

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Universität Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich

**Vergleichende in vivo-Studie zur osteoinduktiven Wirkung von BMP-2 und  
seiner Vorstufe proBMP-2 in bovinem Knochenersatzmaterial BioOss**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Christian Michael Dinu, geb. am 12.03.1978 in Hilden  
aus Mülheim an der Ruhr

Rostock, den 03.11.2020

1. Gutachter: Prof Dr. Dr. Bernhard Frerich, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof Dr. Dr. Kai-Olaf Henkel, Klinik VII Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Plastische Operationen/Oralchirurgie Hamburg

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader, Forschungslabor für Biomechanik und Implantologie Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2022

**Für Liliana und Gheorghe**

## Inhaltsverzeichnis

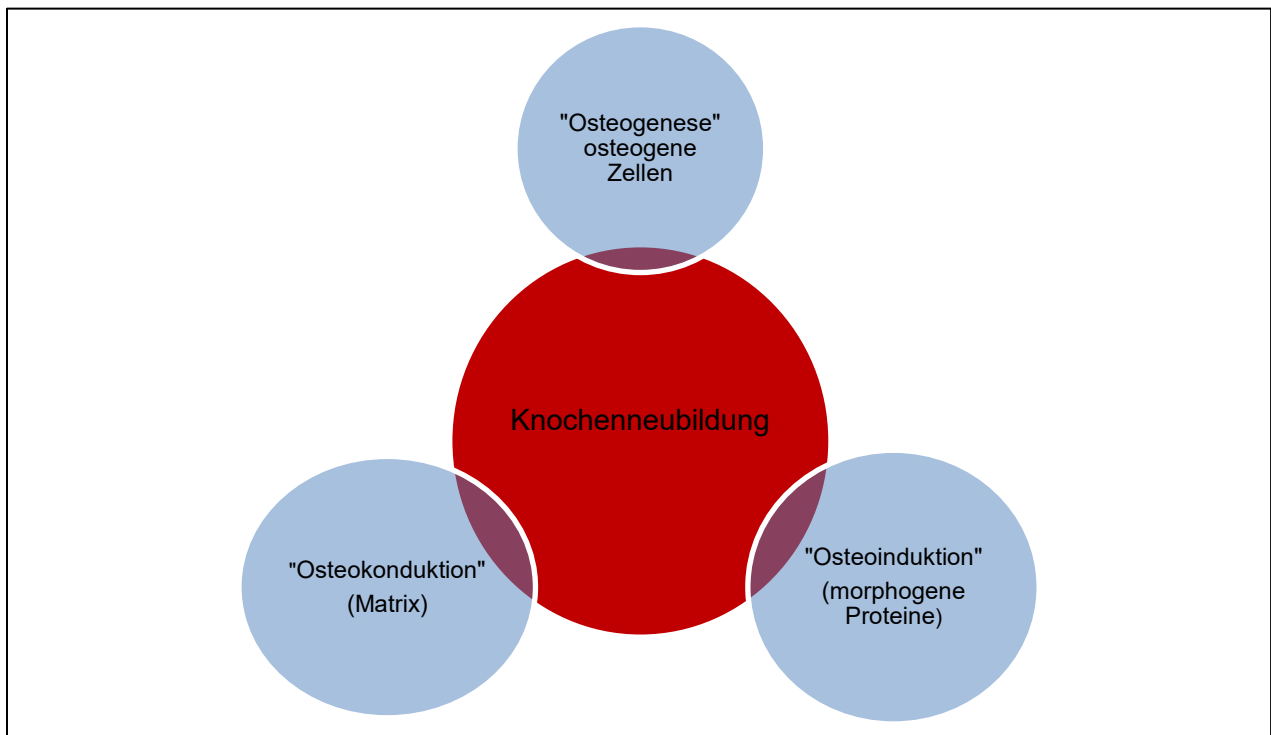
	<u>Seite</u>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Knochenersatzmaterialien .....	7
1.2 BMP-2 .....	10
1.3 BMP-2 assoziierte Komplikationen .....	14
<b>2 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1 Versuchsaufbau .....	16
3.2 Versuchstiere .....	16
3.3 Gruppeneinteilung .....	17
3.4 BioOss.....	18
3.5 BMP-2/proBMP-2 .....	19
3.6 Operatives Vorgehen.....	20
3.7 Tötung der Tiere.....	22
3.8 Entnahme der Blöcke und Histologie .....	22
3.9 Analyse Nebenwirkungsprofil .....	26
3.9.1 Gewichtsveränderung .....	26
3.9.2 Ödeme und Verletzungen .....	26
3.10 Statistische Auswertung .....	27
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
4.1 Gewichtsveränderung.....	28
4.2 Ödeme und Verletzungen.....	30
4.3 Klinische Beurteilung der BioOss Blöcke .....	32
4.4 Histologisches Ergebnis .....	32
4.4.1 Hämatoxylin-Eosin .....	32
4.4.2 Histomorphometrie.....	41
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>54</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>9 Diagrammverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>11 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>69</b>

---

<b>12 Lebenslauf .....</b>	<b>70</b>
<b>13 Danksagung.....</b>	<b>73</b>
<b>14 Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>74</b>
<b>15 Thesen.....</b>	<b>75</b>

## 1 Einleitung

Nach wie vor stellt der Ersatz von ausgedehnten Knochendefekten eine große Herausforderung dar. Unterschiedliche Ätiologien, wie z. B. Tumoren, Traumen, kongenitale Defekte sowie Infektionen sind wesentlich für die Entstehung kraniofazialer Gesichtsschädeldefekte verantwortlich (1, 2). Überschreiten Knochendefekte das biologische Regenerationspotenzial des jeweiligen Organismus, erfolgt ein narbiger Ersatz mit eingeschränkter biomechanischer Funktion. Derartige Knochendefekte mit ausbleibender Restitutio ad integrum werden als Defekte kritischer Größe, sogenannte *critical size defect*, bezeichnet (3). Verluste von Knochengewebe innerhalb einer hochfunktionellen Einheit wie der kraniofazialen Region führen zu erheblicher Einschränkung von Funktion, Form und Ästhetik mit nachfolgender Stigmatisierung und sozioökonomischer Benachteiligung der betroffenen Patienten. Abzugrenzen von ausgedehnten Knochendefekten wie beispielsweise nach ablativer Tumorchirurgie, sind Knochendefekte die sich auf die dentoalveoläre Region beschränken und für eine implantatgestützte prothetische Rehabilitation eine hohe Relevanz besitzen(4). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ergeben sich bei etwa 15 % aller Eingriffe am Skelettsystem der Bedarf an Knochenersatz zur Wiederherstellung von Form und Funktion (5). Prinzipiell werden dabei Knochentransplantate oder Knochenersatzmaterialien (KEM) zur anatomischen Wiederherstellung eingebracht, wobei das autologe Knochentransplantat dabei als Goldstandard gilt (6–8).



**Abbildung 1:** Die qualitative Beurteilung von Knochenersatzmaterialien erfolgt anhand drei wesentlicher Fähigkeiten: Osteogenität, die Stimulation der Knochenregeneration durch die Präsenz von osteogenen Zellen; Osteokonduktion, die Bereitstellung einer Leitstruktur zur Migration von Zellen und Förderung einer Neovaskularisation; Osteoinduktion, die Fähigkeit der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoprogenitorzellen mit der Kapazität der Knochenneubildung (9). Die Überlegenheit des autologen Knochentransplantates beruht auf den Vorrat an osteogenen Zellen, morphogener Proteine und einer idealen osteokonduktiven Struktur bei ausbleibender Immunogenität und guter biomechanischer Stabilität mit der Kapazität zur Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen (10)

Autologe Knochentransplantate werden anhand der jeweiligen Vaskularisation entsprechend in vaskuläre und avaskuläre Transplantate klassifiziert (4). Die Wiederherstellung von kleinen dreidimensionalen Knochendefekten des dentoalveolären Komplexes erfolgt vorwiegend mit avaskulären Knochentransplantaten aus der Retromolarregion, der Kinnregion, des Beckenkamms sowie gelegentlich aus der Tabula externa oder der Tibiaregion (11–16). Zur Rekonstruktion von großvolumigen Knochendefekten, wie z. B. nach Kontinuitätsunterbrechung des Kiefers kommen i. d. R. vaskularisierte mikrochirurgische Knochentransplantate aus der Beckenkamm- (17, 18) Fibula- oder Skapularegion (19) zum Einsatz. Das wesentliche Problem des autologen Knochentransplantates ist das erforderliche zweite Operationsfeld und die dadurch bedingte Verlängerung des chirurgischen Eingriffs (20). Eine ausreichende Knochenmaterialgewinnung ist zudem mit Komplikationen wie Schmerzen, Sensibilitätsstörungen, Hernien und Infektionen behaftet (14, 21, 22). Allogene Knochentransplantate gelten als Alternative zum autologen Knochen (10) verfügen jedoch aufgrund von Sterilisationsvorgängen lediglich über osteokonduktive Eigenschaften bei potenziellem Infektionsrisiko (23–25).

### 1.1 Knochenersatzmaterialien

Gegenwärtig ist die Verwendung von Knochenersatzmaterialien mit unterschiedlichen biologischen und physikalischen Eigenschaften die gebräuchlichste Alternative zum autologen Knochentransplantat. Unter dem Begriff der Knochenersatzmaterialien im eigentlichen Sinne werden vollsynthetische, allogene sowie xenogene Materialien zusammengefasst, welche idealerweise eine sukzessive Ersatzresorption erfahren, bei der das Material vollständig abgebaut und im Verlauf durch neu gebildeten Knochen ersetzt wird (24). Knochenersatzmaterialien werden anhand ihrer Zusammensetzung in drei unterschiedliche Kategorien klassifiziert (Tabelle 1).

Herkunft	Herstellungsgrundlage	Wirkung
<b>Biologisch</b>	Autolog	Osteoinduktiv + Osteokonduktiv
	Allogen	Osteokonduktiv + „Osteoinduktiv“
	Xenogen	Osteokonduktiv
	Phytogen	Osteokonduktiv
<b>Synthetisch</b>	Keramiken	} Osteokonduktiv
	Polymere	
	Zemente	
	Metalle	
<b>Komposite</b>	KEM in Kombination mit <ul style="list-style-type: none"> <li>• osteogene Zellen</li> <li>• Wachstumsfaktoren</li> <li>• Osteokonduktiv,-Induktiv + osteogene Zellen</li> </ul>	} Osteoinduktiv + Osteokonduktiv

**Tabelle 1:** Klassifikation der Ersatzmaterialien anhand ihrer Zusammensetzung (4).

Zielmaßgabe der Knochenersatzmaterialien sind die biomechanischen Eigenschaften des natürlichen Knochens. Von besonderer Bedeutung dabei sind physikalische Eigenschaften einer Leitstruktur, welche eine Adhäsion von Zellen aus dem umliegenden Gewebe ermöglichen (Osteokonduktion) (24). Dabei ist eine interkonnektierende poröse Mikrostruktur des Knochenersatzmaterials einer der wesentlichen Aspekte zur Osteokonduktion. Infolge der porösen Architektur verfügt das Material über eine vergrößerte inneren Oberfläche und begünstigt demzufolge eine zelluläre Migration sowie eine Vaskularisation des Materials (26, 27). Ungeachtet der porösen Mikrostruktur sollten die mechanischen Eigenschaften der Knochenersatzstoffe eine ausreichende Stabilität gewährleisten. Darüber hinaus ist eine graduelle Resorption des KEM gewünscht, um einen sukzessiven Ersatz des Materials durch körpereigenes Knochengewebe zu ermöglichen (Substitution). Im Idealfall besitzen KEM eine osteostimulierende Wirkung aufgrund der Aktivierung von ortsständigen Zellen (Osteogenese) bis hin zur Fähigkeit einer lokalen Osteoinduktion (28). Als optimale Knochenersatzmaterialien gelten Materialien mit zeitgerechter Resorption sowie ohne Anhalt auf Toxizität, Teratogenität, Kanzerogenität oder antigene Eigenschaften. Zudem wäre eine hohe Biokompatibilität, ökonomische Herstellungsverfahren, eine einfache Sterilisierbarkeit und eine möglichst lange Haltbarkeit von Vorteil (29, 30). Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen Stoffklassen der aktuellen Knochenersatzmaterialien gibt Tabelle 2.

Die derzeit gebräuchlichen KEM haben spezifische Nachteile. Hydroxylapatit-Keramiken verfügen über eine gute mechanische Stabilität und sind osteokonduktiv, verzögern jedoch eine Substitution mit neuem Knochen aufgrund der verzögerten Resorption des keramischen Materialanteils (4, 31). Biogläser und Glaskeramiken, deren bioaktive Oberfläche ein Wachstum von Knochengewebe entlang der Materialoberfläche fördern, sind rissanfällig und werden gleichfalls nur zögerlich resorbiert (4). Polymeren und Kopolymeren mangelt es, abgesehen von der potenziellen Sensibilisierung (32), an einem interkonnektierenden Porensystem sowie an mechanischer Stabilität (33). Derzeit finden Materialien dieser Rubrik vorzugsweise Anwendung als resorbierbare Nahtmaterialien, Schrauben oder Pins und werden infolge des spezifischen Degradationsverhaltens als Drug Delivery Systeme zur Freisetzung von Wirkstoffen verwendet (4). Mit Ausnahme von vaskularisierten Transplantaten dienen aktuelle Knochenersatzmaterialien im Wesentlichen als extrazelluläre Matrix zur Stabilisierung eines ossären Defektes (osteokonduktive Wirkung) sowie Unterstützung der ortsständigen Osteoneogenese (29). Immer mehr zeichnet sich daher die Notwendigkeit eines funktionellen und bioaktiven Gewebeersatzes ab, zur Förderung des körpereigenen Regenerationspotenzials.

<h2>Knochenersatzmaterialien</h2>	
	<h3>Anorganische KEM</h3>
<u>Keramiken</u>	Sinterung von biologischen oder synthetischen pulverförmigen Ausgangsstoffen unter Druck und hohen Temperaturen
<i>Hydroxylapatit - Keramiken</i>	chemisch fast identisch zu biologischem Hydroxylapatit osteotrophe Wirkung sowie Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen (29)
<i>Tricalciumphosphat (TCP)</i>	Zwei kristalline Formen: $\alpha$ - und $\beta$ -Form Abbau der TCP erfolgt durch zellulär (Phagozytose) und chemisch (Degradation) (34): Resorptionszeit bis zu 14 Monate gute Biokompatibilität und osteokonduktive Wirkung
<i>biphasische Keramiken</i>	synthetische Gerüstsubstanzen aus $\alpha$ -TCP, $\beta$ -TCP oder aus Hydroxylapatit (29) dem humanen Apatit ähnlich (35) gute Biokompatibilität (36) osteokonduktiv, kaum osteogene und osteoinduktive Eigenschaften (36, 37) gute Stabilität aber langsame Biodegradation (36)
<u>Biogläser</u>	amorphe Materialien basierend aus der Kombination vom sauren (Siliciumoxid, Aluminiumoxid etc.) und basischen (Zinkoxid, Magnesiumoxid etc.) Oxiden Grundform ist ein dreidimensionales Phosphoroxid-Siliciumoxid-Netzwerk, ermöglicht das Anwachsen von Gewebe durch Oberflächenbioaktivität (38) hohe Rissanfälligkeit
<u>Zemente</u> <i>Calciumphosphat- zemente</i>	Herstellung durch Pulverkomponenten und Wasser Ein- und Zwei- Komponenten Systeme Endprodukt Hydroxylapatit osteokonduktiv
Kalziumsulfat	lediglich Platzhalterfunktion keine osteokonduktive oder osteoinduktive Wirkung (Rentsch et al. 2012)
<u>Metalle</u> <i>Titan</i>	innovatives nichtresorbierbares KEM poröse Varianten zeigen osteokonduktive Wirkung sowie gute Biokompatibilität (39, 40) formstabil und gute mechanische Belastbarkeit keine Biodegradation somit Entfernung notwendig
	<h3>Organische KEM</h3>
<u>Polymere</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• methylmethacrylate</li> <li>• laktide</li> <li>• kopolymere</li> </ul>	Abbau erfolgt im Gewebe durch Hydrolyse Verwendung von Polyglycolid, Poly-L-lactid, Poly-D,L-lactid bzw. Kopolymere Verwendung als resorbierbares Osteosynthesematerial (41) ein weitverbreitetes Mischpolymer ist das Poly(lactic-co-glycolic acid) sog. PLGA, das als resorbierbares Nahtmaterial oder als Trägersubstanz Verwendung findet (42)
<u>Komposite</u>	Kombination aus biologischen und synthetischen Materialien bioaktive KEM: Erweiterung der Funktion durch Verwendung von morphogenen Wachstumsfaktoren und/oder mesenchymalen Stammzellen (23, 43, 44)
<u>Hydroxylapatit (HA)</u>	anorganischer Hauptbestandteil des Knochens bovinem, porcinem, phytoenem oder korralinem Ursprungs gute osteokonduktive Wirkung aufgrund interkonnektierender Porenstruktur

**Tabelle 2:** Einteilung der synthetischen und organischen Knochenersatzmaterialien nach Stoffklassen mit den jeweiligen materialspezifischen Eigenschaften.

## 1.2 BMP-2

Tissue Engineering von Knochen basiert auf dem Prinzip der regenerativen Wiederherstellung von Knochengewebe unter Verwendung von knochenspezifischen Wachstumsfaktoren auf Trägermaterialien. Dabei sind diese sogenannten bioaktiven Komposite im Allgemeinen osteokonduktive Trägermaterialien welche im Vorfeld mit morphogenen Wachstumsfaktoren beschichtet wurden und infolge der vermittelten osteoinduktiven Kapazität eine lokale Knochenregeneration bewirken (29).

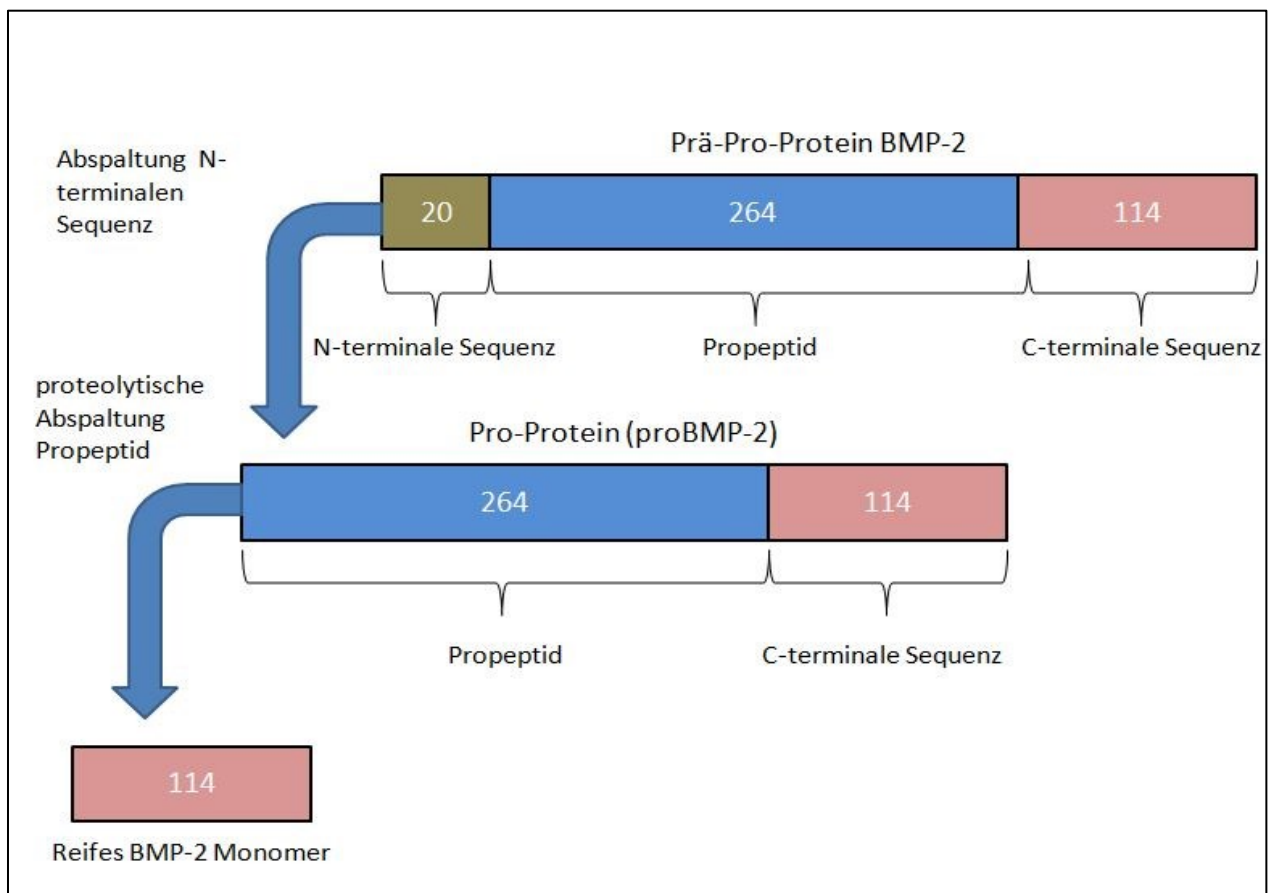
Bone Morphogenetic Proteins (BMP) zählen zu den bedeutsamsten knochenbildenden Proteinen und sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie (45). Die osteoinduktive Wirkung von BMP ist allgemein bekannt und wurde bereits von Marshall Urist Mitte des 20. Jahrhundert beschrieben (46). Bislang konnten etwa 40 verschiedene Bone Morphogenetic Proteins isoliert werden, wobei nicht alle über ein osteoinduktives Potenzial verfügen (47, 48). Die molekularbiologische Isolierung dieser osteogenen Proteine ermöglichte nachfolgend eine industrielle Herstellung von rhBMP (49–51). Die Nomenklatur der BMPs ist im Allgemeinen uneinheitlich und infolge der möglichen Ausbildung von BMP Homo- und Heterodimeren zusätzlich sehr komplex. Unter Berücksichtigung der Homologie BMP-kodierender Gene sowie gemeinsamer homologer Aminosäuresequenzen, werden Bone Morphogenetic Proteine in vier funktionelle Subgruppen zusammengefasst (51). Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Klassifikation der BMP in die entsprechenden Subgruppen.

BMP-Subfamilien	Mitglieder
<b>BMP-2-Subfamilie</b>	BMP-2 und BMP-4
<b>BMP-3-Subfamilie</b>	
<b>BMP-5-Subfamilie</b>	BMP-5, -6, -7, -8, -8B, -9, -10 und -11 BMP-5, -6, -7, -8 (OP-1 [Osteogenic Protein-1 Gruppe])
<b>BMP-12-Subfamilie</b>	BMP-12 [auch GDF-7, CDMP-3], BMP-13 [auch GDF-6, CDMP-2], BMP-14 [auch GDF-5, CDMP-1] und BMP-15

**Tabelle 3:** Klassifikation der BMP in Subkategorien gemäß Funktion und Aminosäuresequenzhomologie (51, 52)

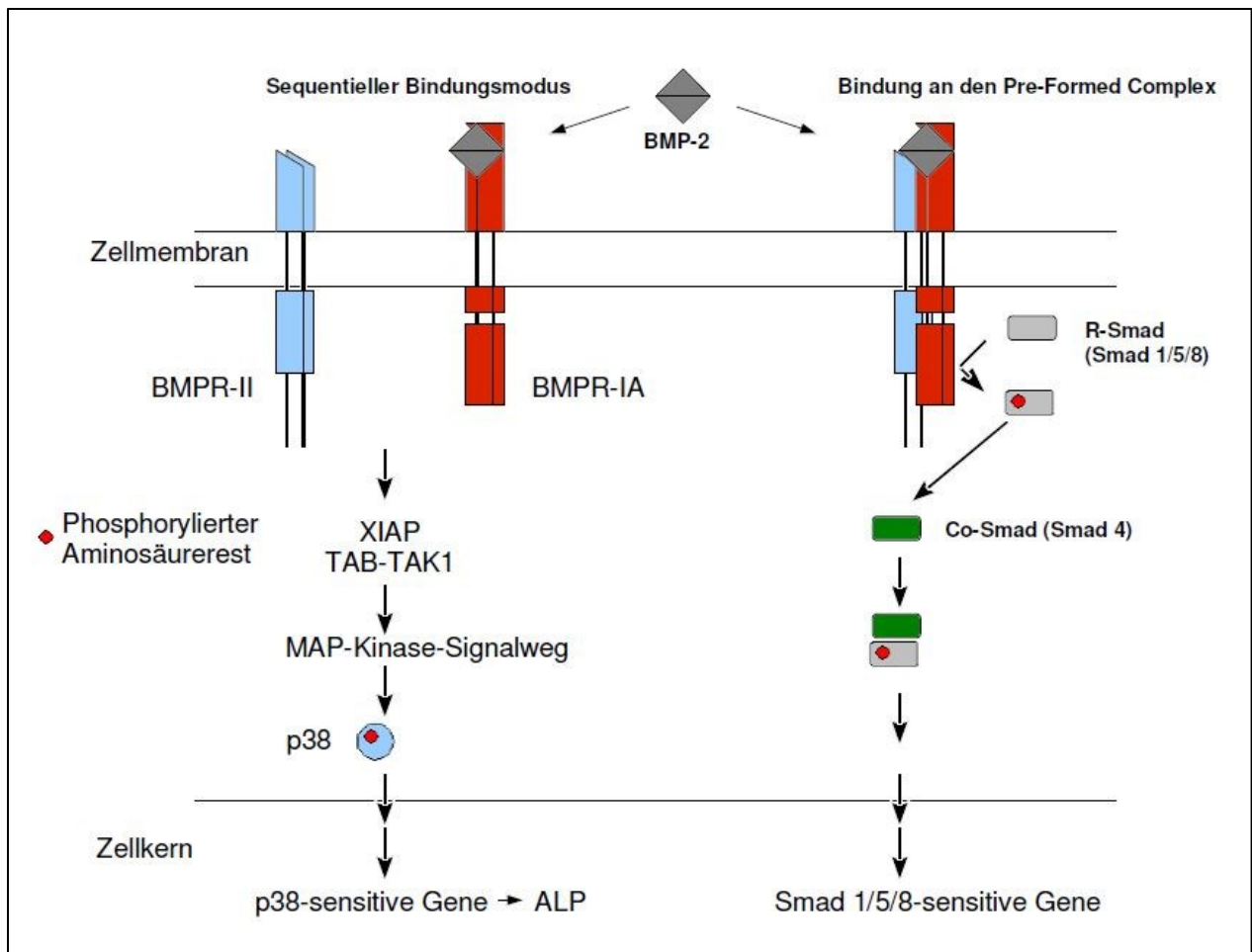
BMP-2 verfügt neben BMP-7 über die ausgeprägteste osteoinduktive Kapazität, wie im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen zur ektopen Knocheninduktion beobachtet werden konnte (53). BMP-2 veranlasst zunächst die Chemotaxis und Proliferation von perivaskulär vorkommenden mesenchymalen Vorläuferzellen und initiiert die Differenzierung dieser Zellen zu Chondroblasten und Osteoblasten, welche im Verlauf über den Vorgang der enchondralen und desmalen Ossifikation neuen Knochen induzieren (51, 54, 55). Des Weiteren führt die Stimulation durch BMP-2 von primär nicht osteogenen mesenchymalen Zellen, selbst in nichtossifizierendem Gewebe, zu einer Differenzierung in Chondro- und Osteoblasten mit konsekutiver Ausbildung von Knochengewebe (ektope Knocheninduktion) (56).

Die natürliche Synthese von BMP-2 erfolgt in Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Thrombozyten (57, 58). Nach auto- und parakriner Sekretion des Peptids dient die Extrazellulärmatrix (EZM) des Knochens als temporäres Reservoir ( $1 \mu\text{g/kg}$  Kortikalis) (59). BMP-2 wird als Vorläufer- bzw. Pro-Protein synthetisiert (60). Dieses besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einem aus bis zu 300 Aminosäuren gebildeten Propeptid und einer C-terminalen, aus etwa 100 – 140 Aminosäuren bestehenden, Polypeptidkette, dem eigentlichen wirksamen Zytokin. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt im C-terminalen Abschnitt, innerhalb des zukünftigen freigesetzten reifen BMP-2, über die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei monomeren Untereinheiten, eine Dimerisierung. Das aus jeweils zwei Propeptiden und zwei C-terminalen Einheiten entstandene Dimer, bildet das Vorläuferprotein – das proBMP-2 (Abbildung 2). Nach proteolytischer Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen Anteil des Dimers werden die reifen BMP-2 Dimere in den Extrazellulärraum sezerniert (61, 62).



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Biosynthese anhand eines BMP-2 Monomers. BMP-2 wird als Prä-Pro-Protein synthetisiert. Die N-terminale Sequenz besteht aus 20 Aminosäureresten und ist für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich, gefolgt vom Propeptid bestehend aus 264 Aminosäureresten. Das C-terminale Ende besteht aus 114 Aminosäureresten und stellt das eigentliche aktive BMP-2 dar. Propeptid + C-terminales Ende repräsentieren die prä-mature Form des BMP-2 - das proBMP-2. Die proteolytische Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen Abschnitt ergibt die aktive Form des BMP-2 (63).

Grundsätzlich erfolgt die zelluläre Signalwirkung von Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie über die Interaktion von membrangebundenen Rezeptoren. Infolge der Bindung an spezifische Rezeptoren kommt es zur Auslösung einer intrazellulären Signalsequenz mit nachfolgender Induktion von Transkriptionsfaktoren und damit der eigentlichen Regulation der Zielgene (64). TGF- $\beta$  Rezeptoren sind spezifische transmembranöse Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren. Gemäß der Sequenzhomologie und Funktion werden die BMP-2 spezifischen Rezeptoren in BMPR-IA und BMPR-II unterteilt (65). In Abhängigkeit der vorherrschenden Rezeptoren-Liganden Konstellation besteht ein SMAD-abhängiger Signalweg (PFC= preformed complex) von einem sequenziellen Bindungsmodus des p38-MAPK abhängigen Signalwegs (66). Die Bindung eines BMP-2 Dimers an einen bereits vorbestehenden Rezeptorkomplex aus jeweils zwei BMPR-IA und BMPR-II Rezeptoren (preformed complex) aktiviert den SMAD-Signalweg. SMAD-Proteine sind intrazelluläre Mediatoren deren Namensgebung sich von den ersten beiden identifizierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie ableiten: dem MAD-Protein (mothers against decapentaplegic) aus *Drosophila melanogaster* (Taufliege) sowie dem SMA-Protein (small body size) aus *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm). Nach Phosphorylierung von R-Smads 1, 5, 8 (R-Smad = receptor regulated Smad) durch die aktivierte Kinase des Typ I Rezeptors, assoziieren diese mit einem weiteren Co-Smad (common mediator Smad – Co-Smad) zu einem SMAD-Komplex. Der nachfolgende Transport dieses entstandenen SMAD-Komplexes in den Zellkern, induziert eine Genexpression von Transkriptionsfaktoren wie z. B. Runx2 mit konsekutiver osteoblastärer Differenzierung von mesenchymalen Zellen (67, 68). Demgegenüber bindet im sequenziellen Bindungsmodus BMP-2 primär an zwei hochaffine BMPR-IA Rezeptoren. Anschließend kommt es zur Rekrutierung von zwei weiteren BMPR-II Rezeptoren und dadurch zur Ausbildung eines BMP induced signaling complex (BISC) bestehend aus einem BMP-2 Dimer sowie je zwei BMPR-IA und BMPR-II Rezeptoren (69). Infolge dieses heterotetrameren Komplexes erfolgt die Aktivierung einer mitogen-aktivierenden p38-MAPK Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase) (70) mit nachfolgender Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Letztendlich kommt es zur Synthese von spezifischen Knochenmatrixkomponenten wie alkalischer Phosphatase, Typ I Kollagen, Fibronectin, Osteopontin und Osteocalcin (71) (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des BMP-Signalweges aus (66). Der Smad-abhängige Signalweg (preformed complex) ist der heute besser erforschte Signaltransduktionsweg. Über eine Ligandenbindung und der damit verbundenen Phosphorylierung wird eine Smad-Kaskade aktiviert, die nachfolgend eine Expression von Genen steigert. Der sequenzielle Bindungsmodus wird über die XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) aktiviert, das dann als Bindeglied für die Signalübertragung über das Protein TAB1 (TGF- $\beta$ -activated binding protein) auf die MAPKKK TAK-1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1) dient. Durch diese Übertragung wird eine MAP-Kinase-Kaskade aktiviert, die über die Phosphorylierung von p38 und einen Transkriptionsfaktor die Expression von typischen Knochenmatrixproteinen, wie Typ-I Kollagen, Fibronectin, Osteopontin, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase, induziert (66, 71–73).

