

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

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. med. dent. Bernhard Frerich

**Tierexperimentelle Untersuchung zur Wirkungsweise der Knochenwachstumsfaktoren
BMP-2 und proBMP-2 in Kombination mit einem xenogenen Knochenersatzmaterial
im Rattenmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Leon Schneider, geboren in Leningrad jetzt St. Petersburg / Russland
aus Bösel

Rostock, Mai 2021

Jahr der Verteidigung: 2024

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernhard Frerich, Klinik für MKPG, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Dr. Anika Jonitz - Heincke, Forschungslabor Biomechanik, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Kurt Reifenberg, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
4. Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse & Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits durch den Autor auf Kongressen vorgestellt:

1. *In vivo*-Testung der BMP-2-Vorläuferstufe proBMP-2 in Kombination mit einem Knochenersatzmaterial. **Schneider L**, Liese J, Kasten A, Schwarz E, Frerich B.
Posterpräsentation und Vortrag im Rahmen des 30. DGZMK/BZÄK/Dentsply-Förderpreis-Wettbewerb anlässlich der 140. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am 12. November 2016 in Frankfurt am Main.
2. Einfluss von proBMP-2 als BMP-2-Vorstufe auf die Knochenbildung *in vivo*.
L. Schneider, A. Kasten, J. Liese, C. Dinu, M. Dau, E. Schwarz, B. Frerich. Vortrag auf dem 68. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am 7. Juni 2018 in Dresden.

1. Einleitung	9
1.1 Klinischer Hintergrund	9
1.2 Kieferkammaugmentation	11
1.2.1 Biologischer und physiologischer Hintergrund	11
1.2.2 Hintergrund Knochenersatzmaterialien	11
1.2.3 Autologer Knochenersatz	12
1.2.4 Knochenersatzmaterialien	13
1.3 Die 3. Generation der Biomaterialien	14
1.3.1 Wachstumsfaktoren und Knochenmorphogene	14
1.3.2 BMP-2	15
1.3.3 proBMP-2	17
1.4 Ausgangspunkt und Ziele	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Versuchsaufbau	21
2.2 Scaffolds und Tiermodell	21
2.2.1 Modifikation der Scaffolds	21
2.2.2 Tiermodell	22
2.2.3 Tierhaltung, Vorbereitung und Durchführung der OP	23
2.2.4 Postoperative Versorgung	23
2.2.5 Euthanasie und Explantation	24
2.3 Durchführung der Auswertung mittels Micro-CT	25
2.3.1 Datensatzerstellung	25
2.3.2 Vorbereitung des Datensatzes zur Auswertung	25
2.3.3 Dreidimensionale Auswertung	29

2.3.4 Zweidimensionale Auswertung	32
2.4 Histomorphometrie	34
2.4.1 Herstellung der Schliffe	34
2.4.2 Erstellung der Bilddatensätze	36
2.4.3 Histomorphometrische Auswertung	37
2.5 Statistik	39
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>40</u>
3.1 Dreidimensionale Auswertung mittels Micro-CT	40
3.1.1 Porosität und Porenvolumen	40
3.1.2 Knochenvolumen	42
3.2 Zweidimensionale Auswertung mittels Micro-CT	45
3.2.1 Axiale Schnittrichtung	45
3.2.2 Koronale Schnittrichtung	46
3.3 Histomorphometrie	48
<u>4. Diskussion</u>	<u>51</u>
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>60</u>
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>62</u>
<u>7. Anlagen</u>	<u>68</u>
<u>8. Danksagung</u>	<u>83</u>
<u>9. Eidesstaatliche Erklärung</u>	<u>84</u>
<u>10. Lebenslauf</u>	<u>85</u>

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
ALP	Alkalische Phosphatase
b/c3t3	Zellen einer fibroblastischen Zelllinie
Bit	<i>Binary digit</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR-IB	<i>bone morphogenetic protein receptor IB</i>
BMPR-II	<i>bone morphogenetic protein receptor II</i>
C2C12	Zellen einer myoblastischen Zelllinie
ca.	circa
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CT	Computertomografie
dzi	Carl Zeiss Dateiformat
DFDBA	<i>Demineralized freeze dried bone allograft</i>
et al.	et altera
ECM	Extracellulärmatrix
E. Coli	Escherichia Coli
g	Gramm
h	Höhe
HAP	Hydroxylapatit

HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IGF	Insulin-like Growth Factor
i. m.	intramuskulär
KEM	Knochenersatzmaterial
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase pathway</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MPBA	<i>Mineralized processed bone allograft</i>
ms	Millisekunde
NaCl	Natriumchlorid
nMol	Nanomol
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
pH	pondus Hydrogenii
PLA	<i>polylactic acid</i>
Px	Pixel
r	Radius
rhBMP-2	<i>recombinant human bone morphogenetic protein</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
s.c.	subkutan

TCP	Tricalciumphosphat
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
.TIFF/.TIF	<i>Tagged Image File Format</i>
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
V	Volumen
v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOI	volume of Interest
WF	Wachstumsfaktor
z. B.	zum Beispiel
α -TCP	Alpha-Tricalciumphosphat
β -TCP	Beta-Tricalciumphosphat
μ CT	Mikro-Computertomograph / Mikro-Computertomographie
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Bereits im späten 19. Jahrhundert wurden unterschiedliche Materialien zur Versorgung von Knochendefekten tierexperimentell untersucht und ihre Anwendung als Knochenersatzmaterialien (KEM) vorgeschlagen (Barth, 1895; Senn, 1889; Abhay and Haines, 1997). Gemäß dem Europäischen Verband der Gewebebanken (*European Association of Tissue Banks*) gehört der Knochen nach Bluttransfusionen, zu dem am zweithäufigsten transplantierten Gewebe. Die Regeneration von Knochendefekten gehört seit Jahrzehnten zu den am meisten erforschten Gebieten der regenerativen Medizin (Schultz et al., 2000).

In der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde werden KEM bei oralchirurgischen Eingriffen und dentalen Implantationen eingesetzt. Durch Trauma, Zahnverlust, Atrophie, odontogene Infektionen, sowie Stoffwechselerkrankungen und Osteonekrose verursachte Defekte, führen zu steigender Bedarf nach KEM. Auf den dentoalveolären Bereich beschränkt sind die ein- oder mehrwandigen horizontalen und vertikalen Alveolarkammdefekte, Defekte unter Einbeziehung der Kieferhöhle, sowie parodontale und periimplantäre Defekte zu nennen (Klein and Al-Nawas, 2011; Smeets et al., 2014; Herford and Nguyen, 2015).

Trotz vieler Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der oralchirurgischen Rehabilitation bzw. enossalen Implantologie in den letzten Jahrzehnten, ist eine ausreichende Knochenquantität und -qualität immer noch der wichtigste Faktor beim Setzen von Implantaten in den alveolären Knochen. Steigende Erfolgsraten durch minimalinvasive chirurgische Protokolle, die computergestützte Planung und Durchführung der operativen Eingriffe sowie Oberflächenmodifikationen der Implantate sollen die Notwendigkeit augmentativer Eingriffe reduzieren. Nicht zuletzt der seit einigen Jahren sich abzeichnende Trend kurze und durchmesserreduzierte Implantate oder teilweise auch koronal abgeschrägte Implantate zu nutzen, legt dem chirurgischen Anwender den Schluss nahe, dass Knochenaugmentationen in den meisten Fällen vermeidbar seien. Aber auch bei kurzen und schmalen Implantaten, ist nach wie vor ein suffizientes Knochenlager für die primäre Stabilität des Implantats von Nöten. Ist dieses nicht vorhanden, muss der Knochen augmentiert werden, um ein sicheres prothetisches Lager bieten zu können. Ebenfalls müssen biomechanische Faktoren wie Parafunktionen sowie Knochenqualität und die daraus resultierende Implantatauswahl in der Planung berücksichtigt werden, die oft eine Augmentation nach sich ziehen. Vor allem im

Frontzahnbereich kann die fehlende vertikale Knochenhöhe nicht durch Anwendung von kurzen Implantaten kompensiert werden, da dies die Anfertigung längerer Kronen und damit ein unbefriedigendes ästhetisches Ergebnis zur Folge hätte. Ebenfalls sind Implantat-Kronenhöhen von über 15 mm mit einer höheren Frakturanfälligkeit im Bereich des krestalen Drittels und der Implantatschraube verbunden (Nissan et al., 2011). Ein höheres Kraft-Lastarm-Verhältnis zwischen vertikaler Kronenhöhe und Implantatlänge kann ebenfalls zum krestalen Knochenabbau (Blanes et al., 2007) und Schraubenlockerungen (Bulaqi et al., 2015) führen.

Nach einer Zahnextraktion entsteht ein durchschnittlicher Knochenverlust von bis zu 5 - 7 mm Alveolarkammbreite nach einem Jahr, zweidrittel davon in den ersten 2 - 3 Monaten (Araújo and Lindhe, 2005). Der vertikale Verlust variiert zwischen weniger als 1 mm und 2 - 4,5 mm innerhalb von 12 Monaten (Schropp et al., 2003). Ebenfalls geht die Durchtrennung des Periosts mit einem höherem Knochenabbau einher (Fickl et al., 2008). Gleichzeitig zeigen Untersuchungen, dass bei nur ca. 10 % der Patienten die Dicke des anterioren maxillären fazialen Knochens mehr als 1 mm beträgt (Braut et al., 2011). Da bei der Implantation auch die physiologische Knochenresorption mitbedacht werden sollte, wird in der Literatur 1 – 2 mm Knochenbreite der bukkalen sowie lingualen Knochenwand für ein stabiles Ergebnis bei einer Implantation empfohlen (Spray et al., 2000; Scutellà et al., 2015). Ebenfalls sind 2 mm Abstand zur Vermeidung einer Verletzung der limitierenden Strukturen, wie des Unterkiefernerfs, einzuhalten.

In der Vergangenheit orientierte sich die Behandlungsplanung und damit die Auswahl des Implantats an dem vorhandenen vertikalen und horizontalen Knochenvolumen. Heute ist das sogenannte *backward planning* der prothetischen Versorgung die Methode der Wahl. Dabei werden die Implantate dort, wo der Zahnersatz diese idealerweise aus funktionellen und ästhetischen Gesichtspunkten benötigt, inseriert. Der fehlende Knochen muss entsprechend augmentiert werden. Durch die demografische Entwicklung, den fortgeschrittenen technologischen Stand der Medizintechnik, sowie ästhetische Anforderungen der Patienten steigt ebenfalls die Nachfrage nach geeigneten Biomaterialien um Knochendefekte zu regenerieren, sowie im Idealfall eine *restitutio ad integrum* zu erwirken. Diese ist beim Knochen, der ohne Narben verheilen kann, möglich (McKibbin, 1978; Einhorn, 1998; Sfeir et al., 2005).

1.2 Kieferkammaugmentation

1.2.1 Biologischer und physiologischer Hintergrund

Ein dynamisches Zusammenspiel zwischen Knochenaufbau und -abbau bestimmt die Struktur (Wolff, 1893) und Zusammensetzung des Knochens. Ein dichtes Netzwerk aus Gefäßen in einem interkonnektierenden Porensystem erlaubt eine hohe metabolische Aktivität und ermöglicht den ständigen Umbau und somit ein sehr gutes Heilungsvermögen. Der Knochen hat zwei grundlegende Funktionen. Die erste ist der strukturelle Halt des Bewegungsapparates und der Schutz der Organe. Die zweite ist der Kalziumstoffwechsel (Riccardi and Gamba, 1999) der für den gesamten Körper unerlässlich ist (Buckwalter et al., 1995; Garg, 2006b; Welsch, 2006; Misch, 2008). Bei der Knochenmatrix wird zwischen organischem Material und anorganischen Salzen unterschieden. Die anorganischen Salze, die 65 % des Knochens ausmachen, sind hauptsächlich in Form von Hydroxylapatit vorhanden und teilen sich in TCP 85 %, CaCO_3 10 % und geringe Mengen von Kalzium- und Magnesiumfluorid 5 %. Das organische Material stellt etwa 35 % der Knochenmasse dar und ist ein Netzwerk aus Kollagen- und Proteinfasern, die mit mineralischen Salzen imprägniert sind. Das Kollagen der Knochenmatrix, das 90 % der organischen Masse ausmacht gehört dem Typ I Kollagen an. Weitere Nicht-Kollagen-Proteine sind die Proteoglykane und Knochenproteine (Welsch, 2006; Garg, 2006b). Durch den Abbau werden die sich im Knochen befindenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie das BMP an der Oberfläche freigesetzt. Die Zellrezeptoren der Stammzellen werden durch das BMP aktiviert und diese differenzieren zu Osteoblasten die anschließend den neuen Knochen aufbauen. Durch das BMP sind die Osteoblasten und Osteoklasten im Knochen gekoppelt. Dieser Zellkomplex der für den Auf- und Abbau der Knochengrundsubstanz zuständig ist wird als BFU bzw. *bone forming unit* bezeichnet (Verborgt et al., 2002; Raggatt and Partridge, 2010; Terheyden et al., 2012; Sims and Martin, 2014).

