung (Robert et al., 1993). Heute werden sie unter anderem als Carrier für Zytokine verwendet, da ihnen selbst ein osteoinduktiver Effekt nachgewiesen werden konnte (Winet & Hollinger, 1993). Vorteile der Polymere sind ihre vollständige Biokompatibilität (PLA wird zum Beispiel im Citratzyklus verstoffwechselt), ihre große Formstabilität (von Interesse bei mechanisch stark beanspruchten Defekten) und ihre synthetische Herkunft, die einerseits den Kostenfaktor niedrig hält und andererseits das Infektionsrisiko auf ein Minimum senkt (Winn et al., 1998; Wozney & Rosen, 1998; Yaszemski et al., 1996).

4.3.3 Anorganische Carrier

Zu den Keramiken zählt man anorganische Substanzen, die in ihrer Struktur, sowie in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften nach denen des natürlichen Knochens ähneln, was sie zu idealen Knochenersatzmaterialien macht (Yaszemski et al., 1996). True Bone Ceramic (TBC), β -Trikalziumphosphat (β -TCP) und Hydroxylapatit (HAP) gehören zu dieser Gruppe. Am weitesten verbreitet ist das synthetisch hergestellte HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Es bildet die Grundlage der Hartschubstanz aller Wirbeltiere, es ist in Knochen zu 40 %, im Zahnbein (Dentin) zu 70 % und im Zahnschmelz (Enamelum) zu 96 % enthalten. Zur Induktion der Osteoneogenese werden poröse HAP-Implantate verwendet, die eine Porengröße zwischen 300 und 400 nm aufweisen sollten, um das Einsprossen von Gefäßen zu begünstigen (Kuboki et al., 1998). Die Neubildung von Knochen geht von der Oberfläche des HAP-Implantats aus und setzt sich entlang der Gefäße in den Poren der Keramik fort (Kuboki et al., 1998). Trikalziumphosphate (TCP) zeichnen sich durch ihre besondere Biokompatibilität, Resorbierbarkeit und

Osteokonduktivität aus. Eine seit 1997 verfügbare vollsynthetische, phasenreine Beta-(β)-TCP-Keramik erfüllt die Forderung nach schneller Resorption bei gleichzeitiger Osteokonduktivität. Des Weiteren stellt eine β -TCP-Keramik aufgrund ihrer universellen Einsetzbarkeit und niedrigen Komplikationsrate eine hervorragende Alternative auch bei größeren Knochendefekten als Ergänzung zu autogenen Spongiosatransplantaten dar (Merten et al., 2000). True Bone Ceramic (TBC) wird aus xenogener Spongiosa gewonnen und bei Temperaturen um 1000° Celsius hergestellt, um immunogene und zytotoxische Effekte zu vermeiden.

Als weitere Träger für Wachstumsfaktoren seien an dieser Stelle noch Kalzium-Phosphate, Kalzium-Karbonate und Kalzium-Sulfate erwähnt. Allen drei Gruppen wurde auf Grundlage tierexperimenteller Studien ein positiver Einfluss auf das Knochenwachstum bestätigt (Hollinger et al., 1999).

Biogläser (z.B. NovaBone-C/M™) sind amorphe Materialien auf Basis der sauren Oxide Phosphorpentoxid, Siliziumdioxid, Aluminiumoxid und der basischen Oxide wie zum Beispiel Kalziumoxid, Magnesiumoxid und Zinkoxid. Bei der Herstellung werden die genannten Ausgangsmaterialien vermischt und in einem mehrstündigen Prozess bei ungefähr 1500° Celsius geschmolzen. Das entstehende Produkt stellt ein dreidimensionales Phosphoroxid-Siliziumoxid-Netzwerk dar, an das sich die entsprechenden Ionen der basischen Oxide anlagern. Bioaktive Glas-Granulate stellen aus mehreren Gründen ein ideales Trägermaterial dar. Das Granulat passt sich problemlos in die Form eines Substanzdefekts ein, hat eine zusätzlich Blut stillende Wirkung und lässt sich gut verarbeiten (MacNeill et al., 1999; Schepers & Ducheyne, 1997).

Eine Oberflächenvergrößerung und damit eine Verstärkung der osteokonduktiven Fähigkeiten wird durch seine granuläre Struktur erreicht (Schepers & Ducheyne P, 1997). Bioaktive Gläser sind degradierbar (Cao & Hench, 1996) und überbrücken den Defekt temporär, um schließlich durch Knochen ersetzt zu werden (Rosenberg et al., 2000; Hollinger et al., 1996). Die

Bioaktivität des jeweiligen Glases ist sowohl abhängig von der Partikelgröße (Cao & Hench, 1996; Kokubo, 1991) als auch vom Verhältnis der einzelnen Komponenten des Glases. In mehreren Versuchen wurde bewiesen, dass Bioglass[®] die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten signifikant steigert (Hench et al., 1991; Ito et al., 1987). Das in der vorliegenden Studie verwendete Bioglass[®] NovaBone-C/MTM ist ein synthetisch hergestelltes Feingranulat mit vernachlässigbarem immunogenen Effekt und daher biokompatibel. Es ist bereits auf dem europäischen Markt zugelassen und wird zur Behandlung von nichtstrukturellen kraniofazialen, maxillofazialen und oralen Defekten verwendet und empfohlen.