Infolge der ausgeprägten osteoinduktiven Kapazität von BMP-2 besteht in der rekonstruktiven Chirurgie ein großes Interesse an diesem Zytokin zur Wiederherstellung von Knochendefekten. Dabei ermöglicht gegenwärtig die rekombinante Herstellung von BMP-2 eine hinreichende Bereitstellung des Faktors für systematische Untersuchungen knochenregenerativer Verfahren (63, 74–76). In zahlreichen Versuchen konnte die Kapazität von BMP-2 zur Ausheilung und Wiederherstellung von Knochendefekten (77–87) wirkungsvoll nachgewiesen werden. Angesichts derartiger positiver Studienergebnisse als Alternative zum autologen Knochentransplantat, erhielt rhBMP-2 eine klinische Zulassung (88) für unterschiedliche Behandlungsindikationen in der Neuro- (89), Unfall- (90) und kraniofazialen (91) Chirurgie. Derzeit wird rhBMP-2 mit einem bovinen Kollagenschwamm als Trägermaterial in Europa unter dem Produktnamen InductOs<sup>®</sup> und in den USA als InFUSE<sup>®</sup> geführt (Medtronic Sofamor Danek, Inc. Minneapolis) (89–91).

### 1.3 BMP-2 assoziierte Komplikationen

Die klinische Anwendung von rhBMP-2 ist jedoch nicht unbedenklich. Bereits im Jahr 2008 warnte die FDA im Zusammenhang mit rhBMP-2 vor potenziell schwerwiegenden Komplikationen (92). Seit Zulassung wurden bis zum Jahr 2017 mehr als 10.000 Berichte über rhBMP-2 assoziierte Nebenwirkungen verfasst (93). Dabei traten in etwa 75 % der Fälle inflammatorische Komplikation in der Region der Applikation auf. Dokumentiert wurden Ödeme, Erytheme, Schwellungen und Schmerzen (93) mit mittelgradigem Verlauf (84, 94) bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen (95) und sogar letalem Ausgang (96). Ursache dieser lebensbedrohlichen Komplikationen waren mitunter das Auftreten der Ödeme und Schwellungen im Bereich der Atemwege nach Verwendung von BMP-2 im kraniofazialen Bereich, was eine ernsthafte Einschränkung dieses Zytokins für die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie darstellt (92).

Problem bei der Anwendung von Bone Morphogenetic Protein sind die hohen Anfangskonzentrationen von BMP-2 im Gewebe, welche aufgrund hoher initialer Freisetzungsmengen (sog. *burst release*) Ursache der inflammatorischen Nebenwirkungen sind (45, 97, 98). Nach der initialen hohen Freisetzungskonzentration von BMP-2 erfolgt die graduelle Freisetzung des verbliebenen Wachstumsfaktors aus dem Trägermaterial mit einer Halbwertszeit von 1 bis zu 10 Tagen (99, 100). Dabei stellt eine hinreichende Anzahl von BMP-2-sensiblen Zielzellen die notwendige Voraussetzung dar zur Umwandlung der Zytokin-spezifischen Differenzierungssignale (101, 102). Im Zuge der Applikation von BMP-2 ist initial die erforderliche Konzentration mesenchymaler Zellen am Implantationsort noch nicht ausreichend präsent, um die hohen Anfangskonzentration des Wachstumsfaktors simultan kompensieren zu können. Von Vorteil wäre daher eine umgekehrte Freisetzungskinetik des Zytokins. In der Literatur wird dem Wachstumsfaktor bereits bei Konzentrationen im femtomolaren Bereich eine Chemotaxis zugesprochen. Nanomolare Konzentrationen ermöglichen eine mesenchymale Zellproliferation und Konzentrationen im Mikrogrammbereich fördern eine Osteoinduktion (103, 104). Folglich würde anfänglich eine geringe Konzentration des Wachstumsfaktors am Applikationsort initial eine Rekrutierung BMP-2 sensibler mesenchymaler Zellen fördern. Eine kontinuierliche und prolongierte Freisetzung des Wachstumshormons im Implantationslager würde folglich eine simultane sowie äquivalente Proliferation an BMP-2 sensiblen Zellen ermöglichen, um nachfolgend eine effiziente Umsetzung BMP-2-vermittelter osteoinduktiver Signale zu ermöglichen. Unter Vermeidung der hohen initialen Anfangskonzentrationen zugunsten einer graduellen und prolongierten Freisetzung wäre eine Knochenregeneration unter Ausbleiben bzw. Verringerung inflammatorischer Nebeneffekte zu erwarten (97).

## 2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie war es, proBMP-2 als mögliches neues verträglicheres Präparat im Vergleich zum konventionell verwendeten BMP-2 für die Therapie von Knochendefekten zu identifizieren.

Die Vermutung gilt, dass die Prozessierung des proBMP-2 zum murenen BMP-2 durch proteolytische Abspaltung des N-terminalen Abschnittes im Gewebe erfolgt (51). Infolge dieser fortlaufenden Prozessierung des prämaturen Faktors ist anzunehmen, dass ein gradueller und kontinuierlicher Konzentrationsanstieg von BMP-2 durch die Verwendung von proBMP-2 im Gewebe erreicht werden kann. Die sukzessive Umsetzung der prämaturen Form könnte eine günstigere und protrahierte Generierung von BMP-2 im Gewebe ermöglichen. Unerwünschte „burst release“ des Proteins könnten vermieden werden und im Vergleich zum reifen BMP-2 eine harmonischere Knocheninduktion begünstigen. Im Tierversuch konnte die knocheninduzierende Wirkung von proBMP-2 bereits nachgewiesen werden (63). Die prämatüre Form besitzt im Gegensatz zum reifen BMP-2 eine unterschiedliche Pharmakokinetik. Es ist bei neutralem pH gut löslich und verursacht aufgrund einer kompetitiven Hemmung am BMP-2-Rezeptor eine Retardwirkung (66).

In dieser Studie sollte geprüft werden, ob durch die Verwendung von proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 in einem ektopen Lager eine entsprechende Fläche an neu gebildetem Knochengewebe innerhalb eines bovinen Hydroxylapatit-Scaffolds (BioOss) generiert werden kann. Zur Erlangung aussagekräftiger Ergebnisse erfolgte die Verwendung korrespondierender Mengenverhältnisse der unterschiedlichen Proteinformen durch den Einsatz äquimolaren Konzentrationen von BMP-2 respektive proBMP-2.

Als zweiter zu untersuchender Aspekt dieser Studie galt die Evaluation von inflammatorischen Komplikationen in Form von Ödemen und Verletzungen an der Implantationsstelle zur Beurteilung des Nebenwirkungsprofils der jeweiligen Wirkstoffe.

Als angemessene Untersuchungsmethode zählen die histomorphologische Auswertung der induzierten Knochenflächen, eine semiquantitative Bewertung der Ödeme und Verletzungen an der Implantationsstelle sowie die Dokumentation der Gewichtsveränderung zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten.

### 3 Material und Methoden

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Tierversuch wurde vom zuständigen Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Rostock unter der Nr.: LALLF M-V/TSD/7221.1-1.1-45/09 genehmigt.

#### 3.1 Versuchsaufbau

Als Versuchstiere wurden 54 weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 250 g verwendet. Es erfolgte die subkutane Implantation von 1 x 1 x 1 cm großen BioOss Blöcken (BioOss, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) in eine paramediane dorsale Hautkammer. Zur Herstellung äquivalenter Komposite mit korrespondierenden Mengenverhältnissen der jeweiligen Proteinformen erfolgte die Beschichtung der BioOss Blöcke mit jeweils äquimolaren Mengen (1,5 nmol) an BMP-2 bzw. proBMP-2. Infolge der unterschiedlichen molekularen Masse des muren bzw. prämaturen Proteins (siehe S. 9 Abb.2) entsprachen 1,5 nmol BMP-2  $\cong$  20  $\mu$ g BMP-2 und 1,5 nmol proBMP-2  $\cong$  70  $\mu$ g proBMP-2. Als Kontrolle erfolgte die Implantation von BioOss Blöcken ohne Wirkstoff. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen zu jeweils 18 Individuen unterteilt. Allen Versuchstieren der Gruppe A (n=18) wurde ein BioOss-Block ohne Wachstumsfaktor (Kontrolle), der Gruppe B ein BioOss-Block mit BMP-2 (n=18) und der Gruppe C ein BioOss-Block mit proBMP-2 (n=18) implantiert. Der postoperative Beobachtungszeitraum innerhalb der jeweiligen Gruppen betrug 3 Wochen, 6 Wochen und 12 Wochen mit jeweils 6 Tieren pro Zeitpunkt (Tabelle 4). Während des Versuchsablaufs wurden alle gesundheitlichen Veränderungen an den Tieren dokumentiert. Alle Versuchstiere wurden zu Beginn und am Tag der Tötung gewogen und Gewichtsveränderungen dokumentiert. Nach den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten erfolgte die Tötung der Tiere mittels Kohlendioxids. Die entnommenen Proben wurden klinisch inspiziert und histologisch aufgearbeitet. Mittels Slide Scanner erfolgte eine Digitalisierung der histologischen Proben und anschließend die systematische histologische und histomorphometrische digitale Auswertung der Präparate. Anhand klinischer, histologischer und histomorphometrischer Untersuchungen sollte die Knocheninduktion innerhalb der Hydroxylapatit-Scaffolds sowie das Nebenwirkungsprofil beider Proteinformen miteinander verglichen werden.

#### 3.2 Versuchstiere

Alle Tiere wurden speziell für wissenschaftliche Versuchszwecke gezüchtet und von der Firma Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH) bezogen. Diese Tierspezies hat in vorangegangenen Studien eine gute Handhabung bewiesen und ist ein etabliertes Tiermodell zur Testung von Knochenersatzmaterialien in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (105, 106). Die gesamte Versuchstierhaltung erfolgte am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie mit zentraler Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Die Haltung der Tiere erfolgte in Standard-käfigen Makrolonkäfig Typ IV mit einer Besatzdichte von zwei Tieren in einem klimatisierten Raum (20 – 25 °C Raumtemperatur sowie relative Luftfeuchte 60 – 70 %) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Futter und Wasser wurden ad libitum angeboten. Nach Anlieferung der Tiere durchliefen diese eine Akklimatisationszeit von einer Woche. Die Tiere befanden sich über den gesamten Zeitraum der Studie unter regelmäßiger veterinärmedizinischer Kontrolle.

### 3.3 Gruppeneinteilung

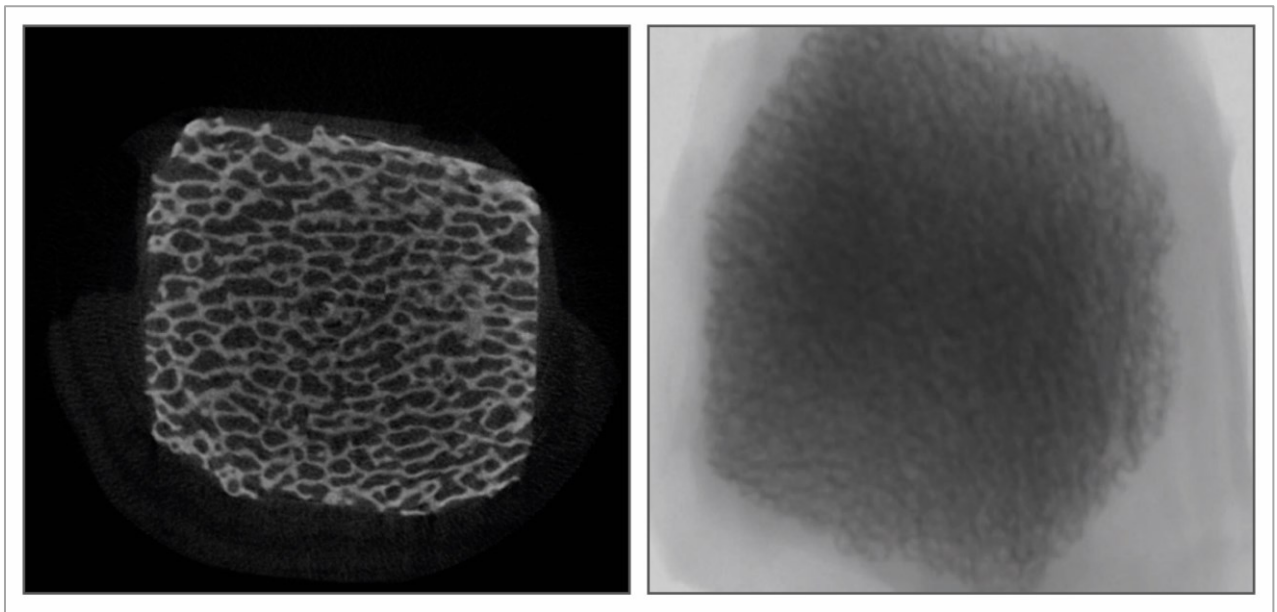
Allen 54 Sprague-Dawley-Versuchstieren wurden BioOss Scaffolds implantiert. Es erfolgte eine randomisierte Aufteilung der Tiere in Gruppe A, B und C zu jeweils 18 Tieren. Individuen der Gruppe A erhielten leere BioOss Scaffolds (Kontrolle). Tiere der Gruppe B erhielten BioOss Scaffolds mit jeweils 1,5 nmol BMP-2. Tiere der Gruppe C erhielten BioOss Scaffolds mit jeweils 1,5 nmol proBMP-2. Nach Ablauf der entsprechenden Beobachtungszeiträumen wurden die Tiere getötet und die Proben der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Die Anzahl der Versuchsgruppen und Versuchszeiträume resultierte aus den Fragestellungen. Um statistische signifikante Berechnungen anhand der histologischen Befunde zu ermöglichen, war eine Mindestzahl von n=6 Tieren pro Versuchsgruppe und Untersuchungszeitraum von 3 Wochen, 6 Wochen und 12 Wochen erforderlich (Tabelle 4).

Versuchsdauer	Versuchsgruppen		
	A	B	C
	<b>BioOss leer (Kontrolle)</b>	<b>BioOss + BMP-2 (1,5nmol)</b>	<b>BioOss + proBMP-2 (1,5nmol)</b>
<b>3 Wochen</b>	6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere
<b>6 Wochen</b>	6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere
<b>12 Wochen</b>	6 Tiere	6 Tiere	6 Tiere
<b>Anzahl der Tiere (pro Versuchsgruppe)</b>	18	18	18
<b>Anzahl der Tiere</b>	<b>3 x 18 = 54</b>		

**Tabelle 4:** Versuchsplanung

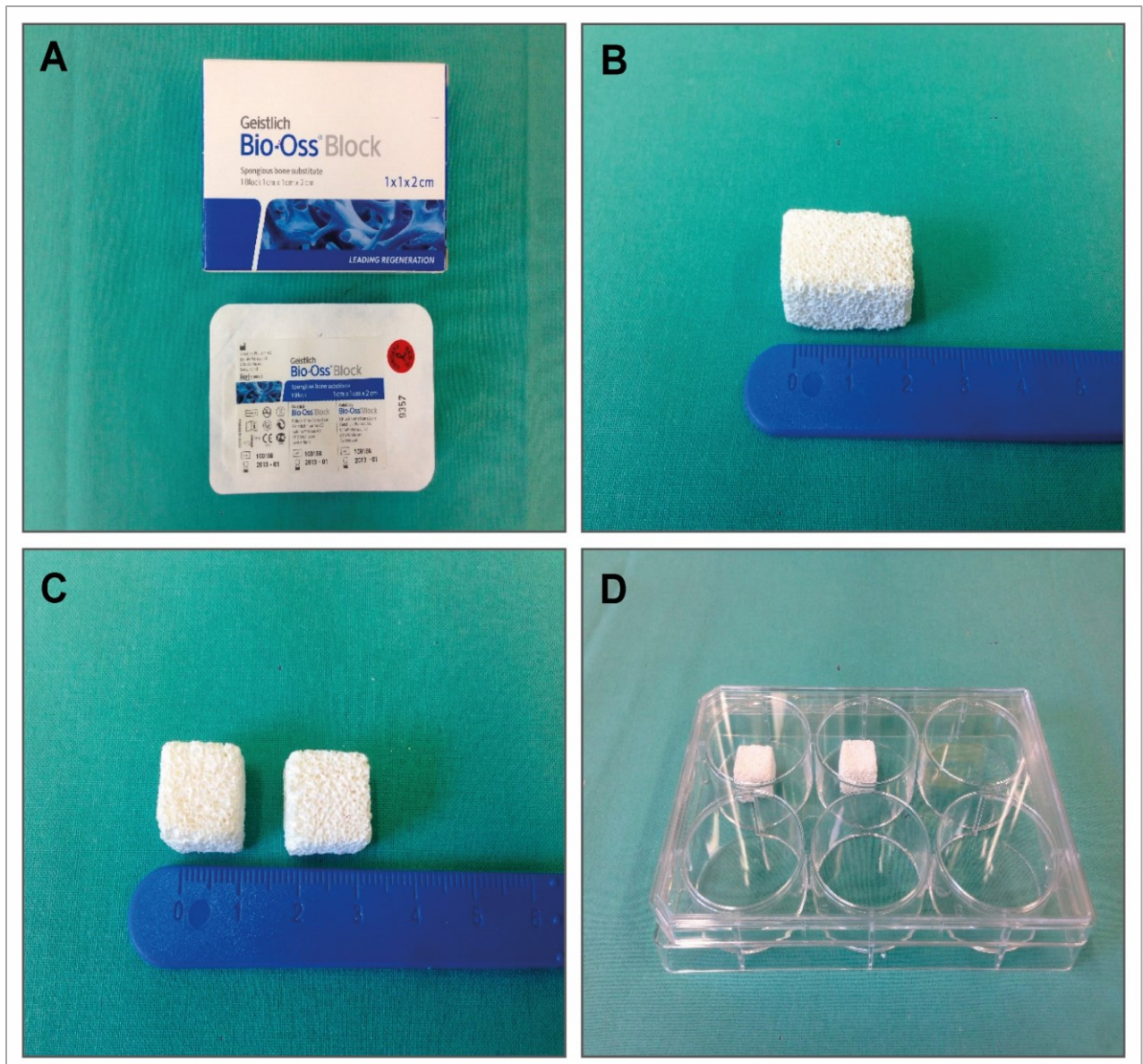
### 3.4 BioOss

Als Trägermaterial wurden BioOss Blöcke der Firma Geistlich (BioOss, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) verwendet. Nach chemischer und physikalischer Sterilisation des bovinen Knochenmaterials entsteht eine hochgereinigte, proteinfreie Hydroxylapatitmatrix. Aufgrund des vergleichbaren Kalzium/Phosphat-Verhältnisses von 2:1 sowie einer Porengröße von etwa 100  $\mu\text{m}$  ähnelt BioOss der Knochenmatrix von humanen Spongiosaknochen (BioOss, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz). BioOss gilt als eines der am ausführlichsten wissenschaftlich dokumentierten KEM (29) und erbrachte in vorangegangenen Untersuchungen als Trägermaterial für BMP-2 vielversprechende Ergebnisse hervor (9, 45, 84, 107, 108).



**Abbildung 4:** BioOss Block dargestellt im Microcomputertomographen. Die hochporöse Struktur des bovinen Hydroxylapatitgerüsts fördert eine Vaskularisation und eine Adhäsion von migrierten Zellen an der Oberfläche im Sinne einer Osteokonduktion.

Die 1 x 1 x 2 cm großen BioOss Blöcke wurden mit einem sterilen Einwegskalpell (Größe 20, Dahlhausen Medizintechnik GmbH, Halberstadt) in 1 x 1 x 1 cm große Implantate halbiert. Das Auftragen der äquimolaren Konzentrationen von jeweils 1,5 nmol BMP-2 ( $\pm 20\mu\text{g}$ ) bzw. 1,5 nmol proBMP-2 ( $\pm 70\mu\text{g}$ ), erfolgte in die Mitte des Blocks mittels Eppendorf Pipette (Eppendorf Bio-Master, Eppendorf AG). Anschließend wurden die durchtränkten Implantate bei 8 C° steril gelagert.



**Abbildung 5:** Herstellung der HA-Scaffolds. A) BioOss der Firma Geistlich, nicht resorbierbares bovines Knochenersatzmaterial auf der Basis von Hydroxylapatit. Aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften des Materials zeigt es eine große Ähnlichkeit zu humanen Spongiosaknochen B) solider BioOss Block, Originalgröße 2 x 1 x 1 cm. C) Halbierung des Blocks in 1 x 1 x 1 cm D) nach Auftragen von BMP-2 bzw. proBMP-2 sterile Lagerung der Komposite bei 8 C°.

### 3.5 BMP-2/proBMP-2

Das in diesem Versuch verwendete rhBMP-2 und rhproBMP-2 wurde mit freundlicher Unterstützung von der Arbeitsgruppe Prof. E. Schwarz aus dem Institut für technische Biochemie der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Die Herstellung des rekombinanten BMP-2 und proBMP-2 erfolgt über eine heterologe Expression der jeweiligen cDNA in *E. coli* in Form von inclusion bodies mit anschließender Renaturierung der Proteine *in vitro*. Dieser Herstellungsprozess wurde durch die Arbeitsgruppe Schwarz entwickelt und gilt als ein etabliertes Verfahren zur Herstellung von rhBMP-2 und rhproBMP-2 (61, 76).

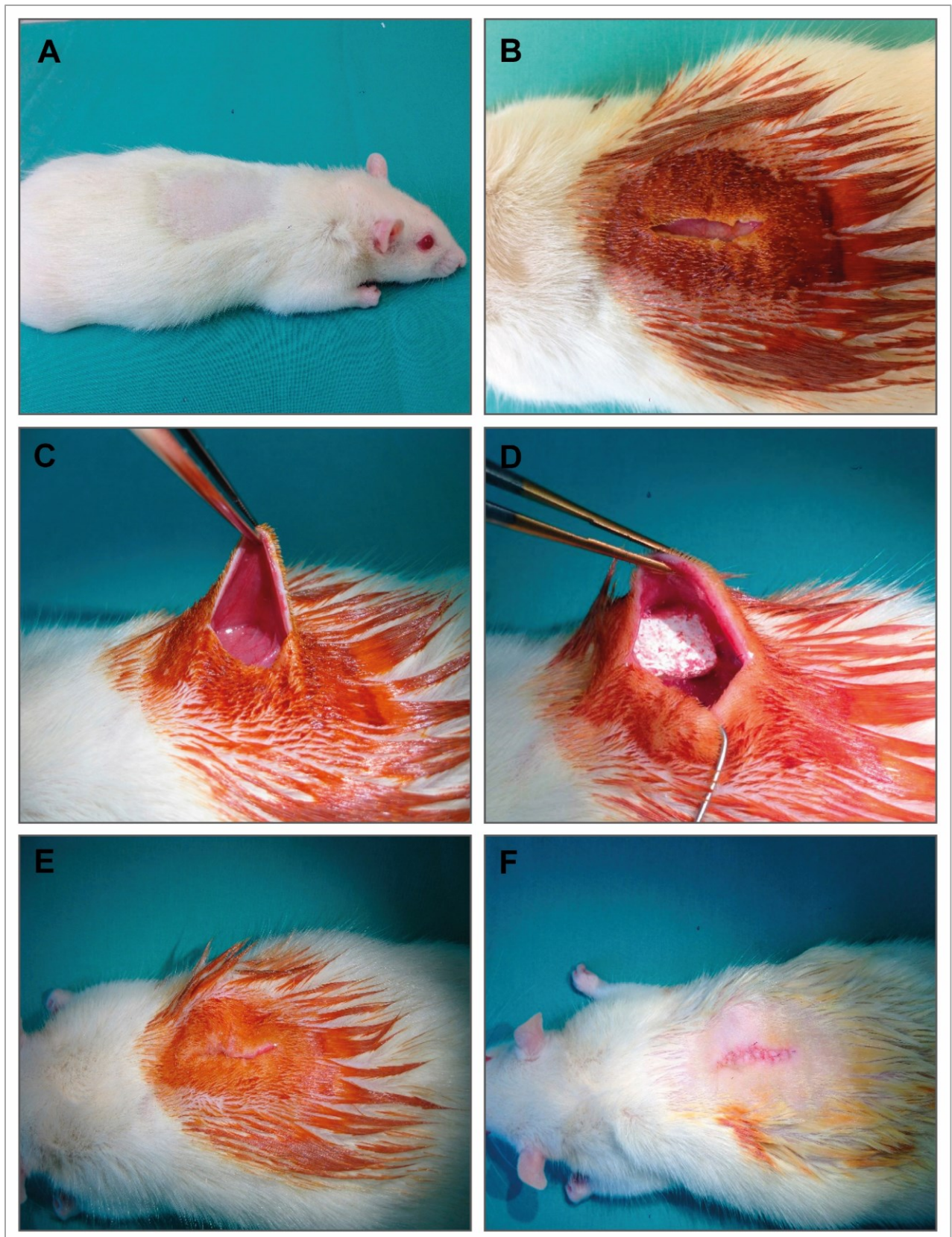
### 3.6 Operatives Vorgehen

Die Versuchstiere wurden präoperativ gewogen und ihr Gewicht dokumentiert. Alle Eingriffe erfolgten in Narkose. Für die Narkose der Tiere kam eine Kombination aus Ketamin (Ketavet, Fa. Upjohn GmbH, Heppenheim, D) und Xylazin (Rompun, Fa. Bayer AG, Leverkusen, D) zum Einsatz (Tabelle 5). Die Kombination wurde unverdünnt mit einer Feindosierungsspritze (Injekt-F Feindosierungsspritze 1 ml B. Braun Melsungen AG) gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert.

<b>Narkose</b>	
<b>Ketavent 10 %</b>	<b>1 µl/g Körpergewicht</b>
<b>Rompun 2 %</b>	<b>0,6 µl/g Körpergewicht</b>

**Tabelle 5:** Dosierung der intraperitonealen Narkose

Nach erfolgreicher Narkose und Respirationskontrolle der Tiere erfolgte die Rasur des Operationsfelds am Rücken und nachfolgend die sorgfältige Desinfektion mit Povidon-Jod (Betaisodona Lösung, MundiPharma, Limburg). Nach entsprechender Bauchlagerung der Tiere auf einer Wärmeplatte erhielten diese zum Schutz der Augen Bepanthen Augensalbe (Bepanthen, Roche). Als Zugang wurde ein dorsaler Medianschnitt gewählt. Nach Darstellung des *M. latissimus dorsi* erfolgte die stumpfe Präparation einer paramedianen subkutanen Hautkammer und nachfolgend die Implantation der unterschiedlich beschichteten BioOss Blöcke. Die Wunde wurde mit 3-0 Vicryl resorbierbarer Naht (Ethicon, Johnson & Johnson Medical) verschlossen. In den ersten drei postoperativen Tagen wurde das Analgetikum Novaminsulfon, 15 Tropfen/100 ml Trinkwasser pro Tag appliziert. Bei Verhaltensauffälligkeiten als Hinweis auf Schmerzen wie z. B. Nahrungsverweigerung erfolgte eine prolongierte Gabe des Analgetikums. Bis zum Tag der Tötung wurden die Versuchstiere in regelmäßigen Abständen gewogen, sorgfältig untersucht und fotografisch dokumentiert.



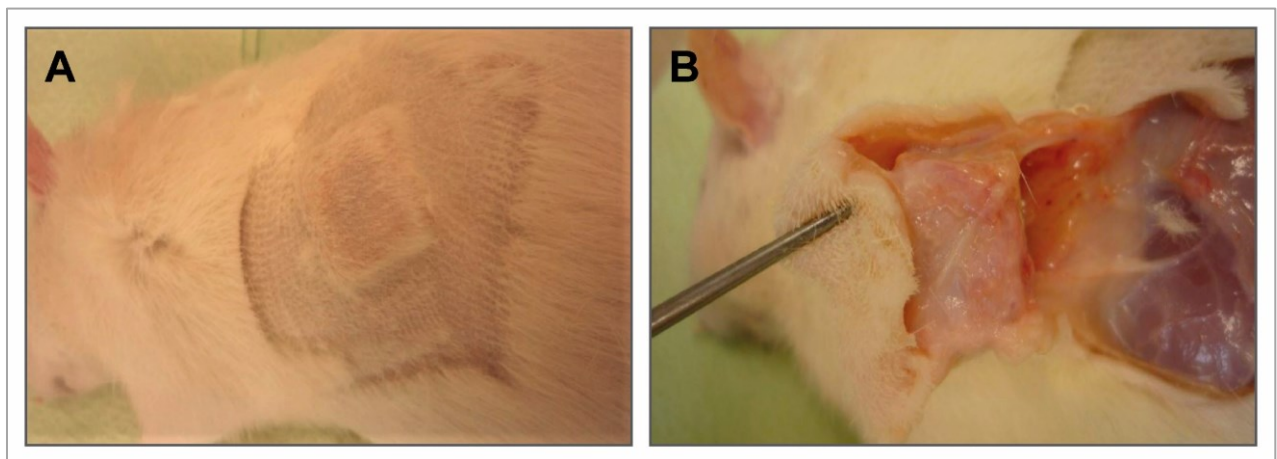
**Abbildung 6:** Operationsablauf der subkutanen Implantation. A) Rasur der Rückenpartie am narkotisierten Tier auf einem Areal von 5 x 3 cm. B) Desinfektion des Operationsgebietes und mediane Schnitfführung an der Haut C) Darstellung des M. latissimus dorsi und stumpfe Präparation einer paramedianen subkutanen Hautkammer D) Implantation der unbeschichteten Kontrollen sowie der rhBMP-2 respektive der rproBMP-2 beschichteten HA-Scaffolds E) Rückverlagerung der Haut F) Wundverschluss mit resorbierbarer Naht (Vicryl 3-0).