1.2.2 Hintergrund Knochenersatzmaterialien

Die Versuche ein biokompatibles KEM zu finden führten zu immer neuen Materialklassen (Heimke, 2018). Die erste Generation der KEM die vor 1970 entwickelt wurde, umfasste inerte, biokompatible, kommerziell verfügbare Materialien mit einem hohen Reinheitsgrad. Die zweite Generation der KEM umfasste nebenwirkungsfrei im Körper zersetzende Materialien. Die dritte Generation der Biomaterialien umfasst die Stimulation bestimmter

Zellantworten, um den Körper zur Selbstheilung zu animieren. Seit der Jahrtausendwende befinden wir uns in der Entwicklung von eben solchen KEM (Hench and Polak, 2002). Insofern ist ein Paradigmenwechsel, zu dem biologisch aktiven Material hin, zu verzeichnen. Eine größtmögliche Übereinstimmung der aufgeführten Anforderungen (Abbildung 1) wäre bei einem „idealen“ KEM wünschenswert (Janicki and Schmidmaier, 2011; Smeets et al., 2016).

steril	belastungsstabil	pH-neutral degradierend
immunokompatibel	volumenstabil	einfach zu handhaben
biokompatibel	resorbierbar	kosteneffizient
osteokonduktiv, \pm -induktiv	formbar	flächendeckend verfügbar
formstabil	radiologisch darstellbar	verbundenes Porensystem

Abbildung 1: Kriterien für die Entwicklung von KEM

Die Mehrzahl der KEM weist lediglich osteokonduktive Eigenschaften auf. Hierbei findet die Osteoneogenese bzw. Knochengewebsbildung aus dem umgebenden Knochen in das Augmentat hinein statt. Die Osteoinduktion, also die Anregung der Knochenneubildung (Osteogenese) aus dem Augmentat heraus, ist keine Eigenschaft der gängigen KEM (Albrektsson and Johansson, 2001). Gerade diese Eigenschaft ist jedoch bei großen Knochenvolumina von Nöten. Ein systematischer Review von Publikationen, die zwischen 1995 und 2015 veröffentlicht wurden zeigte, dass Dehiszenzen an Implantaten mit allen KEM versorgt werden können. Horizontale und vertikale Defekte bis 3,7 mm können mit partikulärem KEM augmentiert werden (Troeltzsch et al., 2016). Ein weiterer systematischer Review sieht KEM sogar, je nach Defektsituation, potenziell als dem autologen Transplantat ebenbürtig an (Al-Nawas and Schiegnitz, 2014). Bei großen Knochenvolumina sowie vertikalen Blockaugmentationen sind autologe Knochentransplantate dagegen nach wie vor alternativlos (Herford and Nguyen, 2015; Khoury and Hanser, 2015; Troeltzsch et al., 2016).

1.2.3 Autologer Knochenersatz

Autologe Transplantate gelten auf Grund fehlender Immunreaktion und der enthaltenen Wachstumsfaktoren und somit der osteoinduktiven Wirkung als therapeutischer Goldstandard. Die Gewinnung des körpereigenen Transplantats ist jedoch mit zusätzlicher Entnahme, u.U. stationären Aufenthalt, Hebedefektmorbidität, Kontaminationen, zusätzlichen postoperativen Schmerzen sowie der nur eingeschränkt zur Verfügung stehenden Menge des Knochens verbunden. Außerdem ist die teilweise unvorhersehbare Resorptionskinetik autologer Transplantate bei fehlender funktioneller Belastung für viele Defektsituationen nachteilig (Proussaefs et al., 2002; Chiapasco et al., 2006; Khoury and

Hidajat, 2012). Gängige Entnahmeregionen sind dabei: Kieferwinkel, mandibuläre Symphyse, *crista zygomatico-alveolaris*, Tuberregion, Beckenkamm, Schädelkalotte, Tibiaplateau, (Ferri and Hunziker, 2011).

1.2.4 Knochenersatzmaterialien

Generell können KEM nach ihrer Herkunft unterschieden werden. Die Zusammenstellung in der Abbildung 2 ist keinesfalls komplett und dient lediglich der groben Übersicht.

Syngen	Transplantate von eineiigen Zwillingen
Allogen	Humane postmortale- oder Lebendspender. In Deutschland DFDBA, MPBA
Xenogen	Bovines (Rind), porzines (Schwein), equines (Pferd), phykogenes (Algen, Korallen) HAP
Alloplastisch	Keramiken: (HAP, α -TCP, β -TCP, CaCO ₃), Biogläser , Polymere: (U.a. Polylactid, Polyglycolid, Polycaprolactone, Cellulose, Hyaluronan, Fibrin, Chitosan, Kollagen), Zemente: (Medizinisches Kalziumsulfat), Komposite: (Kombinationen organischer und/oder anorganischer Materialien)

Abbildung 2: Übersicht KEM

Bei allen KEM ist die Durchbauung mit vitalem Knochen entgegengesetzt proportional zu der Entfernung zum Knochenlager aus dem die vaskuläre Durchbauung stattfindet (Avila et al., 2010). BioOss® (Geistlich Biomaterials, Baden-Baden), ein bovines Hydroxylapatit das auch im Rahmen dieses Versuchs als Carrier genutzt wurde, ist in der Zahnmedizin weit verbreitet und seit Langem wissenschaftlich dokumentiert (Hämmerle et al., 1998). In Studien wird jedoch kritisiert, dass dieses nur eingebaut und nicht durch Knochen ersetzt wird (Merkx et al., 2003). Dagegen bieten alloplastische KEM vor allem die biologische Sicherheit, die unbegrenzte Verfügbarkeit sowie steuerbare Abbaueigenschaften (Kao and Scott, 2007). Jedoch sind eine weniger ausgeprägte Osteoblastenaktivität (Guizzardi et al., 2000), zu schnelle oder zu langsame Degradationsgeschwindigkeiten, geringe mechanische Stabilitäten sowie eine Durchbauung von max. ca. 3 mm Knochen bekannte Nachteile dieser Materialien, die noch nicht überwunden werden konnten (Garg, 2006a; Bohner, 2010; Kolk et al., 2012).

Transplantattyp	Osteokonduktion	Osteoinduktion	Osteogenese
Alloplast	ja	nein	nein
Xenograft	ja	nein	nein
Allograft mineralisiert	ja	ja / nein	nein
Allograft demineralisiert	ja	ja	nein
Autograft	ja	ja	ja

Abbildung 3: Eigenschaften verschiedener KEM-Klassen (Mealey and Klokkevold, 2002)

Jedoch sind eine weniger ausgeprägte Osteoblastenaktivität (Guizzardi et al., 2000), zu schnelle oder zu langsame Degradationsgeschwindigkeiten, geringe mechanische Stabilitäten sowie eine Durchbauung von max. ca. 3 mm Knochen bekannte Nachteile dieser Materialien, die noch nicht überwunden werden konnten (Garg, 2006a; Bohner, 2010; Kolk et al., 2012). Somit ist bisher kein ideales KEM bekannt (Abbildung 3).

1.3 Die 3. Generation der Biomaterialien

1.3.1 Wachstumsfaktoren und Knochenmorphogene

Studien mit alloplastischen Kompositen zeigen, dass die Weiterentwicklung von bekannten KEM verbesserte Regenerationseigenschaften hervorbringt. Eine Verbesserung der biologischen Wertigkeit von KEM kann jedoch, vor allem, durch die Kombination mit osteoinduktiven Wachstumsfaktoren erreicht werden. Biologische Wachstumsfaktoren sind insofern von großem Interesse, da die Induktion des körpereigenen Knochenwachstums die ideale Form der Defektheilung ist. Mit Wachstumsfaktoren beladene synthetische Scaffolds, würden das Problem der Entnahmestellenmorbidity, biologischer Unverträglichkeit etc. umgehen und durch die osteoinduktive Wirkung die Beschleunigung der Heilung sowie Verbesserung der Knochenqualität nach sich ziehen. Auch bei Patienten mit Pseudarthrosen und gehemmtem Knochenstoffwechsel wäre die Osteoinduktion wünschenswert.

Intrazelluläre Vorgänge, die aus einer komplexen Kaskade von Rezeptoraktivierungen erfolgen, führen zur Knochenneogenese (Garg, 2006a; Miron and Zhang, 2012; Wu et al., 2016). Proteine spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Chemotaxis, Mitose, Differenzierung und Matrixsynthese. Die Komplexität der Vorgänge legt nahe, dass die Anwendung von Wachstumsfaktoren die Knochenentwicklungskaskade positiv beeinflussen könnte (Ferri and Hunziker, 2011). Neben vielen bekannten Wachstumsfaktoren scheinen PDGF, IGF, TGF- β und BMP den naheliegendsten Zusammenhang mit der Knochenregeneration aufzuweisen (Schliephake, 2002). Dabei muss erwähnt werden, dass Wachstumsfaktoren, im Vergleich zu Differenzierungsfaktoren (BMP), nicht osteoinduktiv sondern mitogen auf osteogen differenzierte Knochenvorläuferzellen wirken können (Terheyden, 2011). Einem multifunktionellen Glykoprotein, dem BMP, kommt eine besondere Rolle zu. Urist entdeckte 1965 die osteoinduktive Potenz demineralisierter Knochenmatrix (Urist, 1965). Jedoch sollte es mehr als 20 Jahre dauern bis die Proteine die dafür zuständig sind, identifiziert wurden (Wang et al., 1988). Zurzeit sind mehr als 30 verschiedene BMP

Isoformen, die der TGF- β -Überfamilie der multifunktionellen Cytokine angehören, bekannt. BMPs sind für Zellwachstum, Morphogenese, Entwicklung, Apoptose und immunologische Abwehrreaktionen zuständig (Hogan, 1996). Von den verschiedenen BMPs scheinen nach bisherigen Untersuchungen besonders BMP-2 und BMP-7 klinisch für die Knochenneubildung interessant zu sein (Albrektsson and Johansson, 2001; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011; Terheyden, 2011).

1.3.2 BMP-2

Das BMP-2 ist ein osteoinduktiver Differenzierungsfaktor, der in postfetalen Säugetieren Osteogenese, Knochenregeneration und -remodellierung steuert (Urist, 1997). Es gehört der Cystin-Knoten-Familie an, die durch dimere Proteine gekennzeichnet ist. Es bindet an Serin-Threonin-Kinase Rezeptoren BMPR-II und BMPR-1B, was in Expression verschiedener Gene, die für die Osteoneogenese relevant sind, resultiert. Die Signalweiterleitung kann dabei sowohl auf dem Smad-abhängigen- als auch dem Smad-unabhängigen-Signalweg (p38 MAPK) stattfinden (Chen et al., 2012). Dieses Zytokin hat eine Länge von 114 Basenpaaren und zeigt beim Menschen, Maus und Ratte eine sich ähnelnde Aminosäuren Sequenz. Eine Vielzahl an Tierstudien, aber auch klinische Studien seit den 1990er Jahren zeigten, dass BMP-2 in der Lage war, auch ektopisches Knochenwachstum zu fördern ((Nevins et al., 1996; Boyne et al., 1997a; Boyne et al., 1998; Gonnerman et al., 2006; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011)). Allerdings gab es auch Unsicherheiten in Bezug auf die Gesamtdosis und die damit verbundenen Anwendungssicherheit sowie den optimalen Träger für die Substanz (Boden et al., 1999; Richardson et al., 2001; Hench and Polak, 2002; Seeherman et al., 2002; Kamakura et al., 2004; Issa et al., 2008). Die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit des Menschen gegenüber BMP-2 führt zu hohen klinischen Dosen, da im gesunden Knochen, im Gegensatz zu einer Fraktur oder Osteotomie, weniger Rezeptoren für das BMP-2 zu finden sind (Bishop and Einhorn, 2007).