4.3.4 Gentherapie

Die Gentherapie stellt eine alternative Möglichkeit dar, um BMPs über eine bestimmte Zeitperiode direkt an der Frakturstelle zu produzieren und zu exprimieren (Itoh et al., 2003; Wang et al., 2003; Alden et al., 1999; Niyibizi et al., 1998). Man unterscheidet dabei zwei unterschiedliche Strategien, das jeweilige Gen dem Regenerationsort zuzuführen, die In-vivo-Transduktion (viral) und die Ex-vivo-Transduktion (nonviral). Bei der In-vivo-Transduktion wird das benötigte Gen direkt über Viren in das gewünschte Gewebe (Wunde) eingebracht, nach Aufnahme durch Wirtszellen wird das erwünschte Zytokin exprimiert. Viren sind sehr effiziente Vektoren, da der Transport und die Expression von DNA im Lebenszyklus der Viren essentiell sind. Für den Gentransfer verwendet man Retroviren, Adenoviren oder Herpes-Simplex-Viren (Niyibizi et al., 1998). Unter Ex-vivo-Transduktion versteht man die Explantation und Isolation von Wirtszellen, die in vitro genetisch modifiziert werden und danach zurück implantiert werden. Die genetische Modifizierung der Ex vivo Variante geschieht ebenfalls mit Hilfe von (adeno-)viralen Vektoren. Beide Methoden haben eine Reihe von Vor- und Nachteilen. So können virale Kapselproteine bei der In-Vivo-Methode schwere immunogene Reaktionen auslösen. Deshalb stellt man mittlerweile bereits virale Vektoren der zweiten Generation her, die keine viralen Proteine mehr kodieren können

und die Immunantwort somit eine untergeordnete Rolle spielt. Die episodale Position der eingefügten DNA und die immunogene Antwort auf die viralen Proteine limitieren die Dauer der Genexpression in den meisten Fällen auf Tage bis Wochen (Wilson, 1996). Als Vorteile werden sowohl die einfache Erzeugung von hohen Viren-Titern beschrieben (Schek et al., 2004), als auch die hohe Effizienz, mit der die Wirtszellen infiziert werden. Da sich die Viren nicht in das Wirtszell-Genom integrieren, bleibt die Genexpression zeitlich begrenzt. Dies ist eine essentielle Voraussetzung viraler Vektoren, da eine fortgeführte Genexpression nach Knochenheilung nicht erwünscht ist (Schek et al., 2004). Nachteile des Ex-vivo-Verfahrens sind der große Zeitaufwand und die hohen Kosten für Isolation, Kultivierung, Umwandlung und Retransplantation der modifizierten Wirtszellen. Vorteile der Ex-vivo-Methode ist die Umwandlung der Wirtszellen unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen sowie die präzise Zugabe der Zellen auf eine entsprechende Trägermatrix (Schek et al., 2006, Franceschi et al., 2004, Schek et al., 2004). Als Trägermatrix für die virale und die nonvirale Gentherapie testeten Schek und Mitarbeiter verschiedene Substanzen unter anderem PLA-Schwämme, Fibrinhydrogel und Collagenhydrogel. Dabei stellte sich in den bisherigen Studien heraus, dass die Eigenschaften des Fibrinhydrogels am besten mit der Aufgabe der verzögerten Freisetzung der Vektoren und Bioverträglichkeit zu vereinbaren ist, sowohl im In-vivo-Experiment (Schek et al., 2006) als auch im Ex- vivo-Experiment (Schek et al., 2004). In der Literatur wird kontrovers diskutiert ob der jeweilige Defekt noch zusätzlich mit einem biodegradierbaren osteokonduktiven Grundgerüst z.B. in Form von Keramiken versehen wird oder ob Fibrinhydrogel beispielsweise ohne weitere Träger injiziert wird (Schek et al., 2006, Franceschi et al., 2004, Schek et al., 2004).