### 3.7 Tötung der Tiere

Nach Ablauf des vorgesehenen Versuchszeitraums erfolgte die Tötung der Tiere mittels Kohlendioxids. Die Entnahme der BioOss Blöcke fand unmittelbar nach der Tötung der Tiere statt. Die Präparate wurden makroskopisch untersucht und unmittelbar in Formalin fixiert.

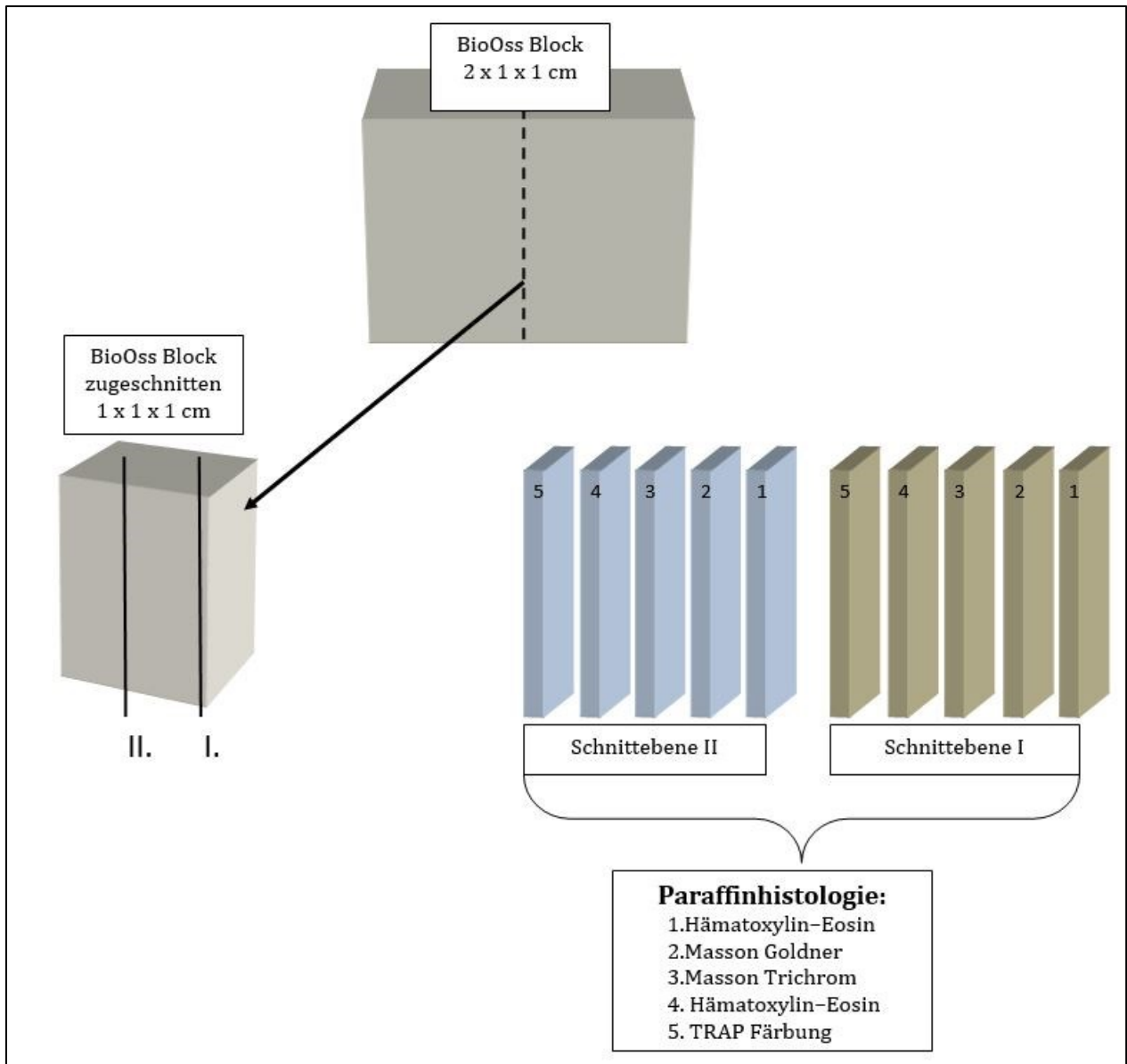
### 3.8 Entnahme der Blöcke und Histologie

Nach siebentägiger Fixation der Proben in 10 %igem Formalin, wurden die Blöcke wiederum halbiert und anschließend wurde das Material für die Paraffinhistologie aufbereitet.



**Abbildung 7:** Entnahme Präparat. A) Rasur der reizfreien Implantationsstelle vor der Entnahme des BioOss Blocks B) Entnahme des Implantats mit umliegendem Gewebe, um eine Beschädigung des Präparates zu vermeiden.

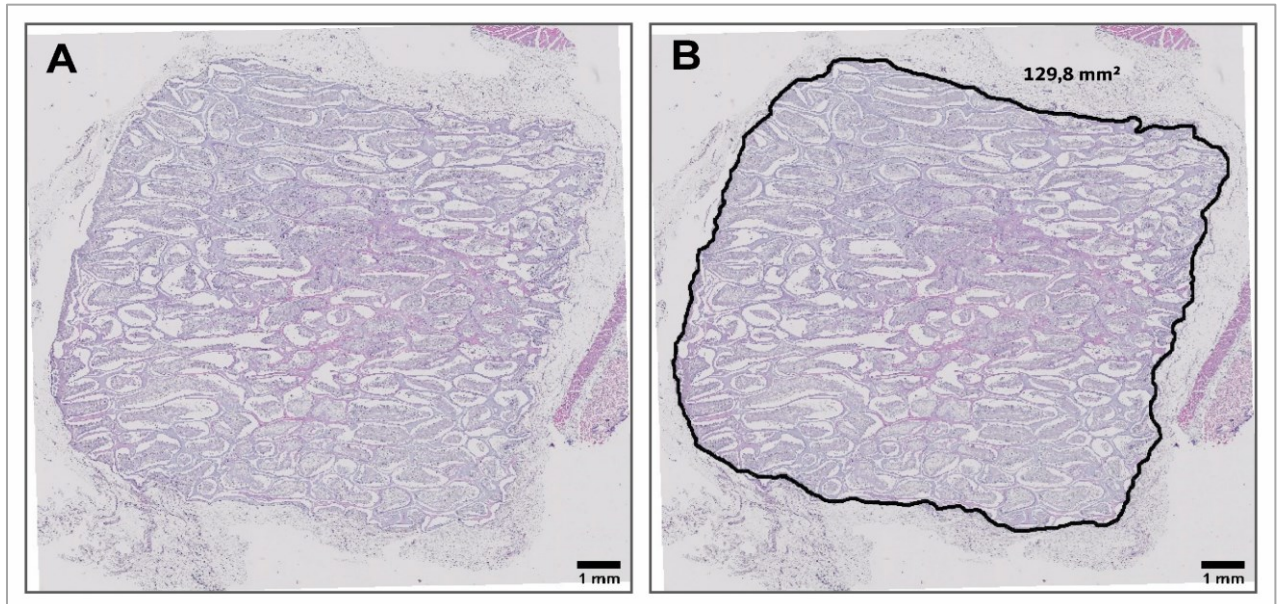
Die Herstellung der histologischen Präparate erfolgte jeweils aus der zur Mitte hin angeschnittenen Seite des BioOss Blocks. Zur repräsentativen Beurteilung der Knochenneubildung innerhalb der Implantate wurden zwei separate Schnittebenen definiert. Schnittebene I der zur Mitte angeschnittenen Seite anliegend. Schnittebene II um 100  $\mu\text{m}$  parallel zur Schnittebene I versetzt. Je Schnittebene erfolgte die Herstellung von jeweils fünf Präparaten mit einer Stärke von jeweils 4  $\mu\text{m}$ . Anschließend wurden die Präparate jeder Schnittebene nacheinander der Hämatoxylin-Eosin- (HE), Masson-Goldner-, Masson-Trichrom-, Hämatoxylin-Eosin- sowie der TRAP- (Tartrate Resistent Acid Phosphatase) Färbung zugeführt (Abbildung 9). Demzufolge standen für jedes Tier 10 feingewebliche Präparate zur Verfügung, was bei der Gesamtanzahl von 54 Tieren 540 repräsentative histologische Präparate ergab.



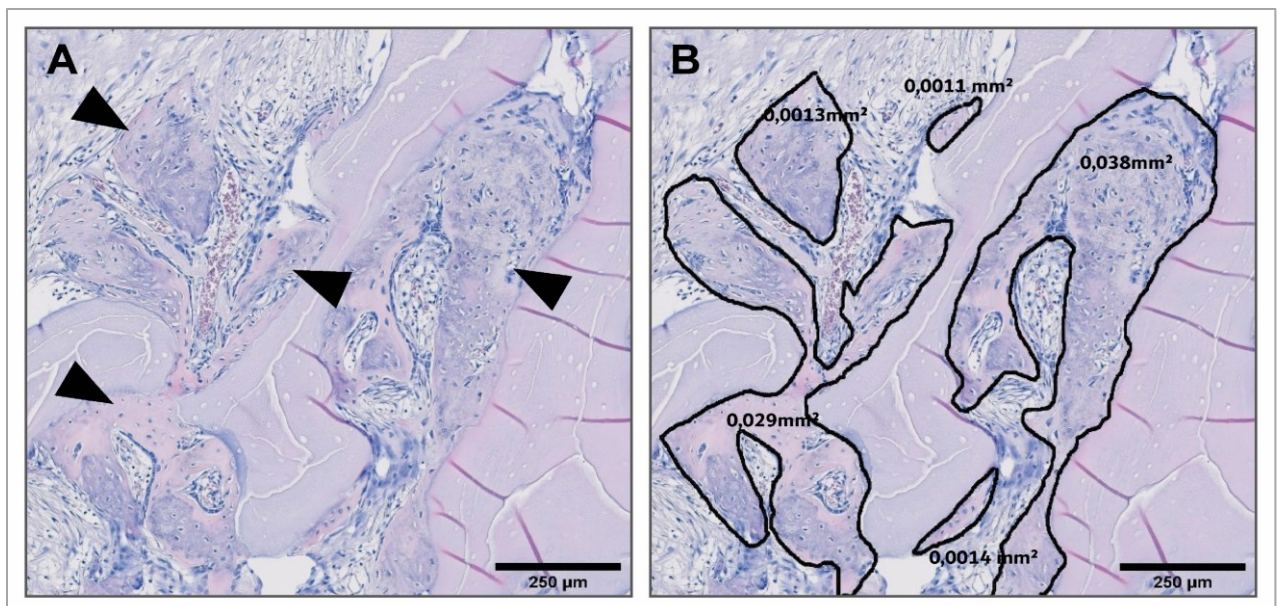
**Abbildung 8:** Halbierung der entnommenen BioOss Implantate und Festlegung der zwei separaten Schnittebenen. Schnittebene I der zur Implantatmitte zugerichteten Seite. Schnittebene II um 100 µm parallel zur Schnittebene I versetzt. Je Schnittebene Herstellung von jeweils fünf histologischen Präparaten der Stärke 4 µm. Färbung der Paraffinpräparate in nachfolgend gleichbleibender Sequenz: 1. Hämatoxylin-Eosin, 2. Masson-Goldner, 3. Masson-Trichrom, 4. Hämatoxylin-Eosin und 5. TRAP.

Die HE-Färbung von histologischen Paraffinpräparaten zur Darstellung von BMP-2-induziertem Knochengewebe gilt als wissenschaftliches Standardverfahren und ist in der Literatur vielfach zitiert (77, 109, 110). Dementsprechend erfolgte die histomorphometrische Analyse der Knochenneubildung primär an den zur Verfügung stehenden 216 HE-gefärbten Präparaten. Die Präparate nach Masson-Goldner- und Masson-Trichrom-Färbung dienen dabei als Referenz zum Abgleich der Knochenneubildung zu den HE-Präparaten (Abbildung 11) (77). Die ergänzende Färbung von TRAP erlaubte die Identifizierung von Osteoklasten als Nachweis knochenspezifischer Zellen sowie eines Knochenremodeling (Abbildung 11). Es erfolgte eine Digitalisierung aller Präparate mittels Slide Scanner (Carl Zeiss MicroImaging Mirax Micro Digital). Zur Auswertung wurde das digitale Invert Mikroskop Axio Imager M2 und die dazugehörigen Software AXIOVISION 4.8.2 verwendet.

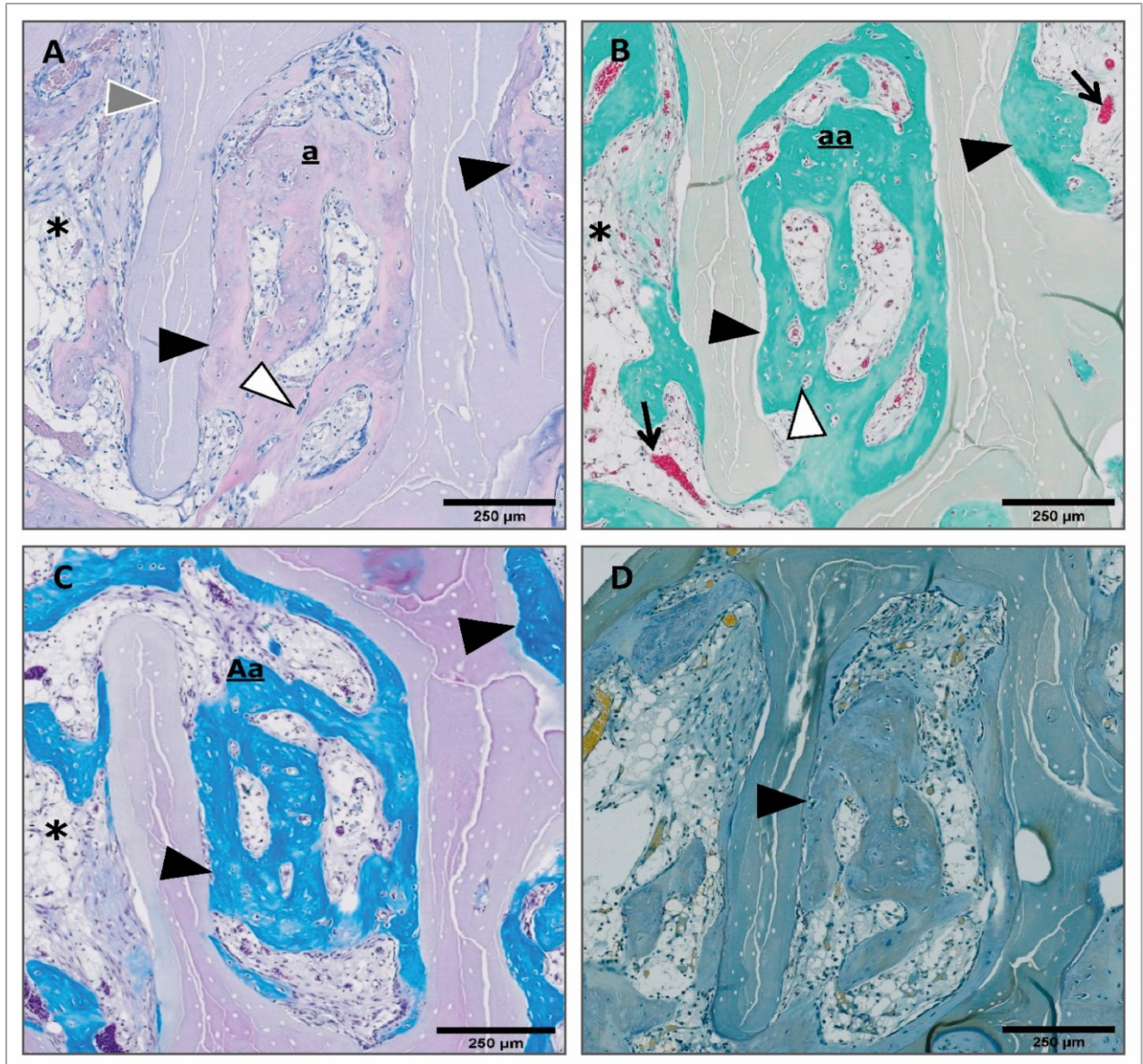
Bei bekanntem Pixelabstand und Auflösung wurde die Kalibrierung der Software vorgenommen, um eine maßstabsgerechte Vermessung der Flächen an frischem Knochengewebe zu gewährleisten. Die Vermessung der zu analysierenden Flächen erfolgte durch manuelles Umfahren mittels Cursors. Die umfahrenen Flächen wurden automatisch berechnet und in  $\text{mm}^2$  gespeichert (Abbildung 9 und 10). Von allen ausgewerteten 216 histologischen HE-Präparaten wurden jeweils die gesamte Blockfläche sowie die Fläche des neu entstandenen Knochens in Quadratmillimeter [ $\text{mm}^2$ ] vermessen und automatisch in einer Excel-Tabelle dokumentiert.



**Abbildung 9:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B, Versuchszeitraum 12 Wochen. A) Übersichtsaufnahme; Fläche des Präparats nach Fixation in Formalin und HE Färbung. B) manuelles Vermessen der Gesamtfläche des Präparats durch Umfahren der äußeren Grenzen des Blocks mit dem Cursor (schwarze Markierung). Infolge der Kalibrierung der Software erfolgt eine automatische Berechnung der Fläche in  $\text{mm}^2$ .



**Abbildung 10:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B, Versuchszeitraum 12 Wochen. A) Ausschnittsvergrößerung neu gebildeter Knochen (schwarze Pfeile) innerhalb des Hydroxylapatitgerüsts B) Erfassung der Fläche an frischem Knochen mittels manueller Vermessung und automatischer Berechnung in  $\text{mm}^2$ .



**Abbildung 11:** Korrespondierende BioOss Präparate der Gruppe B, Versuchszeitraum 3 Wochen. A) Hämatoxylin-Eosin Färbung: charakteristische Darstellung von neu gebildetem Knochengewebe (schwarze Pfeile), typisch intensive violette Färbung des frischen Knochens in der HE-Färbung. Gut zu erkennen die kompakte und geordnete Binnenstruktur des frischen Knochens im Vergleich zum umliegenden ungeordneten Bindegewebe (\*) und BioOss Material (grauer Pfeil). Innerhalb des neuen Knochens gut erkennbar zahlreiche eingemauerte Osteozyten (weißer Pfeil). Demgegenüber zeigt das bovinen Hydroxylapatitgerüst lediglich eine leicht violette Färbung und verfügt über keine zellulären Bestandteile. Bindegewebe (\*) zeigt eine helle Färbung in der HE Technik mit ungeordneten und lockeren Zellsträngen B) Masson-Goldner Färbung: Knochengewebe (schwarze Pfeile) wird intensiv türkis angefärbt. Auch hier die für Knochengewebe charakteristischen umschlossenen Osteozyten (weißer Pfeil). Bindegewebe (\*) demonstriert demgegenüber eine schwache türkis Färbung mit ungeordneter Binnenstruktur sowie zahlreichen Gefäßen (kleine schwarze Pfeile) C). In der Masson-Trichrom Färbung wird Knochengewebe (schwarze Pfeile) intensiv blau angefärbt. Bindegewebe (\*) hingegen zeichnet sich bei dieser Färbetechnik hell bläulich bis violett ab. Zum Abgleich von Knochengewebe in der HE-Färbung dienten diese beiden Färbetechniken als Referenz (77) (korrespondierende Präparate zur Darstellung von Knochengewebe in HE-Färbung a vs. aa Masson-Goldner bzw. Aa Masson-Trichrom Färbung D) TRAP Färbung zur Identifikation von Osteoklasten (schwarze Pfeil) als knochenspezifische Zellen innerhalb des neu gebildeten Knochens und Nachweis eines physiologischen Knochenumbaus (Remodeling).

Aus den sich ergebenden Mehrfachwerten für jedes Tier, entsprechend der vier vorliegenden HE-Präparate pro Tier (2 x HE-Präparate je Schnittebene), erfolgte die Mittelung der Werte auf Tieresebene, wonach die aufgetragenen Werte Mittelwerte der jeweiligen Messungen repräsentierten. Die resultierenden Ergebnisse repräsentierten absolute Werte der Fläche der jeweiligen vermessenen Flächen des neu gebildeten Knochens sowie die Gesamtfläche des Implantats. Die relative Knochenfläche (Verhältnis Knochenneubildung zum Implantat) wurde durch Dividieren der absoluten Knochenfläche durch die gesamte Blockfläche ermittelt und als relative Knochenbildung dargestellt. Die Darstellung der Knochenneubildung erfolgte mittels deskriptiver Statistiken der absoluten [mm<sup>2</sup>] und relativen Knochenfläche [%] in den drei Gruppen und für jeden der drei Beobachtungszeiträume.

### 3.9 Analyse Nebenwirkungsprofil

#### 3.9.1 Gewichtsveränderung

Als orientierender Hinweis bezüglich des Gesundheitszustands der Versuchstiere und damit Informationen über BMP-2 bzw. proBMP-2 assoziierter Nebenwirkungen, erfolgte die Gewichtskontrolle der Versuchstiere am Tag der Operation sowie am Tag der Tötung. Der Gewichtsverlauf aller Tiere wurde in Gramm tabellarisch festgehalten.

#### 3.9.2 Ödeme und Verletzungen

Zur differenzierten Beurteilung des Nebenwirkungsprofils der in diesem Versuch verwendeten Wachstumsfaktoren BMP-2 und proBMP-2 wurden sichtbare gesundheitliche Veränderungen im Bereich der Implantationsstelle graduiert bewertet. Um die Schwere von Nebenwirkungen statistisch verwenden zu können, wurden Ödeme und Verletzungen in aufsteigender Graduierung in vier Gruppen unterteilt (Tabelle 6).

Veränderung	Klassifikation
Keine Ödeme bzw. keine Verletzung	0
Leichte Ödeme oder Verletzungen	+
Mittelstarke Ödeme oder Verletzungen	++
Starke Ödeme oder Verletzungen	+++

**Tabelle 6:** Klassifikation von aufgetretenen Ödemen und Verletzungen

Dabei erfolgte eine Kategorisierung der gesundheitlichen Veränderungen anhand des Umfangs eines Ödems sowie der Größe und Tiefenausdehnung einer Verletzung im Bereich der Implantationsstelle. Jedes Tier wurde auf vorhandene Ödeme und/oder Verletzungen untersucht und bewertet. Die subjektiven Ergebnisse wurden dokumentiert und zur nachfolgenden Auswertung fotodokumentiert. Diese Datenerfassung ermöglicht eine zuverlässige Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuchstiere in Bezug auf Ödeme und Verletzungen.

### **3.10 Statistische Auswertung**

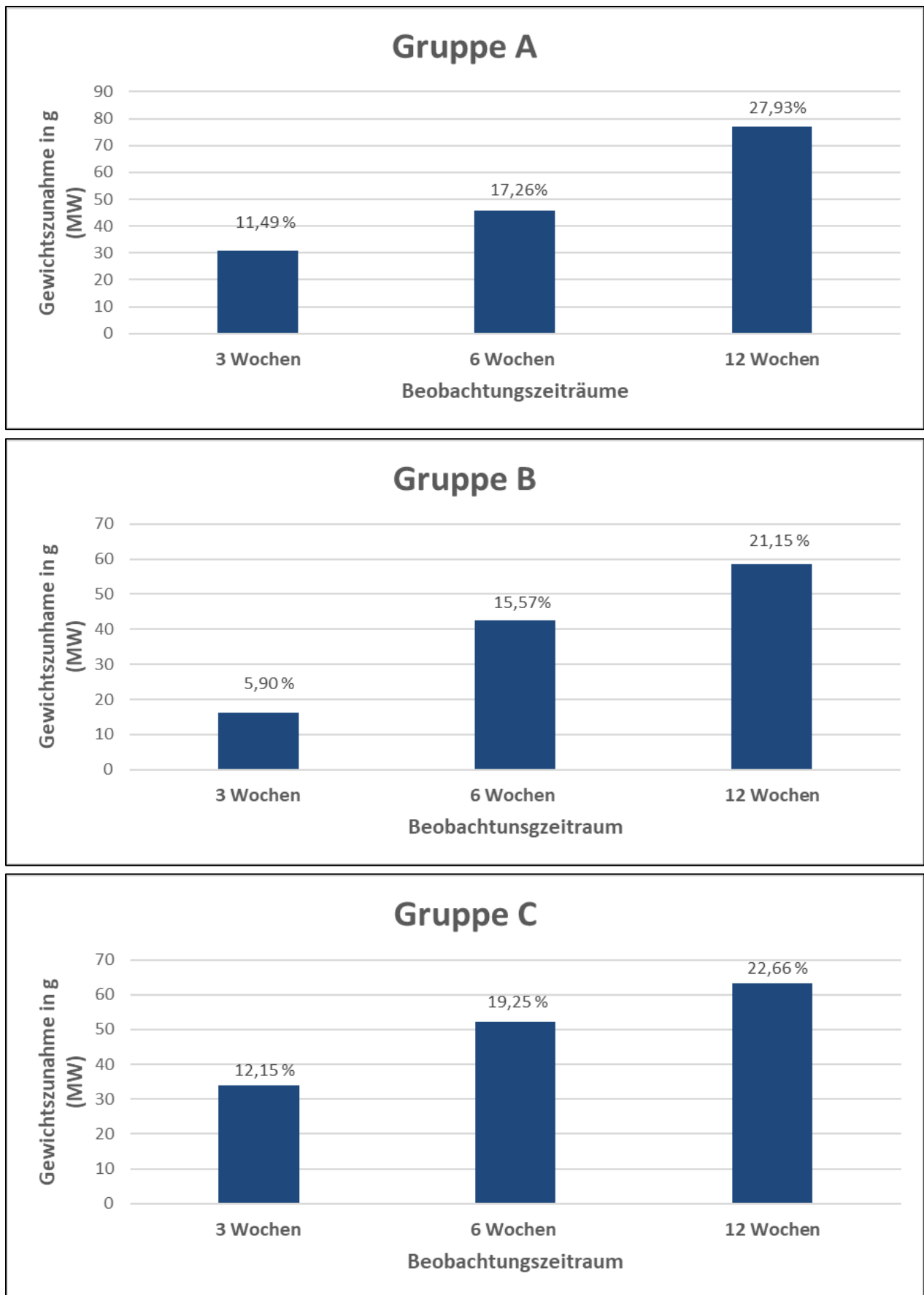
Zum Vergleich der Gruppen bezüglich der absoluten Knochenneubildung, relativer Knochenneubildung und Gewichtsveränderung (getrennt für jeden Beobachtungszeitraum) wurden der Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse) und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (für die paarweisen Vergleiche zwischen den Gruppen) verwendet. Die statistische Auswertung der Nebenwirkungen erfolgte mittels exakten Tests nach Fisher nach Auftreten von Ödemen und Verletzungen (ja/nein), in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit. Eine Testung erfolgte getrennt nach Beobachtungszeitraum sowie alle 54 Tiere zusammen. Die Darstellung der aufgetretenen Nebenwirkungen erfolgte mittels Abbildung von absoluten und relativen Frequenzen der Ödeme und Verletzungen nach Gruppe und Beobachtungszeitraum. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  verwendet. Tabellen und Grafiken wurden mit der Software Microsoft Office Excel 2010 erstellt.

## 4 Ergebnisse

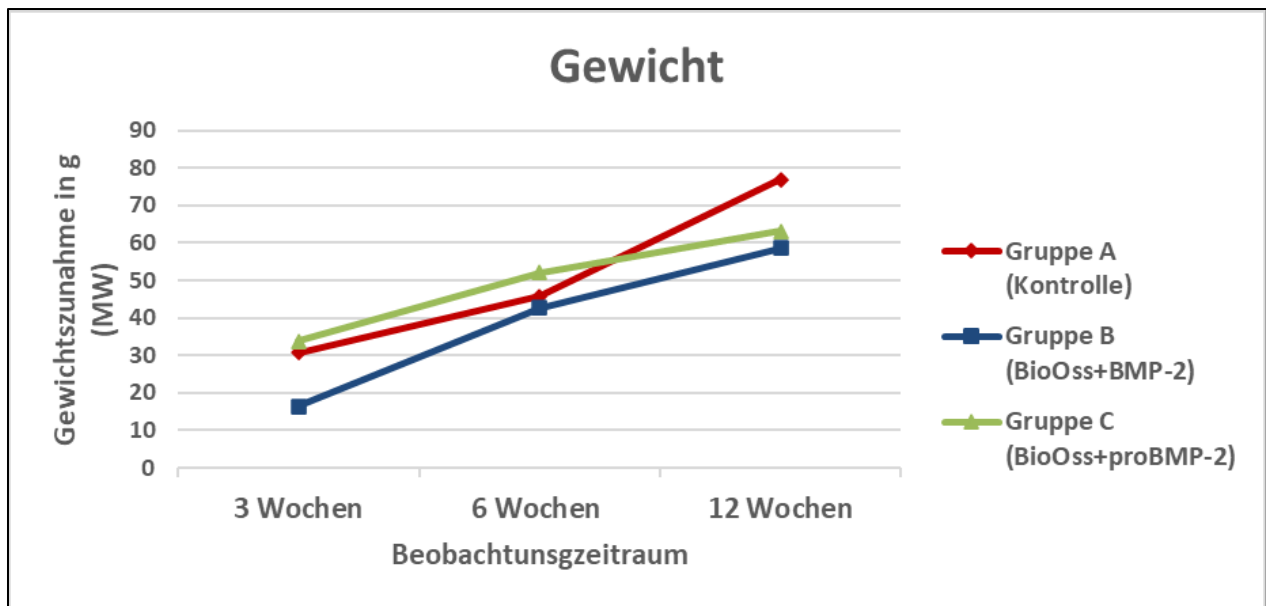
### 4.1 Gewichtsveränderung

Zusammenfassend konnte bei allen 54 Tieren für alle Beobachtungszeitpunkte eine Gewichtszunahme beobachtet werden. Tiere der Gruppe A erreichten innerhalb des Beobachtungszeitraums 3. Woche im Schnitt eine Gewichtszunahme von 11,49 % (MW: 30,66g). Nach 6 Wochen konnte eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 17,26 % (MW: 45,66 g) und nach 12 Wochen im Durchschnitt eine Zunahme des Körpergewichtes von 27,93 % (MW: 77g) beobachtet werden. Versuchstiere der Gruppe B zeigten nach der 3. Woche durchschnittlich eine Gewichtszunahme von 5,90 % (MW: 16,33g). Innerhalb der 6. Woche zeigte sich ein Anstieg des Körpergewichtes von durchschnittlich 15,57 % (MW: 42,66g) und in der 12. Woche eine Zunahme des Körpergewichtes von durchschnittlich 21,15 % (MW: 58,66g). Bei den Versuchstieren der Gruppe C wurde nach der 3. Woche im Mittel eine Gewichtszunahme von 12,15 % (MW: 33,83g), nach der 6. Woche im Mittel von 19,25 % (MW: 52,16g) und nach 12 Wochen eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 22,66 % (MW: 63,16g) ermittelt. Diagramm 1 mit Darstellung der durchschnittlichen Gewichtszunahme innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Diagramm 2 illustriert den zeitlichen Verlauf der Gewichtsveränderung während des gesamten Versuchsablaufs.