Die Menge des natürlich vorhandenen BMP im menschlichen Körper ist sehr gering und wird mit etwa 1 μ g/kg demineralisierter Knochenmasse angegeben (Kenley et al., 1993). Für die therapeutische Anwendung wird das BMP-2 rekombinant hergestellt. Allerdings ist die osteoinduktive Potenz der rekombinanten Formen der natürlichen unterlegen. Diese wird zunächst in CHO-Zellen überexprimiert und danach in reifer dimerer Form ins Kulturmedium sezerniert. Der weitergeführte Schritt von größeren Mengen des rhBMP-2 war die Entwicklung

der intrazellulären Synthese in prokaryotischen Wirtszellen wie *E. Coli*. Bei diesem Verfahren mussten allerdings die monomeren Proteine im zweiten Schritt oxidativ renaturiert werden, da sich keine Disulfid-Brücken im Zytosol der prokaryoten Organismen ausbilden (Wang et al., 1990; Kübler, 1997).

Speziespezifische Dosen für die Applikation von rhBMP-2 wurden experimentell herausgefunden (Valentin-Opran et al., 2002). Dabei steigt die benötigte Menge mit höherer Ordnung der Spezies. Bei der primär angewendeten Applikationsform, wurde ein Kollagenschwamm mit rhBMP-2 durchtränkt. Die systemische **Belastung** ist dabei laut Studien durch die schnelle Clearance-Rate innerhalb von 24 h als gering einzuschätzen, jedoch ist eine lokale Applikation bei langfristiger Freisetzung wichtig (Valentin-Opran et al., 2002). Die Verwendung eines Kollagenträgers erhöhte die Retention des rhBMP-2 auf 15 – 55 % im Vergleich zu der Applikation ohne Zellträger von 5 % (Haidar et al., 2009a). Gleichzeitig mussten höhere Gesamtdosen, auf Grund der geringen Affinität von BMP-2 für Kollagen, angewendet werden (Kim and Valentini, 2002). Das rhBMP-2 wird in der orthopädischen Chirurgie und außerhalb Deutschlands auch für Augmentationen in der Oralchirurgie seit einigen Jahren angewendet (Lo et al., 2012).

Der Einsatz des rhBMP-2 erlebte einen Boom in den frühen 2000er Jahren. 2002 wurde ein rhBMP-2-Produkt namens InductOs (Wyeth, Madison, New Jersey, USA) vorgestellt. Zunächst wurde es von der FDA für die anteriore Lendenwirbelkörper Fusion mit Hilfe von speziellen Käfigen (2002) sowie später für offene Tibiafrakturen (2004) und orale Chirurgie (2007) zugelassen. Schon sehr bald nach der Einführung fand ein *off-label-use* des Produkts statt. Jedoch wurde bereits 2006 eine Reihe von Studien veröffentlicht, die von ernsthaften und lebensgefährlichen Komplikationen durch die Anwendung des rhBMP-2 in einem Ausmaß von 20 – 70 % der Fälle berichteten. Im Juni 2008 veröffentlichte die FDA eine öffentliche Meldung über Komplikationen wie Anschwellen des Halses und Rachens die in der konsekutiven Verlegung der Luftwege und neurologischer Strukturen resultierten sowie Schluck-, Sprech- und Atemstörung hervorriefen. Die meisten Komplikationen traten zwischen dem 2. und 14. postoperativem Tag auf. In einer Gruppe mit erhöhten Dosen konnte auch ein erhöhtes Auftreten von Malignomen festgestellt werden. Es bestand bei den veröffentlichten Studienergebnissen eine erhebliche Voreingenommenheit sowie eine nachweisbare Manipulation der statistischen Daten (Carragee et al., 2011). Daher ist die Anwendung des rhBMP-2 im Kopf-Hals-Bereich in Deutschland derzeit nicht statthaft. Ein Grund dafür ist, dass

für einen osteogenen Effekt der Einsatz weit überphysiologischer Dosen erforderlich ist, um nach einem initialen *burst release* (Kim and Valentini, 2002) wenigstens eine minimale rhBMP-2-Freisetzung über einen Zeitraum von Tagen bis wenigen Wochen zu erreichen. Die in der Literatur lokal verwendeten Dosen von 4 - 8 mg im Falle eines mandibulären Defekts oder 1,77 - 3,4 mg beim Sinuslift, übersteigen die natürlich vorkommende Menge des BMP-2 im Körper um ein Vielfaches (Boyne et al., 1997b; Herford and Boyne, 2008). Wünschenswert wäre jedoch eine niedrige kontinuierliche Dosierung über 21 - 28 Tage (Nakagawa et al., 2001; Issa et al., 2008). Neu entwickelte Methoden zur langsamen Freisetzung zeigen vielversprechende Ergebnisse, die eine höhere osteogenetische Wirkung bei langsamer Abgabe des BMP-2 belegen (Liu et al., 2014).

1.3.3 proBMP-2

Wissenschaftliche Veröffentlichungen zum proBMP-2 sind sehr begrenzt und beschränken sich hauptsächlich auf die Arbeitsgruppe um Prof. i. R. Dr. Schwarz (AG Rekombinante therapeutische Proteine, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Ebenfalls ist im Rahmen der Literaturrecherche die Publikation einer kanadischen Arbeitsgruppe zu finden, die die zuvor publizierten Ergebnisse bestätigt (Zhou et al., 2012). Bei dem aktuellsten Artikel handelt es sich um die Publikation einer iranischen AG, die ein alternatives Expressionssystem in *Leishmania tarentolae* zur Herstellung von bereits biologisch aktivem proBMP-2 vermeldet (Rahmati et al., 2016). Weitere publizierte Erkenntnisse zur Wirkungsweise von proBMP-2, vor allem deren Wirkung *in vivo*, liegen derzeit nicht vor

Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und somit auch BMP-2, werden in eukaryotischen Zellen als Prä-Pro-Formen gebildet. Weitere BMP bei denen eine pro-Form bekannt ist sind z. B. BMP-4, -7, -9. Der N-terminalen primären Erkennungssequenz schließt sich ein 259 Aminosäuren langes, cysteinfreies Peptid an, gefolgt von der 114 Aminosäurereste enthaltenden Polypeptikette des eigentlichen BMP-2 Zytokins (Abbildung 4). Bei der ersten Spaltung vermittelt die primäre Erkennungssequenz bzw. das Transitpeptid die Translokation ins endoplasmatische Retikulum. Das Propeptid bleibt mit dem reifen Faktor verbunden bis eine zweite Spaltung erfolgt (Hillger et al., 2005; Buttstedt et al., 2011). Die zweite Prozession erfolgt durch die Proprotein-Convertase PSCK5 die das Pro-Protein in seine

reife Form überführt. Es folgt die Abspeicherung in der ECM und anschließende Sekretion.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Prä-Pro-Form des BMP-2. Die Prä-Sequenz ist in hellgrau, die Pro-Domäne grau und der reife Teil dunkelgrau markiert. Grafik modifiziert, aus „Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und ihre Pro-Formen“ (Buttstedt et al., 2011).

Mit dem *in vivo* Versuch von Hillger *et al.* konnte die osteoinduktive Eigenschaft des zuvor in *in vitro*-Versuchen als biologisch inaktiv beschriebenen proBMP-2 identifiziert werden. Dabei zeigte sich bei äquimolarer Applikation von BMP-2 und proBMP-2 auf keramischen β -TCP-Scaffolds in einem ektopen Rattenmodell in beiden Gruppen deutlich neugebildete Knochensubstanz. Dies ist durch den proteolytischen Abbau *in vivo* zu erklären, da das proBMP-2 empfindlich gegenüber Proteolyse ist. Es hat eine insgesamt langsamere Entfaltungskinetik da die Propeptidomäne an die BMP-Domäne gebunden ist. Die BMP-2 Domäne kann erst nach Abspaltung der Propeptid Domäne und unter physiologischen Bedingungen in die biologisch aktive Konformation gefaltet werden (Hillger et al., 2005).

Weitere Untersuchungen durch Hauburger *et al.* konnten zeigen, dass proBMP-2 um die Bindung an die extrazelluläre Ligand-Binde-Domäne BMPR-IA, jedoch nicht BMPR-II, mit BMP-2 konkurriert. Somit inhibierte proBMP-2 die Induktion von ALP, dem Marker für die Osteoblastenaktivität, durch BMP-2. *In vitro* zeigte sich ein protrahiertes Wirkprofil von proBMP-2, das zum reifen BMP-2 prozessiert wurde. BMP-2 beeinflusste nicht den MAPK P38-Signalweg in C2C12-Zellen der für die Expression der ALP notwendig ist. Jedoch wurde durch die Überexpression von Smad-Proteinen der p38-Signalweg aktiviert was die anschließende Expression der ALP bewirkte. Diese Beobachtung wurde in b/c3t3 Zellen nicht bestätigt. In diesen Zellen wurden beide zuvor genannte Signalwege beeinflusst (Hauburger et al., 2009).

In den Versuchen der AG um von Einem *et al.* wurde eine effizientere Methode der rhproBMP-2-Herstellung etabliert. Außerdem wurde der Frage nachgegangen warum proBMP-2 zwar ektopen Knochen in Ratten induziert, jedoch keine ALP in Zellkulturen. Wie sich herausstellte, bestand in den vorherigen Versuchen eine Diskrepanz bei der Verweildauer des applizierten proBMP-2. Waren es *in vivo* 30 Tage, so in der Zellkultur nur 4 Tage. Die Inkubationszeit der C2C12 Zellen wurde daher auf 11 Tage verlängert. Im Unterschied zum frühen hohen Ansprechverhalten bei BMP-2-Gabe, stieg die Aktivität der ALP bei Anwendung

von proBMP-2 am 5. Tag an. Die Induktion der knochenspezifischen Markergene erfolgte sowohl beim BMP-2 als auch beim proBMP-2. Allerdings unterschied sich der Ausprägungsgrad deutlich (Tabelle 1). Bei der Applikation von BMP-2 war keine Sättigung festzustellen. Bei der Gabe von proBMP-2 waren dagegen Plateaus zu erkennen. Eine erhöhte Dosis erzielte keine stärkere Wirkung. Im Gegensatz zum reifen BMP-2, das extrazellulär an einen Rezeptor bindet, wird proBMP-2 intrazellulär erst durch proteolytische Spaltung zu reifem BMP-2 prozessiert. Das reife BMP-2 wird anschließend von der Zelle sezerniert. Zusammen mit einer Abspeicherung in der ECM ergibt sich daraus ein gewünschter Retard Effekt (von Einem et al., 2011).

Tabelle 1: Vergleich von BMP-2 und proBMP-2 beim Anstieg knochenspezifischer Markergene. Tabelle modifiziert aus (von Einem et al., 2011)

	BMP-2	proBMP-2
ALP-Expression	8000x nach 72 Std.	1000x nach 72 Std.
Osteocalcin	330x nach 48 Std.	20x nach 48 Std.
Osterix	10x nach 6 Std. 700x nach 72 Std.	10x nach 24 Std. 120x nach 72 Std.

Eine weitere Untersuchung zeigte deutlich, dass im Falle einer fehlenden Pro-Domäne keine Sekretion oder Faltung des reifen BMP-2 stattfinden kann (Kuhfahl and Schwarz, 2015). Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen somit die Hypothese zum Einsatz von proBMP-2. Da für das proBMP-2 eine Latenz vermittelnde Funktion nachgewiesen wurde, könnte dessen Anwendung, die bekannten Probleme im Idealfall vermieden werden (Buttstedt et al., 2011).