5. Klinische Relevanz

Bone Morphogenetic Proteins stellen mit einem geeigneten Trägersystem eine vielversprechende Alternative dar, um herkömmliche Methoden der Knochendefektbehandlung abzulösen. Bisher wurden hauptsächlich Knochentransplantate verwendet, die entweder autogen, allogene oder xenogen gewonnen wurden (Bauer & Muschler, 2000). Diese Form der ossären Defektbehandlung wurde in den letzten Jahrzehnten verfeinert und stellt im Allgemeinen eine geeignete Methode dar. Dennoch ist sie durch viele Risikofaktoren limitiert. Immunreaktionen, die Übertragung von Infektionskrankheiten und eingeschränkte Verfügbarkeit sind Nachteile, die die herkömmliche Behandlung mit sich bringen kann. Das ideale Knochenersatzmaterial sollte biokompatibel und resorbierbar sein, den mechanischen Beanspruchungen genügen sowie osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Mittlerweile stehen viele unterschiedliche Biomaterialien zur Verfügung, deren individuelle Eigenheiten zum größten Teil erforscht sind. Die ultimative Alternative zum autologen Knochentransplantat wurde bisher noch nicht entwickelt. Die Verwendung von BMPs ist ein vielversprechender Ansatz. Die meisten Studien beschränkten sich jeweils auf die Verwendung eines BMPs, obwohl bekannt ist, dass sie synergistisch wirken. Vielleicht ist es sinnvoll sie zu kombinieren, um einerseits die maximale Menge eines Zytokins zu reduzieren und andererseits die synergistischen Effekte auszunutzen. Weitere Aufgabe ist es, ein optimales Trägersystem zu entwickeln, um die BMP-Menge zu reduzieren, damit Kosten sparen und gleichzeitig die Gefahr von Immunreaktionen minimieren zu können. Die vielversprechendsten Ansätze bietet momentan die Gentherapie mit dem Einsatz der In-vivo- und der Ex-vivo-Methode. Gelingt es, dort Risiken zu minimieren und wirtschaftlich zu arbeiten, könnte dies den bisherigen Goldstandard ablösen und die Knochendefektbehandlung revolutionieren. Dazu sind weitere intensive Bemühungen auf diesem Gebiet erforderlich.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der osteokonduktive Effekt von BMP 4 in vivo am Kalottentrepanationsdefekt sowie am Mittelohrdefekt bei adulten Meerschweinchen hinsichtlich ihrer osteogenen Potenz untersucht. Als Träger- und Vergleichssubstanz verwendete man das Bioglass[®]NovaBone-C/MTM. Die 24 Tiere wurden in je drei Gruppen unterteilt, mit unterschiedlichen Sitzzeiten, Gruppe 1 vier Wochen, Gruppe 2 acht Wochen und Gruppe 3 zwölf Wochen. Jedem Tier wurden zwei Defekte in die Kalotte gesetzt, wobei in den linken Defekt das bioaktive Glas (Carrier) mit dem BMP-4-Zusatz implantiert wurde und in den rechten nur das Bioglass[®] als Vergleichsdefekt. Im Bereich des Mittelohrs/Bulla wurden bei jedem Tier die Substanzen in gleicher Anordnung implantiert, auf der linken Seite wurde dem Bioglass[®] das Zytokin zugesetzt. Die Tiere wurden nach vier, acht und zwölf Wochen euthanasiert sowie das Knochenwachstum über einfache Flächenmessung evaluiert und ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Knochenwachstum innerhalb der ersten acht Wochen durch den Zusatz von BMP 4 günstig beeinflusst wird. Im Vergleich der Kalottentrepanationsdefekte stellte sich sowohl in Gruppe 1 ($p=0.057$), als auch in Gruppe 2 ($p=0.077$) ein tendenzieller signifikanter Einfluss dar. Der beobachtete Effekt wird auf den Zusatz von BMP 4 zurückgeführt, auch wenn das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Die Ergebnisse der Osteoneogenese am Defekt der Bulla sind kontrovers zu diskutieren. In Gruppe 1 ($p=0.214$) als auch in Gruppe 2 ($p=0.765$) konnte das Signifikanzniveau nicht unterschritten werden. Hier vermutet man eine erschwerte Knochenneubildung aufgrund der Größe des Defekts und durch mögliche lokale Infektionen im Sinne einer Otitis media. Ob Bioglass[®] das ideale Trägermedium ist bleibt fraglich, da die Konzentration des Zytokins im Defekt schnell sinkt. Um eine optimale Wirkdauer zu gewährleisten ist die Entwicklung anderer Systeme oder Methoden in Betracht zu ziehen.

Literaturverzeichnis

1. Alden T, Pittman DD, Beres EJ, Hankins GR, Kallmes DF, Wisotsky BM, Kerns K, Helm GA: Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. *J Neurosurg* 90 (1999) 109-114
2. Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh D: Demonstration of TGF- β 1 mRNA by In Situ Hybridisation in Normal Human Fracture Healing. *Calcif Tissue Int* 52(1992) 74-78
3. Andrew JG, Hoyland J, Freemont, AJ, Marsh D: Insuline like Growth Factor Gene Expression in Human Fracture Callus. *Calcif Tissue Int* 53 (1993) 97-102
4. Bauer TW, Muschler GF: bone graft materials. an overview of the basic science. *Clin Orthop* 371 (2000) 10-27
5. Bax BE, Wozney JM, Ashhurst UDE: bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 65 (1999) 83-89
6. Bergeron E, Marquis M E , Chretien I, Fauchoux N: Differentiation of preosteoblasts using a delivery system with BMPs and bioactive glass microspheres. *J Matter Sci:Mater Med* (2007) 18: 255-263
7. Bergman S, Litkowski L: Bone in-fill of non-healing calvarial defects using particulate Bioglass[®] and autogenous bone. In: Wilson J, Hench LL, Greenspan D (eds): *Bioceramics*. Elsevier Science, Tarrytown, NY, (1995), pp. 17-21.
8. Bostrom MJ, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildauer T: Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 327 (1996) 272-282
9. Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, Bramlage P, Müller G-A, Strutz F: Bone Morphogenetic Proteins im Skelettsystem- eine zusammenfassende Darstellung. *Z Rheumatol* 64 (2005) 416-422
10. Cao W, Hench LL: Bioactive materials. *Ceramics Int* 22 (1996) 493-507
11. Chen Y, Cheung KMC, Kung H, Leong JCY, Lu WW, Luk KDK: In vivo new bone formation by direct transfer of adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-4 gene. *Biochem Biophys Res Com* 298 (2002) 121-127