Die statistische Testung der Gewichtszunahme zwischen den Gruppen ergab beim Beobachtungszeitraum von 3 Wochen signifikante Unterschiede ( $p = 0,032$ ). Die paarweisen Vergleiche zwischen den Gruppen demonstrierte, dass die Gewichtszunahme in der Gruppe B zum Beobachtungszeitpunkt 3. Woche signifikant geringer war als die der Gruppe A und auch der Gruppe C (in beiden Fällen  $p = 0,025$ ), während keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen A und C zu diesem Zeitpunkt bestanden ( $p = 0,936$ ). Zu den späteren Beobachtungszeitpunkten waren die Unterschiede zwischen den Gruppen A, B und C in der Gewichtszunahme nicht mehr signifikant ( $p = 0,242$  nach 6 Wochen und  $p = 0,163$  nach 12 Wochen).



**Diagramm 1:** Durchschnittliche Gewichtszunahme in g und % der Versuchstiere innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Beobachtungszeiträumen. Bei allen Versuchstieren konnte eine Gewichtszunahme nachgewiesen werden.



**Diagramm 2:** Entwicklung der durchschnittlichen Gewichtszunahme (absolut) der Versuchstiere über den gesamten Versuchsablauf von 12 Wochen. Zum Beobachtungszeitpunkt 3. Woche zeigten Tiere der Gruppe B (blaue Linie) eine signifikant ( $p=0,025$ ) geringe Gewichtszunahme im Vergleich zu den Tieren der Gruppen A (rote Linie) und C (grüne Linie). Zu den späteren Beobachtungszeitpunkten 6 und 12 Wochen waren die Unterschiede zwischen den drei Gruppen nicht signifikant.

#### 4.2 Ödeme und Verletzungen

Akut medizinische Maßnahmen waren zu keinem Zeitpunkt des Versuchs notwendig. Es konnte für jedes Tier der vorgesehene Versuchszeitraum eingehalten werden. Zusammenfassend traten bei 6 (11,1 %) der 54 Versuchstieren Ödeme leichten Grades (+) an der Implantationsstelle auf. Demgegenüber konnten bei keinem der insgesamt 54 Versuchstieren Verletzungen an der Implantationsstelle beobachtet werden. In Tabelle 7 dargestellt die absoluten Frequenzen von Ödemen an der Implantationsstelle nach Gruppen und Beobachtungszeiträumen. Am häufigsten waren Ödeme in der Gruppe B (BioOss+BMP-2) mit 3 betroffenen Tieren (16,7 % der insgesamt 18 Tiere dieser Gruppe) zu verzeichnen, alle innerhalb des Beobachtungsintervalls der 3. Woche (50 % dieser 6 Tiere). Es folgte die Gruppe A mit 2 betroffenen Tieren (11,1 % der 18 insgesamt Tiere dieser Gruppe), alle bei einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen (33,3 % dieser 6 Tiere). Die Gruppe C (BioOss+proBMP-2) wies 1 betroffenes Tier (5,6 % der 18 Tiere dieser Gruppe) innerhalb des Beobachtungsintervalls der 6. Woche (16,7 % dieser 6 Tiere) auf. Der Zeitpunkt des Auftretens eines Ödems variierte vom 2. Tag bis zum 78. Tag post implantationem und ist nach der Gruppenzugehörigkeit in Tabelle 7 dargestellt.

Beobachtungsintervall	Anzahl der Tiere mit Ödemen an der Implantationsstelle			
	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	<u>Total</u>
3. Woche	0	3	0	<u>3</u>
6. Woche	0	0	1	<u>1</u>
12. Woche	2*	0	0	<u>0</u>
<u>Total</u>	<u>0</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>4</u>

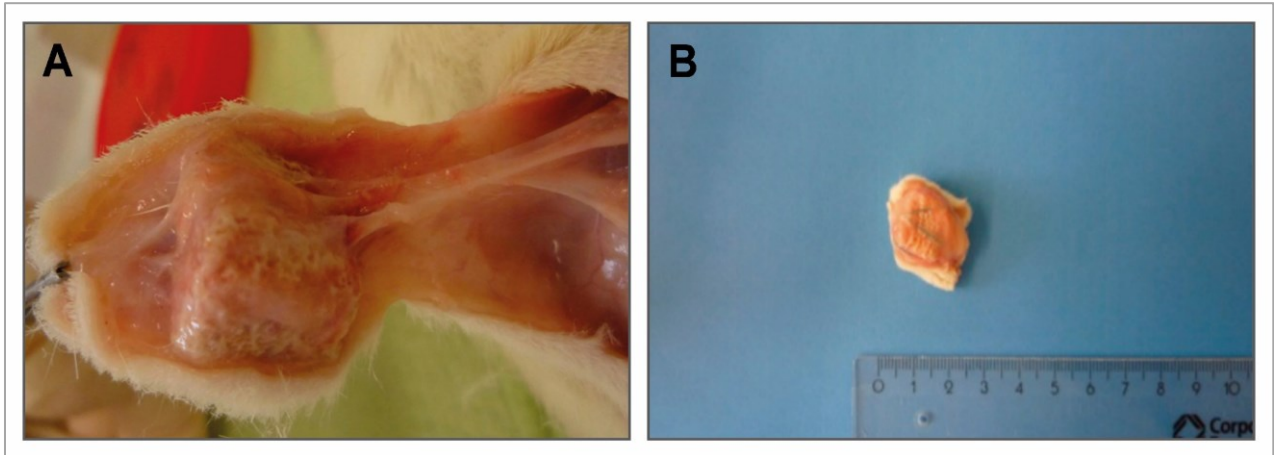
**Tabelle 7:** Absolute Frequenz der Ödeme an der Implantationsstelle innerhalb der Versuchsgruppen A, B und C und anhand der jeweiligen Beobachtungsintervalle 3, 6 und 12 Wochen. Die mit \* gekennzeichneten Ödeme der Gruppe A traten am 78. Tag post implantationem auf und beruhten auf eine bakterielle Abszedierung an der Implantationsstelle. Innerhalb der Gruppe B konnten am 2. Tag post implantationem 3 Tiere mit Ödem an der Implantationsstelle festgestellt werden. Tiere der Gruppe B zeigten insgesamt die höchste Frequenz an Ödemen im Gruppenvergleich sowie für alle Beobachtungsintervalle. Demgegenüber konnte in der Gruppe C lediglich 1 Tier mit Ödem an der Implantationsstelle am 40. Tag post implantationem dokumentiert werden.

Innerhalb der Gruppe A (Kontrolle) zeigten zwei Tiere im Beobachtungsintervall 12. Woche eine bakteriell bedingte Abszedierung an der Implantationsstelle. Die daraus resultierenden Begleitödeme erfüllten nicht die in diesem Versuchsaufbau definierten Voraussetzungen zur Erhebung der primär materialspezifischen Nebenwirkung. Es erfolgte nachfolgend die statistische Testung zur Ödembildung anhand von zensierten (Gruppe A => n=16 exklusive „Abszesstiere“) und unzensierten Daten (Gruppe A n=18 => inklusive „Abszesstiere“) um mögliche Unterschiede in der statistischen Aussagekraft der alternierenden Daten zu demonstrieren. Die Testung mittels exaktem Test nach Fisher der unzensierten Ergebnisse (Gruppe A => n=18) konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Auftreten der Ödeme und der Gruppenzugehörigkeit, weder für alle 54 Tiere zusammen ( $p = 0,861$ ), noch für die Beobachtungszeiträume getrennt nachgewiesen werden. Für den Beobachtungszeitraum 3 Wochen waren ausschließlich Tiere der Gruppe B betroffen (3 Tiere = 16,7 % der 18 Tiere =>  $p = 0,074$ ). Der Beobachtungszeitraum 6 Wochen wies lediglich in Gruppe C ein Tier mit Ödem auf (5,6 % der 18 Tiere =>  $p=1,000$ ). Innerhalb des Beobachtungszeitraums 12 Wochen zeigten 2 Tiere aus der Gruppe A ein Ödem\* (\* = Abszess) (11,1 % der 18 Tiere =>  $p = 0,294$ ).

Die Testung der zensierten Ergebnisse (Gruppe A => n=16 exklusive „Abszesstiere“) ergaben keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Auftreten der Ödeme und der Gruppenzugehörigkeit, weder für alle 52 Tiere zusammen ( $p=0,309$ ), noch für die Beobachtungszeiträume getrennt. Bei den zensierten Tieren handelte es sich ausschließlich um Individuen des Beobachtungszeitraums 12. Wochen, sodass keine Änderung innerhalb der Beobachtungszeiträume von 3. und 6. Wochen gegenüber den obengenannten Ergebnissen eintrat. Nach erwähnter Zensur traten im Beobachtungszeitraum 12. Woche keine Ödeme auf.

### 4.3 Klinische Beurteilung der BioOss Blöcke

Zusammenfassend zeigten die entnommenen BioOss Blöcke makroskopisch keine auffälligen Veränderungen. Überwiegend wurden die Implantate von einer bindegewebigen Kapsel umhüllt, die fest mit der Haut verbunden war.



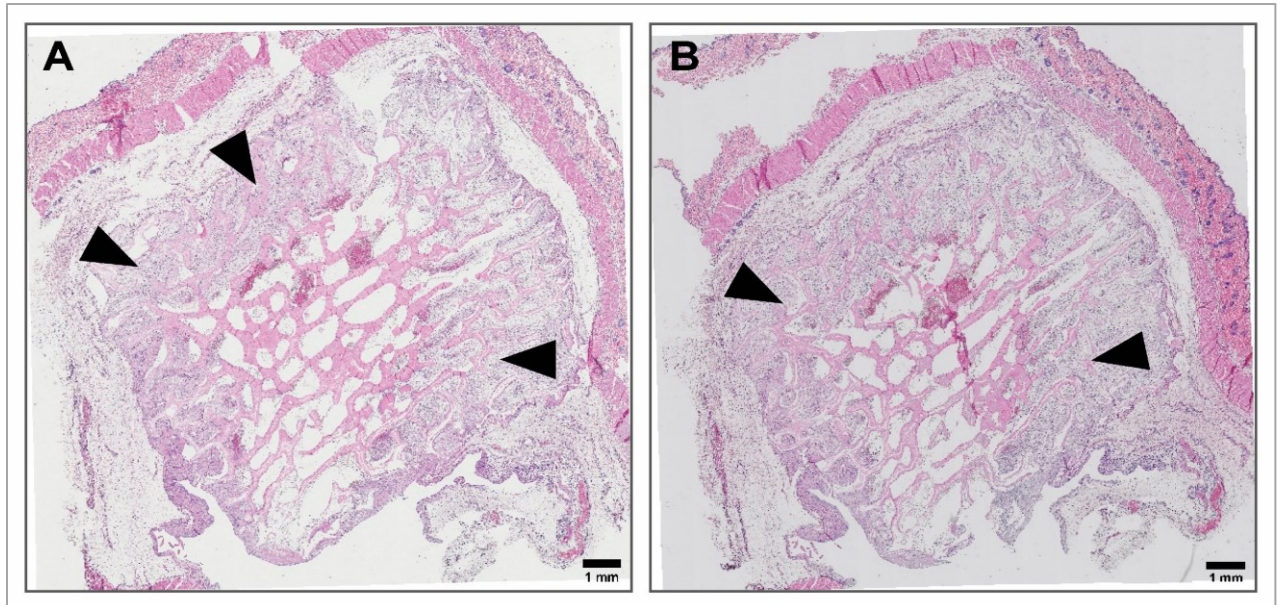
**Abbildung 12:** Transplantatentnahme A) Explantation eines BioOss Blocks aus der dorsalen Hautkammer. Gut zu erkennen ist die bindegewebige Kapsel und die fixierte Haut. B) Ansicht des entnommenen Implantats.

### 4.4 Histologisches Ergebnis

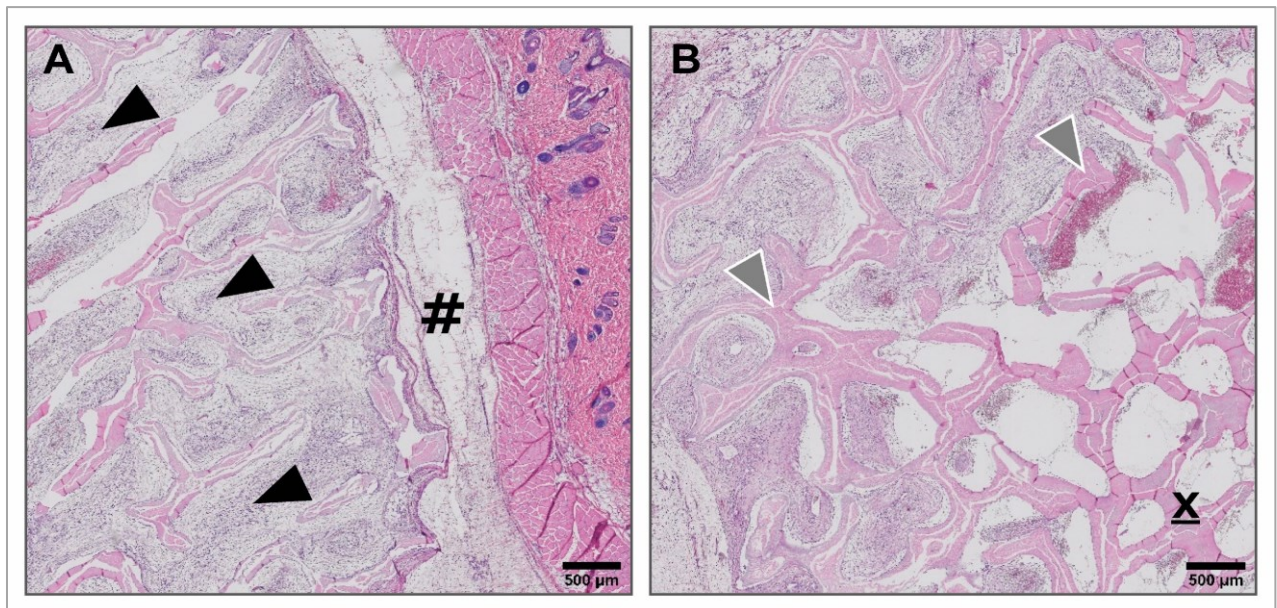
Die histologische Untersuchung der Knochenneubildung innerhalb der BioOss-Scaffolds, wurde mikroskopisch anhand der insgesamt 216 repräsentativen histologischen Hämatoxylin-Eosin Präparaten systematisch untersucht.

#### 4.4.1 Hämatoxylin-Eosin

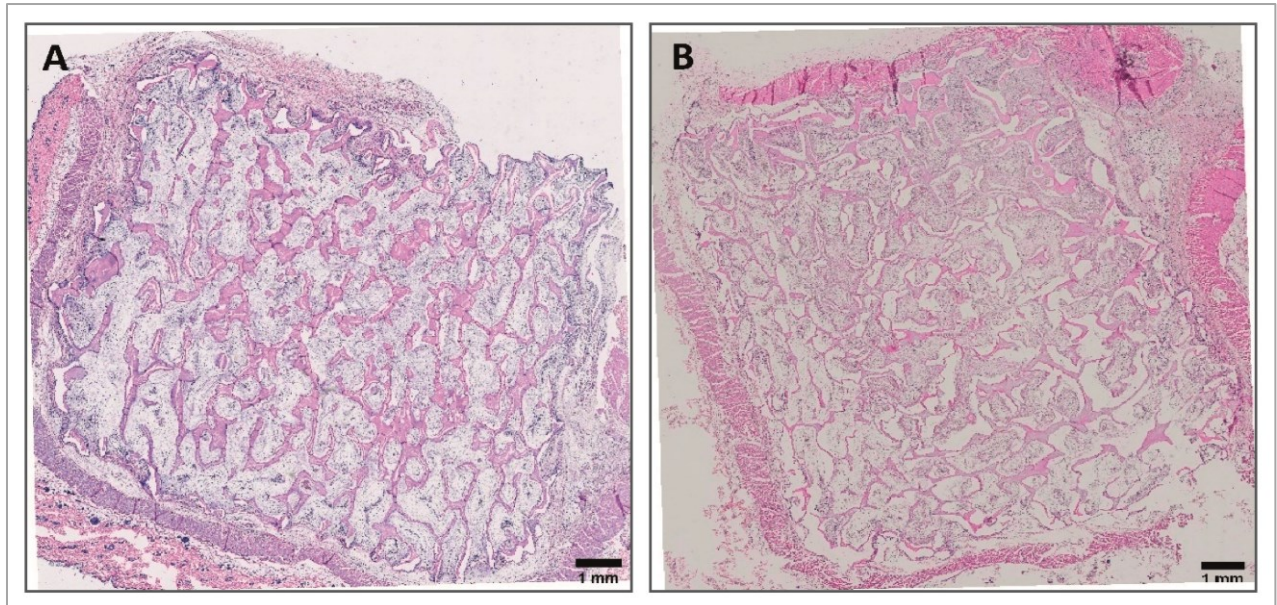
In Präparaten der Gruppe A (Kontrolle) konnte zu keinem Beobachtungszeitpunkt neu gebildeter Knochen nachgewiesen werden. Die Präparate der Gruppe A zeigten eine faserreiche Bindegewebskapsel (Abbildung 14), welche die Implantate vollständig umgab. Die trabekuläre Struktur des bovinen Knochenersatzmaterials war weitgehend gut erhalten (Abbildung 14). Die Räume zwischen den Trabekeln wurden von faserreichem Bindegewebe und teilweise Fettgewebe ausgefüllt. Deutlich war dabei eine zentripetal gerichtete Infiltration von Bindegewebe innerhalb der Präparate zu erkennen (Abbildung 13, 14). Präparate der 6. und 12. Woche wurden nahezu vollständig von Bindegewebe ausgefüllt (Abbildung 15).



**Abbildung 13:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle), Versuchszeitraum 3 Wochen. A) und B) korrespondierende Paraffinschnitte der Schnittebene I und II, in der Übersicht ist die zentripetal gerichtete Infiltration durch Bindegewebe (schwarze Pfeile) gut zu erkennen.



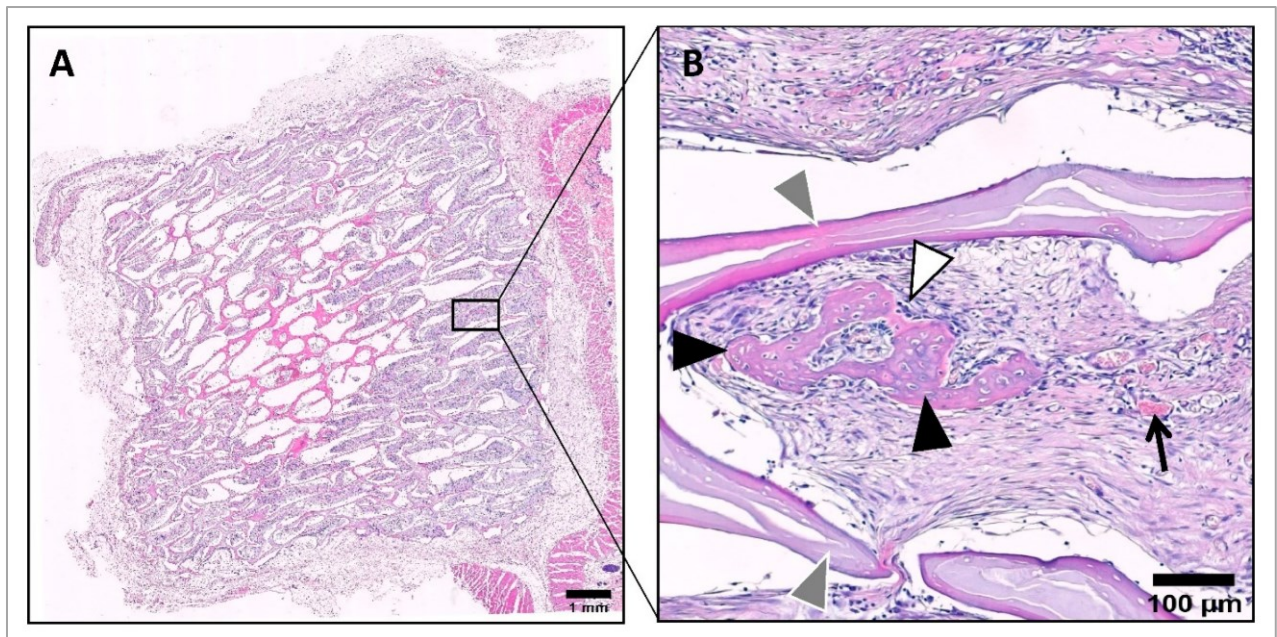
**Abbildung 14:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle), Versuchszeitraum 3 Wochen. A) Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 13 A mit faserreicher Kapsel (#) die das BioOss Implantat umgibt, Bindegewebe (schwarze Pfeile) füllen die Hohlräume des Hydroxylapatitgerüsts zunehmend aus B) graue Pfeile deuten auf das erhaltenen Leitschienenwerk des bovinen Knochenersatzmaterials hin; Implantatmitte (X).



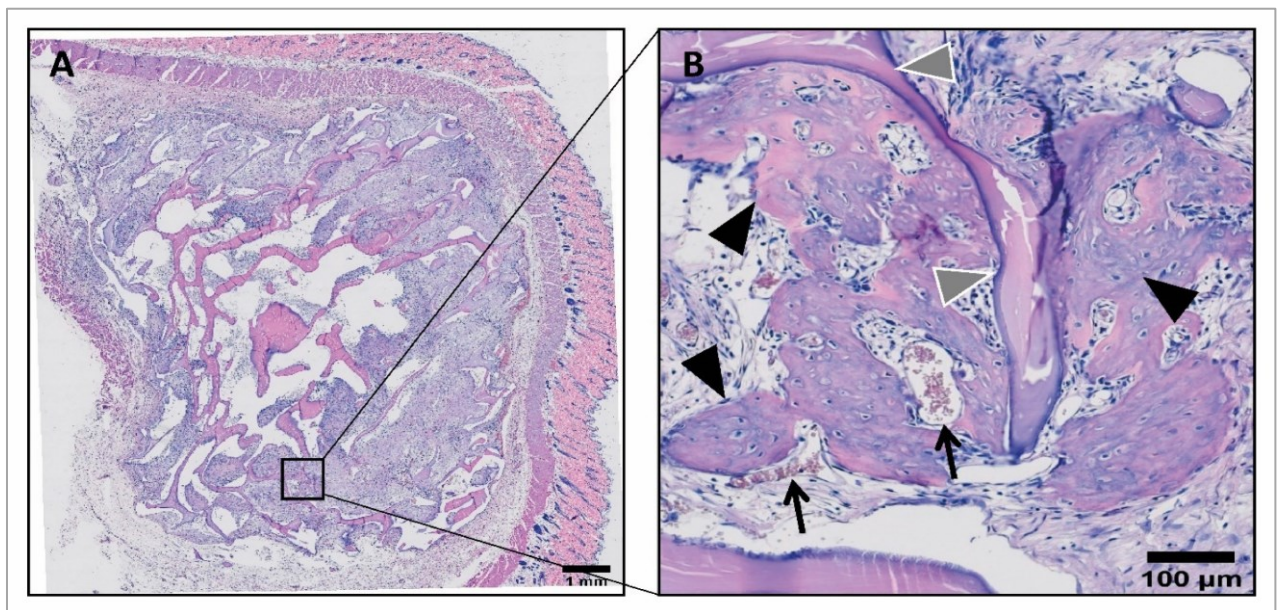
**Abbildung 15:** BioOss Block, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle) Versuchszeitraum 6 und 12 Wochen. A) Übersicht BioOss Block Versuchszeitraum 6 Wochen und B) Versuchszeitraum 12 Wochen, das Hydroxylapatitgerüst der Implantate wird vollständig von Bindegewebe ausgefüllt.

Implantate der Gruppe B (BioOss+BMP-2) zeigten ebenfalls eine bindegewebige Kapsel. Innerhalb aller histologischen Präparate der Gruppe B konnte bei allen drei Beobachtungsintervallen neu gebildeter Knochen nachgewiesen werden. Der frische Knochen demonstrierte eine gewebetypische Ansammlung von Osteoblasten (Abbildung 16, 18, 19) sowie von ummauerten Osteozyten (Abbildung 18). Die Trabekel des Hydroxylapatitgerüsts waren breitbasig mit frischem Knochen überwachsen (Abbildung 17, 18, 21).

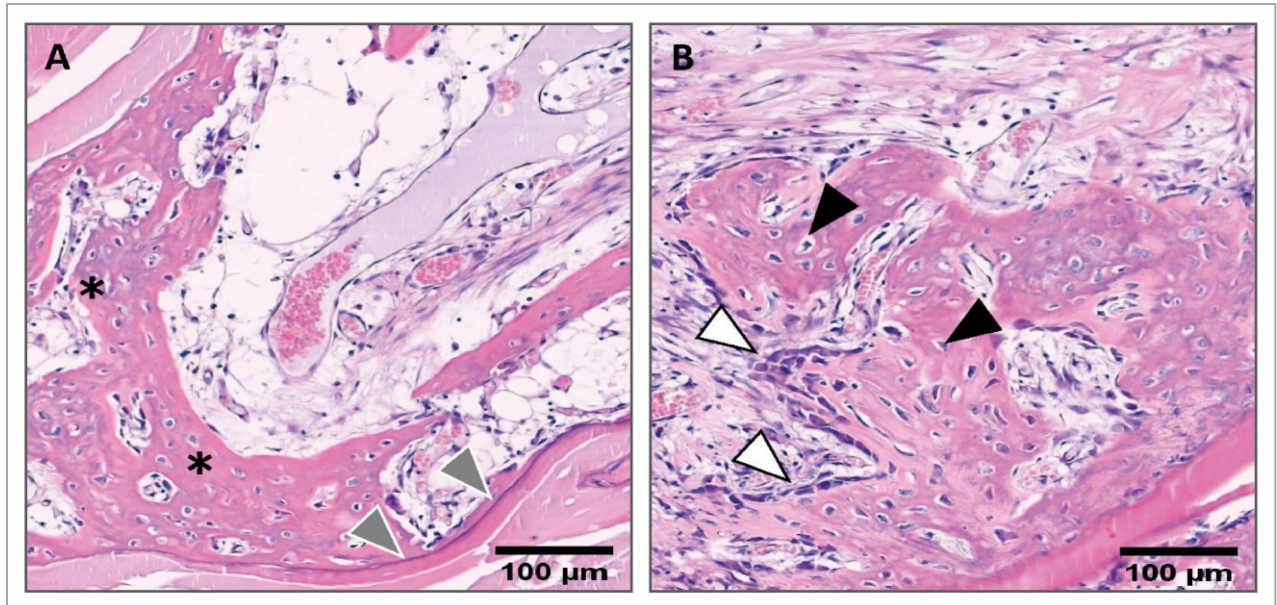
Als Zeichen einer aktiven Knochenbildung konnten Osteoidablagerungen am Übergang zum Hydroxylapatitgerüst beobachtet werden (Abbildung 18). Des Weiteren konnten Zeichen des aktiven Knochenumbaus durch Osteoklasten (Abbildung 19) und knochenspezifische Funktionselemente wie Osteone (Abbildung 20) und nachgewiesen werden.