1.4 Ausgangspunkt und Ziele

Im Rahmen dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit dem Ansatz ein biologisch aktives KEM zu untersuchen, welches die Knochenneubildung induziert. Die bisherigen Beobachtungen zeigen, dass die Wirkungskinetik je nach Zellart sehr unterschiedlich und somit die Testung *in vivo* unerlässlich ist. Wie bereits aus anderen wissenschaftlichen Publikationen ersichtlich, ist die ektope Knochenbildung beim intramuskulären, heterotropen Ansatz im Rattenmodell gut realisierbar (Gruber et al., 2009; Miron and Zhang, 2012). Jedoch gibt es auch die Kritik, dass im Zentrum der Gerüste die Osteogenese ausbleibt (Warnke et al., 2010). Nachdem zuvor bereits die Anwendung eines mit BMP-2 und proBMP-2 beladenen BioOss®-Carriers im subkutanen Fettgewebe der Ratte durch die AG um Prof. Dr. Dr. Frerich untersucht wurde (LALLF M-V/TSD/7221.1-1.1-45/09), sollte nun auch die ektope Knochenneubildung im Muskel untersucht werden. Die histologischen Ergebnisse des Vorversuchs zeigten eine vergleichbare

Knochenneubildung. Die nach i.m. Implantation erwartete quantitativ deutlichere Osteoneogenese, auf Grund der besseren Durchblutungssituation, sollte dabei zu detaillierteren Aussagen führen können. Der Unterschied zu den bereits vielfach publizierten Arbeiten zum rhBMP-2 (Miron and Zhang, 2012) liegt dabei in der Verwendung des rhproBMP-2. Außerdem sollte es im Gegensatz zu der Arbeit von Hillger *et al.* zu zwei Zeitpunkten, in einem klinisch weit verbreitetem KEM auf seine Osteoinduktion untersucht wurde. Hypothetischer Vorteil von proBMP-2 gegenüber reifem BMP-2 wäre sein protrahiertes Wirkmuster, da dieses intrazellulär durch proteolytische Spaltung zu BMP-2 prozessiert und dann freigesetzt wird. Dadurch könnten die genannten Nebenwirkungen möglicherweise vermieden und eine günstigere Nachhaltigkeit in der Induktion der Osteoneogenese gewährleistet werden. Da im Rahmen des Vorversuchs eine teilautomatisierte μ CT-Analyse nicht möglich war, soll dieser Ansatz in dieser Untersuchung ausgearbeitet werden. Die teilautomatisierte Untersuchung der μ CT-Daten wäre für zukünftige quantitative Datenerhebungen in Bezug auf die non-destruktive und schnellere Methode der μ CT-Analyse von großer Bedeutung. Falls die Hypothese, der langsamen, kontinuierlichen Abgabe des zunächst intrazellulär prozessierten und anschließend exprimierten BMP-2, korrekt wäre, wäre dieser Ansatz von einer signifikanten klinischen Relevanz. Die Aufgaben dieser Dissertation sind:

1. Der Vergleich der isomolaren i.m. Anwendung des proBMP-2 in Kombination mit einem etablierten xenogenen KEM wurde noch nicht durchgeführt und sollte daher den prinzipiellen Beweis für die Wirksamkeit des proBMP-2 in einem solchen Modell bringen.
 2. Die Auswertung der Knochenmenge in Abhängigkeit der Applikation der Knochenwachstumsfaktoren sollte mittels μ CT und anhand histologischer Färbung erfolgen.
 3. Die Verteilung des Knochens innerhalb des KEM sollte überprüft werden.
- Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die teilautomatisierte, non-destruktive Auswertung von μ CT-Datensätzen mit einem Auswertungsalgorithmus anhand spezifischer Grenzwerte möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Der Versuch wurde an weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 295 g durchgeführt. Da es sich bei diesem Versuch um die Erbringung des prinzipiellen Beweises handelte, wurden innerhalb der Gruppen jeweils 3 Tiere zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (6. und 12. Woche nach der Implantation) ausgewertet. Zusammen mit jeweils einer Kontrollgruppe zu beiden Zeitpunkten ergab dies die Gesamtzahl von 18 zu untersuchenden Tieren (Tabelle 2). Das Versuchsvorhaben wurde vor der Durchführung vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-089/12 genehmigt. Der Gesamtversuch umfasste noch den gleichen Versuchsaufbau mit einem nanoporösen alloplastischen KEM, der nicht im Rahmen dieser Dissertation ausgewertet wird.

Tabelle 2: Studiendesign mit insgesamt 18 untersuchten Tieren zu zwei Zeitpunkten

Versuchsdauer	Kontrolle	BMP-2	proBMP-2	Summe
6 Wochen	3	3	3	n = 9
12 Wochen	3	3	3	n = 9
				n = 18

2.2 Scaffolds und Tiermodell

2.2.1 Modifikation der Scaffolds

Die vorangegangene Studie (LALLF M-V/TSD/7221.1-1.1-45/09) konnte den Nachweis erbringen, dass BioOss® sich als Trägermaterial für Wachstumsfaktoren eignet. Das gewählte KEM erlaubt durch die rein osteokonduktive Natur, ausschließlich die Wirkung des zugesetzten BMP-2 oder proBMP-2 nachzuweisen. Mit einer Hautstanze (Durchmesser 10 mm) wurden intraoperativ KEM-Zylinder mit einem Durchmesser von 10 mm und der von Höhe 5 mm aus dem kommerziell erhältlichen spongiösen BioOss®-Block herausgestanzt und beladen. Damit ergab sich ein rechnerisches Volumen von 0,3927 cm³ bzw. 392,7 mm³ gemäß der Zylinder-volumenformel: $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$. Die Größe des Implantats orientierte sich dabei an den Versuchen von Gruber *et al.* bei denen Konstrukte mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 3 mm zum Einsatz kamen (Gruber et al., 2009). Zusätzlich wurden die Zylinder aus unterschiedlichen Blocklokalisationen ausgestanzt, um eine Randomisierung der natürlich schwankenden Mineralisierungsrate bieten zu können. Die Beladung der Scaffolds erfolgte

isomolar mit 1,5 nMol rekombinant in *E. Coli* produzierten rhBMP-2 bzw. rhproBMP-2 (Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Dr. Schwarz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle (Saale)). Die Zylinder in der Gruppe 2 wurden mit 40 µg (100 µg/cm³) rhBMP-2 bzw. 140 µg (350 µg/cm³) rhproBMP-2 in der Gruppe 3 durch Pipettieren / Aufträufeln durchtränkt und anschließend implantiert. Als Kontrolle wurden in Gruppe 1 die Zylinder lediglich mit 0,9 % NaCl durchtränkt. Die Menge des verwendeten rhBMP-2 bezog sich auf die durch die Untersuchungen von Valentin-Opran bekannten oberen Grenze des therapeutischen Dosisbereichs (Abbildung 5).

TABLE 1. Dose Response Observed in Preclinical and Clinical Studies Using rhBMP-2^a

Species	rhBMP-2 (mg/mL)									
	0	0.013	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.5	2.0
Rodent		+/-	+	+	+/*	*	*			
Dog radius				+		+		*		
Dog mandible					+	+	+	+/*		*
Nonhuman primate radius							+	+	+	
Nonhuman primate mandible						+/-		+		
Human							+/-	+	+	

^aUnpublished data, Reports on file at Genetics Institute, Cambridge, MA.
+ = Concentrations at which bone induction was observed defining the therapeutic dose range.
- = Concentrations at which bone induction was not observed.
* = Concentrations at which excessive bone formation was observed.

Abbildung 5: Dosis-Wirkung die in präklinischen und klinischen Studien bei der Verwendung von rhBMP-2 beobachtet wurde. Bei der Rattenspezies wurde die eindeutige Knochenneubildung bei der Konzentration zwischen 0,025 und 0,1 mg/mL beobachtet. Bei einer Konzentration von 0,1mg/mL wurde teilweise hypertrophe Knochenneubildung beobachtet (Valentin-Opran et al., 2002).

2.2.2 Tiermodell

Der Tierversuch wurde auf der Grundlage des vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigten Tierversuchsantrags (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-089/12) durchgeführt. Die in dem Versuch verwendeten weiblichen Ratten vom Stamm CD[®] (Sprague-Dawley) wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Das Körpergewicht der zum Zeitpunkt der Lieferung 8 Wochen alten Ratten betrug zwischen 251 – 275 g. Um die Versuchstiere möglichst wenig zu beeinträchtigen, wurde in diesem Versuch der Rückenmuskel, *musculus latissimus dorsi*, als Implantationsort ausgewählt, da hierbei keine Antriebsmuskulatur beeinträchtigt wird. Diese Lokalisation ist auch aus anderen Arbeiten bekannt (Warnke et al., 2010).

2.2.3 Tierhaltung, Vorbereitung und Durchführung der OP

Die Tiere wurden im Institut für experimentelle Chirurgie mit zentraler Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, Schillingallee 69a, für mindestens 1 Woche nach Anlieferung zur Akklimatisierung gehalten. Die Tiere wurden mit industriell gefertigtem Standardfutter für Nager sowie Wasser *ad libitum* ernährt. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen in zentral belüfteten sowie vollklimatisierten Räumen bei einem künstlichen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus unter Standardbedingungen.

Im Mittel betrug das Körpergewicht der Tiere bei der Operation 295 g (273 – 384 g) und das Alter 9 - 10,5 Wochen. Nach Randomisierung und Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Gruppen wurden die Tiere mittels gewichtsadaptierter intraperitonealer Injektion von 0,4 mL (0,5 - 0,3 mL) Ketamin (Injektionslösung 10 %, Bela-Pharm, Vechta, Deutschland) und 0,05 mL (0,1 - 0,25 mL) Xylazin (Rompun 2 %, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) in 0,9 % NaCl-Lösung narkotisiert. Nach Lagerung auf einer sterilen Kompresse und sterilen Einmal-Unterlage (Medi-Sets®, Paul Hartmann GmbH, Heidenheim) erfolgte die Desinfektion des Fells und der Haut erfolgte mit Octenisept (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt). Danach wurden die Tiere im OP-Bereich rasiert.

Die operativen Eingriffe wurden durch Assistenzärzte der Klinik für MKG-Chirurgie Rostock (C. Dinu, Dr. I. Buttchereit, Dr. Dr. Dau) durchgeführt und protokolliert. Zur Implantation im Rückenmuskel wurde, wie in Abbildung 6 zu sehen, rechtsseitig ein ca. 2 cm langer Schnitt am Rücken angelegt und das Implantat in eine präparierte Tasche in der Rückenmuskulatur platziert. Die Fixation erfolgte mit einer darüber liegenden resorbierbaren Naht (Glycolon 5-0, Resorba Medical GmbH, Nürnberg) mit darüber liegendem Hautverschluss (Resolon 5-0, Resorba Medical GmbH, Nürnberg). Vor dem Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgelegt.



Abbildung 6: OP-Bereich und Schnittführung

2.2.4 Postoperative Versorgung

Auf Grund des operativen Traumas bei der Defektsetzung (Schnitt, Implantation, Naht) wurde in den ersten drei postoperativen Tagen das Analgetikum Novaminsulfon (Ratiopharm, Ulm,

Deutschland), 15 Tropfen / 100 ml Trinkwasser pro Tag appliziert. Die Pflege der Tiere wurde durch das Personal der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt.

2.2.5 Euthanasie und Explantation

Im Mittel betrug das Körpergewicht der Tiere am Ende des Versuchs 346 g (258 - 484g). Die Euthanasie der Tiere erfolgte am Ende der Beobachtungszeit von 6 Wochen bzw. 12 Wochen unter bereits beschriebener Narkose mit Ketamin / Xylazin und anschließender zervikaler Dislokation. Die KEM-Implantate wurden zusammen mit dem umgebenden Gewebe reseziert (Abbildung 7). Im Mittel wurden 20 x 20 mm (min.16 x 10mm, max. 25 x 25mm) große Gewebeprobe entnommen. Die Resektate wurden kranial mit 2 Fäden versehen und unverzüglich in gepufferter 4 % Formalinlösung fixiert.