12. Cheng H, Jiang W, Phillips F M, Haydon R C, Peng Y, Zhou L, Luu H H, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski J P, Park J Y, He T C: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A (2003): 1544- 1552
13. De Gruyter W: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl. De Gruyter, Berlin, 2002
14. Denboer FC, Patka P, Bakker FC, Haarman HJT: Current concepts of fracture healing, elayed unions, and nonunions. *osteo. Trauma Care* 10 (2002) 1-7
15. Drenckhahn D, Kugler P, Rahn B A, Putz R: Systematik der Gewebe. In: Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.): Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1994, S. 109-197
16. Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath T, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T: Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 112 (1999) 3519-3527
17. Einhorn TA: Current Concepts Review: Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg* 77a (1995) 940-956
18. Einhorn TA: Breakout Session 1: Definitions of fracture repair. *Clin Orthop* 1 (1998) 353
19. Einhorn TA: Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop* 1 (1999) 59-67
20. Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA: Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Amm. N.Y. Acad. Sci.* Oct. 23, 857 (1998), 33-42.
21. Franceschi R, Yang S, Rutherford B, Krebsbach P, Zhao M, Wang D: Gene Therapy Approaches for Bone Regeneration *Cells Tissues Organs* 2004; 176:95-108
22. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, Laforte AJ, Yin S: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83 Suppl 1 (2001) 151-158
23. Gao TJ, Lindholm TS, Martinen A, Puolakka T: Bone inductive potential and dose-dependent response of bovine bone morphogenetic protein combined with type iv collagen carrier. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 207 (1993) 77-84

-
24. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop MJ, Henning GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293 (1993) 317-326
 25. Gilboa L, Nohe A, Geissendorfer T, Sebald W, Henis YI, Knaus P: Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11 (2000) 1023-1035
 26. Giltaij L: BMP-7 in Orthopedic Applications: A Review. *J of Musculoskeletal Research* (2002) 6 (1) :55-62
 27. Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, Lopez AR, Lee A, Derynck R: Recombinant vgr-1/bmp-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J Cell Biol* 126 (1994) 1595-1609
 28. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD: Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein-1: structural paradigm for the transforming growth factor-(beta) superfamily. *Proc Natl Acad Sci, Usa* 93 (1996) 878-883
 29. Gross UM, Kinne R, Schmitz HJ, Strunz V: The response of bone to surface-active glasses/glass ceramics. In: Williams DF (ed): *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, CRC-Press, ORT, 1988, Vol. 4, pp 155-179
 30. Hench LL, Andersson Ö: Bioactive glasses. In: Hench LL, Wilson J (eds). *Advanced Series In Ceramics* (Vol. 1), World Scientific, Singapore, 1993, pp. 41-62
 31. Hench LL, Andersson O H, LaTorre GP: The kinetics of bioactive ceramics part III: surface reactions for bioactive glasses compared with an inactive glass. In: Bonfield W, Hastings GW, Tanner KE (eds): *Bioceramics 4* VERLAG, ORT, 1991, pp 156-161
 32. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp* 2 (1971) 117-141
 33. Hofbauer LC, Heufelder AE: Updating the metalloprotease nomenclature: bone morphogenetic protein 1 identified as procollagen C proteinase. *Eur J Endocrin* 135 (1996) 35-36
 34. Hollinger JO, Schmitz JP: Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 45 (1987) 594-600