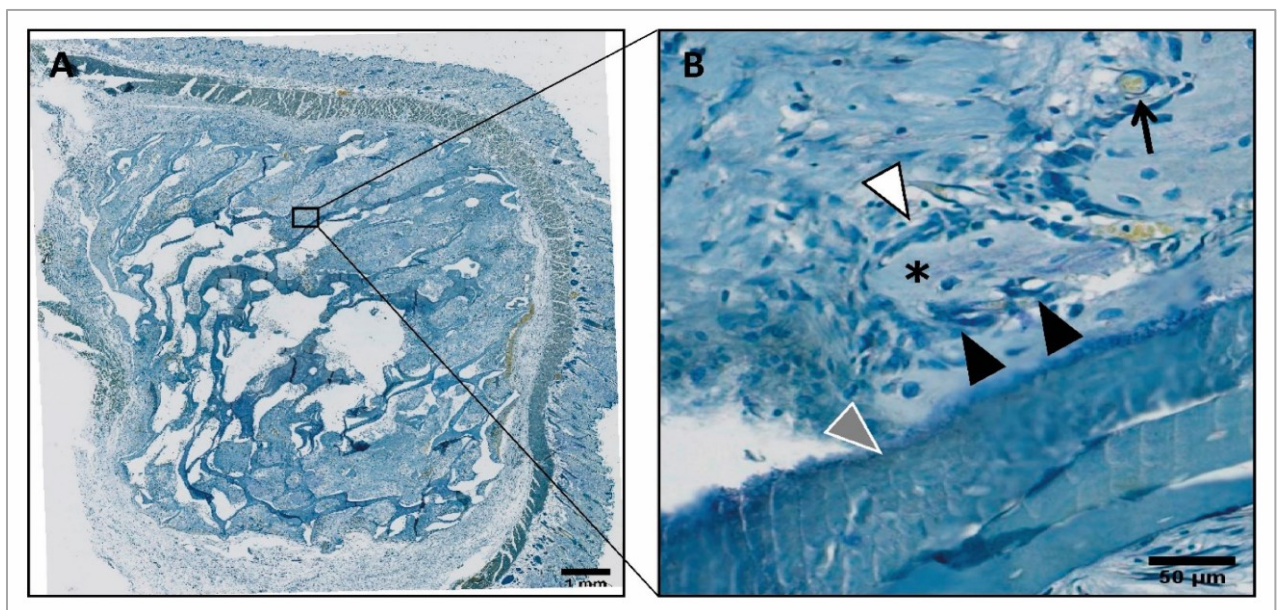
**Abbildung 16:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 3 Wochen. A) Übersichtsaufnahme B) Ausschnittsvergrößerung zeigt Osteoblastensaum (weißer Pfeil) um Knochenneubildung (schwarze Pfeile) innerhalb der trabekulären Leitstruktur (graue Pfeile) und beginnenden Gefäßneubildung (kleiner schwarzer Pfeil)



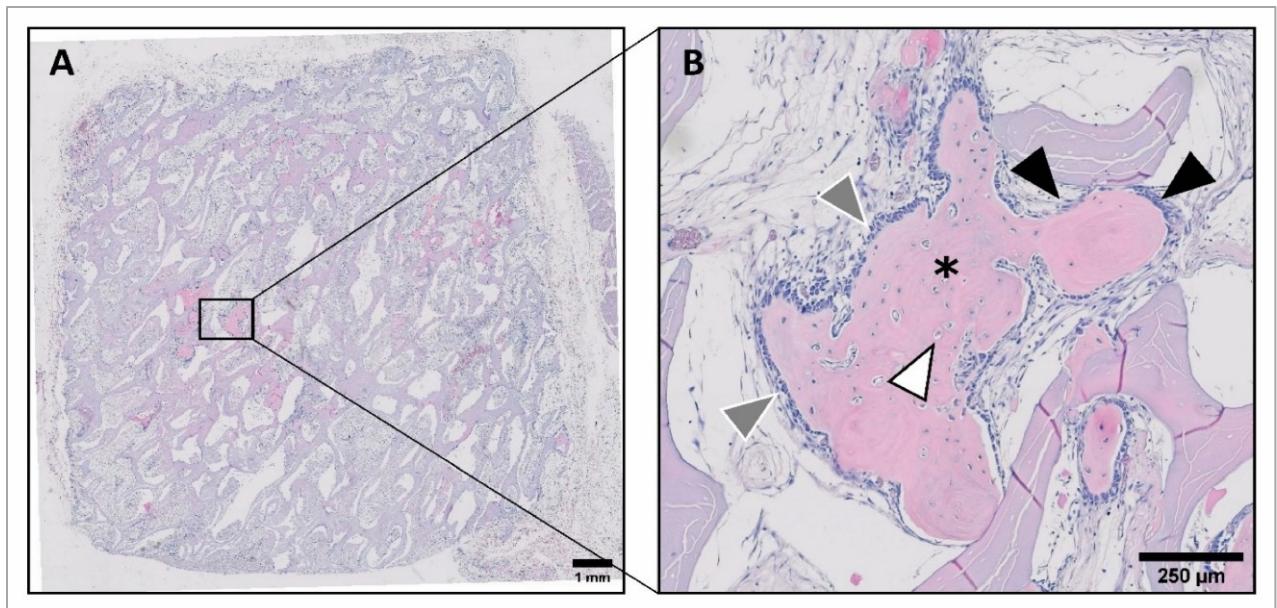
**Abbildung 17:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) Übersichtsaufnahme, zentripetal gerichtete Knochenbildung B) Ausschnittsvergrößerung und Darstellung des frischen Knochens (schwarze Pfeile) innerhalb des Porensystems, gut erkennbar die breitbasige Anlagerung des neuen Knochens entlang des Hydroxylapatitgerüsts (graue Pfeile), im umliegenden Bindegewebe zeigen sich zahlreiche angeschnittene Blutgefäße (kleine schwarze Pfeile)



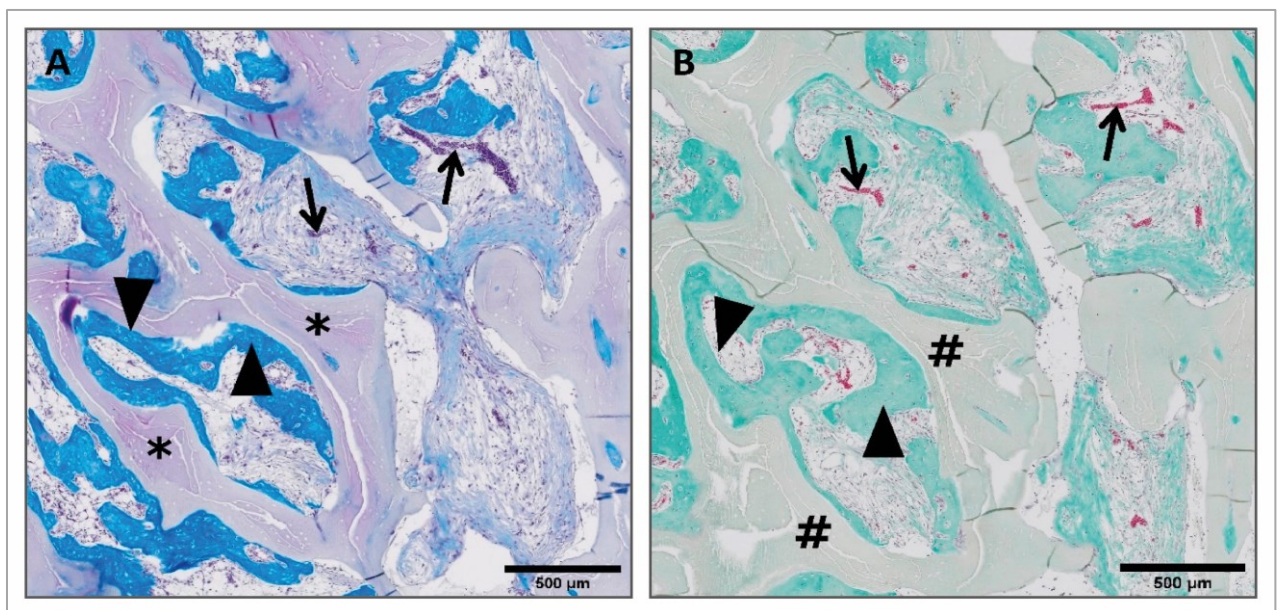
**Abbildung 18:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) Osteoidsaum (graue Pfeile) am Übergang von BioOss und neu gebildeten Knochengewebe (\*) belegen die osteogene Aktivität der Osteoblasten B) Osteozyten (schwarze Pfeile) welche charakteristisch von Knochengewebe umschlossen werden, dem frischen Knochen aufliegend ein Saum aus Osteoblasten (weiße Pfeile)



**Abbildung 19:** TRAP Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) korrespondierende Übersichtsaufnahme zu Abb. 17 nach TRAP Färbung B) Ausschnittsvergrößerung und Darstellung von Osteoklasten (schwarze Pfeile) auf dem neu gebildeten Knochen (\*), entlang der gegenüberliegenden Seite zahlreiche Osteoblasten (weißer Pfeil) sowie Blutgefäße (kleiner schwarzer Pfeil), grauer Pfeil markiert das bovine Hydroxylapatitgerüst, welches als osteokonduktive Leitschiene fungiert.

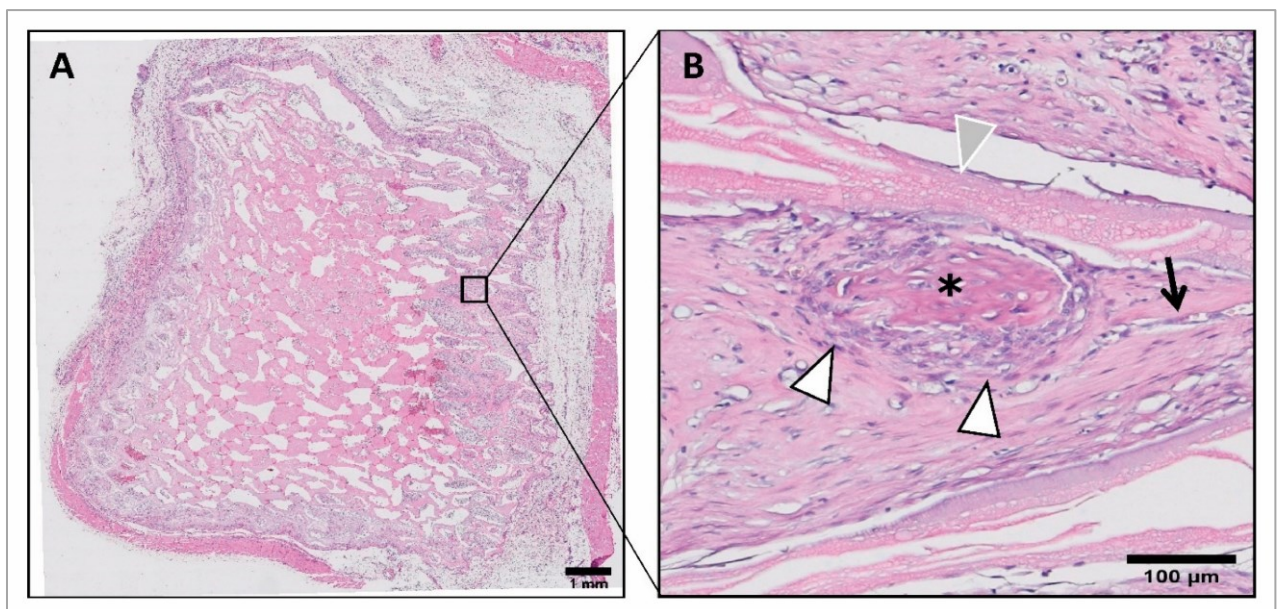


**Abbildung 20:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen. A) Übersichtsaufnahme des entnommenen Implantats B) Bildung von frischem Knochen (\*) innerhalb des Hydroxylapatitgerüsts sowie Ausbildung eines charakteristischen Osteon (schwarze Pfeile), dem frischen Knochen aufgelagerte zahlreiche Osteoblasten (graue Pfeile), weißer Pfeil markiert Osteozyten innerhalb des frischen Knochens.

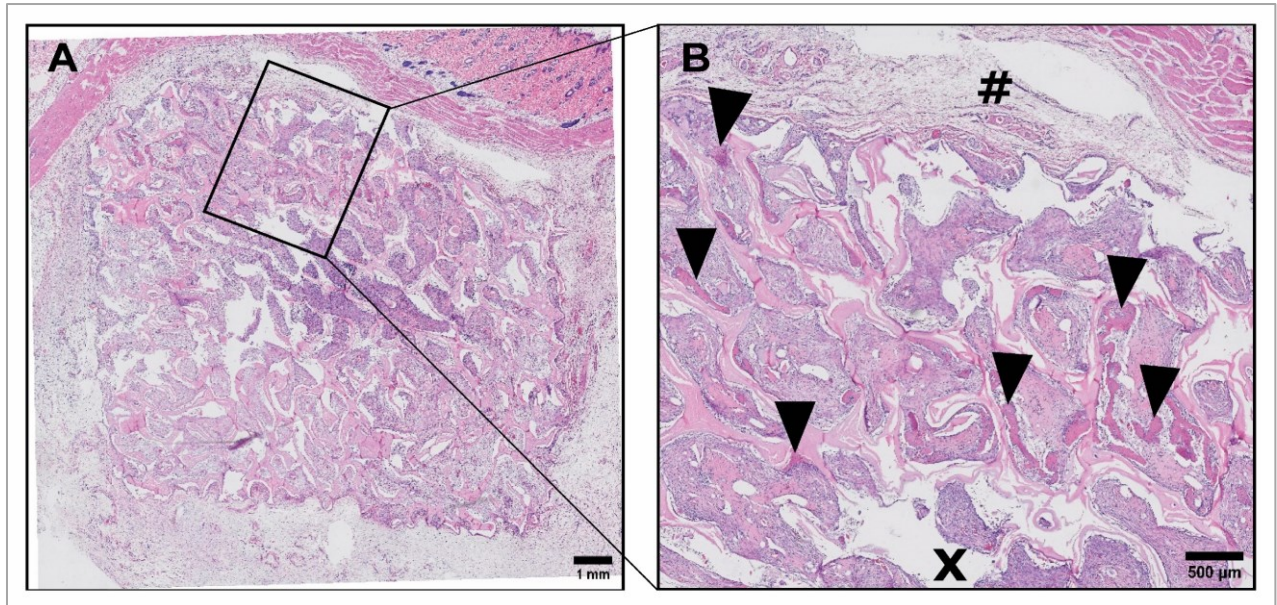


**Abbildung 21:** Knochenbildung BMP-2. A) BioOss, Masson-Trichrom Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen. A) Knochenneubildung (schwarze Pfeile) entlang des Hydroxylapatitgerüsts (\*), innerhalb des umliegenden Bindegewebes zeigen sich zahlreiche Gefäße (kleine schwarze Pfeile) B) korrespondierender Ausschnitt zu A nach Masson-Goldner Färbung, ▲: neuer Knochen, #: BioOss, ↑: perfundierende Gefäße

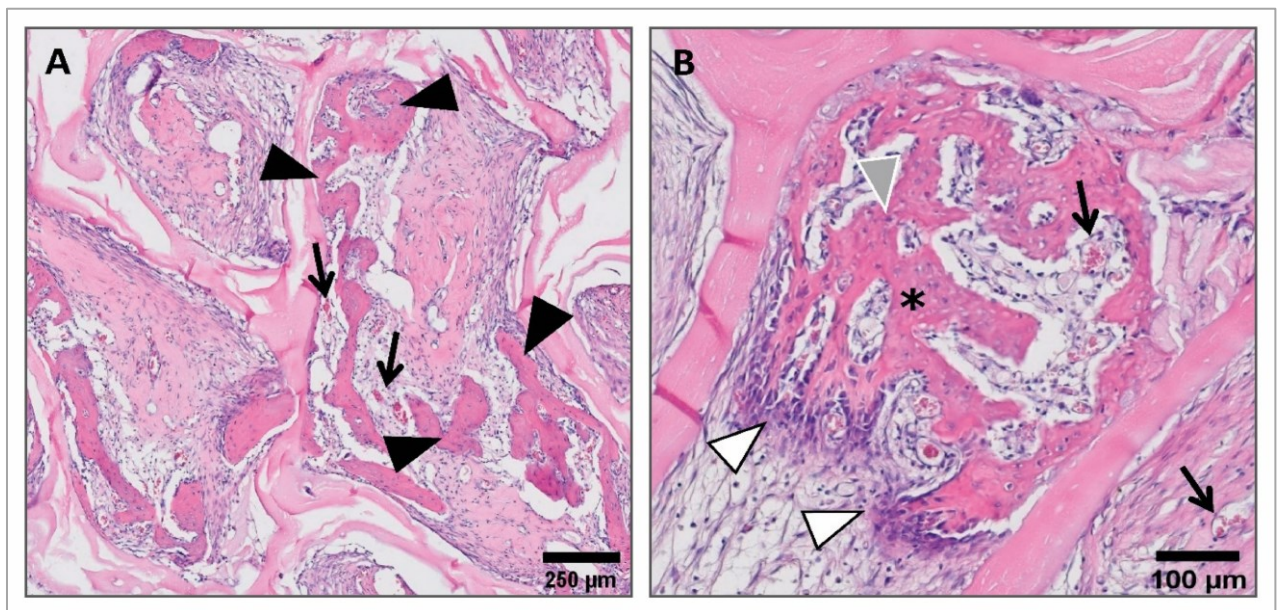
In allen Präparaten der Gruppe C (BioOss+proBMP-2) konnte innerhalb aller Beobachtungsintervalle frischer Knochen nachgewiesen werden. Entsprechend der Gruppe B nahm die Knochenneubildung in Richtung Implantatmitte zunehmend ab (Abbildung 23). Die Knochenneubildung zeigte vergleichsweise ein landkartenartiges Wachstumsmuster innerhalb des trabekulären Gerüsts (Abbildung 24). Als Nachweis der proBMP-2 induzierten osteogenen Differenzierung konnten zahlreiche Osteoblasten und Osteozyten in sämtlichen Präparaten der Gruppe C beobachtet werden (Abbildungen 22, 24, 25). Am Übergang zum porösen Leitgerüst ließen sich zudem Osteoidablagerungen als Nachweis einer aktiven Knochenneubildung beobachten (Abbildung 25). Zahlreiche Osteoklasten dokumentierten einen aktiven Knochenumbau des durch proBMP-2 induzierten Knochen (Abbildung 25, 26). Im frischen Knochen konnten zahlreiche perfundierende Gefäße innerhalb des interstitiellen Raums nachgewiesen werden (Abbildung 22, 24, 27). Es zeigten sich knochenspezifische funktionelle Einheiten unter Ausbildung von Zentralkanälen mit konzentrischen Knochenlamellen (Abbildung 26) sowie eine insgesamt gleichmäßige und harmonische Anlagerung von frischem Knochen entlang des bovinen KEM (Abbildung 27).



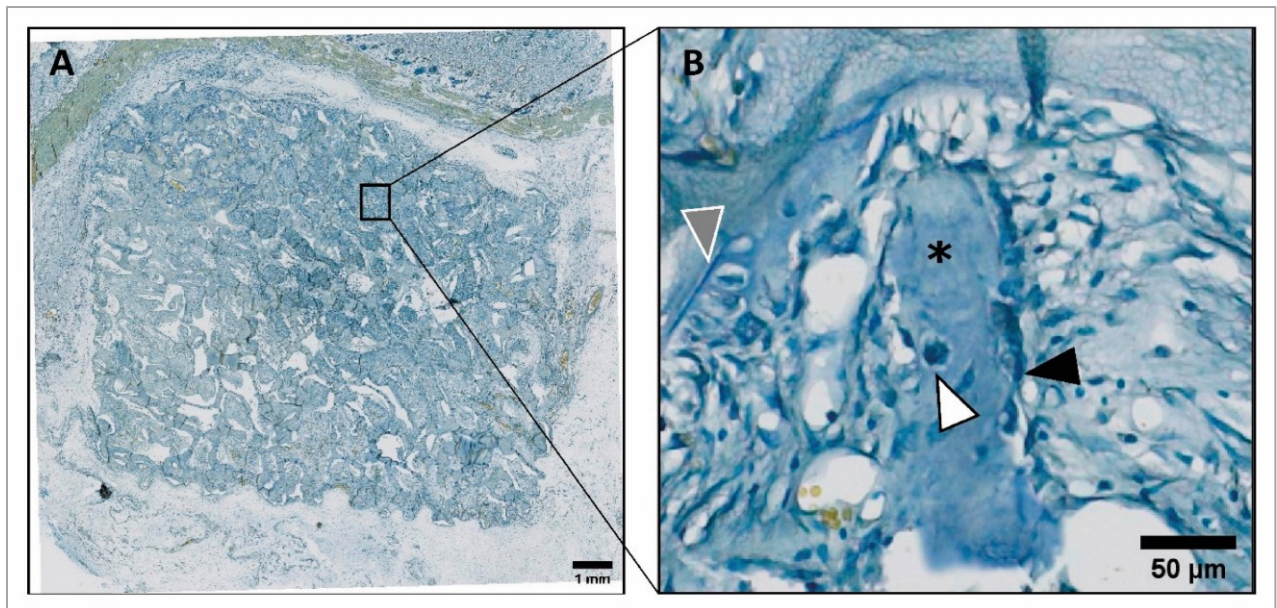
**Abbildung 22:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 3 Wochen. A) Übersichtsaufnahme des Implantats B) (\*) neu gebildeter Knochen entlang des bovinen Knochenersatzmaterials (grauer Pfeil), radiäre Ansammlung von Osteoblasten um den frischen Knochen (weiße Pfeile), angrenzend an den neuen Knochen ist ein perfundierendes Gefäß (kleiner schwarzer Pfeil) zu beobachten.



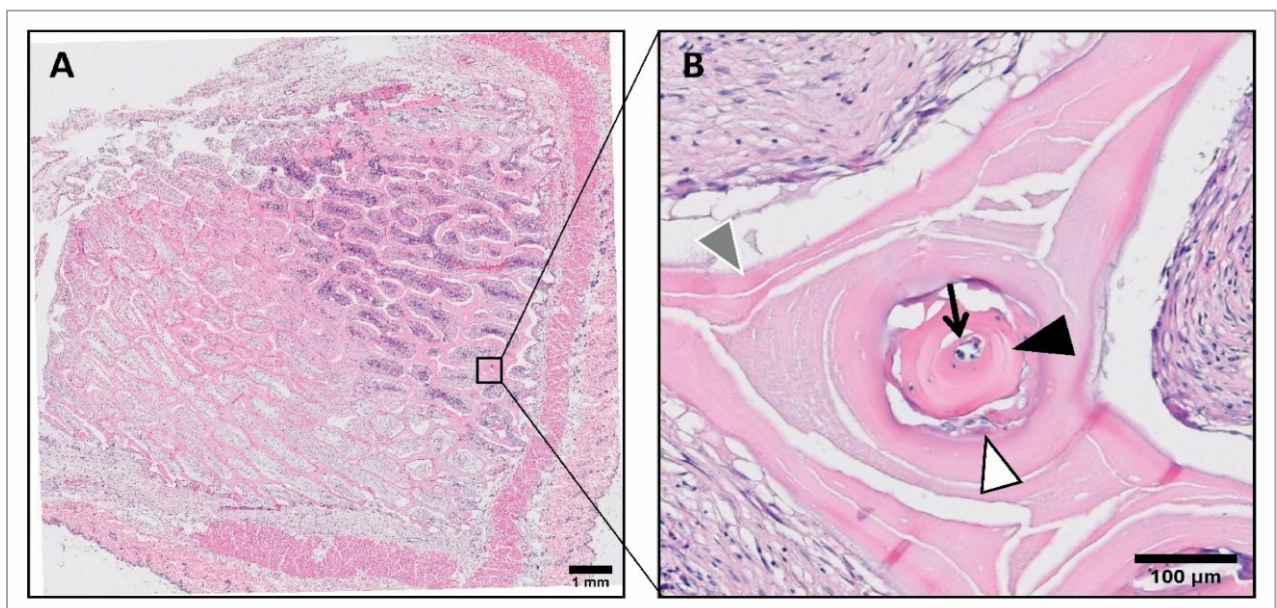
**Abbildung 23:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) Übersichtsaufnahme des Implantats B) schwarze Pfeile deute auf das zentripetale Knochenwachstum hin; X: Implantatzentrum, #: äußere bindegewebige Kapsel.



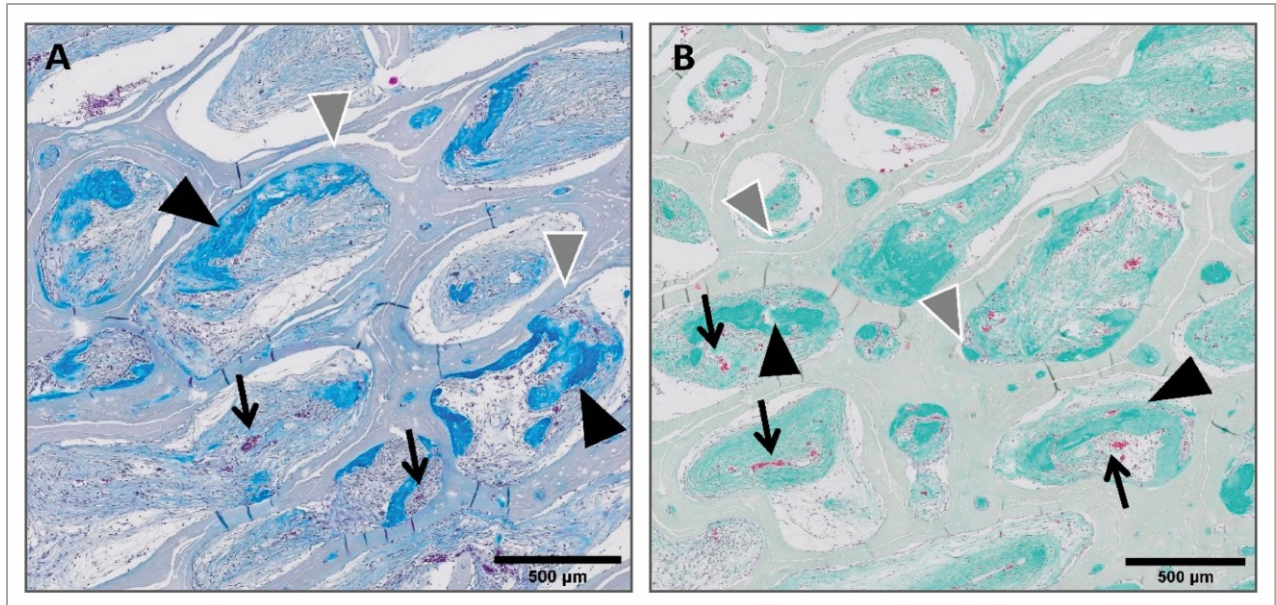
**Abbildung 24:** Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) Ausschnittsvergrößerung; Landkartenartiges Wachstumsmuster des neuen Knochens (schwarze Pfeile), begleitende zahlreiche neu gebildete Blutgefäße dienen der Perfusion des frischen Knochens (kleine schwarze Pfeile) B), Ansammlung von Osteoblasten (weiße Pfeile) peripher des frischen Knochens (\*) dokumentieren eine osteogene Aktivität, innerhalb des Lakunensystems in der mineralisierten Knochenmatrix sind vielzählige Osteozyten (grauer Pfeil) zu erkennen, perfundierende Blutgefäße (kleine schwarze Pfeile).



**Abbildung 25:** BioOss, TRAP Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen. A) korrespondierende Übersichtsaufnahme zu Abb. 23 nach TRAP B) dem neu gebildeten Knochen (\*) gut erkennbar ein aufgelagerter Osteoklast (schwarzer Pfeil) als Zeichen des aktiven Knochenumbaus („bone remodeling“), zudem im interstitiellen Raum der Knochenmatrix ein ummauerter Osteozyt (weißer Pfeil) mit radiär angelegten Zellausläufern und zarter Osteoidablagerung (grauer Pfeil) am Übergang zum KEM.



**Abbildung 26:** BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen. A) Übersichtsaufnahme Implantat B) Knochenbildung entlang des osteokonduktiven Hydroxylapatit (grauer Pfeil), Ausbildung eines Zentralkanals mit Gefäß (kleiner schwarzer Pfeil) und konzentrischen Knochenlamellen (schwarzer Pfeil), im Kompartiment zwischen dem frischen Knochen und bovinen KEM aktiver Knochenumbau durch Osteoklasten (weißer Pfeil).



**Abbildung 27:** Knochenbildung proBMP-2. A) BioOss, Masson-Trichrom Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen. Das interkonnektierende Porensystem des bovinen Knochenersatzmaterials begünstigt die osteoinduktive Wirkung von proBMP-2, harmonische Knochenneubildung (schwarze Pfeile) entlang der bovinen Leitstruktur (graue Pfeile), zudem Ausbildung von zahlreichen neu gebildeten Gefäßen (kleine schwarze Pfeile) entlang des Knochengewebes. B) korrespondierender Ausschnitt zu Bild A nach Masson-Goldner Färbung, ▲: neuer Knochen, ▲ : BioOss, ↑ : perfundierende Gefäße.

#### 4.4.2 Histomorphometrie

Innerhalb der Präparate der Gruppe A (Kontrollgruppe, BioOss-Scaffold ohne Wachstumsfaktor) konnte in keinem der Beobachtungszeiträume eine Knochenneubildung nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte in allen Beobachtungszeiträumen der Gruppen B (BioOss+BMP-2) und C (BioOss+proBMP-2) frischer Knochen nachgewiesen werden. Unter Verwendung des Komposite BioOss+BMP-2 konnte eine Gesamtfläche (Summe der Knochenfläche aller 18 Tiere) von 14,08 mm<sup>2</sup> wohin gegen unter Verwendung von BioOss+proBMP-2 eine Gesamtfläche von 10,94 mm<sup>2</sup> an neu gebildeten Knochen nachgewiesen werden konnte. Die Tabellen 8 und 9 geben eine Übersicht der summierten absoluten Flächen an neu gebildetem Knochen der Gruppe B und C zu den jeweiligen Beobachtungszeiträumen.

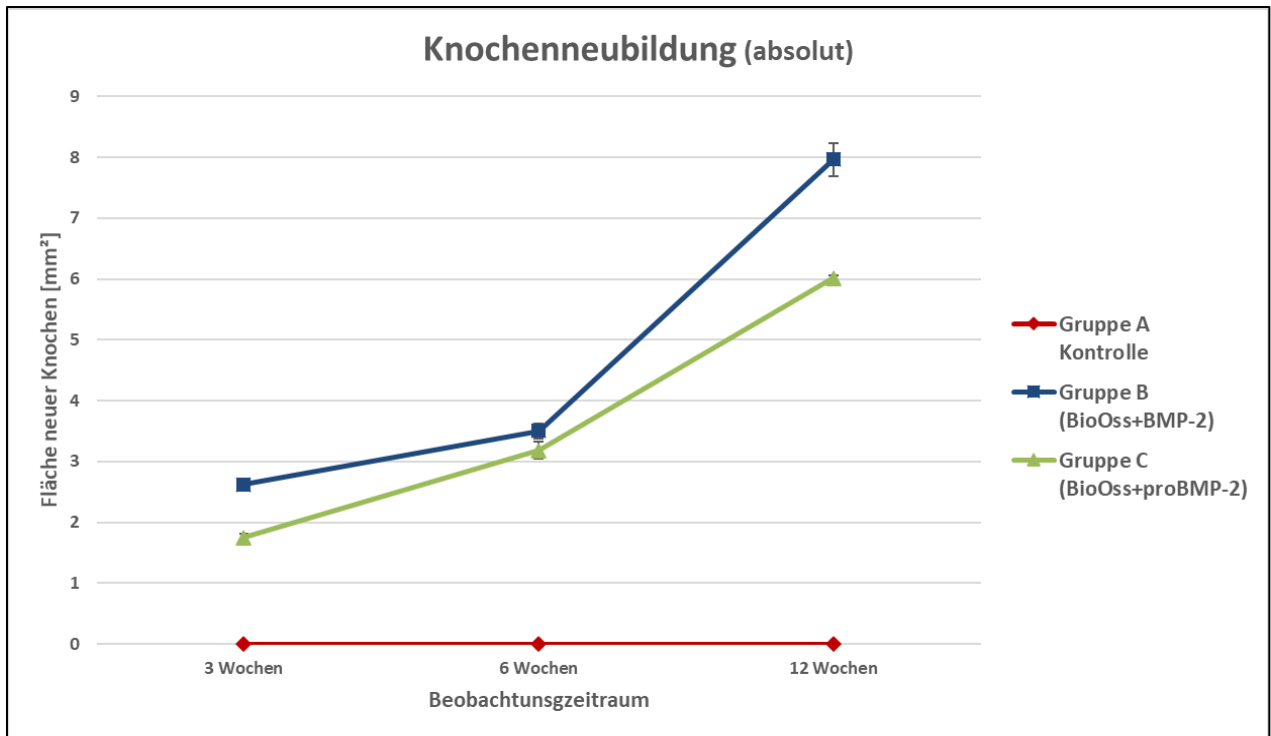
Gruppe B			
Versuchsdauer	Gesamtfläche neuer Knochen [mm <sup>2</sup> ]	Mittelwert [mm <sup>2</sup> ]	Standardabweichung [mm <sup>2</sup> ]
<b>3 Wochen</b>	2,62	0,44	0,07
<b>6 Wochen</b>	3,50	0,58	0,13
<b>12 Wochen</b>	7,96	1,33	0,27

**Tabelle 8:** Knochenneubildung (absolut) der Gruppe B (BioOss+BMP-2). Summe der Knochenfläche an neu gebildeten Knochen der Gruppe B mit entsprechenden Mittelwerten und Standardabweichungen innerhalb der jeweiligen Beobachtungszeiträume in mm<sup>2</sup>.