Abbildung 7: Ein in Formalin fixiertes Resektat mit kranialwärts platzierten Fäden

Der Tierversuch wurde vor der Auswertung durch den Autor, von Dr. Voges (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock) vorbereitet, die Scaffolds erstellt und modifiziert, sowie die Auswertungskriterien und Abläufe gemeinsam mit dem Autor festgelegt. Ebenfalls fand die Auswertungsbetreuung durch Dr. Liese (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock) im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Datensatzrekonstruktion und der Erstellung des Auswertungs-Algorithmus statt.

2.3 Durchführung der Auswertung mittels Micro-CT

2.3.1 Datensatzerstellung

Die Untersuchung der Proben auf Knochenbildung sollte in zwei Schritten erfolgen. Der erste beinhaltete die non-destruktive, dreidimensionale teilautomatisierte Untersuchung der Proben mittels μ CT-Datensätzen. Im zweiten Schritt folgte die histomorphometrische Auswertung. Die zuvor fixierten Proben wurden aus den Probenbehältern entnommen und anschließend am Institut für Biomedizinische Technik (Friedrich-Barnewitz-Straße 4, 18119 Rostock) durch PD Dr. -Ing. habil. Martin mit Hilfe von Bruker SKYSCAN 1172 μ CT (Bruker microCT, Kontich, Belgien) eingescannt. Die Scanbehälter werden benötigt da bei dem verwendeten μ CT-System im Gegensatz zu einem regulären CT nicht der Detektor um das Objekt, sondern das Objekt schrittweise auf einem Drehteller um 360 Grad rotiert. Außerdem benötigt es für einen optimalen Scanvorgang eine Probe in der Form eines Zylinders gleichen Volumens, um unterschiedliche Röntgenstrahlabschwächung zu vermeiden. Die Fixierung der Probe im Behälter dient der Vermeidung jeglicher Bewegung, von Bewegungsartefakten. Außerdem muss die Probe feucht gehalten werden. Dafür wurden die Resektate in handelsübliche Zellstoff-Tücher gewickelt, zentral im Behälter positioniert und mit der Fixierlösung aus dem Probenbehältern befeuchtet. Hiernach wurden die Behälter auf dem Drehteller der Aufnahmeeinheit positioniert. Außerdem musste das Objekt zunächst zentral ausgerichtet werden (Abbildung 8). Die Aufnahmen wurden bei einer Röhrenspannung von 80 kV, 100 mA und einer Bestrahlungszeit von 8712 ms aufgenommen. Die Farbtiefe betrug 16 bit, die Pixelgröße der Aufnahmen lag bei 13,78 μ m. Die erworbenen Datensätze wurden und im TIFF-Datenformat abgespeichert. Die weiteren Aufnahmeparameter sowie Gerätespezifikationen befinden sich in Anlage 6.1.

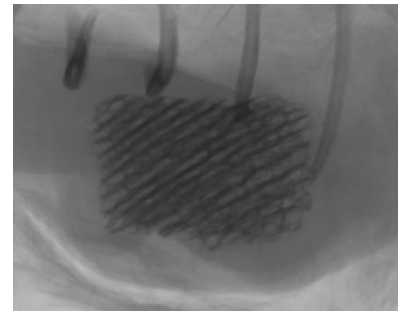


Abbildung 8: Positionierungs-Scan einer Probe vor dem Einscannen. Die Rippen befinden sich immer oberhalb des KEM-Blocks.

2.3.2 Vorbereitung des Datensatzes zur Auswertung

Die rohen Scandateien wurden mit dem Programm NRecon Version 1.6.10.2 (Bruker microCT, Kontich, Belgien) durch Dr. Jan Liese und Dr. Annika Voges rekonstruiert. Die Rekonstruktionsparameter finden sich unter Anlage 6.2. Die Rekonstruktion der Scandateien dient dabei der Umrechnung der 360 Grad Projektionen in einen Volumendatensatz und in

zweiter Linie der Korrektur bzw. Beseitigung von Ringartefakten (*ring artefact reduction*) sowie Strahlauvhärtung (*beam hardening correction*) als auch der Umwandlung des Dateienformats von TIFF ins Bitmap-Dateiformat was mit einer erheblichen Reduzierung der gesamten Datenmenge einhergeht. Die durchgeführten Korrekturen erzeugen ein insgesamt homogeneres Bild durch den Ausgleich von technisch systematischen Fehlern.

Die so rekonstruierten μ CT-Datensätze wurden durch den Autor, wie nachfolgend detailliert dargestellt, schrittweise zur Berechnung des neugebildeten Knochens bearbeitet und ausgewertet. Dazu wurde ein Auswertungsalgorithmus verwendet, der die Parameter und Schwellenwerte teilautomatisiert definierte. Die Berechnungen fanden am Spezialarbeitsplatz-Rechner „Silver“ (PC-Typ Dell Precision T3600, Intel Xeon E5-1620 CPU, 16GB RAM, NVidia Quadro 2000 Grafik, Dell U2412M Monitor) im IT- und Medienzentrum der Universität Rostock statt. Bei dem Betriebssystem des Rechners handelte es sich um ein Windows 10 Betriebssystem. Die an diesem Rechner zur Auswertung verwendeten Programme waren DataViewer (Bruker microCT, Kontich, Belgien), CT-Analyzer Version 1.15.4.0 (Bruker microCT, Kontich, Belgien) und Microsoft Excel (Office 365, Microsoft, Redmond, USA).

Die Durchsicht der rekonstruierten Volumendaten erfolgte mittels des Programms DataViewer. Die rekonstruierten Bilddatensätze wurden zunächst semiquantitativ auf das Vorhandensein von Knochen innerhalb des KEM betrachtet. Dafür wurde die Knochenmenge in Kategorien eingeteilt: 0 = kein Knochen, + = Spuren von Knochen, ++ = Knochen deutlich sichtbar vorhanden, +++ = viel Knochen, ++++ = Poren größtenteils mit Knochen durchbaut. Die einzelnen Resultate werden im Ergebnisteil besprochen.

Zuerst fand die Vorbereitung der Scandateien für die nachfolgende halbautomatisierte Auswertung statt. Zunächst wurde das *volume of interest (VOI)* mit Hilfe von DataViewer bestimmt. Die Proben wurden in den X-Y-Z-Achsen zentral ausgerichtet, die Rippen, als Referenzebene bei allen Proben stets in der gleichen Achsrichtung positioniert. Die Rippen sollten ebenfalls als Referenzgrauwert für den neugebildeten Knochen dienen (Abbildung 8). Auf Grund der Tatsache, dass die KEM-Zylinder aus einem größeren Block ausgestanzt wurden, ergaben sich auf Grund der mechanischen Belastung und den Unterschieden innerhalb des biologischen Materials teilweise leichte Differenzen in den Randbereichen der Zylinder. Danach folgte die Bestimmung des VOI. Dafür wurde der Bereich um den KEM-Zylinder mit

einem Kasten eingegrenzt und darauf geachtet, dass die gesamte Probe innerhalb des Kastens liegt - in allen Schichten und Richtungen (Abbildung 9). Diese Begrenzung des zu untersuchenden Raumes mit dem Ziel der Reduzierung der Datengröße sowie dem Ausschluss von Knochenstrukturen (Rippen) die das Auswertungsergebnis der neugebildeten Knochenmenge beeinflussen könnten ergab das VOI. Der Datensatz wurde abgespeichert.

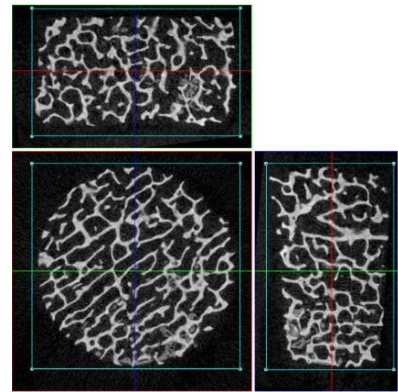


Abbildung 9: Zentrale Ausrichtung der Proben horizontale (grün) und vertikale Linie (rot). VOI = Kasten (blau)

Die Weiterverarbeitung erfolgte mit dem Programm CT-Analyzer. Um die Proben weiter auswerten zu können musste zunächst für jede Probe die *region of interest (ROI)* des Datensatzes gebildet werden. Die ROI grenzt die Ausdehnung des zu untersuchenden Gebiets ab. Auf Grund des großen Datenvolumens, das bei der Untersuchung anfällt, hat es ebenfalls eine positive Auswirkung auf den geringeren Speicherplatzbedarf und schnellere Auswertung der Datensätze. Schnittbereiche, die keine KEM- bzw. Knochenanteile enthielten, wurden durch die manuelle Festlegung von nicht auszuwertenden Schnitten aus der Auswertung herausgenommen. Danach wurde die ROI in der 2-D-Auswahl gebildet. Mehrere interpolierte ROI pro Datensatz wurden gebildet, um den zu untersuchenden Bereich einzuschränken und damit unnötige Rechenzeit zu reduzieren. Die nun veränderte Datei mit den neuen ROI, die in ihrer Summe ein neues VOI bilden, wurde abgespeichert (Abbildung 10).

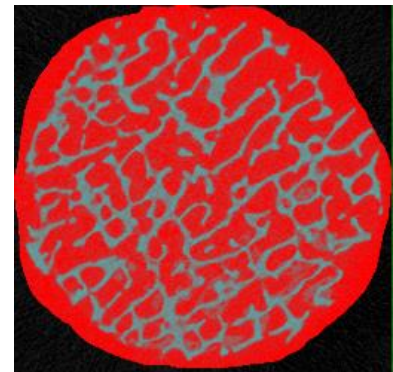


Abbildung 10: ROI (roter Bereich)

Danach erfolgte die Segmentierung (*binary selection preview*) die über die Binarisierung erfolgt. Damit ist die Kontrastierung des gesuchten inhaltlich zusammenhängenden Segments (KEM und Knochen) vom übrigen Bild gemeint (Abbildung 11). Dieser Schritt war der zeitintensivste der μ CT-Auswertung. Ein von Dr. Jan Liese entwickelter Algorithmus für die Auswertung des KEM und Knochens im Programm CT-Analyzer wurde dafür genutzt. Es mussten die spezifischen Graustufen-Schwellenwerte und Auswertungsparameter für die Proben

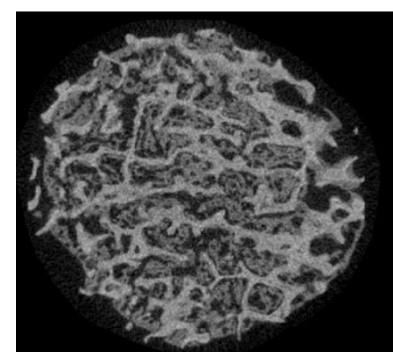


Abbildung 11: Rekonstruierter Schnitt mit KEM (hellgrau) und Knochen (dunkelgrau)

herausgefunden und der Algorithmus für das zu untersuchende KEM modifiziert werden. Dabei wurden für jede Probe verschiedene Referenzwerte für die Graustufen des Knochens und des KEMs getestet sowie die Werte für die Bildbearbeitung und -optimierung verändert. Die Graustufenpalette enthielt 255 Abstufungen bzw. 8 Bit. Da die Unterschiede zwischen neuem Knochen und KEM dabei gut erkennbar waren, konnte auf die Anwendung von 16-Bit-Aufnahmen, die in der Datenmenge deutlich speicherplatzintensiver wären, verzichtet werden. Der Wert „0“ steht dabei im Farbsystem für die Farbe Schwarz, der Wert „255“ für Weiß. In diesem Fall stehen die niedrigen Werte dabei für den Knochen. Dies entspricht der niedrigeren Abschwächung des Röntgenstrahls. Die höheren Werte stehen für das KEM. Die Graustufen-Grenzwerte für das KEM und den Knochen wurden basierend auf trabekulären strukturellen Unterschieden der Übergänge zu nicht mehr sichtbaren Artefakten (Rauschen bzw. *noise*) bzw. in den zweidimensionalen Schichtbildern sichtbaren „Sprenkel“ des KEM durch den Autor mittels des Programms CT-Analyzer festgelegt. Der untere Grenzwert des Knochens bzw. des KEM wurde angesetzt, sobald ein „Rauschen“ (*noise*) zu erkennen und der obere Wert, sobald die dicksten Strukturen zu erkennen waren. Die Segmentierung des Knochens vom KEM wurde histogrammbasiert durchgeführt. Diese Art der Auswertung erlaubte die Segmentierung des Knochens vom KEM. Da es im Histogramm keine Werte > 190 gab, konnte der Wert 190 mit 255 (schwarz) gleichgesetzt werden. Es wurden unterschiedliche Grenzwerte für die 18 Proben getestet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Die getesteten Schwellenwerte für KEM (erstes Zahlenpaar) und Knochen (zweites Zahlenpaar)