-
35. Hollinger JO, Brekke J, Kruskin E, Lee UD: Role of bone substitutes. *Clin. Orthop.* 324 (1996) 55-65
 36. Hollinger JO, Joh SP, Suh KW: Radiomorphometry and biomechanical assessment of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and polymer in rabbit radius ostectomy model. *J Biomed Mater Res* 43 (1998) 365-373
 37. Hollinger JO, Buck D, Schmitt UJ: An injectable endothermically-setting calcium phosphate material bridges critical-sized defects in rabbits in combination with rhbmp-2. *Trans Orthop Res Soc* 22 (1999) 189
 38. Horisaka Y, Okamoto J, Matsumoto N, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J, Yamashita K, Takagi UT: Histological changes of implanted collagen material during bone induction. *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 97-103
 39. Hosokawa R, Kubo T, Wadamoto M, Sato Y, Kimoto UT: Direct bone induction in the subperiosteal space of rat calvaria with demineralized bone allografts. *J Oral Implant* 1 (1999) 30-34
 40. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM: The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1 (1998) 673-683
 41. Itoh G, Matsuda T, Inoue N, Kamegai T: A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica glass. *J Biomed Mater Res* 21 (1987) 485-497
 42. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Tendijke P: Signaling of transforming growth factor-beta family members through smad proteins. *Eur J Biochem* 267 (2000) 6954-6967
 43. Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, Matsunaga S, Kadosawa T, Kokubo S, Yokota S, Sasaki N: Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 60 (1998) 451-458
 44. Itoh T, Tokunaga K, Maruyama H, Kawashima H, Kitahara H, Horikoshi T, Ogose A, Hotta Y, Kuwano R, Katagri H, Endo UN: Coxsackievirus and adenovirus receptor (car)-positive immature osteoblasts as targets of adenovirus-mediated gene transfer for fracture healing. *Gene Ther* 10 (2003) 1623-1628
 45. Janitz MHV, Bottcher U, Landt O, Lauster R: Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic -1. *J Mol Med* 76(1998):141-146

46. Johnson EE, Urist UMR: Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop* 371 (2000) 61-74
47. Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K: Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 17 (1998) 4056-4065
48. Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou J, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi K, Kato M, Miyazono K: Intracellular signaling of the $\text{tgf-}\beta$ superfamily by smad proteins. *Ann Ny Acad Sci* 886 (1999) 73-82
49. Kawamura M, Urist MR: Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop* 236 (1988) 240-248
50. King GN, King N, Hughes UFJ: Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodont Res* 33 (1998) 226-236
51. Klaushofer K, Peterlik M: Pathophysiologie der Knochenbruchheilung. *Radiologe* 34 (1994) 709-714
52. Kokubo T: Bioactive glass-ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12 (1991) 155-163
53. Korchynsky O, ten Dijke P: Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. In: Vukicevic S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice*, Birkhäuser Verlag, Basel, 2002, pp. 31-60
54. Kübler NR: Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 1 (1997) 2-25
55. Kübler NR, Würzler K, Reuther JF, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W: EHBMP-2: Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften. *Mund Kiefer GesichtsChir* 3 [Suppl 1] (1999) 134-139
56. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Iinoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H: Bmp-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 39 (1998) 190-199
57. Lacroix P: Recent investigations on the growth of bone. *Nature* 156 (1945) 576

58. Lacroix P: The organization of bones. Blakiston Co, Philadelphia, USA, 1951
59. Lane JM: Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop* 1 (1999) 107-117
60. Lane JM Yasko AW, Tomin E, Cole BJ, Waller S, Browne M, Turek T, Gross J: Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair. *Clin Orthop* 361 (1999) 216-227
61. Lindholm TS, Gao TJ: Functional carriers for bone morphogenetic proteins. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 207 (1993) 3-12
62. Lindholm TC, Lindholm TS, Alitalo I, Urist UMR: Bovine bone morphogenetic protein (bbmp) induced repair of skull trephine defects in sheep. *Clin Orthop* 227 (1988) 265-268
63. Löffler G, Petrides PE: Stoffwechsel spezifischer Gewebe In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 731-1089
64. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P: In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 26 (1999) 239-245.
65. Martinez SA, Walker T: Bone grafts. *Vet. Clin North Am Small Anim Pract* 29, 5 (1999) 1207-1219
66. Merten HA, Wiltfang J, Honig JF, Funke M, Luhr HG: Intraindividueller Vergleich von α - und β -TCP-Keramik im Tierexperiment. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 2 (2000) 509-515
67. Miettinen H, Makela EA, Vainio J, Rokkanen P, Tormala P: The effect of an intramedullary self-reinforced poly-L-lactide (SRPLLA) implant on growing bone with special reference to fixation properties. An experimental study on growing rabbits. *Journal of Biomaterial Science Polymers Ed.* 3 (1992) 443-450
68. Mommsen U, Schumpelick V: Allgemeine Traumatologie. In: Schumpelick V, Bleese M, Mommsen U (Hrsg.): *Chirurgie*, 4. Auflage Enke, Stuttgart, 1999, S. 1155-1202
69. Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, Ichikawa H, Yamaai Y, Sugimoto T, Takigawa M: Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 234 (1997) 206-210