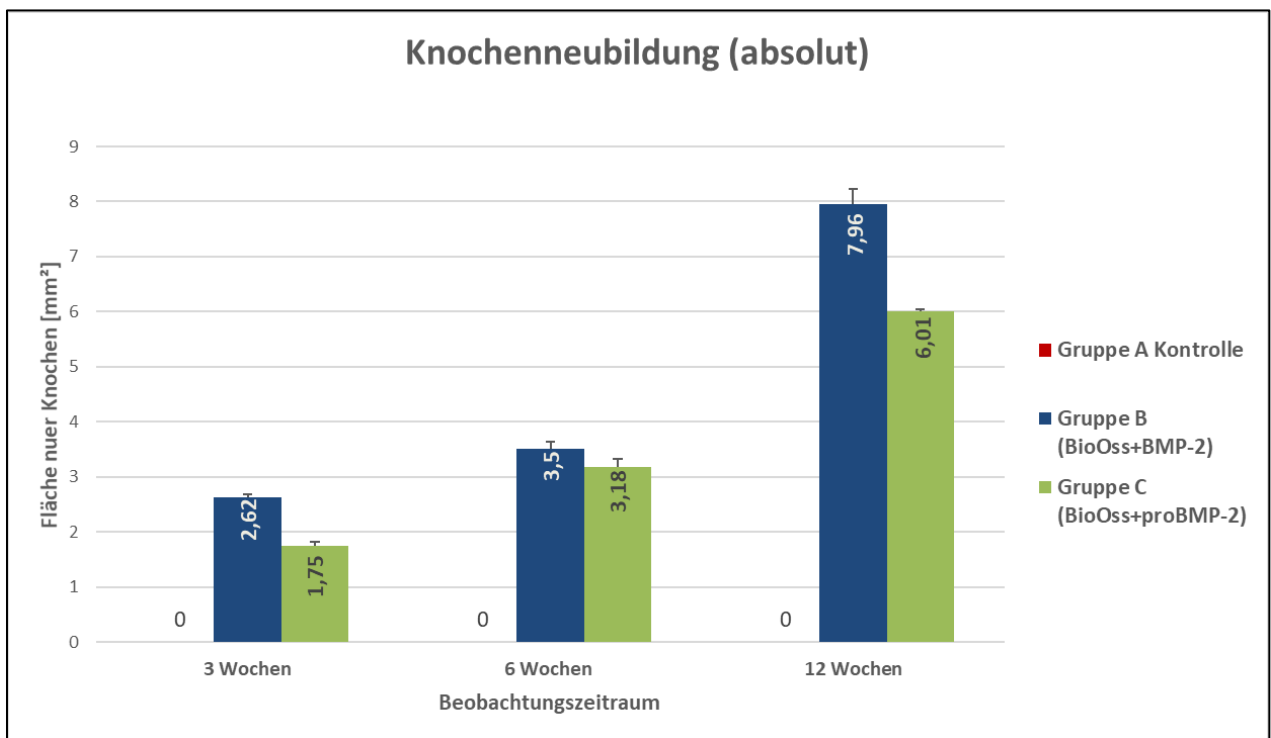
Gruppe C			
Versuchsdauer	Gesamtfläche neuer Knochen [mm <sup>2</sup> ]	Mittelwert [mm <sup>2</sup> ]	Standardabweichung [mm <sup>2</sup> ]
<b>3 Wochen</b>	1,75	0,29	0,06
<b>6 Wochen</b>	3,18	0,53	0,14
<b>12 Wochen</b>	6,01	1,00	0,04

**Tabelle 9:** Knochenneubildung (absolut) der Gruppe C (BioOss+proBMP-2). Summe der Knochenfläche an neu gebildeten Knochen der Gruppe C mit entsprechenden Mittelwerten und Standardabweichungen innerhalb der jeweiligen Beobachtungszeiträume in mm<sup>2</sup>.

Zwischen den Versuchsgruppen konnten signifikante ( $p = 0,001$ ) Unterschiede in der **absoluten Knochenfläche** für jeden der drei Beobachtungszeiträume nachgewiesen werden. Sowohl in der Gruppe B als auch in der Gruppe C war die absolute Knochenfläche für jeden der drei Beobachtungszeiträume signifikant höher als in der Gruppe A, in allen drei Fällen mit  $p = 0,002$ . In Gruppe B konnte für alle Beobachtungszeiträume eine größere absolute Knochenfläche als in Gruppe C nachgewiesen werden, wobei der Unterschied nur für den Beobachtungszeitraum von 3 Wochen signifikant ( $p = 0,015$ ) war. Diagramm 3 mit der Darstellung der zeitlichen Knochenentwicklung der Versuchsgruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum. Diagramm 4 demonstriert die Summe der absoluten Flächen an frischem Knochen zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten.



**Diagramm 3:** Zeitliche Entwicklung der summierten Knochenflächen (absolut) sowie entsprechende Standardabweichungen. Die absolute Knochenneubildung in der Gruppe B (blaue Linie) als auch in der Gruppe C (grüne Linie) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (rote Linie) signifikant ( $p=0,002$ ) höher. Gruppe B zeigte für alle Beobachtungszeiträume eine höhere Knochenneubildung im Vergleich zu Gruppe C, wobei der Unterschied nur für den Beobachtungszeitraum 3. Woche signifikant ( $p=0,015$ ) war.



**Diagramm 4:** Summe der absoluten Knochenfläche der drei Gruppen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten mit entsprechenden Standardabweichungen.

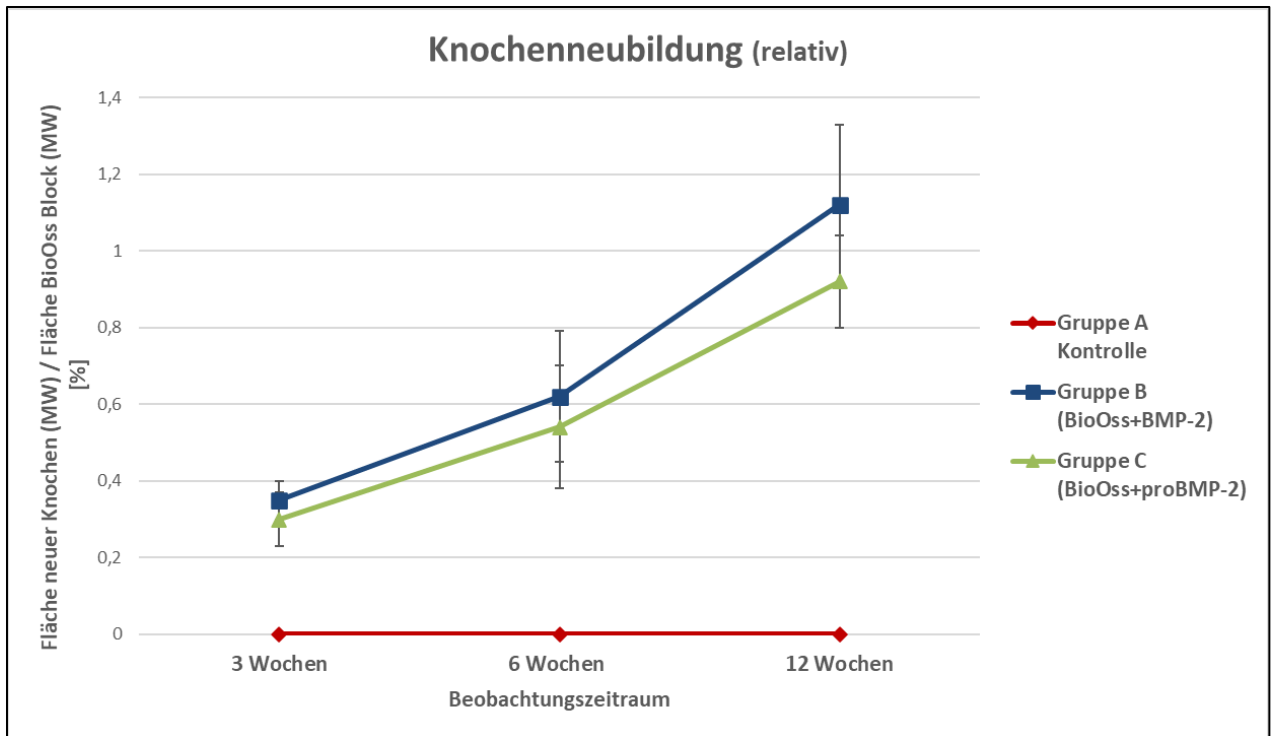
Zwischen den einzelnen Gruppen konnten signifikante ( $p = 0,002$ ) Unterschiede für die **relative Knochenfläche** (Quotient aus Knochenfläche neu/gesamte Blockfläche) für jeden der drei Beobachtungszeiträume nachgewiesen werden. Sowohl für die Gruppe B als auch für die Gruppe C war die relative Knochenfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe A für jeden der drei Beobachtungszeiträume signifikant ( $p=0,002$ ) höher. In Gruppe B war die relative Knochenfläche für alle Beobachtungszeiträume höher als in der Gruppe C, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

Gruppe B		
Versuchsdauer	Relative Knochenfläche pro BioOss Block [%]	Standardabweichung [%]
<b>3 Wochen</b>	0,36	0,05
<b>6 Wochen</b>	0,62	0,17
<b>12 Wochen</b>	1,12	0,21

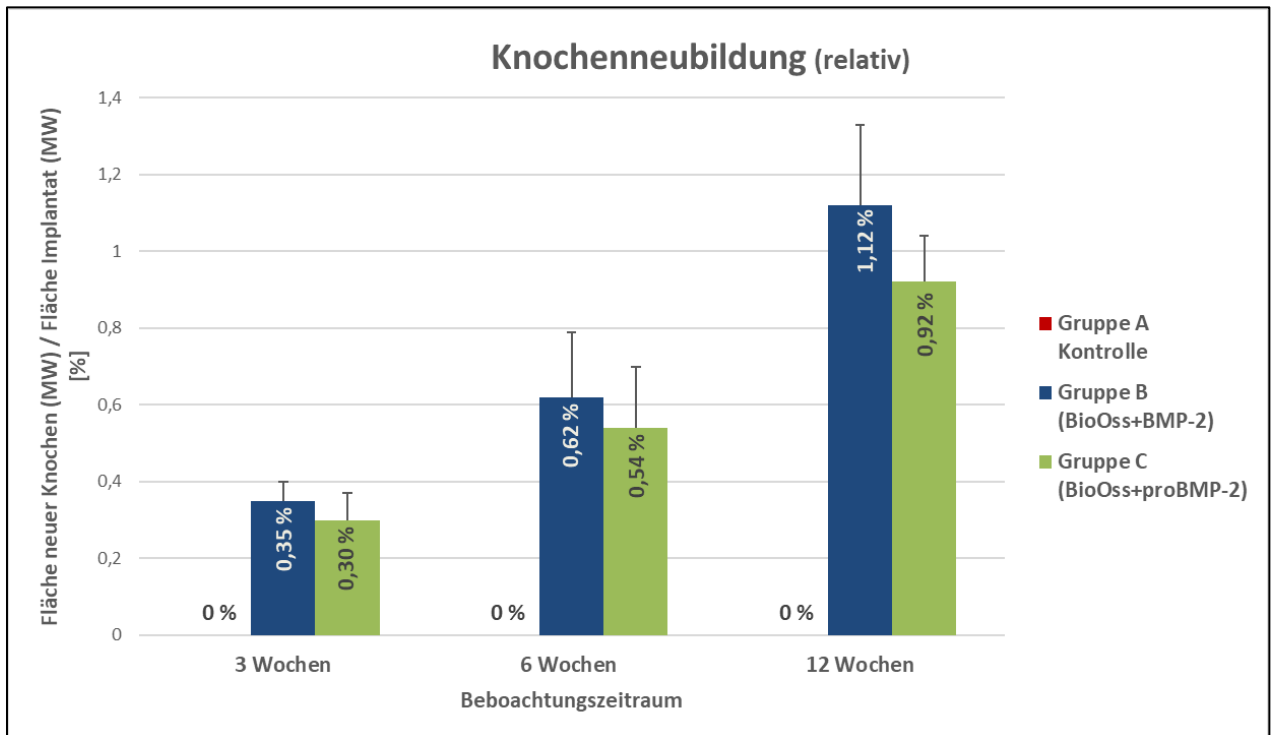
**Tabelle 10:** Relative Knochenneubildung (Quotient aus MW Knochenfläche und MW gesamter Blockfläche) der Gruppe B mit entsprechender Standardabweichung für die jeweiligen Beobachtungszeiträume 3, 6 und 12 Wochen.

Gruppe C		
Versuchsdauer	Relative Knochenfläche pro BioOss Block [%]	Standardabweichung [%]
<b>3 Wochen</b>	0,30	0,07
<b>6 Wochen</b>	0,54	0,16
<b>12 Wochen</b>	0,92	0,12

**Tabelle 11:** Relative Knochenneubildung (Quotient aus MW Knochenfläche und MW gesamter Blockfläche) der Gruppe C mit entsprechender Standardabweichung für die jeweiligen Beobachtungszeiträume 3, 6 und 12 Wochen.



**Diagramm 5:** Zeitliche Entwicklung der relativen Knochenbildung sowie entsprechende Standardabweichungen während des Versuchsablaufs. Die relative Knochenneubildung sowohl in der Gruppe B (blaue Linie) als auch in der Gruppe C (grüne Linie) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (rote Linie) signifikant ( $p=0,002$ ) höher. Gruppe B zeigte im Verhältnis zur Fläche des Implantats eine insgesamt höher Knochenneubildung als Gruppe C, wobei die Unterschiede für keinen der Beobachtungszeiträume signifikant waren.



**Diagramm 6:** Darstellung der relativen Knochenbildung sowie entsprechende Standardabweichungen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten.

## 5 Diskussion

Die Wiederherstellung von Knochendefekten ist für das Fachgebiet der rekonstruktiven Chirurgie nach wie vor eine Herausforderung. Das autologe Knochentransplantat gilt als Goldstandard in der Therapie von knöchernen Defekten (44). Die Nachteile und Kontraindikationen (16, 111–113), welche den Einsatz von autologen Knochentransplantaten einschränken, führten zur Erforschung von alternativen Knochenersatzmaterialien (24, 29). Komposite aus Bone Morphogenetic Proteins auf einem Hydroxylapatit-Träger vereinen dabei osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften mit vielversprechenden Ergebnissen zur Wiederherstellung von Knochengewebe (98). In der Fachliteratur ist die BMP-2-vermittelte Knocheninduktion durch Marshal Urist bereits in den 70. Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben worden und in unterschiedlichen präklinischen (56, 99, 114–117) und klinischen (83, 84, 118–123) Untersuchungen ausreichend dokumentiert. Aufgrund von ernst zu nehmenden inflammatorischen Ödemen im Bereich der oberen Atemwege ist die Verwendung von BMP-2 in der kraniofazialen Region als kritisch zu betrachten (41, 124, 125). Grund der inflammatorischen Nebenwirkungen sind die erforderlichen hohen therapeutischen Konzentrationen des Wachstumsfaktors, welche eine initial hohe Freisetzung des Zytokins aus dem Trägermaterial („burst release“) verursachen (45, 97, 98).

Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung zur Vermeidung von Nebenwirkungen und Steigerung der Effektivität von BMP-2 liegen in der Herstellung einer kontrollierten und prolongierten Freisetzungskinetik am Implantationsort entgegen der Freisetzungskinetik des momentan zugelassenen Wirkstoffes (126–128). Dabei fokussieren sich aktuelle Untersuchungen vorwiegend auf eine chemische Strukturveränderung von BMP-2 (129–132) sowie die Modifikation von unterschiedlichen Trägermaterialien (99, 100, 115, 117, 129, 133). Zudem verfolgen innovative Forschungsansätze eine Optimierung der Pharmakodynamik des Zytokins mittels Gen- und Zelltherapie. (134, 135).

Grundlagen dieser Studie zur Erlangung einer prolongierten Freisetzung des Wachstumshormons war die bereits nachgewiesene knocheninduzierende Wirkung von proBMP-2 (63), sowie eine sukzessive Prozessierung des prämaternen Faktors zum maturated BMP-2, wie sie bereits für phylogenetisch ähnliche Wachstumsfaktoren in der Literatur beschrieben worden ist (136). Infolge der biologischen Umsetzung des prämaternen Faktors wäre eine graduelle Generierung von BMP-2 im Gewebe zu erwarten. Der sukzessive Konzentrationsanstieg des Wachstumsfaktors würde eine analoge Rekrutierung und Proliferation von BMP-2-sensiblen mesenchymalen Zielzellen am Implantationsort ermöglichen und somit eine der BMP-2-Konzentration äquivalente Umsetzung der osteoinduktiven Signale begünstigen. Zudem wurde proBMP-2, infolge der konkurrierenden Interaktion am spezifischen BMP-2-Rezeptor, eine Retardwirkung zugesprochen (66). Unter der Herstellung einer graduellen Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors wäre demnach die Wiederherstellung von Knochengewebe unter Reduktion von inflammatorischen Nebenwirkungen zu erwarten. Angelehnt an diese Erkenntnisse erfolgte die Verwendung von proBMP-2 als möglicher alternativer Wirkstoff zur Erzeugung einer harmonischeren Knocheninduktion. Dabei lag ein wesentlicher Vorteil des auf dieser Studie basierenden Konzepts im Vergleich zu alternativen Lösungsansätzen, im Erhalt der natürlichen biologischen Struktur des Zytokins unter Verwendung eines etablierten Trägermaterials des Knochenengineering (29, 91).

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Fragestellung, unter Verwendung welchen Reifegrades von BMP-2 (BMP-2 vs. proBMP-2) auf einem bovinen Hydroxylapatit-Scaffold (BioOss), eine höhere Knochenneubildungsrate in einem ektopen Tiermodell nachgewiesen werden kann. Hierbei wurde insbesondere das Nebenwirkungsprofil von BMP-2 mit der prämaternen Variante proBMP-2 verglichen.

BioOss gilt als eine der am ausführlichsten wissenschaftlich dokumentierten Knochenersatzmaterialien (29) und belegte in zahlreichen Untersuchungen eine hervorragende Biokompatibilität als Trägermaterial des Zytokins (137–140). Das in dieser Studie verwendete BMP-2 und proBMP-2 stammt mit freundlicher Unterstützung von Frau Professor Schwarz aus dem Institut für Biochemie der Universität Halle-Wittenberg (141). Es liegen derzeit keine Berichte vor, die im Rahmen der Endokultivierung in einem ektopen Tiermodell die Knochenbildungsrate sowie das Nebenwirkungsprofil zwischen BMP-2 und dessen prämaturnen Form proBMP-2 direkt miteinander vergleichen.

Die für diesen Versuchsaufbau verwendeten Versuchstiere weisen gute Eigenschaften zur Handhabbarkeit auf und erbrachten in vorangegangenen Untersuchungen stets erfolgreiche Ergebnisse. Ratten verfügen über Osteoklasten, die eine sehr starke Analogie zur Lebensdauer von menschlichen Osteoklasten zeigen. Zeitliche Unterschiede bestehen allerdings im Remodeling von Knochengewebe, das bei der Ratte wesentlich schneller erfolgt (137). Zudem ist die Knochenneubildungsrate bei Ratten im Vergleich zum Menschen um ein Vielfaches höher (138). Infolgedessen konnte innerhalb der gewählten Beobachtungsintervalle von einer ausreichend quantifizierbaren Knochenneubildung ausgegangen werden. Des Weiteren ist die Verwendung von Nagern aufgrund der vergleichbaren Weichgewebseigenschaften zum Menschen eine in der Wissenschaft vielfach verwendete Spezies zur Testung von BMP-2 assoziierten Nebenwirkungen (142). Die aus diesem Tierversuch resultierenden Erkenntnisse können keinesfalls direkt auf den Menschen übertragen werden und sind lediglich als Anhalt zu verstehen (54, 137).

Es konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Auftreten von Ödemen an der Implantationsstelle und der Gruppenzugehörigkeit, weder für alle 54 Tiere zusammen noch für die Beobachtungszeiträume getrennt, nachgewiesen werden. Auch unter der Zensur der 2 Tiere mit infektionsbedingtem Ödem innerhalb der Gruppe A, ergab die wiederholte statistische Testung anhand der adaptierten Anzahl der Versuchstiere von  $n=52$  ebenfalls keine signifikanten Abhängigkeiten zwischen dem Auftreten der Ödeme und der Gruppenzugehörigkeit. Die statistische Aussage bezüglich der Ödembildung wurde durch die infektionsbedingten Bias nicht affektiert. Infolge der geringen Anzahl an Ödemen in der vorliegenden Studie können keine verlässlichen Aussagen zu Unverträglichkeiten und damit Nebenwirkungsprofil von BMP-2 und proBMP-2 gemacht werden. Dennoch zeigten sich qualitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in Hinblick auf den Verlauf der Ödembildung an der Implantationsstelle. Innerhalb der Gruppe B (BMP-2+BioOss) zeigten 50 % der Tiere während des frühen Beobachtungszeitraums ein Ödem, welches bereits am 2. postoperativen Tag an der Implantationsstelle zu beobachten war. Dabei handelte es sich um lokal begrenzte Ödeme mit begleitender Rötung der Haut. Diese Beobachtung zeigte, ungeachtet der fehlenden Signifikanz, starke Analogien zum Verlauf der in der Literatur beschriebenen inflammatorischen Nebenwirkungen nach der Anwendung von BMP-2.

Smucker et al. konnten in einer retrospektiven klinischen Studie beobachten, dass nach der Applikation von BMP-2 gleichfalls ab dem zweiten postoperativen Tag ausgeprägte inflammatorische Nebenwirkungen nachzuweisen waren. Auffällig dabei war, dass bei unkomplizierten Fällen, wo ein regelhafter Verlauf zu erwarten gewesen wäre, unter BMP-2 eine höhere Frequenz an inflammatorischen Komplikationen offensichtlich war. Die nachfolgende Regressionsanalyse dieser Ergebnisse zeigte, dass die Anwendung von BMP-2 signifikant mit dem Auftreten dieser inflammatorischen Komplikationen assoziiert war (96). Bei der Meta-Analyse zur Beurteilung des Sicherheitsprofils von BMP-2 berichteten Carragee et al. gleichermaßen über den signifikanten Zusammenhang der inflammatorischen Komplikationen unter BMP-2, welche ebenfalls ab dem zweiten postoperativen Tag zu beobachten waren (143). In einer Untersuchung zur Charakterisierung BMP-2-assoziiertes entzündlicher Nebenwirkungen implantierten Lee et al. BMP-2-getränkte Kollagenträger in eine dorsale Hautkammer an Lewis-Ratten. Nachfolgende MRT Analysen der

Implantationsstelle demonstrierten einen Peak der entzündlichen Ödeme unter anderem am 2. postoperativen Tag (144). In Hinblick auf das zu ermittelnde Nebenwirkungsprofil der beiden Proteinformen erfolgte ergänzend die Untersuchung der Gewichtsveränderung der Versuchstiere. Gewichtsveränderungen repräsentieren unspezifische Zeichen des allgemeinen Gesundheitszustandes von Nagern und bieten aufgrund der einfachen und objektiven Erhebung einen Anhalt über mögliche Krankheitszustände (145). Versuchstiere der BMP-2-Gruppe demonstrierten während des Beobachtungszeitraums der 3. Woche eine signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe und der proBMP-2 Gruppe. Im Verlauf des Versuchs kam es zu keiner Veränderung des Futterangebots oder zu aggressiven Verhalten zwischen den einzelnen Individuen, was eine geringere Gewichtszunahme der Versuchstiere hätte begründen können. Dahingehend unterstützt die signifikant geringere Gewichtszunahme zum Zeitpunkt 3. Woche die Annahme einer BMP-2-assoziierten gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere der Gruppe B. Unter Berücksichtigung der ermittelten signifikant geringeren Gewichtszunahme der BMP-2-Tiere und der zeitlichen Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenem Verlauf BMP-2-korrelierender Ödeme, kann durchaus eine gewisse Assoziation zwischen der Anwendung von BMP-2 und den beobachteten Ödemen an der Implantationsstellen dieser Studie vermutet werden. Demgegenüber trat das einzige Ödem an der Implantationsstelle in der Gruppe C, im Verhältnis zum Implantationszeitpunkt, erst deutlich verzögert auf (40. Tag post implantationem). Gleichwohl konnte innerhalb der histologischen Präparate der Gruppe C bereits ab dem 21. Tag eine Knochenneubildung nachgewiesen werden, womit die biologische Aktivität von proBMP-2 indirekt bestätigt wurde. Demzufolge wäre zu vermuten, dass eine proBMP-2 provozierte inflammatorische Nebenwirkung bereits innerhalb dieser 21 Tage zu erwarten gewesen wäre. Infolgedessen kann angenommen werden, dass kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen dem Ödem an der Implantationsstelle und proBMP-2 bestand. Derartige Komplikationen nach initial problemlosen Insertionen von Implantaten ins Weichgewebe sind im klinischen Alltag nicht ungewöhnlich und werden in der Literatur oft beschrieben (146, 147). Unterschiedliche Ätiologien, wie bakterielle Kontaminationen der Implantate oder diskrete Wunddehiszenzen mit sekundärer chronischer Infektion, könnten materialunspezifische Ursachen für das hier beobachtete Ödem gewesen sein.

Die histologischen Korrelate der Tiere mit Ödem an der Implantationsstelle der Gruppe A demonstrierten ein partiell gemischtzelliges Bild und untermauern die klinische Annahme eines infektiösen Geschehens. Ursache der Abszedierung könnten die mitunter semisterile Handhabung der BioOss Blöcke oder sekundäre Wundinfektionen im ehemaligen Operationsfeld gewesen sein.

Methodenkritisch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass eine Kontamination der Implantate sowie die Verunreinigung der Wirkstoffe unter semisterilen Kautelen nicht sicher auszuschließen ist und somit Ursache der materialunspezifischen Inflammationen gewesen sein könnte. Daher ist bei zukünftigen Testreihen eine Präparation der Trägermaterialien sowie die Handhabung der Wachstumsfaktoren unter ausschließlich sterilen Bedingungen zu empfehlen.

In Präparaten der Gruppe A (Kontrolle) konnte kein neu formierter Knochen nachgewiesen werden. Das zu vernachlässigende knocheninduktive Potenzial durch den alleinigen Einsatz eines auf Hydroxylapatit basierenden Knochenersatzmaterials, konnte in diesem Versuch bestätigt werden (4, 139). Dagegen konnte in der histomorphometrischen Analyse neu formierter Knochen in allen Präparaten der Gruppe B (BioOss+BMP-2) und der Gruppe C (BioOss+proBMP-2) zu allen Beobachtungszeitpunkten nachgewiesen werden. Histomorphologisch zeigte sich bereits ab der 3. Woche deutlich frischer Knochen innerhalb aller BMP-2 und proBMP-2 beschichteten Proben. Die Knochenneubildung erfolgte in beiden Gruppen relativ gleichmäßig, wobei bei der prämaternen Form tendenziell ein landkartenartiges Wachstumsmuster innerhalb des Trabekelsystems zu erkennen war. Grundsätzlich war in beiden Gruppen ein harmonisches appositionelles

Knochenwachstum entlang des trabekulären Knochenersatzmaterials nachzuweisen. Gemeinsam zeigte sich in allen Präparaten das in der Literatur beschriebene zentripetale Knochenwachstum innerhalb der BioOss-Scaffolds (54) welches im Wesentlichen auf die Applikationstechnik der Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist. Aufgrund der gewöhnlichen physikalischen Adsorption von BMP-2 bzw. proBMP-2 an der Oberfläche des Trägermaterials, erfolgte in diesem Bereich eine Akkumulation der Zytokine. Das sich ergebende Konzentrationsgefälle in Richtung Implantatzentrum begünstigte somit eine Knochenneubildung im oberflächlichen Anteil des BioOss-Blocks. Alle Proben beinhalteten vitale Osteozyten, Osteoblasten und Osteoidablagerungen sowie Havers-Systeme unterschiedlicher Entwicklungsstufen. In beiden Testgruppen waren teilweise osteoklastische Resorptionslakunen als Zeichen des aktiven Knochenremodeling nachzuweisen. Die Präparate beider Gruppen zeigten somit vitales neu gebildetes Knochengewebe. Vorangegangene Ergebnisse, wonach das prämaturre Protein *in vivo* zu einer ektope Knochenneubildung führte (61), konnten in dieser Studie damit bestätigt werden. Dabei waren die ermittelten absoluten Knochenflächen der BMP-2-Präparate für alle Beobachtungszeiträume im Vergleich zu den proBMP-2 beschichteten Präparate insgesamt größer, wobei der Unterschied lediglich für den Beobachtungszeitraum 3 Wochen signifikant höher war. Gleiches war auch für die relative Knochenfläche zu beobachten, wobei hier keine signifikanten Unterschiede auffielen. Okubo et al. konnten in einem vergleichbaren Tierversuch zur ektope Knocheninduktion mit BMP-2 nach drei Wochen im Durchschnitt eine absolute Knochenfläche von 0,87 mm<sup>2</sup> nachweisen. Die Knochenbildungsrate war bei Okubo et al. insgesamt größer, entspricht jedoch der Größenordnung der vorliegenden Studie (56). Die Implantationen bei Okubo et al. erfolgten hingegen innerhalb eines muskulären Implantatlagers, welches infolge der überlegenen Perfusion im Vergleich zum hier verwendeten subkutanen Implantatlager eine höhere Knochenneubildungsrate ermöglichten. Ähnliche Ergebnisse zur Abhängigkeit einer vorteilhaften Perfusion und damit assoziierter höhere Knochenbildungsraten konnten durch entsprechende Versuchsmodelle weiter bestätigt werden (105, 148).

Die unterschiedlichen Knochenbildungsraten der BMP-2-Präparate im Vergleich zu den proBMP-2-beschichteten Präparaten, ist auf die Metabolisierung des prämaturren Wachstumshormons zurückzuführen, auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll. Die Fähigkeit von BMP-2 zur Transdifferenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten wurde mehrfach beschrieben und kann anhand der Induktion von alkalischer Phosphatase (AP) nachgewiesen werden (149). Dabei gilt die Bestimmung der Enzymaktivität als Standardmethode zur Verifizierung der biologischen Aktivität von BMP-2 (150, 151). Wie bereits beschrieben, konnten Hillger et al. im Tiermodell eine ektope Knocheninduktion durch proBMP-2 hervorrufen (63). Demzufolge wäre eine Induktion von AP nach einer Stimulation durch proBMP-2 zu erwarten. Allerdings konnten von Einem et al. in einem Zellkulturmodell nach Stimulation von C2C12-Zellen, auch mit außergewöhnlich hohen Konzentrationen von proBMP-2, selbst nach vier Tagen keine Enzymaktivität nachweisen (152). Diese Tatsache kollidiert mit den Ergebnissen dieser Studie sowie den von Hillger et al. beschriebenen Beobachtungen der knocheninduktiven Wirkung von proBMP-2.