1. 105 - 220, 70 - 105	10. 117 - 190, 70-117	19. 130 - 190, 70 - 130
2. 105 - 190, 75 - 105	11. 117 - 190, 75-117	20. 130 - 220, 80 - 130
3. 107 - 190, 65 - 107	12. 119 - 190, 70-119	21. 130 - 190, 85 - 130
4. 107 - 190, 70 - 117	13. 119 - 190, 75-119	22. 135 - 190, 80 - 135
5. 107 - 190; 60 - 107	14. 120 - 220, 60-115	23. 135 - 190, 90 - 135
6. 109 - 190, 65 - 109	15. 120 - 190, 60 - 120	24. 135 - 190, 95 - 135
7. 109 - 190, 67 - 109	16. 120 - 190, 80 - 120	25. 140 - 190, 90 - 140
8. 111 - 190, 70 - 111	17. 125 - 190, 70 - 125	
9. 112 - 220, 70 - 112	18. 125 - 220, 75 - 125	

Nachfolgend die festgelegten Schwellenwerte für die einzelnen Gruppen. Die Gründe für die unterschiedlich gewählten Schwellenwerte beruhen unter anderem auf der Tatsache, dass unterschiedliche Mineralisierungsgrade des biologischen Knochenersatzmaterials und des ggf. neugebildeten Knochens zu einer höheren Ablenkung der Röntgenstrahlen und der daraus folgenden notwendigen Korrektur der Schwellenwerte führte.

Tabelle 4: Festlegung der Schwellenwerte für KEM und Knochen

	Kontrolle	BMP-2	proBMP-2
6 Wochen	KEM 105 - 220 Knochen 70 - 105	KEM 112 - 220 Knochen 70 - 112	KEM 112 - 220 Knochen 70 - 112
12 Wochen	KEM 112 - 220 Knochen 70 - 112	KEM 125 - 220 Knochen 75 - 125	KEM 130 - 220 Knochen 80 - 130

2.3.3 Dreidimensionale Auswertung

Die Untersuchung erfolgte anschließend in der benutzerdefinierten Verarbeitungs-Vorschau (*custom processing preview*). Der Auswertungsalgorithmus umfasste insgesamt 17 Schritte. Zuerst fand die Segmentierung des KEM aus dem 3-D-Datensatz statt. Es folgte dann die Bestimmung der Porenausdehnung und des Porenvolumens. Nachdem diese Faktoren bekannt waren konnte der Knochen innerhalb des KEM heraussegmentiert und dessen Anteil innerhalb des KEM bestimmt werden. Die Auswertung einer Probe, mit dem verwendeten Computer-System dauerte durchschnittlich 22 Minuten. Der gesamte Auswertungsalgorithmus befindet sich in Anlage 6.3. Nachfolgend eine kurze Erläuterung der wichtigsten Schritte:

Schritt 1: Berechnung des KEM

Segmentierung über Grenzwertbildung im 3D-Datensatz (*Thresholding 3D space*):

Aus dem in Abbildung 11 gezeigten Schnittbild sollte zuerst der Knochen heraussegmentiert werden. Gruppenspezifische, minimale und maximale Grau-Wert-Intervalle (*Adaptive (mean of min an max values)*) für das KEM wurden gesetzt. Die Abgrenzung des KEM vom Knochen innerhalb des Schnittes erfolgte somit über die höheren Graustufengrenzwerte. Die höheren Grenzwerte werden zu „weiß“ binarisiert, die tiefen zu „schwarz“ (*space*), daraus resultieren weiße Objekte. Die Objektbildung für die Segmentierung erfolgte nach Empfehlung des μ CT-Herstellers auf 4 Voxel.

Bildbereinigungs- und -optimierungsfunktionen:

Bereinigung durch Entfernung von kleinen Objekten (*Despeckle*): Dabei wurden bei jedem Schnitt (Remove speckles from 2D space) Objekte, die kleiner als 10 Pixel waren, entfernt (Abbildung 12 b).

Entfernung von nicht plausiblen Strukturen (*Morphological operations Closing 3D space*):

Die durch die Skalierung der Graustufen-Grenzwerte eventuell entstandenen "Löcher" im KEM Gebilde werden durch diesen Schritt mit kleinen Sphären bzw. "Kugeln" mit dem Radius von 4 Voxeln geschlossen (Abbildung 12 c).

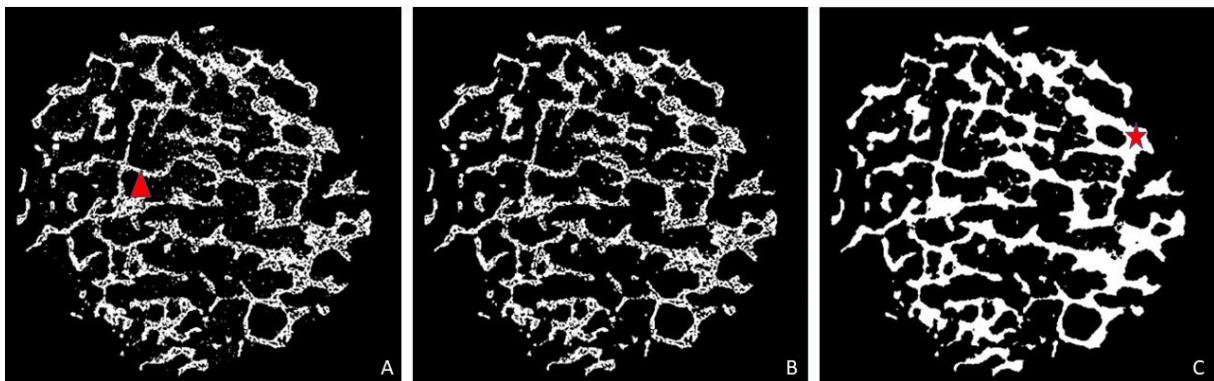


Abbildung 12: Berechnung des KEM durch Segmentierung des KEM über Grenzwertbildung aus dem 3-D-Datensatz sowie Bildbereinigungs- und -optimierungsfunktionen. Reduzierung kleiner Objekte (Dreieck Abb. 12 a) durch die Funktion „*Despeckle*“ (Abb. 12 b). Anschließender Verschluss von entstandenen Perforationen im KEM (Stern Abb. 12 c).

Schritt 2: Berechnung der Porenfläche

Speicherort- und Parameterauswahl des segmentierten KEM:

(*3-D-Analysis*): Verweis auf die relevanten Parameter der 3-D-Analyse des KEM.

Automatisierte Berechnung der ROI zur Ermittlung der Porenfläche (*ROI shrink-wrap*):

Um die inneren Flächen (KEM-Poren) zu messen, muss zunächst eine einheitliche Begrenzung der äußeren – offenen Poren – gefunden werden, um Randartefakte zu vermeiden. Ein Unterlassen dessen hätte zu Folge, dass der leere Raum zwischen der ROI-Begrenzung zu den Porenfläche hinzugezählt wird. Die ROI darf nicht durch einen Hohlraum unterhalb von 80 Pixeln gehen. Dieser Wert stellt das Zweifache des zuvor ermittelten mittleren Porendurchmessers dar. Somit kann eine poröse dreidimensionale Struktur ausgewertet werden indem virtuelle Sphären den Hohlraum umfahren (Abbildung 13 a).

Bildbereinigungs- und Bildoptimierungsfunktionen (*Despeckle*):

„Weiße Spreckel“ (*white speckles*) mit einer Größe von weniger als 50 Pixeln werden entfernt (Abbildung 13 b).

Morphological operations: *Erosion (3D space)*: Sphären mit dem Radius von 4 Voxeln erodieren die zuvor verschlossenen Bereiche (Abbildung 13 c).

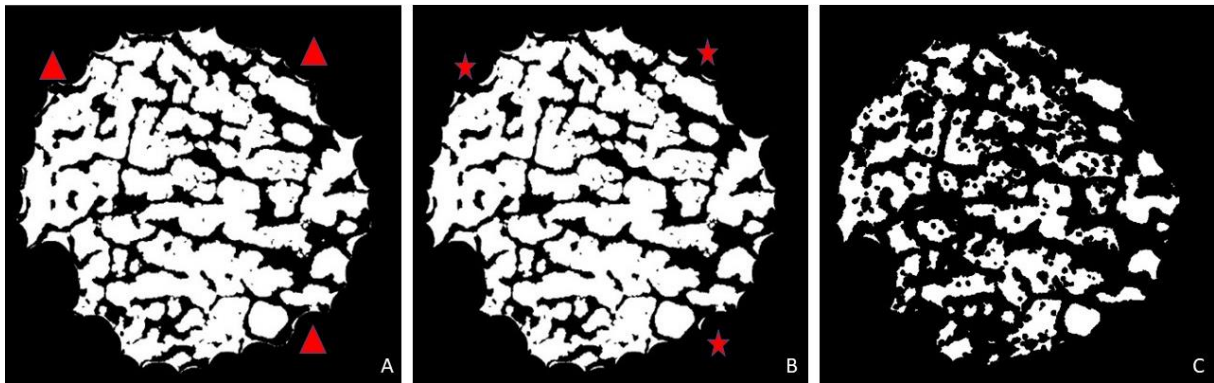


Abbildung 13: Berechnung der Porenfläche durch die Begrenzung der peripheren ROI durch definierte Sphären mit sichtbaren verbliebenen „Spreckeln“ (Dreieck) (Abb. 13 a). Mit der Bildbereinigungsfunktion „*Despeckle*“ werden Spreckel mit einer Größe von weniger als 50 Pixeln entfernt (Stern) (Abb. 13 b) sowie die zuvor verschlossenen Bereiche (Abb. 12 c) mit der Funktion „*Morphological operations*“ wieder erodiert (Abb. 13 c).

Schritt 3: Berechnung des Knochenvolumens

Zunächst wird die neue ROI übernommen. Danach erfolgt die Auswertung nach demselben Muster wie beim KEM. Es folgt wie beim KEM die **Segmentierung des Knochens über Grenzwertbildung**: Gruppenspezifische, minimale und maximale Grau-Wert-Intervalle für den Knochen wurden gesetzt, d.h. die Abgrenzung des Knochens innerhalb des Schnittes (Abbildung 14 a). Die hohen Grenzwerte werden zu „weiß“ binarisiert, die tiefen zu „schwarz“ (*space*), es resultieren weiße Objekte (Abbildung 14 b).

Bildbereinigungs- und -optimierungsfunktionen (*Despeckle*):

Objekte mit einer Größe von weniger als 20 Pixeln werden aus dem 2-dimensionalen Raum entfernt. Objekte (*white speckles*) mit einer Größe von weniger als 100 Voxeln werden aus dem 3-dimensionalen Raum entfernt (Abbildung 14 c).