-
70. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH: Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 389 (1997) 631-635
 71. Nishida T, Nakanishi T, Asano M, Shimo T, Takigawa M: Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. *J Cell Physiol* 184 (2000) 197-206
 72. Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T: Smad5 and DPC4 are the key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 1872-1879
 73. Niyibizi C, Baltzer A, Lattermann C, Oyama M, Whalen JD, Oyama M, Whalen JD, Robbins D, Evans UCH: Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop NR* (1998) 148-153
 74. Nomura S, Hirota S, Nakase T, Hirakawa K, Takaoka K: Expression and Lokalisation of BMP 4 mRNA during Embryogenesis and Fracture Healing. 1st International Conference on Bone Morphogenetic Proteins., Baltimore, 1994
 75. Oguntebi B, Clark A, Wilson J: Pulp capping with Bioglass and autologous demineralized dentin in miniature swine. *J. Dent. Res.*, 72 (1993) 484-489
 76. Paralkar VM, Grasser WA, Baumann AP, Castleberry TA, Owen TA, Vukicevic S: Prostate-derived factor and growth and differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF- β superfamily. In: Vukicevic S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice.* Birkhäuser Verlag, Basel, 2002, S. 19-30
 77. Park J, Ries, Gelse K, Kloss F, Von Der Mark K, Wiltfang J, Neukam FW, Schneider H: Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated bmp-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 10 (2003) 1089-1098
 78. Ramoshebi LN, Matsaba T, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U: Tissue engineering; TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Exp. Rev. Mol. Med.* Sept. 2 (2002) 1-11
 79. Reddi AH: Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4 (1994) 737-744
 80. Reddi AH: Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 16 (1998) 247-252

81. Reddi AH: Bone Morphogenetic Proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 83A (2001) 1-6
82. Ripamonti U, Reddi AH: The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* 12 (1992) 202-212
83. Ripamonti U, Duneas N: Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg*, 101, 1 (1998) 227-239
84. Ripamonti U, Tasker JR: Advances in Biotechnology for Tissue Engineering of Bone. *Curr Pharm Biotech*, Vol 1 (2000) 1-12
85. Robert PM, Maudit J, Frank RM, Vert M: Biocompatibility and resorbability of a reabsorbable polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration. *Biomaterials* 14 (1993) 353-358
86. Rosenberg ES, Gregory KF, Cohen UC: Bioactive glass granules for regeneration of human periodontal defects. *J Esthetic Dentistry* 12 (2000) 248-257
87. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K: Cloning and characterization of a human tyrosine II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 7632-7636
88. Rueger JM: Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 27, 2 (1998) 72-79
89. Rueger DC: Biochemistry of bone morphogenetic proteins. In: Vukicevic S, Sampath KT (eds): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice*. Birkhäuser Verlag, Basel, 2002, pp 1-18
90. Runkel M, Rommens M: Pseudarthrosen. *Unfallchirurg* 103, 1 (2000) 51-63
91. Rüter A, Mayr E: Pseudarthrosen. *Chirurg* 70, 11 (1999) 1239-1245
92. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, Corbett C, Ozkaynak 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. *J Biol Chem* 267 (1992) 20352-20362
93. Sakou T: Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone* 22 (1998) 591-603

94. Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath TK, ten Dijke P: Localization of Smads, the TGF- β family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 14 (1999) 1145-1152
95. Sarmiento A, Latta LL, Tarr RR: The Effects of Function in Fracture Healing and Stability. *Instr Course Lect* 33 (1984) 83-106
96. Sato K, Urist MR: Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (bmp) in dogs. *Clin Orthop* 197 (1985) 301-311
97. Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW: *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 790-794
98. Schek M, Wilk E, Hollister S, Krebsbach P: Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal tissue engineering *Biomaterials* 27 (2006) 1160–1166
99. Schek R, Hollister S, Krebsbach P: Delivery and Protection of Adenoviruses Using Biocompatible Hydrogels for Localized Gene Therapy. *Molecular Therapy*; 9 (2004) 130-138
100. Schepers EJG, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehab*; 24 (1997) 171-181
101. Schiebler TH: Knochen und Knochenverbindungen In: Schiebler TH (Hrsg): *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 4. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, S. 93-96
102. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 205 (1986) 299-308
103. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL, Wozney JM, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD: Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol* 69 (1998) 1337-1345
104. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM: Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139 (1995) 1347-1358

-
105. Senn N: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am j Med Sci* 98 (1889) 219-243
 106. Silver IA, Deas J, Erecinska M: Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglasst, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability, *Biomaterials* 22 (2001) 175-185
 107. ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH: Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 25 (2000) 64-7
 108. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Esrevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K: Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269 (1994) 16985-16988
 109. Termaat MF, Blokhuis TJ, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJTM: The role of bone morphogenetic proteins in bone healing. *Osteo Trauma Care* 11 (2003) 122-125
 110. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Riedel R, Wozney UJM: Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 50 (2000) 227-238
 111. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Z Science* 150 (1965) 893-899
 112. Urist MR, Stratea, BS: Mechanisms of growth and development: bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50 (1971) 1391-1406
 113. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop* 59 (1967) 59-96
 114. Wan M, Shi X, Feng X, Cao X: Transcriptional mechanisms of BMP induced osteoprotegrin gene expression. *J Biol Chem* 276 (2001) 10119-10125
 115. Wang JC, Kanim LEA, Yoo S, Campbell PS, Berk AJ, Lieberman JR: Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *J Bone Joint Surg* 85a, 5 (2003) 905-911
 116. Wang EA., Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci Usa* 85 (1988) 9484-9488