In vorangegangenen Versuchen konnten Hauburger et al. die Bindung von proBMP-2 am spezifischen BMPR-IA-Rezeptor nachweisen, allerdings konnte Sie keine Interaktion am spezifischen Rezeptor BMPR-II nachweisen (66). Diese Beobachtung ist Ursache der unterschiedlichen Signalwirkung von proBMP-2 zu BMP-2. Wie bereits beschrieben, erfolgt die BMP-2-vermittelte Signalübertragung sowohl über bereits bestehende Rezeptorkomplexe (PFC= preformed complex), als auch über die Ausbildung eines heterotetrameren Komplexes aus Wachstumsfaktor und den beiden spezifischen BMPR-IA und BMPR-II Rezeptoren (BISC= BMP induced signaling complex) (siehe Kapitel 1, S. 10f). Die Interaktion von BMP-2 mit PFC führt zur

Aktivierung des SMAD-abhängigen Signalwegs mit nachfolgender Induktion von knochenspezifischen Transkriptionsfaktoren, während die Ausbildung von BISC über Aktivierung des p38/MAPK-Signalwegs eine Induktion von AP nach sich zieht (67, 68). Für proBMP-2 konnte eine SMAD-abhängige Signaltransduktion nachgewiesen werden, wohingegen eine p38/MAPK-vermittelte Übertragung nicht beobachtet wurde (66). Da nachgewiesen werden konnte, dass die Induktion der alkalischen Phosphatase über eine p38/MAPK-vermittelte Signalkaskade erfolgt (153, 154), ist das Ergebnis konsistent mit der Beobachtung, dass durch die Stimulation durch proBMP-2 keine Aktivität von AP nachzuweisen war. Dahingegen konnten von Einem et al. anhand einer zeitlich verlängerten Stimulation von C2C12-Zellen mit proBMP-2 schließlich eine AP-Aktivität nachweisen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (C2C12+BMP-2), fiel die Enzymaktivität nach Stimulation mit proBMP-2 allerdings geringer aus und um 5 Tage verzögert (152). Die zeitverzögerte biologische Aktivität des prämaternen Faktors beruhte dabei auf zwei unterschiedliche zelluläre Prozesse. Die Internalisierung von BMP-2 erreichte nach etwa 2 h ein Plateau, wohingegen bei der prämaternen Form diese Plateau erst nach etwa 15 h erreicht wurde (152). Vor dem Hintergrund, dass die Aufnahme der Wachstumshormone in die Zelle mit der Internalisierung der spezifischen Rezeptoren assoziiert ist (155, 156), begründete von Einem die zeitliche Diskrepanz der Internalisierung von BMP-2 und proBMP-2 mit der bereits beschriebenen unterschiedlichen Rezeptorinteraktion des murenen und prämaternen Faktors (152).

Der maßgebliche Unterschied zeigte sich nachfolgend in der Metabolisierung der beiden Faktoren. In den Proben der mit proBMP-2 stimulierten Zellen konnte im Verlauf eine fast vollständige Aufnahme des prämaternen Faktors beobachtet werden, wohingegen in den BMP-2-stimulierten Proben extrazellulär eine nahezu unveränderte Detektion des murenen Wachstumsfaktors bis zum 5. Tag möglich war. Korrespondierend zu der sukzessiven extrazellulären Abnahme von proBMP-2, konnte innerhalb derselben Proben ab dem 4. Tag BMP-2 nachgewiesen werden. Die Induktion der alkalischen Phosphatase war demnach auf das gegenwärtig generierte BMP-2 zurückzuführen. Der Nachweis von BMP-2 innerhalb der proBMP-2 stimulierten Proben, deutet auf eine intrazelluläre Umwandlung der prämaternen Form zu BMP-2 hin und gegen die vorangegangene Annahme einer extrazellulären proteolytischen Aktivierung, wie es bereits für vergleichbare Wachstumsfaktoren beschrieben worden war (136).

Die intrazelluläre Metabolisierung von proBMP-2 scheint so eine graduelle Generierung zu BMP-2 im Gewebe zu ermöglichen und nachfolgend eine osteoinduktive Wirkung zu vermitteln. Anhand der dokumentierten zeitlichen Verzögerung von 5 Tagen bis zur Detektion einer AP-Aktivität nach Stimulation durch proBMP-2, ist von einer sukzessiven Freisetzung des murenen Faktors mit verzögertem Wirkungsbeginn im Sinne eines Retardeffektes auszugehen. Vor diesem Hintergrund sind auch die unterschiedlichen Knochenbildungsraten nach Stimulation mit BMP-2 respektive proBMP-2 zu erklären. Der innerhalb des Beobachtungsintervalls 3 Wochen signifikant höhere Anteil an frischen Knochen (absolut) der BMP-2-Gruppe, beruht anscheinend auf die unmittelbare Wirkung des bereits initial aktiven und lokal zur Verfügung stehenden murenen Wachstumsfaktors. Dahingegen erforderte die Entfaltung der osteoinduktiven Wirkung von proBMP-2 zunächst die beschriebene verzögerte Internalisierung und Prozessierung zur murenen Form innerhalb der Zielzelle, mit einer Verzögerung von etwa 5 Tagen (Retardeffekt). Die in der Literatur beschriebene schwächere biologische Aktivität von proBMP-2 (141) konnte somit infolge der geringeren Knochenbildungsraten im Vergleich zu BMP-2 in dieser Studie bestätigt werden. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass die Menge an neu gebildeten Knochen (absolut) innerhalb der Gruppen B und C während der Beobachtungsintervalle 6 und 12 Wochen sowie die relative Knochenneubildung innerhalb aller drei Beobachtungszeiträume keine weiteren signifikanten Unterschiede mehr aufzeigten. Daher ist anzunehmen, dass es zu einer ausreichend hohen Konzentration von BMP-2 im Gewebe gekommen ist, um die fortlaufende Knochenneubildung zu

ermöglichen. Anhand dieser Erkenntnisse konnte belegt werden, dass proBMP-2 über eine ausreichend lange Halbwertszeit verfügt und eine ergänzende Applikation des Wirkstoffs nicht notwendig zu sein scheint. Des Weiteren wurde in dieser Studie eine Wirkdauer von 12 Wochen für proBMP-2 nachgewiesen und dokumentiert erstmalig eine um insgesamt 8 Wochen prolongierte Wirkdauer im Vergleich zu den in der Literatur bisher beschriebenen 4 Wochen (63). Ein wesentlicher Aspekt der BMP-2 vermittelten Wirkung stellt die Rekrutierung von mesenchymalen Zielzellen dar (157). Hauburger et al. konnten in einem Migrationstest mit Fibroblasten durch die Stimulation mit proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 eine korrespondierende Zellmigration beobachten (158). Die in dieser Studie beschriebene intrazelluläre Prozessierung von proBMP-2 zu BMP-2 setzt initial eine Rekrutierung von mesenchymalen Zielzellen voraus. Durch den Nachweis der Knocheninduktion innerhalb der proBMP-2 stimulierten Proben, konnte indirekt eine chemotaktische Wirkung des prämaternen Faktors bestätigt werden und manifestiert somit eine weitere für die Knocheninduktion komplementäre Funktion von proBMP-2.

Die Studie kommt zu der Erkenntnis, dass durch proBMP-2 eine ektopische Knocheninduktion vermittelt werden kann. Dabei ist die biologische Kapazität von proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 in Hinblick auf die Knochenbildungsrate insgesamt schwächer, wobei diese nur für die frühe Knochenbildungsphase signifikant war. Das prämaturne Protein verfügt über keine intrinsische osteoinduktive Wirkung. Die osteoinduktive Wirkung erfolgt durch eine zelluläre Internalisierung und nachfolgender intrazelluläre Prozessierung zu BMP-2. Anhand der verzögerten proBMP-2 vermittelten AP-Enzymaktivität ist zu vermuten, dass der Wirkungseintritt des prämaternen Wachstumsfaktors erst mit einer Karenzzeit von 5 Tagen erfolgt. Demzufolge ist für proBMP-2 ein verzögerter Wirkungseintritt anzunehmen, was sich in der signifikant geringeren Knochenbildungsrate innerhalb des 3. Wochen Beobachtungsintervall widerspiegelte. Eine Wirkdauer für proBMP-2 konnte nachfolgend jedoch bis zur 12. Woche nach Verabreichung nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint eine graduelle und prolongierte Freisetzung von BMP-2 durch die Verabreichung von proBMP-2 möglich zu sein. Im Hinblick auf die Fragestellung zur Verwendung des prämaternen Faktors als nebenwirkungsärmere Alternative kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die beobachteten inflammatorischen Nebenwirkungen innerhalb der BMP-2 beschichteten BioOss-Implantate lassen aufgrund vergleichbarer Verläufe in unterschiedlichen Studien einen Zusammenhang vermuten. Im direkten Vergleich zu proBMP-2 konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Ödembildung an der Implantationsstelle nachgewiesen werden. Hingegen konnte eine signifikant geringe Gewichtszunahme in der frühen Beobachtungsphase bei Versuchstieren der Gruppe B nachgewiesen werden, welche mit dem Beobachtungszeitpunkt der Ödembildung konsistent ist. Diese Beobachtung unterstützt ergänzend die Vermutung einer BMP-2-assoziierten gesundheitlichen Beeinträchtigung. Zur Erlangung einer zuverlässigen Aussage hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils von BMP-2 und proBMP-2, sollte in nachfolgenden Untersuchungen die doppelte Anzahl an Tieren pro Gruppe und Beobachtungszeitraum gewählt werden. Aufgrund der unterschiedlichen effektiven Wirkungs-dosis von BMP-2 zwischen verschiedenen Spezies und damit korrelierender Nebenwirkungen (45, 92), würde die Verwendung ansteigender Konzentrationen des prämaternen Faktors hinsichtlich der Evaluation des Nebenwirkungsprofils zusätzliche Erkenntnisse erbringen. Zur Differenzierung der durch Wachstumsfaktoren induzierten entzündlichen Nebenwirkungen, wäre zudem eine biochemische Analyse des Ödems an der Implantationsstelle zur Identifizierung charakteristischer Zytokine von Vorteil (92, 159). Unter den gewonnenen Erkenntnissen könnten nachfolgende Studien eine große Chance für diesen möglicherweise nebenwirkungsärmeren prämaternen Faktor ergänzend belegen.

## 6 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von Knochendefekten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie nach Traumen, Tumoren oder kongenitalen Defekten erfordert die Verwendung von Knochenersatz zur Wiederherstellung von Form und Funktion. Dabei gilt das autologe Knochenransplantat als Goldstandard zur Rekonstruktion von knöchernen Defekten. Verschiedene Knochenersatzmaterialien finden aktuell Verwendung, um gegebene Nachteile der autologen Knochengewinnung zu vermeiden. Dabei erbrachten bioaktive Komposite aus einem osteokonduktiven Trägermaterial in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 vielversprechende Ergebnisse zur Regeneration von Knochengewebe hervor. Die wirkstoffspezifische Freisetzungskinetik von BMP-2 bedingt allerdings eine initial hohe Konzentration (burst release) des Zytokins am Implantationsort, was nach Anwendung in der kraniofazialen Region zu ernstzunehmenden inflammatorischen Nebenwirkungen wie Schwellungen, Ödemen und Erytheme der oberen Atemwege führt. Für die prämaturre Form des BMP-2, das proBMP-2 konnte ebenfalls eine ektopische Knocheninduktion nachgewiesen werden. Unter der Annahme einer kontinuierlichen Prozessierung von proBMP-2 durch die proteolytische Prozessierung zum murenen BMP-2, wie sie bereits für phylogenetisch ähnliche Wachstumsfaktoren in der Literatur beschrieben worden ist, wäre ein gradueller und prolongierter Konzentrationsanstieg des reifen Zytokins im Gewebe zu erwarten. Unerwünschte burst release könnten zugunsten dieser umgekehrten Freisetzungskinetik vermieden werden und eine harmonische Knochenregeneration begünstigen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Fragestellung, ob durch die Verwendung von proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 innerhalb eines bovinen Hydroxylapatit-Scaffolds in einem ektopen Tiermodell entsprechend effektiv Knochengewebe induziert werden konnte. Dabei galten induzierte Knochenflächen (absolut und relativ) innerhalb der Scaffolds als Maßstab zur Beurteilung der osteoinduktiven Kapazität der jeweiligen Proteinformen.

Als zweiter zu untersuchender Aspekt dieser Studie galt die Identifikation von inflammatorischen Nebenwirkungen in Form von Ödemen und Verletzungen am Implantationsort zur Evaluation des Nebenwirkungsprofils von BMP-2 und proBMP-2.

54 Sprague-Dawley Versuchsratten wurden äquimolare Konzentration von BMP-2 und proBMP-2 auf einem bovinen Hydroxylapatit-Scaffold implantiert. Tiere der Gruppe B erhielten BioOss+ BMP-2 und Tiere der Gruppe C BioOss+proBMP-2. Als Kontrolle erhielten Tiere der Gruppe A Scaffolds ohne Wachstumsfaktoren. Die Versuchszeiträume betragen 3, 6 und 12 Wochen mit jeweils 6 Tieren pro Zeitpunkt. Die histomorphometrische und histologische Auswertung erfolgte anhand digitalisierter Paraffinschnitte. Zur Beurteilung des Nebenwirkungsprofils der jeweiligen Wirkstoffe erfolgte die Dokumentation und Klassifikation inflammatorischer Ereignisse in Form von Ödemen und Verletzungen an der Implantationsstelle. Ergänzend wurden Gewichtsveränderung der Tiere zu Beginn und nach Tötung der Individuen dokumentiert.

Im Ergebnis dieser Studie zeigten die Implantate ohne Wachstumsfaktor (Kontrolle) zu keinem Zeitpunkt eine Knochenbildung. BMP-2 konnte für alle Beobachtungszeiträume eine insgesamt größere absolute Knochenfläche als proBMP-2 generieren, wobei der Unterschied nur für den Beobachtungszeitraum von 3 Wochen statistisch signifikant waren. Auch die relative Knochenneubildung (Verhältnis Knochenneubildung zum Implantat) war für BMP-2 für alle Zeiträume größer, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

Die Studie hat gezeigt, dass eine vergleichbare Menge an Knochengewebe innerhalb eines ektopen Lagers durch proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 induziert werden konnte.

Das prämaturre Protein verfügte dabei über keine intrinsische osteoinduktive Wirkung. Die Vermittlung der osteoinduktiven Wirkung des prämaturren Faktors erfolgte nach Internalisierung und nachfolgender zellulärer Prozessierung zum reifen BMP-2. Die signifikant schwächere osteoinduktive Kapazität von proBMP-2 innerhalb des frühen Beobachtungsintervalls war auf die unterschiedliche Metabolisierung des prämaturren Zytokins gegenüber BMP-2 zurückzuführen. Infolge der beschriebenen unterschiedlichen Affinität zu den spezifischen Rezeptoren erfolgte die Internalisierung von proBMP-2 im Vergleich zum maturaen Protein verlangsamt. Eine nachfolgende mehrtägige Prozessierung zum reifen BMP-2 bedingte eine zusätzliche zeitliche Verzögerung der biologischen Aktivierung des proBMP-2. Demgegenüber generierte die initiale biologische Aktivität des maturaen Faktors diesem einen zeitlichen Vorsprung und spiegelte sich in den signifikant höheren Knochenflächen innerhalb des frühen Beobachtungszeitpunkts wider. Eine graduelle und prolongierte Freisetzungskinetik von BMP-2 unter Verwendung von proBMP-2 innerhalb eines ektopen Tiermodells konnte innerhalb dieser Studie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurden 6 Ödeme innerhalb dieser Studie dokumentiert. Die höchste Frequenz (n=3) war in der Gruppe B (BMP-2) während der ersten 2 postoperativen Tage zu verzeichnen. Ödeme (n=2) innerhalb der Gruppe C (proBMP-2) traten im Verhältnis zum Wirkungseintritt zeitlich verspätet auf und waren auf eine sekundäre Infektion zurückzuführen. Das einzige Ödem in der Kontrollgruppe war auf eine Abszedierung zurückzuführen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen den beobachteten Ödemen an der Implantationsstelle und BMP-2 bzw. proBMP-2 konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Die ergänzende statistische Auswertung unter Zensur der Abszesstiere der Kontrollgruppe A ergab gleichermaßen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Ödemen und den jeweiligen Proteinformen. Allerdings deutete der zeitliche Ablauf der frühzeitig aufgetretenen Ödeme in Verbindung mit der signifikant geringen Gewichtszunahme der betroffenen BMP-2 Ödemtiere auf eine gewisse Assoziation zwischen Inflammation und dem maturaen Zytokin hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine Basis dar zur weiteren Überprüfungen, ob proBMP-2 als alternativer therapeutischer Wirkstoff geeignet scheint. Eine Testung mittels unterschiedlicher Konzentrationen beider Proteinformen bei höher Anzahl an Versuchstieren, könnte eindeutige Resultate zu Nebenwirkungen der jeweiligen Wirkstoffe ergeben. Nachfolgend sollte proBMP-2 in Defektmodellen verwendet werden, um Aussagen bezüglich der Qualität des induzierten Kochens machen zu können.

---

## 7. Literatur

1. Allgöwer M. Grundsätzliches zur Osteosynthese. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 1975; 19:1–3.
2. Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden LJ et al. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharm. Res.* 1993; 10(10):1393–401.
3. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33(5):312–8.
4. R. Smeets, H. Hanken et al. Knochenersatzmaterialien. *MKG-Chirurg* 2016; Feb 2016(9):2–11.
5. Garrel T von, Gotzen L. Allogene Knochen transplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg* 1998; 101(9):713–27.
6. Windhager R, Hobusch GM, Matzner M. Allogene Transplantate für biologische Rekonstruktionen von Knochendefekten. *Orthopade* 2017; 46(8):656–64. doi: 10.1007/s00132-017-3452-0.
7. Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma* 2010; 24 Suppl 1:S36–40. doi: 10.1097/BOT.0b013e3181cec4a1.
8. Laurencin C KYE-AS. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices.* 2006 Jan;3(1):49–57.
9. Blokhuis TJ, Arts, J J Chris. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury* 2011; 42 Suppl 2:S26–9. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.010.
10. De Long, William G, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89(3):649–58. doi: 10.2106/JBJS.F.00465.
11. Sammartino G, Marenzi G, Colella G, Califano L, Grivetto F, Mortellaro C. Autogenous calvarial bone graft harvest: intraoperative complications. *J Craniofac Surg* 2005; 16(2):312–9.
12. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 2003; 28(2):134–9. doi: 10.1097/01.BRS.0000041587.55176.67.
13. Athanasiou VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa CD, Megas P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med. Sci. Monit.* 2010; 16(1):BR24–31.
14. Jäger M, Westhoff B, Wild A, Krauspe R. Knochenspanentnahme am Becken. Techniken und Probleme. *Orthopade* 2005; 34(10):976–82, 984, 986–90, 992–4. doi: 10.1007/s00132-005-0839-0.
15. Khoury F, Hanser T. Mandibular bone block harvesting from the retromolar region: a 10-year prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015; 30(3):688–97. doi: 10.11607/jomi.4117.
16. Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Tröger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12(5):495–502.

17. Binger T, Hell B. Resorption of microsurgically vascularized bone grafts after augmentation of the mandible. *J Craniomaxillofac Surg* 1999; 27(2):82–5.
18. Kärcher H, Eskici A. Möglichkeiten der mikrochirurgischen Knochentransplantation im Kiefer-Gesichts-Bereich. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 1990; 35:74–6.
19. Yim KK, Wei FC. Fibula osteoseptocutaneous flap for mandible reconstruction. *Microsurgery* 1994; 15(4):245–9.
20. Linhart W. Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken 2000; (16):294–8.
21. Zimmermann CE, Börner BI, Hasse A, Sieg P. Donor site morbidity after microvascular fibula transfer. *Clin Oral Investig* 2001; 5(4):214–9.
22. Nkenke E R-TMWJS-MSWGNF. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Oct;13(5):514-21. 2002:514–21.
23. Schieker M, Mutschler W. Die Überbrückung von posttraumatischen Knochendefekten. *Bewährtes und Neues. Unfallchirurg* 2006; 109(9):715–32. doi: 10.1007/s00113-006-1152-z.
24. Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. Knochenersatz. Transplantate und Ersatzmaterialien--ein Update. *Unfallchirurg* 2012; 115(10):938–49. doi: 10.1007/s00113-012-2238-4.
25. Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noël L, Strong DM. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop* 2012; 36(3):633–41. doi: 10.1007/s00264-011-1391-7.
26. Eggli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1988; (232):127–38.
27. Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dent. Clin. North Am.* 1998; 42(3):491–503.
28. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 2011; 42 Suppl 2:S77-81. doi: 10.1016/j.injury.2011.06.014.
29. Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A et al. Knochenersatzmaterialien. *MKG-Chirurg* 2014; 7(1):53–67. doi: 10.1007/s12285-013-0394-3.
30. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2004; 362(1825):2821–50. doi: 10.1098/rsta.2004.1466.
31. Schneider S. In-Vivo-Langzeittestung der Knochenaufbaumaterialien NanoBone und Ostim bei Reossifikation von Unterkieferdefekten : eine tierexperimentelle Studie am Miniaturschwein. Rostock: Universitätsklinikum Rostock; 2009.
32. Termaat M.F., Blokhuis T. J., Den Boer F. C., Bakker F. C., Patka P., Haarman H. J. T. M. The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Bone Healing. *Osteosynthesis and Trauma Care* 2003; (11(3)):122–5.

33. Chang-Sung Kim. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 2004; (26):2501–7.
34. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2012; 40(8):706–18. doi: 10.1016/j.jcms.2012.01.002.
35. Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; 31 Suppl 4:37–47.
36. Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD. Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 58(1):36–41.
37. Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M et al. Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(2):166–72. doi: 10.1016/j.ijom.2008.11.018.
38. Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21(2):225–31.
39. Bashara H, Wohlfahrt JC, Polyzois I, Lyngstadaas SP, Renvert S, Claffey N. The effect of permanent grafting materials on the preservation of the buccal bone plate after tooth extraction: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2012; 23(8):911–7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02240.x.
40. Sabetrsekh R, Tiainen H, Lyngstadaas SP, Reseland J, Haugen H. A novel ultra-porous titanium dioxide ceramic with excellent biocompatibility. *J Biomater Appl* 2011; 25(6):559–80. doi: 10.1177/0885328209354925.
41. Hayden Gephart, Melanie G, Woodard JI, Arrigo RT, Lorenz HP, Schendel SA, Edwards, Michael S B et al. Using bioabsorbable fixation systems in the treatment of pediatric skull deformities leads to good outcomes and low morbidity. *Childs Nerv Syst* 2013; 29(2):297–301. doi: 10.1007/s00381-012-1938-y.
42. Lim TY, Poh CK, Wang W. Poly (lactic-co-glycolic acid) as a controlled release delivery device. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20(8):1669–75. doi: 10.1007/s10856-009-3727-z.
43. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110):920–6.
44. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell. Mol. Med.* 2006; 10(1):7–19.
45. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(9-10):1389–99. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0555.
46. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150(3698):893–9.
47. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 2000; 57(6):2207–14. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00081.x.
48. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2(1):1–13. doi: 10.1002/term.63.

49. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85(24):9484–8.
50. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885):1528–34.
51. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1998; (346):26–37.
52. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16(3):247–52. doi: 10.1038/nbt0398-247.
53. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF et al. 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.* 1992; 267(28):20352–62.
54. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002; (395):110–20.
55. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6.
56. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Tani Y et al. Comparative study of intramuscular and intraskeletal osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(1):34–8.
57. Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* 2004; 35(6):1316–22. doi: 10.1016/j.bone.2004.08.020.
58. Pecina M, Vukicevic S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. *Int Orthop* 2007; 31(6):719–20. doi: 10.1007/s00264-007-0425-7.
59. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter, David J J, Sier, Cornelis F M, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 2011; 35(9):1271–80. doi: 10.1007/s00264-011-1301-z.
60. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog. Growth Factor Res.* 1989; 1(4):267–80.
61. Hillger F, Herr G, Rudolph R, Schwarz E. Biophysical comparison of BMP-2, ProBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(15):14974–80. doi: 10.1074/jbc.M414413200.
62. Sun PD, Davies DR. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1995; 24:269–91. doi: 10.1146/annurev.bb.24.060195.001413.
63. Hillger F. Rekombinante Herstellung und biophysikalische Charakterisierung von proBMP-2, BMP-2 und dem BMP-2 Propeptid [Dissertation]: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2005.
64. Dijke P ten, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(5):265–73. doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.008.
65. Rao SM, Ugale GM, Warad SB. Bone morphogenetic proteins: periodontal regeneration. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3):161–8. doi: 10.4103/1947-2714.109175.

66. Hauburger A, Einem S von, Schwaerzer GK, Buttstedt A, Zebisch M, Schräml M et al. The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J.* 2009; 276(21):6386–98. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07361.x.
67. Di Chen, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4):233–41. doi: 10.1080/08977190412331279890.
68. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Dijke P ten. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267(24):6954–67.
69. Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N et al. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 3:44–51.
70. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1):50–83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
71. Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4:16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9.
72. Lai C-F, Cheng S-L. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277(18):15514–22. doi: 10.1074/jbc.M200794200.
73. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 220(2):366–71. doi: 10.1006/bbrc.1996.0411.
74. Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A et al. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2002; 94(2):185–94.
75. Vallejo LF, Rinas U. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol Bioeng* 2004; 85(6):601–9. doi: 10.1002/bit.10906.
76. Rudolph R, Schwarz, E. Herr, G. & Hillger, F., inventors. Production of Recombinant BMP-2 International Patent Application WO 0244203 A.
77. Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 2004; 11(17):1312–20. doi: 10.1038/sj.gt.3302298.
78. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *Journal of biomedical materials research* 10.1994; 28(10):1149–56.
79. Toriumi DM, O'Grady K, Horlbeck DM, Desai D, Turek TJ, Wozney J. Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long-term follow-up in a canine model. *Laryngoscope* 1999; 109(9):1481–9. doi: 10.1097/00005537-199909000-00023.

80. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1993; (293):317–26.
81. Mori M, Isobe M, Yamazaki Y, Ishihara K, Nakabayashi N. Restoration of segmental bone defects in rabbit radius by biodegradable capsules containing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Journal of biomedical materials research* 2000; 50(2):191–8.
82. Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008; 66(4):616–24. doi: 10.1016/j.joms.2007.11.021.
83. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997; 17(1):11–25.
84. Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB et al. De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63(12):1693–707. doi: 10.1016/j.joms.2005.08.018.
85. Burkus JK, Gornet MF, Dickman CA, Zdeblick TA. Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech* 2002; 15(5):337–49.
86. Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* 2005; 76(4):605–13. doi: 10.1902/jop.2005.76.4.605.
87. Hanisch O, Tatakis DN, Rohrer MD, Wöhrle PS, Wozney JM, Wikesjö UM. Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subantral augmentation procedures in nonhuman primates. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12(6):785–92.
88. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 2007; 31(6):729–34. doi: 10.1007/s00264-007-0418-6.
89. FDA. InFuse Bone Graft/LT Cage Lumbar Tapered Fusion Device; 2002. Verfügbar unter: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cftopic/pma/pma.cfm?num=p000058>.
90. FDA. Infuse bone graft Tibia. USA; 2004. Verfügbar unter: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cftopic/pma/pma.cfm?num=p000054>.
91. FDA. Infuse bone graft Maxillofacial. USA; 2007. Verfügbar unter: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cftopic/pma/pma.cfm?num=p050053>.
92. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 2016; 22(4):284–97. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357.
93. Nguyen V, Meyers CA, Yan N, Agarwal S, Levi B, James AW. BMP-2-induced bone formation and neural inflammation. *J Orthop* 2017; 14(2):252–6. doi: 10.1016/j.jor.2017.03.003.
94. Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; 67(9):1947–60. doi: 10.1016/j.joms.2009.04.085.

95. Shields, Lisa B E, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J et al. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 2006; 31(5):542–7. doi: 10.1097/01.brs.0000201424.27509.72.
96. Smucker JD, Rhee JM, Singh K, Yoon ST, Heller JG. Increased swelling complications associated with off-label usage of rhBMP-2 in the anterior cervical spine. *Spine* 2006; 31(24):2813–9. doi: 10.1097/01.brs.0000245863.52371.c2.
97. Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2005; 66:239–85. doi: 10.1016/S0070-2153(05)66008-5.
98. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol.* 2001; 19(7):255–65.
99. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46(2):193–202.
100. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1999; (367 Suppl):S95-106.
101. Boyne PJ, Nath R, Nakamura A. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36(2):84–90.
102. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* 2010; 3(107):mr1. doi: 10.1126/scisignal.3107mr1.
103. Hollinger, Uludag, Winn. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 31(3):303–18.
104. Ripamonti U, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998; 101(1):227–39.
105. Yoshida K, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Tani Y et al. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 1998; 26(2):112–5.
106. Kim C-S, Kim J-I, Kim J, Choi S-H, Chai J-K, Kim C-K et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 2005; 26(15):2501–7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.015.
107. Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C et al. Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39(1):54–64. doi: 10.1016/j.jcms.2010.03.016.
108. Hänsele P, Ehrbar M, Kruse A, Fischer E, Schibli R, Ghayor C et al. Delivery of BMP-2 by two clinically available apatite materials: in vitro and in vivo comparison. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(2):628–38. doi: 10.1002/jbm.a.35211.
109. Yuasa M, Yamada T, Taniyama T, Masaoka T, Xuetao W, Yoshii T et al. Dexamethasone enhances osteogenic differentiation of bone marrow- and muscle-derived stromal cells and augments ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *PLoS ONE* 2015; 10(2):e0116462. doi: 10.1371/journal.pone.0116462.

110. Lin H, Tang Y, Lozito TP, Oyster N, Wang B, Tuan RS. Efficient in vivo bone formation by BMP-2 engineered human mesenchymal stem cells encapsulated in a projection stereolithographically fabricated hydrogel scaffold. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1):254. doi: 10.1186/s13287-019-1350-6.
111. Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(5):514–21.
112. Scheerlinck LME, Muradin MSM, van der Bilt A, Meijer GJ, Koole R, van Cann EM. Donor site complications in bone grafting: comparison of iliac crest, calvarial, and mandibular ramus bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013; 28(1):222–7. doi: 10.11607/jomi.2603.
113. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1996; (329):300–9. doi: 10.1097/00003086-199608000-00037.
114. Koolen M, Longoni A, van der Stok J, van der Jagt O, Gawlitta D, Weinans H. Complete regeneration of large bone defects in rats with commercially available fibrin loaded with BMP-2. *Eur Cell Mater* 2019; 38:94–105. doi: 10.22203/eCM.v038a08.
115. Maisani M, Sindhu KR, Fenelon M, Siadous R, Rey S, Mantovani D et al. Prolonged delivery of BMP-2 by a non-polymer hydrogel for bone defect regeneration. *Drug Deliv Transl Res* 2018; 8(1):178–90. doi: 10.1007/s13346-017-0451-y.
116. Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, D'Augusta D, Li X, Stevens M et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A(8):1219–30.
117. Mumcuoglu D, Fahmy-Garcia S, Ridwan Y, Nicke J, Farrell E, Kluijtmans SG et al. Injectable BMP-2 delivery system based on collagen-derived microspheres and alginate induced bone formation in a time- and dose-dependent manner. *Eur Cell Mater* 2018; 35:242–54. doi: 10.22203/eCM.v035a17.
118. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 2000; 71(8):1241–57. doi: 10.1902/jop.2000.71.8.1241.
119. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (230):257–65.
120. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (236):249–57.
121. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). *Clin Orthop Relat Res* 1990; (250):234–40.
122. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Resistant nonunions and partial or complete segmental defects of long bones. Treatment with implants of a composite of human bone morphogenetic protein (BMP) and autolyzed, antigen-extracted, allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (277):229–37.