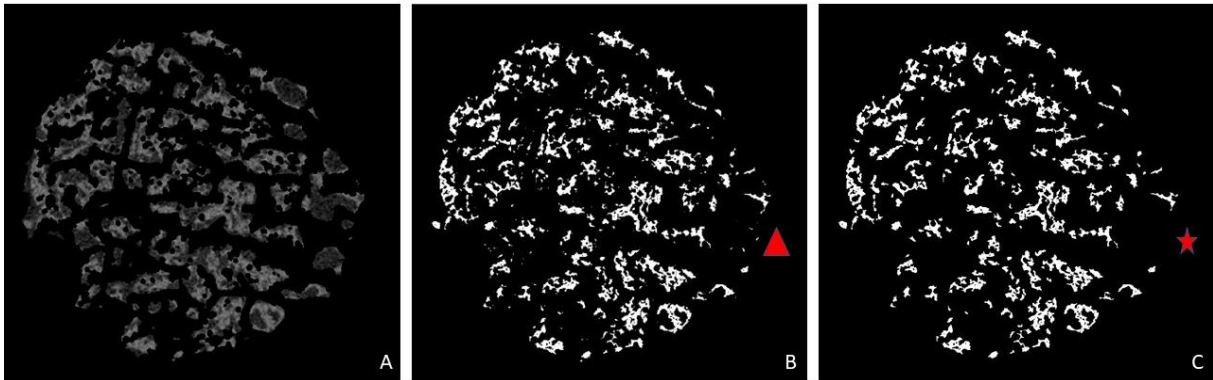


Abbildung 14: Berechnung des Knochens durch Segmentierung des Knochens („*Bitwise operations*“) (Abb. 14 a) über Grenzwertbildung („*Thresholding*“) (Abb. 14 b) aus dem 3-D-Datensatz sowie Bildbereinigungs- und -optimierungsfunktionen („*Despeckle*“) (Abb. 14 c). Objekte mit einer Größe von weniger als 100 Voxeln werden entfernt. Vergleich beispielhaft Abb. 14 b (Dreieck) und nach der durchgeführten Bildbereinigungsfunktion Abb. 14 c (Stern).

Nach Subtraktion wurde der neugebildete Knochen dreidimensional quantifiziert. Die Ergebnisse der Ausgabedateien wurden anschließend in einer Excel-Tabelle zusammengeführt. Es wurde somit eine teilautomatisierte, non-destruktive Untersuchung der Proben mittels μ CT-Datensätzen etabliert (Abbildung 15).

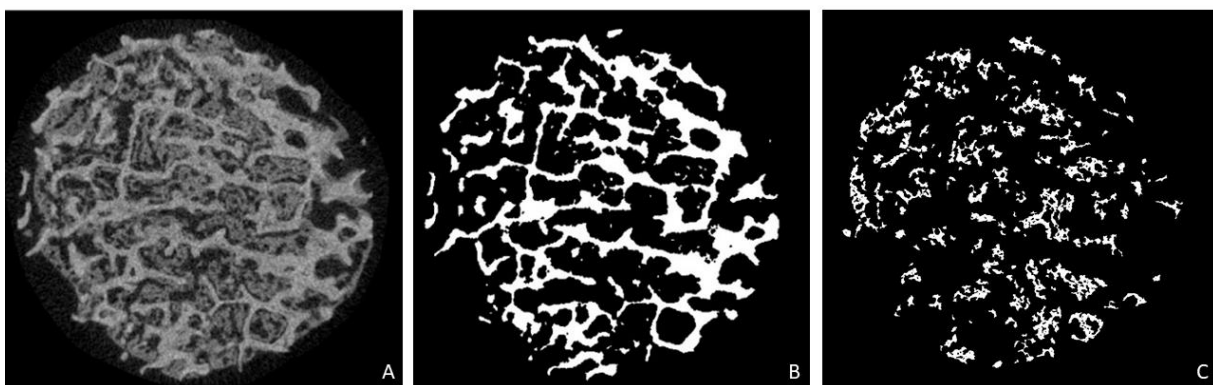


Abbildung 15: Schrittweise 3D-Auswertung zur Berechnung des neu gebildeten Knochenvolumens im Scaffold. Festlegung einer *region of interest* (15 a). Nachfolgend wird das KEM (15 b) und der neu gebildete Knochen (15 c) segmentiert, womit das Volumen des neu gebildeten Knochens quantifiziert werden kann.

2.3.4 Zweidimensionale Auswertung

Um die 3D-Auswertung und den subjektiv gewonnenen Eindruck, dass bei den proBMP-2-Proben zentral mehr Knochen gebildet wurde zu überprüfen, wurde zur besseren regionalen Analyse auch eine Einzelschichtauswertung (2-D) der μ CT-Datensätze durchgeführt. Dafür mussten zunächst die Auswertungsvorgaben modifiziert werden. Die Z-Achse wurde mit dem Programm Data Viewer definiert, d.h. der Datensatz erstens so ausgerichtet und abgespeichert, dass die Auswertung in axialer Richtung erfolgt (von der Rippe zur Haut). Eine zweite Ausrichtung definierte die koronale Auswertungsrichtung, in diesem Fall, vom Kopf

zum Schwanz. Nach Abspeicherung der so ausgerichteten Datensätze wurden die im Programm CT-Analyzer geöffnet und mit dessen Hilfe wiederum die ROI gebildet. Da die Schwellenwerte bereits bekannt waren, erfolgte wieder die bereits beschriebene benutzerdefinierte Verarbeitung nach bekannten Parametern. Dafür mussten erneut die zuvor beschriebenen Analyseschritte befolgt werden. Die 17 Auswertungspunkte wurden durch einen weiteren Punkt, die „2-D-Analyse“ an vorletzter Stelle ergänzt. Die 2-D-Analyse erlaubt die Schicht-für-Schicht-Auswertung (*layer by layer*) der 2-D-Aufnahmen aus denen der 3-D-Datensatz besteht. Erneut erfolgte die Segmentierung des Knochens aus dem KEM. Jedoch erlaubten die Ergebnisse der 2-D-Auswertung weitere Schlussfolgerungen aus der Verteilung des Knochens innerhalb des KEM. Die beiden Kontrollgruppen wurden auf Grund der sehr geringen Knochenmenge nicht ausgewertet. Die Anzahl der Schnitte (Tabelle 5) für jede Probe variierte (axial 380-537, koronal 734-879).

Tabelle 5: Anzahl der Schnitte nach Schnittebenen für BMP-2 und proBMP-2 Proben

Probe	Gruppe	Zeitpunkt	Anzahl der Schnitte axiale Schnittebene	Anzahl der Schnitte koronale Schnittebene
b07b	BMP-2	6 Wochen	457	772
b08b	BMP-2	6 Wochen	479	816
p09b	BMP-2	6 Wochen	537	819
p25b	proBMP-2	6 Wochen	478	879
p26b	proBMP-2	6 Wochen	476	788
p38b	proBMP-2	6 Wochen	459	858
b11b	BMP-2	12 Wochen	380	774
k10b	BMP-2	12 Wochen	484	744
k12b	BMP-2	12 Wochen	477	734
p28b	proBMP-2	12 Wochen	525	776
p29b	proBMP-2	12 Wochen	452	754
p30b	proBMP-2	12 Wochen	519	770

Die grafische Darstellung jeder einzelnen Schnittebene erlaubte es nicht die Versuchsgruppen grafisch nachvollziehbar miteinander zu vergleichen. Daher wurden die Proben in 5 (axiale Schnittrichtung) und 7 (koronale Schnittrichtung) zusammengefasste Ebenen aufgeteilt. Dies erlaubte eine übersichtliche und vergleichbare grafische Darstellung (Abbildung 16).

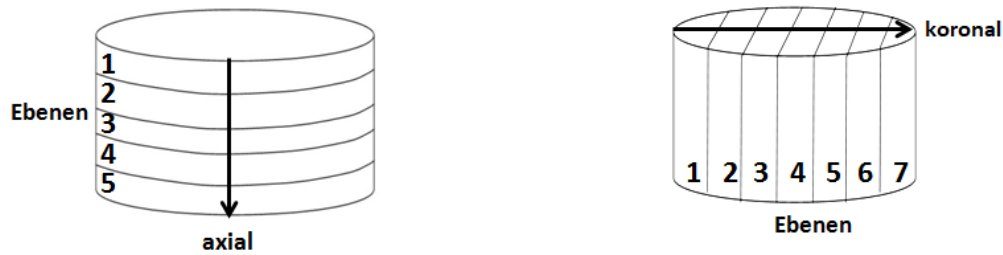


Abbildung 16: Darstellung der Verteilung einzelner Ebenen in axialer und koronaler Schnittrichtung

Die Knochenmenge innerhalb der Ebenen wurde mithilfe der Analyse-Software Microsoft Excel in Tabellen summiert. Daraus wurde ein Durchschnittswert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

2.4 Histomorphometrie

2.4.1 Herstellung der Schliffe

Da im Rahmen dieses Versuchs überprüft werden sollte, ob die Etablierung einer halbautomatischen non-destruktiven Auswertungsmethode möglich ist, diente die klassische Histomorphometrie als Kontrolle und Referenz für die Auswertung. Die Herstellung der Schnitte bzw. Schliffe erfolgte in koronaler Schnittrichtung. Nach Herstellung der Paraffinschnitte und der zeitlich aufwendigeren Schliffe folgte die Färbung der Schliffe. Die histologischen Präparate wurden durch die TA des Histologielaors Fr. Dorothea Gütschow hergestellt. Folgendes Protokoll für die Schliffherstellung wurde verwendet:

1. Die in 4 % Formalin fixiertes Gewebe wurde rippenseitig mit blauer histologischer Markierfarbe (Histological Marking Colour, WAK-HM-BL-5, WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts.), die später zur Orientierung dienen sollte, markiert.
2. Die Gewebsexplantate wurden zunächst mittig in koronaler Schnittrichtung in zwei Hälften gesägt. Eine Hälfte wurde entkalkt (Usedecalc, Medite, U.S.A.) und für die Paraffineinbettung vorbereitet, die andere Hälfte, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde, für die Trenn-Dünnschliff-Histologie vorbereitet.
3. Die Proben wurden 2 Std. unter laufendem heißem Wasser entwässert.
4. Darauf folgte das 14-tägige Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %).

5. Danach wurden die Proben mit Technovit® 7200 (Kulzer GmbH Division Technik, Wehrheim) auf Basis von Glycolmethacrylat in Kunststoff für jeweils 1 Woche in 30, 50, 70 und 100 % Technovit® 7200 in Histoformen eingebettet.
6. Anschließend fand noch für einen Tag die Polymerisation in Förmchen mit frischem 100 % Technovit® 7200 VLC statt.
7. Zur Aushärtung kamen die Förmchen bei 50 °C für 3 Tage in den Brutschrank und anschließend noch für eine Woche ins Tageslicht bei Raumtemperatur.
8. Die ausgeblockten Präparate wurden zunächst mit Technovit 7210 VLC (Kulzer GmbH Division Technik, Wehrheim), einem Einkomponentenpräzisionskleber auf Methacrylatbasis auf den Objektträger geklebt und am Mikro-Schleifgerät (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) planparallel geschliffen.
9. Die Präparate wurden dann mit der Diamant Bandsäge (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) in 200 µm dicke Scheiben gesägt.
10. Diese wurden nach der Trenn-Dünnschliff-Technik in Anlehnung an Prof. Donath in 15-20 µm dünne Schriffe mit dem Mikro-Schleifgerät (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) geschliffen.
11. Abschließend erfolgte noch die Endpolitur am Mikro-Schleifgerät.

Einige Schriffe und Paraffinschnitte wurden zunächst mit Hämatoxylin-Eosin-, Giemsa-Toluidinblau-, Masson-Goldner- und van-Giesson-Färbungen gefärbt und zur Übersicht eingescannt. Es erfolgte eine Vorabanalyse zur Auswahl der kontrastreichsten Methode. Der mit Abstand deutlichste Unterschied ergab sich bei den Knochenschliffen mit der van-Gieson-Färbung. Dabei zeigte sich das KEM durch den Schleifvorgang segmentiert und hell rot, der Knochen dunkelrot, Osteoid dunkel gelb und das Bindegewebe sowie Muskelgewebe gelb (Abbildung 17). Das Färbeprotokoll „Van Gieson nach Hansen“ umfasste die Stammlösungen A + B (1 : 1) nach Weigert, das Pikrofuchsin nach Hansen (Morphisto GmbH, Frankfurt a.M.) sowie mehrere Spülungen mit *Aqua dest.*, *Aqua nondest.*, Salzsäure, Alkohol 1 %, Ethanol vergällt (70, 96 %), Isopropanol und Xylol. Nach jedem Färbeschritt wurden die Schriffe unter dem Mikroskop kontrolliert.