117. Wilson JM: Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 334 (1996) 1185-1187
118. Winet H, Hollinger JO: Incorporation of polylactide/polyglycolide in a cortical defect: neoosteogenesis in a bone chamber. *Journal of Biomedical Materials Research* 27 (1993) 667-676
119. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO: Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev* 31 (1998) 303-318
120. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO: Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* (1999) 95-106
121. Wittenberg JM, Wittenberg RH: Prostaglandinfreisetzung nach experimentellen Frakturen am Rattenfemur. In: Ittel TH, Sieberth GH, Matthiaß HH (Hrsg): *Aktuelle Aspekte der Osteologie* Springer, Berlin, Heidelberg, 1992, S. 298-302
122. Wozney JM: Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1, 4 (1989) 267-280
123. Wozney JM: The bone morphogenetic proteins family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and the adult. *Eur J Oral Sci* 106, 1 (1998) 160-166
124. Wozney JM, Rosen V: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346 (1998) 26-37
125. Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K: Bone Morphogenetic Protein Receptors. *Bone* 19, 6 (1996) 569-574
126. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K: Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130 (1995) 217-226
127. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos UAG: Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17 (1996) 175-185
128. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM: The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein-4. *Cell* 86 (1996) 599-606

Anhang

Tabelle 2.5.1: Giemsa-Färbung

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zytoplasma	blau
Zellkerne	blau
Knochen	schwarz (dunkelbraun)
Osteoid	braun
Erythrozyten	blassrosa
Thrombozyten/Lymphozyten	blau
Eosinophilen-Granula	rot

Tabelle 2.5.2: Masson-Goldner-Färbung

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zytoplasma	ziegelrot
Osteoid	rot
Zellkerne	schwarzbraun
Knochen/Kollagen (Bindegewebe)	grün (blassgrün)
Muskelgewebe	orange-rot
Erythrozyten	orange-gelb

Tabelle 2.5.3: Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung nach Ehrlich

<u>Zellstruktur</u>	<u>Färbeverhalten</u>
Zellkerne	blau
Zytoplasma	rot (blass)
Bindegewebe	blassrosa bis rot
Muskelgewebe	rot
Erythrozyten	rot-orange
Knorpel	blau

ANHANG

Tabelle 3.1 t-Test bei gepaarten Stichproben (Kalotte, vier Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Kalotte	21.10	13.01	12.65	8.65	2.28	7	.057

Tabelle 3.2 t-Test bei gepaarten Stichproben (Kalotte, acht Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Kalotte	32.93	15.81	17.70	12.48	2.07	7	.077

Tabelle 3.3 t-Test bei gepaarten Stichproben (Kalotte, zwölf Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Kalotte	68.11	24.66	68.67	23.16	-0.05	7	.962

Tabelle 3.4 t-Test bei gepaarten Stichproben (Bulla, vier Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Bulla	9.61	8.34	6.42	5.58	1.37	7	.214

Tabelle 3.5 t-Test bei gepaarten Stichproben (Bulla, acht Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Bulla	29.35	24.89	25.55	33.35	.31	7	.765

ANHANG

Tabelle 3.6 t-Test bei gepaarten Stichproben (Bulla, zwölf Wochen)

	links		rechts		<i>T</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			
Bulla	75.83	23.69	52.84	23.61	3.03	7	.019

Tabelle 3.7 (a): ANOVA Kalotte links

Zeit	<i>M</i>	-95 %	+95 %	<i>N</i>
4 Wochen	21.09	7.47	34.71	8
8 Wochen	32.93	19.30	46.55	8
12 Wochen	68.11	54.48	81.73	8

Tabelle 3.7 (b): ANOVA Kalotte links

		Kalotte links	
Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zeit	2,21	13.93	<.001

Tabelle 3.8 (a): ANOVA Kalotte rechts

Zeit	<i>M</i>	-95 %	+95 %	<i>N</i>
4 Wochen	12.65	0.89	24.41	8
8 Wochen	17.70	5.94	29.46	8
12 Wochen	68.67	56.92	80.43	8

Tabelle 3.8 (b): ANOVA Kalotte rechts

		Kalotte links	
Quelle	<i>df</i>	<i>F-Wert</i>	<i>p</i>
Zeit	2,21	30.03	<.001

Tabelle 3.9 (a): ANOVA Bulla links

Zeit	<i>M</i>	-95 %	+95 %	<i>N</i>
4 Wochen	9.61	-5.39	24.62	8
8 Wochen	29.35	14.34	44.36	8
12 Wochen	75.38	60.37	90.39	8

Tabelle 3.9 (b): ANOVA Bulla links

		Bulla links	
Quelle	df	F-Wert	p
Zeit	2,21	21.86	<.001

Tabelle 3.10 (a): ANOVA Bulla rechts

Zeit	<i>M</i>	-95 %	+95 %	<i>N</i>
4 Wochen	6.42	-11.08	23.93	8
8 Wochen	25.55	8.04	43.05	8
12 Wochen	52.84	35.33	70.34	8