123. Boyne PJ. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2):S146-50.
124. Shahlaie K, Kim KD. Occipitocervical fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2: adverse effects due to tissue swelling and seroma. *Spine* 2008; 33(21):2361-6. doi: 10.1097/BRS.0b013e318183971d.
125. Woo EJ. Adverse events reported after the use of recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012; 70(4):765-7. doi: 10.1016/j.joms.2011.09.008.
126. Jeon O, Song SJ, Yang HS, Bhang S-H, Kang S-W, Sung MA et al. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369(2):774-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.099.
127. La W-G, Kang S-W, Yang HS, Bhang SH, Lee SH, Park J-H et al. The efficacy of bone morphogenetic protein-2 depends on its mode of delivery. *Artif Organs* 2010; 34(12):1150-3. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00988.x.
128. Krishnan L, Priddy LB, Esancy C, Klosterhoff BS, Stevens HY, Tran L et al. Delivery vehicle effects on bone regeneration and heterotopic ossification induced by high dose BMP-2. *Acta Biomater* 2017; 49:101-12. doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.012.
129. Agrawal V, Sinha M. A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2017; 105(4):904-25. doi: 10.1002/jbm.b.33599.
130. Smith RAA, Murali S, Rai B, Lu X, Lim ZXH, Lee JLL et al. Minimum structural requirements for BMP-2-binding of heparin oligosaccharides. *Biomaterials* 2018; 184:41-55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.056.
131. Chen R, Yu Y, Zhang W, Pan Y, Wang J, Xiao Y et al. Tuning the bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with surface immobilization strategies. *Acta Biomater* 2018; 80:108-20. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.011.
132. Terauchi M, Inada T, Kanemaru T, Ikeda G, Tonegawa A, Nishida K et al. Potentiating bioactivity of BMP-2 by polyelectrolyte complexation with sulfonated polyrotaxanes to induce rapid bone regeneration in a mouse calvarial defect. *J Biomed Mater Res A* 2017; 105(5):1355-63. doi: 10.1002/jbm.a.36016.
133. Seo B-B, Koh J-T, Song S-C. Tuning physical properties and BMP-2 release rates of injectable hydrogel systems for an optimal bone regeneration effect. *Biomaterials* 2017; 122:91-104. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.016.
134. Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, Mark K von der, Wiltfang J et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther.* 2003; 10(13):1089-98. doi: 10.1038/sj.gt.3301960.
135. Cowan CM, Shi Y-Y, Aalami OO, Chou Y-F, Mari C, Thomas R et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22(5):560-7. doi: 10.1038/nbt958.
136. Beck S, Le Good JA, Guzman M, Ben Haim N, Roy K, Beermann F et al. Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 2002; 4(12):981-5. doi: 10.1038/ncb890.
137. Cesnjaj M, Stavljenic A, Vukicevic S. In vivo models in the study of osteopenias. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29(4):211-9.

138. Simmons DJ, Kunin AS. Development and healing of rickets in rats. II. Studies with tritiated proline. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1970; 68:261–72.
139. Huh J-B, Yang J-J, Choi K-H, Bae JH, Lee J-Y, Kim S-E et al. Effect of rhBMP-2 Immobilized Anorganic Bovine Bone Matrix on Bone Regeneration. *Int J Mol Sci* 2015; 16(7):16034–52. doi: 10.3390/ijms160716034.
140. Schmitt C, Lutz R, Doering H, Lell M, Ratky J, Schlegel KA. Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24(4):450–60. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02351.x.
141. Einem S von, Erler S, Bigl K, Frerich B, Schwarz E. The pro-form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2. *Growth Factors* 2011; 29(2-3):63–71. doi: 10.3109/08977194.2011.561798.
142. Xiong C, Daubs MD, Montgomery SR, Aghdasi B, Inoue H, Tian H et al. BMP-2 adverse reactions treated with human dose equivalent dexamethasone in a rodent model of soft-tissue inflammation. *Spine* 2013; 38(19):1640–7. doi: 10.1097/BRS.0b013e31829cf348.
143. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011; 11(6):471–91. doi: 10.1016/j.spinee.2011.04.023.
144. Lee K-B, Taghavi CE, Song K-J, Sintuu C, Yoo JH, Keorochana G et al. Inflammatory characteristics of rhBMP-2 in vitro and in an in vivo rodent model. *Spine* 2011; 36(3):E149-54. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181f2d1ec.
145. Suckow. Mark A., Weisbroth SH, Franklin Craig L., Hrsg. *The Laboratory Rat: Medical Management and Diagnostic Approaches*: Elsevier; 2006.
146. Azzi JL, Thabet C, Azzi AJ, Gilardino MS. Complications of tissue expansion in the head and neck. *Head Neck* 2019. doi: 10.1002/hed.26017.
147. Dzonov B, Daskalov O, Noveski L, Zhivadinovik J, Isjanovska R. Tissue expansion in limbs vs other body regions. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2014; 35(1):219–24.
148. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29(1):62–6.
149. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994; 127(6 Pt 1):1755–66. doi: 10.1083/jcb.127.6.1755.
150. Raiche AT, Puleo DA. Cell responses to BMP-2 and IGF-I released with different time-dependent profiles. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69(2):342–50. doi: 10.1002/jbm.a.30006.
151. Yeh L-CC, Zavala MC, Lee JC. Osteogenic protein-1 and interleukin-6 with its soluble receptor synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2002; 190(3):322–31. doi: 10.1002/jcp.10064.
152. Einem S von. *Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2 - Präklinische Untersuchungen zur Anwendung als Wirkstoff zur Knochenheilung [Dissertation]*. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität; 2011.

153. Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 2003; 18(11):2060–8. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.11.2060.
154. Hsu Y-L, Chang J-K, Tsai C-H, Chien T-TC, Kuo P-L. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(4):504–14. doi: 10.1016/j.bcp.2006.10.020.
155. Zwang Y, Yarden Y. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic* 2009; 10(4):349–63. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00870.x.
156. Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergemann JH, Hassel S et al. Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* 2006; 26(20):7791–805. doi: 10.1128/MCB.00022-06.
157. Fiedler J, Röderer G, Günther K-P, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Biochem.* 2002; 87(3):305–12. doi: 10.1002/jcb.10309.
158. Hauburger A. Die Pro-Form des Knochenwachstumsfaktors BMP-2: Charakterisierung der Rezeptorbindung und Identifizierung einer Subdomäne [Dissertation]. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität; 2010.
159. Robin BN, Chaput CD, Zeitouni S, Rahm MD, Zerris VA, Sampson HW. Cytokine-mediated inflammatory reaction following posterior cervical decompression and fusion associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: a case study. *Spine* 2010; 35(23):E1350-4. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181e85756.

## 8 Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abbildung 1:</b> Die qualitative Beurteilung von Knochenersatzmaterialien .....	6
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachte Darstellung der Biosynthese anhand eines BMP-2 Monomers .....	11
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der BMP-Signalweges .....	13
<b>Abbildung 4:</b> BioOss Block dargestellt im Microcomputertomographen .....	18
<b>Abbildung 5:</b> Herstellung der HA-Scaffolds .....	19
<b>Abbildung 6:</b> Operationsablauf der subkutanen Implantation.....	21
<b>Abbildung 7:</b> Entnahme Präparat .....	22
<b>Abbildung 8:</b> Halbierung der entnommenen BioOss Implantate und Festlegung der zwei separaten Schnittebenen.....	23
<b>Abbildung 9:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B, Versuchszeitraum 12 Wochen.....	24
<b>Abbildung 10:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B, Versuchszeitraum 12 Wochen.....	24
<b>Abbildung 11:</b> Korrespondierende BioOss Präparate der Gruppe B, Versuchszeitraum 3 Wochen.....	25
<b>Abbildung 12:</b> Transplantatentnahme A) Explantation eines BioOss Blocks aus der dorsalen Hautkammer. Gut zu erkennen ist die bindegewebige Kapsel und die fixierte Haut. B) Ansicht des entnommenen Implantats.....	32
<b>Abbildung 13:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle), Versuchszeitraum 3 Wochen.....	33
<b>Abbildung 14:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle), Versuchszeitraum 3 Wochen.....	33
<b>Abbildung 15:</b> BioOss Block, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe A (Kontrolle) Versuchszeitraum 6 und 12 Wochen .....	34
<b>Abbildung 16:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 3 Wochen.....	35
<b>Abbildung 17:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	35
<b>Abbildung 18:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	36
<b>Abbildung 19:</b> TRAP Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	36
<b>Abbildung 20:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe B (BioOss+BMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen.....	37

---

<b>Abbildung 21:</b> Knochenbildung BMP-2.....	37
<b>Abbildung 22:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 3 Wochen.....	38
<b>Abbildung 23:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	39
<b>Abbildung 24:</b> Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	39
<b>Abbildung 25:</b> BioOss, TRAP Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 6 Wochen.....	40
<b>Abbildung 26:</b> BioOss, Hämatoxylin-Eosin Färbung, Gruppe C (BioOss+proBMP-2), Versuchszeitraum 12 Wochen.....	40
<b>Abbildung 27:</b> Knochenbildung proBMP-2.....	41

## 9 Diagrammverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Diagramm 1:</b> Durchschnittliche Gewichtszunahme in g und % der Versuchstiere innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Beobachtungszeiträumen.....	29
<b>Diagramm 2:</b> Entwicklung der durchschnittlichen Gewichtszunahme (absolut) der Versuchstiere über den gesamten Versuchsablauf von 12 Wochen .....	30
<b>Diagramm 3:</b> Zeitliche Entwicklung der summierten Knochenflächen (absolut) sowie entsprechende Standardabweichungen .....	43
<b>Diagramm 4:</b> Summe der absoluten Knochenfläche der drei Gruppen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten mit entsprechenden Standardabweichungen.....	43
<b>Diagramm 5:</b> Zeitliche Entwicklung der relativen Knochenbildung sowie entsprechende Standardabweichungen während des Versuchsablaufs.....	45
<b>Diagramm 6:</b> Darstellung der relativen Knochenbildung sowie entsprechende Standardabweichungen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten. ...	45

## 10 Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Tabelle 1:</b> Klassifikation der Ersatzmaterialien anhand ihrer Zusammensetzung.....	7
<b>Tabelle 2:</b> Einteilung der synthetischen und organischen Knochenersatzmaterialien nach Stoffklassen mit den jeweiligen materialspezifischen Eigenschaften.....	9
<b>Tabelle 3:</b> Klassifikation der BMP in Subkategorien gemäß Funktion und Aminosäuresequenzhomologie .....	10
<b>Tabelle 4:</b> Versuchsplanung .....	17
<b>Tabelle 5:</b> Dosierung der intraperitonealen Narkose.....	20
<b>Tabelle 6:</b> Klassifikation von aufgetretenen Ödemen und Verletzungen .....	26
<b>Tabelle 7:</b> Absolute Frequenz der Ödeme an der Implantationsstelle innerhalb der Versuchsgruppen A, B und C und anhand der jeweiligen Beobachtungsintervalle 3, 6 und 12 Wochen .....	31
<b>Tabelle 8:</b> Knochenneubildung (absolut) der Gruppe B (BioOss+BMP-2).....	42
<b>Tabelle 9:</b> Knochenneubildung (absolut) der Gruppe C (BioOss+proBMP-2).....	42
<b>Tabelle 10:</b> Relative Knochenneubildung (Quotient aus MW Knochenfläche und MW gesamter Blockfläche) der Gruppe B mit entsprechender Standartabweichung für die jeweiligen Beobachtungszeiträume 3, 6 und 12 Wochen.....	44
<b>Tabelle 11:</b> Relative Knochenneubildung (Quotient aus MW Knochenfläche und MW gesamter Blockfläche) der Gruppe C mit entsprechender Standartabweichung für die jeweiligen Beobachtungszeiträume 3, 6 und 12 Wochen.....	44

## 11 Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
BISC	<u>B</u> MP <u>i</u> nduced <u>s</u> ignaling <u>c</u> omplex
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Co-Smad	common mediator Smad
EZM	Extrazellulärmatrix
FDA	United States Food and Drug Administration
HA	Hydroxyapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
KEM	Knochenersatzmaterialien
nmol	nanomol
MAD	mothers against decapentaplegic
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK TAK-1	TGF- $\beta$ -activated kinase 1
PFC	preformed complex
R-Smad	receptor regulated Smad
Sma	<u>s</u> mall <u>b</u> ody <u>s</u> ize
TAB1	TGF- $\beta$ -activated binding protein
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Christian Dinu

Geburtsdatum: 12.03.1978

Geburtsort: Hilden

Familienstand: verheiratet

### Schulischer Werdegang

1984 – 1997 Grundschule und Gymnasium in Oberhausen

08 – 12/1996 Satellite High School Melbourne, Florida, USA

02/1998 – 03/1999 Zivildienst

### Universitärer Werdegang

1999 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

2006 – 2010 Studium der Zahnmedizin an der Universität Rostock

### Beruflicher Werdegang

07/2020 Anstellung in der Praxis Dr. Dr. Rasche in Herne

12/2019 Oberarzt Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen am Klinikum Oldenburg

10/2017 Zusatzbezeichnung plastische und ästhetische Operationen

04/2017 Gastarzt Plastic and Reconstructive Surgery, Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan - Chefarzt: Prof. Fu-Chan Wei

08/2015 Ernennung zum Oberarzt der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am Klinikum Oldenburg

06/2015 Facharzt für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

09/2014 – 05/2015 Assistenzarzt Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen am Klinikum Oldenburg – Chefarzt: PD Lei Li

05/2013 – 08/2014 Vorbereitungsassistent Zahnkultur Berlin, Standort Karlshorst, ÜBAG

01/2013 – 08/2014 Assistenzarzt Klinik für plastische und ästhetische Chirurgie Privatklinik Sanssouci, Berlin/Potsdam - Chefarzt: Dr. Krueger

08/2008 – 10/2008 Gastarzt Plastic, Reconstructive and Cosmetic Surgery University of Illinois at Chicago - Chefarzt: Prof. Mimis Cohen

08/2007 – 12/2012 Assistenzarzt Klinik für Mund-, Kiefer- und plastischen Gesichtschirurgie der Universität Rostock - Chefarzt: Prof. Gundlach und Prof. Frerich

- 04/2005 – 03/2006 Praktisches Jahr an der Universität Rostock Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie
- Shanghai Second Medical University, Ruijin Hospital, China
- Department of Gastroenterology
  - Department of Minimal Invasive Surgery

#### Vorträge / Kongresse

- Vortrag „*Knöchernen Induktion mit proBMP-2 versus reifem BMP-2 in HA-Scaffolds*“ 63. DGMKG 2012 Freiburg
- Vortrag „*Ossifikation von Gefäßstielen nach Rekonstruktion mittels mikrochirurgischen Fibulatransplantaten*“ 65. DGMKG 2014 Stuttgart
- Vortrag „*Dynamische Mundwinkelanhebung durch komplette Transposition des M. temporalis*“ 19. ÖGMKG 2015 Mayrhofen, Österreich
- Mitorganisation der „*Conference of Taiwan German Academic Communication*“ Wang Fang Hospital 2016 Taipei, Taiwan
- Vortrag „*The microsurgical end-to-side continuous suture technique for free flap reconstruction in the head and neck. A safe and favorable procedure?*“ 23. ICOMS 2017 Hong Kong, China
- Vortrag „*The subscapular System*“ Flaps Dissection Workshop Tzu Chi University Hualien, Taiwan 2017
- Faculty „*1. TAOMS Cadaver Hands-on Workshop*“ Tzu Chi University Hualien, Taiwan 2017
- Vortrag „*Lengthening Temporalis Myoplasty for Dynamic Lip Reanimation*“ TAOMS, Taiwan 2018
- Vortrag „*Surgical Reconstruction Options with Flaps based on the Subscapular System*“ Faculty of Dentistry Mahidol University Bangkok, Thailand 2018
- Vortrag „*Klinische Fallbeispiele der mikrochirurgischen Defektdeckung nach ausgedehnten Angiosarkomen der Kopfhaut.*“ 49. DÖSAG Jahrestagung Rostock 2018

Publikationen

- J Craniomaxillofac Surg. 2015 Dec;43(10):1948-51 *Etiology and injury patterns of maxillofacial fractures from the years 2010 to 2013 in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany: A retrospective study of 409 patients.* Schneider D, Kämmerer PW, Schön G, Dinu C, Radloff S, Bschorer R.
- Shock. 2010 Feb;33(2):189-96. *A comprehensive study of survival, tissue damage, and neurological dysfunction in a murine model of cardiopulmonary resuscitation after potassium-induced cardiac arrest.* Menzebach A, Bergt S, von Waldthausen P, Dinu C, Nöldge-Schomburg G, Vollmar B.

Mülheim, den 03.11.2020

Christian Dinu

### 13 Danksagung

Herrn Prof. Dr.med. Dr. med. dent. Frerich danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ununterbrochene Betreuung über die lange Zeit.

Mein Dank gilt Herrn Ansgar Seyfferth für die freundlichen Unterstützung bei der statistischen Analyse der Untersuchungsergebnisse.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Institutes für Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät Rostock (Direktorin: Prof. Dr.med. B. Vollmar) für die Hilfe bei der Betreuung der Tiere.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des experimentellen Forschungslabors der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie für die Anfertigung des umfangreichen Probematerials. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Daniel Wolter für seine Unterstützung beim Umgang mit dem digitalen Mikroskop sowie der Unterstützung bei der digitalen Bearbeitung des Probematerials.

Ebenso danke Ich Herrn Prof. CTC Mario Frerker des Taiwan-Do Institutes für die moralische Unterstützung bei der Bearbeitung dieser Promotionsarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater und meiner Frau Bettina für ihre ununterbrochene Unterstützung und Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit.

## **14 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht haben.

Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Mülheim an der Ruhr, den 03.11.2020

Christian Dinu

## 15 Thesen

### **Vergleichende in vivo-Studie zur osteoinduktiven Wirkung von BMP-2 und seiner Vorstufe proBMP-2 in bovinem Knochenersatzmaterial BioOss**

Thesen  
zur  
Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Universität Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich

von Christian Michael Dinu  
geboren am 12.03.1978 in Hilden  
aus Mülheim an der Ruhr

1. In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ergeben sich bei etwa 15 % aller Eingriffe am Skelettsystem der Bedarf an Knochenersatz zur Wiederherstellung von Form und Funktion. Prinzipiell werden dabei Knochentransplantate oder Knochenersatzmaterialien zur anatomischen Wiederherstellung eingebracht.
2. Das autologe Knochentransplantat gilt als Goldstandard zur Wiederherstellung von Knochendefekten da es über osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Eigenschaften verfügt, ohne immunogene Reaktionen hervorzurufen.
3. Die Gewinnung von autologem Knochengewebe erfordert ein zweites Operationsfeld und ist mit Komplikationen behaftet.
4. Vollsynthetische, allogene und xenogene Knochenersatzmaterialien gelten als gebräuchlichste Alternative zum autologen Knochentransplantat.
5. Zielmaßgabe aller Knochenersatzmaterialien sind dabei die biomechanischen Eigenschaften des natürlichen Knochens zu reproduzieren.
6. Derzeit verwendete Knochenersatzmaterialien verfügen allerdings über eine zu vernachlässigende osteoinduktive Kapazität und dienen im Wesentlichen als extrazelluläre Matrix zur Stabilisierung eines ossären Defektes (osteokonduktive Wirkung).
7. Tissue Engineering von Knochen basiert auf dem Prinzip der regenerativen Wiederherstellung von Knochengewebe unter Verwendung von knochenspezifischen Wachstumsfaktoren auf Trägermaterialien. Diese bioaktive Komposite sind im Allgemeinen osteokonduktive Trägermaterialien, die im Vorfeld mit morphogenen Wachstumsfaktoren beschichtet wurden und infolge der vermittelten osteoinduktiven Kapazität eine lokale Knochenregeneration bewirken.
8. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie und zählen zu den bedeutsamsten knochenbildenden Wachstumsfaktoren.
9. BMP-2 veranlasst zunächst die Chemotaxis und Proliferation von perivaskulär vorkommenden mesenchymalen Vorläuferzellen und initiiert die Differenzierung dieser Zellen zu Chondroblasten und Osteoblasten, welche im Verlauf über den Vorgang der enchondralen und desmalen Ossifikation neuen Knochen induzieren.
10. Die Stimulation durch BMP-2 führt auch von primär nicht osteogenen mesenchymalen Zellen, selbst in nichtossifizierendem Gewebe, zu einer Differenzierung in Chondro- und Osteoblasten mit konsekutiver Ausbildung von Knochengewebe (ektopye Knocheninduktion).
11. BMP-2 verfügt neben BMP-7 über die ausgeprägteste osteoinduktive Kapazität.
12. BMP-2 wird als Vorläufer- bzw. Pro-Protein synthetisiert. Dieses besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einem Propeptid und einer C-terminalen bestehenden Polypeptidkette - dem eigentlichen wirksamen Zytokin.

13. Nach proteolytischer Abspaltung des Propeptids vom C-terminalen Anteil erfolgt die Sekretion des reifen BMP-2 in den Extrazellularraum.
14. Die Signalwirkung von BMP-2 erfolgt über die Interaktion von transmembranösen Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren (BMPR-IA und BMPR-II). In Abhängigkeit der Rezeptor-Liganden-Konstellation beider Moleküle erfolgt ein SMAD-abhängiger Signalweg (PFC= preformed complex) von einem sequenziellen Bindungsmodus des p38-MAPK abhängigen Signalweg.
15. Derzeit besteht eine klinische Zulassung zur Verwendung von BMP-2 auf einem bovinen Kollagenschwamm als Alternative zum autologen Knochentransplantat für unterschiedliche Behandlungsindikationen in der Neuro-, Unfall- und kraniofazialen Chirurgie.
16. Seit Zulassung wurden bis zum Jahr 2017 mehr als 10.000 Berichte über rhBMP-2 assoziierte Nebenwirkungen verfasst. Dabei traten in etwa 75 % der Fälle inflammatorische Komplikation in der Region der Applikation auf. Dokumentiert wurden Ödeme, Erytheme, Schwellungen und Schmerzen mit mittelgradigem Verlauf bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen und sogar letalem Ausgang.
17. Ursache dieser lebensbedrohlichen Komplikationen waren mitunter das Auftreten der Ödeme und Schwellungen im Bereich der Atemwege nach Verwendung von BMP-2 in der kraniofazialen Region, was eine ernsthafte Einschränkung des Wachstumsfaktors für die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie darstellt.
18. Problem bei der Anwendung von Bone Morphogenetic Protein sind die initial hohen Anfangskonzentrationen des Zytokins (sog. burst release) im Gewebe, welche aufgrund der hohen initialen Freisetzungskonzentration Ursache der beschriebenen Nebenwirkungen sind.
19. Die initial hohen Konzentrationen des Wachstumsfaktors können nicht äquivalent kompensiert werden, da anfangs noch keine hinreichende Anzahl an BMP-2 sensiblen Zellen rekrutiert wurden.
20. Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung zur Vermeidung von Nebenwirkungen und Steigerung der Effektivität von BMP-2 liegen in der Herstellung einer graduellen und prolongierten Freisetzungskinetik am Implantationsort entgegen der Freisetzungskinetik des momentan zugelassenen Wirkstoffes. Dabei fokussieren sich aktuelle Untersuchungen vorwiegend auf eine chemische Strukturveränderung von BMP-2 sowie die Modifikation von unterschiedlichen Trägermaterialien.
21. Grundlagen dieser Studie zur Erlangung einer prolongierten Freisetzung des Wachstumshormons war die bereits nachgewiesene knocheninduzierende Wirkung von proBMP-2, sowie eine sukzessive Prozessierung des prämaternen Faktors zum murenen BMP-2, wie sie bereits für phylogenetisch ähnliche Wachstumsfaktoren in der Literatur beschrieben worden ist. Infolge der biologischen Umsetzung des prämaternen Faktors wäre eine

graduelle Generierung von BMP-2 im Gewebe zu erwarten. Der sukzessive Konzentrationsanstieg des Wachstumsfaktors würde eine analoge Rekrutierung und Proliferation von BMP-2-sensiblen mesenchymalen Zielzellen am Implantationsort ermöglichen und somit eine der BMP-2-Konzentration äquivalente Umsetzung der osteoinduktiven Signale begünstigen.

22. Unter der Herstellung einer graduellen Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors wäre demnach die Wiederherstellung von Knochengewebe unter Reduktion von inflammatorischen Nebenwirkungen zu erwarten. Angelehnt an diese Erkenntnisse erfolgte die Verwendung von proBMP-2 als möglicher alternativer Wirkstoff zur Erzeugung einer harmonischeren Knocheninduktion.
23. Ziel der Arbeit war es proBMP-2 als mögliches neues verträglicheres Präparat im Vergleich zum konventionell verwendeten BMP-2 für die Therapie von Knochendefekten zu identifizieren.
24. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob durch die Verwendung von proBMP-2 im Vergleich zu BMP-2 innerhalb eines bovinen Hydroxylapatit-Scaffolds (BioOss) in einem ektopen Tiermodell entsprechend effektiv Knochengewebe induziert werden konnte. Dabei galten induzierte Knochenflächen (absolut und relativ) innerhalb der Scaffolds als Maßstab zur Beurteilung der osteoinduktiven Kapazität der beiden Proteinformen.
25. Als zweiter zu untersuchender Aspekt dieser Studie galt die Evaluation von inflammatorischen Komplikationen in Form von Ödemen und Verletzungen an der Implantationsstelle zur Beurteilung des Nebenwirkungsprofils der jeweiligen Wirkstoffe.
26. 54 Sprague-Dawley Versuchsratten wurde äquimolare Konzentration von BMP-2 bzw. proBMP-2 auf einem bovinen Hydroxylapatit-Scaffold subkutan implantiert. Tiere der Gruppe B erhielten BioOss+BMP-2 und Tiere der Gruppe C BioOss+proBMP-2. Als Kontrolle erhielten Tiere der Gruppe A Scaffolds ohne Wachstumsfaktoren. Die Versuchszeiträume betragen 3, 6 und 12 Wochen mit jeweils 6 Tieren pro Zeitpunkt. Die histomorphometrische und histologische Auswertung erfolgte anhand digitalisierter Paraffinschnitte. Zur Beurteilung des Nebenwirkungsprofils der jeweiligen Wirkstoffe erfolgte die Dokumentation und Klassifikation inflammatorischer Ereignisse in Form von Ödemen und Verletzungen an der Implantationsstelle sowie die Gewichtsveränderung der Tiere zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten.
27. Innerhalb der Präparate der Kontrollgruppe (BioOss-Scaffold ohne Wachstumsfaktor) konnte in keinem der Beobachtungszeiträume eine Knochenneubildung nachgewiesen werden.

28. BMP-2 konnte für alle Beobachtungszeiträume eine insgesamt größere absolute Knochenfläche im Vergleich zu proBMP-2 generieren, wobei der Unterschied nur für den Beobachtungszeitraum der 3. Woche statistisch signifikant war.
29. Auch die relative Knochenneubildung (Verhältnis Knochenneubildung zum Implantat) war für BMP-2 für alle Zeiträume größer, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant war.
30. Die Unterschiede der Knochenneubildung beider Proteinformen war auf die heterogene Affinität zu den spezifischen BMPRI- und BMPRII- Rezeptoren zurückzuführen.
31. ProBMP-2 zeigte keine Interaktion mit dem BMPRII-Rezeptor was zu einer verzögerten Internalisierung des prämaternen Faktors führte. Die Aufnahme von BMP-2 erreichte innerhalb von 2 h ein Plateau. Demgegenüber erreichte die Internalisierung von proBMP-2 erst nach 15 h ein dieses Plateau.
32. Der maßgebliche Unterschied zeigte sich nachfolgend in der Metabolisierung der beiden Faktoren. Die Prozessierung von proBMP-2 zum reifen BMP-2 benötigte nach der Aufnahme in die Zielzelle 5 Tage. ProBMP-2 verfügte über keine intrinsische osteoinduktive Kapazität, sondern bedurfte der beschriebenen proteolytischen Umwandlung.
33. Die verzögerte Internalisierung und prolongierte Metabolisierung von proBMP-2 bedingte somit einen verspäteten Wirkungseintritt des unreifen Zytokins. Demgegenüber generierte die initiale biologische Aktivität des murenen Faktors diesem einen zeitlichen Vorsprung, welcher sich in der größeren Fläche an frischem Knochengewebe widerspiegelte.
34. Aufgrund der beschriebenen zeitlich verzögerten Prozessierung des prämaternen Faktors konnte diesem eine prolongierte und graduelle Freisetzungskinetik zugeschrieben werden.
35. Es konnte eine osteoinduktive Wirkung von proBMP-2 erstmals für eine Dauer von 12 Wochen nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass proBMP-2 über eine ausreichend lange Halbwertszeit verfügt und eine ergänzende Applikation des Wirkstoffs nicht notwendig zu sein scheint.
36. Die Ergebnisse dieser Studie sprechen für eine graduelle und prolongierte Freisetzung von BMP-2 durch die Verabreichung von proBMP-2 im Kleintiermodell.
37. Es konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Auftreten von Ödemen an der Implantationsstelle und der Gruppenzugehörigkeit, weder für alle 54 Tiere zusammen noch für die Beobachtungszeiträume getrennt, nachgewiesen werden.
38. Es zeigten sich dennoch qualitative Unterschiede bezüglich der Ödembildung zwischen den Gruppen. Ödeme innerhalb der Gruppe B (BMP-2+BioOss) traten bereits am 2. und 3. postoperativen Tag (Beobachtungszeitraum 3. Woche) an der Implantationsstelle auf. Demgegenüber trat das einzige Ödem an der Implantationsstelle in der Gruppe C, im Verhältnis zum Implantationszeitpunkt, erst deutlich verzögert auf (40. Tag post implantationem).

39. Unterschiedliche Studien zur Beurteilung des Nebenwirkungsprofils von BMP-2 demonstrierten, analog zu Ergebnissen dieser Studie, das Auftreten BMP-2 induzierter Ödeme während des 2. postoperativen Tags.
40. Ergänzend zeigten Tiere der BMP-2-Gruppe innerhalb des Zeitraums in dem es zur Ödembildung kam eine signifikant geringe Gewichtszunahme im Vergleich zu den Versuchstieren der Gruppe A (Kontrolle) und C (proBMP-2).
41. Unter Berücksichtigung der ermittelten signifikant geringeren Gewichtszunahme der BMP-2-Tiere und der zeitlichen Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenem Verlauf BMP-2-korrelierender Ödeme, kann durchaus eine gewisse Assoziation zwischen der Anwendung von BMP-2 und den beobachteten Ödemen an der Implantationsstelle dieser Studie vermutet werden.
42. Im Hinblick auf die Fragestellung zur Verwendung des prämaternen Faktors als nebenwirkungsärmere Alternative konnte aufgrund zu geringer Anzahl an Ödemen, keine eindeutige Aussage getroffen werden.