Tabelle 3.10 (b): ANOVA Bulla rechts

		Bulla rechts	
Quelle	df	F-Wert	p
Zeit	2,21	7.67	.003

Thesen

1. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse ist das Meerschweinchen für die Untersuchung zur Heilung knöcherner Defekte im Kopf- Hals-Bereich gut geeignet.
2. Synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien beherbergen nicht das Risiko ansteckender Infektionskrankheiten im Gegensatz zu der Transplantation allogener Knochenspongiosa.
3. Das Bioglass[®]NovaBone besitzt osteokonduktive Eigenschaften.
4. Biogläser haben ein geringes antigenes Potenzial und können somit unkompliziert eingesetzt werden.
5. Bone Morphogenetic Proteins beschleunigen die Knochenheilung.
6. Bone Morphogenetic Proteins spielen nachweislich eine wichtige Rolle in der Knochen- und Knorpelentwicklung als auch bei der Differenzierung anderer Gewebe.
7. BMP 2, 6, 4 und 7 besitzen die größte osteoinduktive Aktivität.
8. BMP 4 wird vermehrt in der frühen posttraumatischen Phase freigesetzt.
9. Der Effekt von BMP 4 auf den Knochenheilungsprozess ist in den ersten vier Wochen nach dem operativen Eingriff am deutlichsten.
10. Aufgrund der Sequenzhomologie der osteoinduktiven BMPs wurde exemplarisch der Zusatz von BMP 4 untersucht.

11. Wegen der kurzen Halbwertszeiten von BMP 4 sind kürzere Beobachtungszeiträume sinnvoll.

12. Die Kombination exogen applizierter osteokonduktiver und osteoinduktiver Materialien können die Osteogenese zusätzlich beschleunigen

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Richard Markwart
Anschrift	Landwirtschaftsring 4 a 06179 Zappendorf
Telefon	0345-5115613
Mobiltelefon	0163-2891393
E-mail	richbd2000@yahoo.de
Nationalität	Deutsch
Geburtsdatum	17.März 1979 in Halle-Dörlau
Familienstand	ledig, 1 Kind (Emma-Katharina Markwart)
Eltern	Dipl.-Ing. Udo Markwart Dipl.-med. Annemarie Markwart

LEBENS LAUF

Beruf

01/2007 Assistenzarzt im Klinikum Bernburg (Chirurgie)

Studium

10/1999-12/2006 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale)

03/2003-10/2005 Studentische Hilfskraft im Krankenhaus Bergmannstrost im Bereich Pflege im Fach Neurologie mit Schwerpunkt der Frührehabilitation und Stroke-Unit

Praktika

Famulatur
Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie Halle
Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Halle
Arztpraxis Dipl. med. A. Markwart

Praktisches Jahr
I. Terial: Innere Medizin im Krankenhaus Dölau (Kardiologie)
II. Terial: Urologie im Uniklinikum Halle-Kröllwitz
III. Terial Chirurgie im Diakoniekrankenhaus Halle

Schulbildung

1992-1998 Gymnasium mit Abitur an der Sportschule Halle

1995-1996 Revere Highschool-Abschluss 12. Klasse
(in Richfield/Ohio)

Zivildienst
Zivildienst an der Martin Luther Universität Halle,
Klinik für Orthopädie

LEBENS LAUF

Sprachkenntnisse

Muttersprache	Deutsch
Englisch	schriftlich/mündlich: gut (einschließlich Fachenglisch im Bereich der Medizin)
Latein	Grundkenntnisse
Russisch	Grundkenntnisse

Ehrenamtlich

08/1997-08/2000	Trainer eines Basketball C-Jugend Teams
10/2000-03/2006	Spieler und Trainer eines Basketball Senioren Teams
08/2004-03/2005	Vize- Präsident des Halleschen SC 96 e.V.

Private Interessen

Familie
Basketball, American Football, Marathon

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Zuhilfenahme unzulässiger Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtliche oder dem Sinne nach übernommene Ausführungen sind so gekennzeichnet, dass Missverständnisse über die geistige Urheberschaft ausgeschlossen sind.

Halle, den 17.März 2007

Richard Markwart

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Marc Bloching gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche und konstruktive Betreuung sowie die jederzeit gewährte Unterstützung. Frau Susanne Amm danke ich besonders für die Unterstützung während der Operationen sowie für die Gesprächsbereitschaft im Rahmen der Betreuung dieser Arbeit. Frau Dr. Ilona Schön danke ich für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung. Des Weiteren möchte ich mich bei den Kollegen der Universitätsklinik für Pathologie für die Herstellung der Präparate und die Nutzung der Gerätschaften bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich immer moralisch und finanziell unterstützte, um meine Ziele zu verwirklichen. Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meiner lieben Freundin Franziska für ihre beratende Tätigkeit in statistischen und strukturellen Fragen.