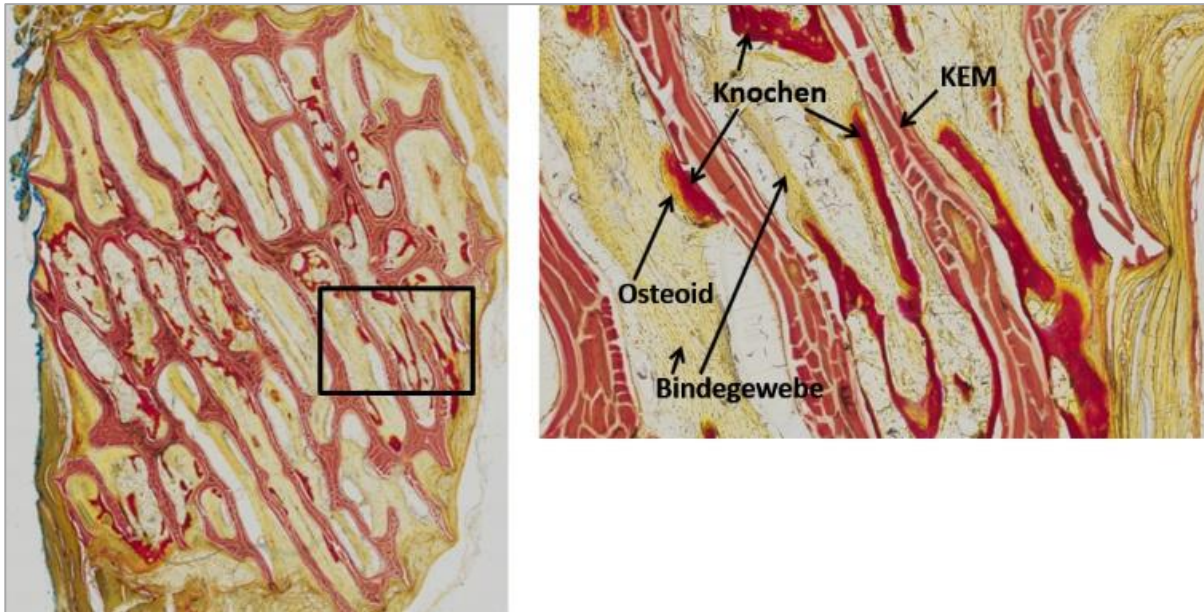


Abbildung 17: Übersicht Schlifffpräparat Van-Gieson-Färbung

Auf Grund der Heterogenität einzelner Schlifffärbungen war in diesem Versuch eine automatisierte Untersuchung weder mit dem Programm ImageJ Version 1.51J8 (NIH, USA) noch ZEN 2.3 blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) möglich. Daher wurde die, zeitlich deutlich aufwendigere, manuelle Knochenarealmarkierung mit Hilfe von Markierungspunkten vorgenommen.

2.4.2 Erstellung der Bilddatensätze

Für die histomorphometrische Auswertung erfolgte das Einscannen der Schliffe, durch den TA des Histologielabors Hr. Wolter, mit dem Mikroskop AxioImager M2 inkl. Scanningtisch (Wienecke & Sinske GmbH, Gleichen-Bremke) und Kamera Zeiss AxioCamMRc5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) bei 20-facher Vergrößerung. Die dazu verwendete Software Zeiss Zen blue 2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) erzeugte die aus einzelnen Aufnahmen zusammengesetzten Übersichten im .dzi-Rohformat die anschließend zu TIF-Format konvertiert wurden. Die Farbtiefe der Bilder lag bei 24 bit. Die zusammengesetzten Bilddateien wurden mit einem Maßstabsbalken (1000 μm) bei einer Skalierung von 0,68 $\mu\text{m}/\text{px}$ versehen.

2.4.3 Histomorphometrische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der Software ZEN 2.3 blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Dazu wurde ein 9-Felder-Raster-Modell ausgewählt welches den Vergleich der Knochenverteilung innerhalb der Probe ermöglichen sollte.

Das Vorgehen bei der histologischen Auswertung (Abbildung 18):

1. Die Bilder wurden alle mit der blau markierten Seite (rippenseitig) nach oben gedreht sowie waagrecht ausgerichtet (Adobe Photoshop CS2, Version 9.0) um eine standardisierte Auswertung zu ermöglichen (Abbildung 18 a).
2. Der Randbereich des KEM wurde mit einem Kreis festgelegter Größe (1000 μm Durchmesser = 1470 Pixel) umfahren, um die Bereiche vom Bindegewebe zu beschneiden (Adobe Photoshop CS2, Version 9.0). Die so bearbeiteten Bilder wurden zur Weiterverarbeitung mit ZEN 2.3 abgespeichert (Abbildung 18 b).
3. Für eine standardisierte Auswertung wurde ein 9-Felder-Raster innerhalb eines Vierecks gebildet. Dabei betrug die Skalierung 0,68 $\mu\text{m}/\text{px}$. Die Rasterdimensionen ergaben sich aus der festgelegten Regel: „Die Ecke des Vierecks = Scheitelpunkt der KEM-Grenzbereiche“. Die oberen Felder 1-3 (von links nach rechts) stellen dabei den Bereich „rippenseitig“, das zentrale Feld 5 den Bereich „zentral“ und die Felder 7-9 den Bereich „hautseitig“ dar. Die Felder 4 und 6 wurden nicht ausgewertet, da nur die zentrale Kernregion für den Vergleich vom Interesse war (Abbildung 18 c).
4. Der Knochen wurde durch das Setzen von Markierungspunkten an dessen Außengrenzen abgegrenzt und die Flächen in einer Übersichtstabelle in ZEN 2.3 gespeichert (Abbildung 18 d).
5. Anschließend wurden die Rasterflächen in „rippenseitig“, „zentral“ und „hautseitig“ nach gleichem Prinzip markiert und berechnet (Abbildung 18 e, Fläche türkis).
6. Die Leerbereiche in Randbereichen des Rasters wurden markiert (Abbildung 18 f, Fläche pink, Pfeil) und von der jeweiligen Fläche subtrahiert.
7. Alle Werte wurden in Tabellen übertragen und nach Datenexport grafisch mit dem Programm Microsoft Excel dargestellt.

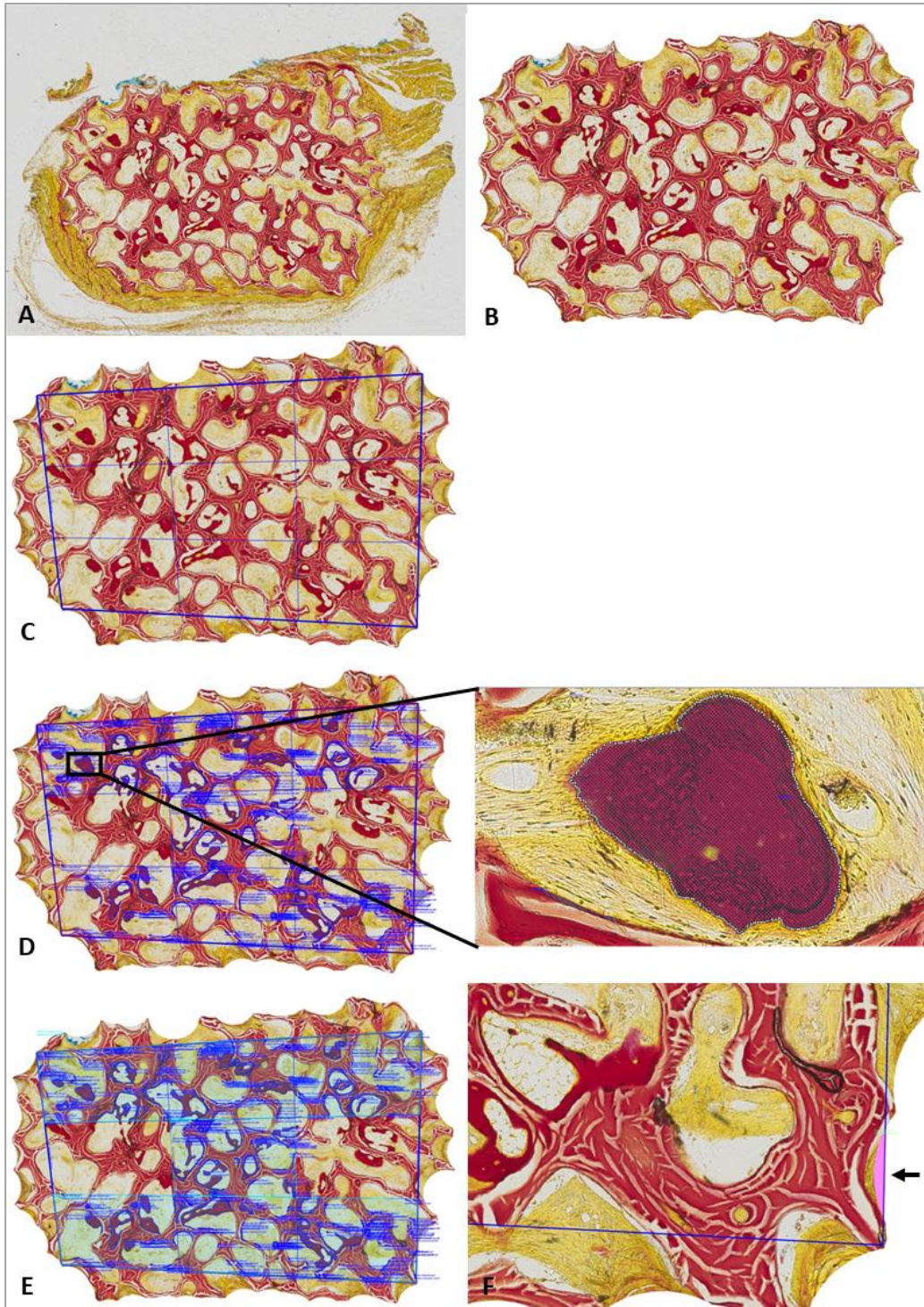


Abbildung 18: Auswertungsschritte Histomorphometrie. A: Ausrichten der Bilder, rippenseitige Fläche (blaue Markierung) zeigt nach oben. B: Beschneiden des Randbereichs. C: Bildung eines 9-Felder-Rasters nach festgelegten Kriterien. D: Abgrenzen des neugebildeten Knochens mit Markierungspunkten. Die so ermittelten Knochenflächen werden in einer Übersichtstabelle zusammengefasst. E: Abgrenzen der Rasterflächen in „rippenseitig“, „zentral“ und „hautseitig“ (Flächen türkis hinterlegt). F: Markierung der Leerbereiche (Pfeil, pinke Fläche) im Randbereich des Rasters und Subtraktion dieser von der jeweiligen Fläche. Bei der im Schaubild verwendeten Schnitt handelte es sich um eine BMP-2, 12 Wochen Probe.

2.5 Statistik

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Parameter der deskriptiven Statistik, nämlich arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Median sowie Quartile angewendet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten studentischen t-Test, $n=3$, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ ermittelt. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgten mit der Analyse-Software Microsoft Excel.

3. Ergebnisse

Für den Versuch wurden insgesamt 21 Tiere verwendet. Zwei Tiere verstarben nach Einleitung der Narkose für die Implantation der Scaffolds. Ein Tier aus der Gruppe proBMP-2 12 W verstarb am 13. Tag bei der Einleitung der Narkose zur Deckung einer Wunddehiszenz. Kleine Wunddehiszenzen waren bei allen Versuchsgruppen zu beobachten. Nach spätestens 6-9 Tagen verlief die Heilung der übrigen Tiere ohne nennenswerte Komplikationen.

3.1 Dreidimensionale Auswertung mittels Micro-CT

3.1.1 Porosität und Porenvolumen

Die mittlere Porosität der KEM-Zylinder (Abbildung 19) betrug 75,21 ($\pm 2,6$) %. Die einzelnen Werte variierten dabei von maximal 84,24 % bis minimal 69,12 %. Damit korrelierten diese mit den in der Literatur beschriebenen Werten von 75 - 80 % für das KEM Bio-Oss® (Jensen et al., 1996).

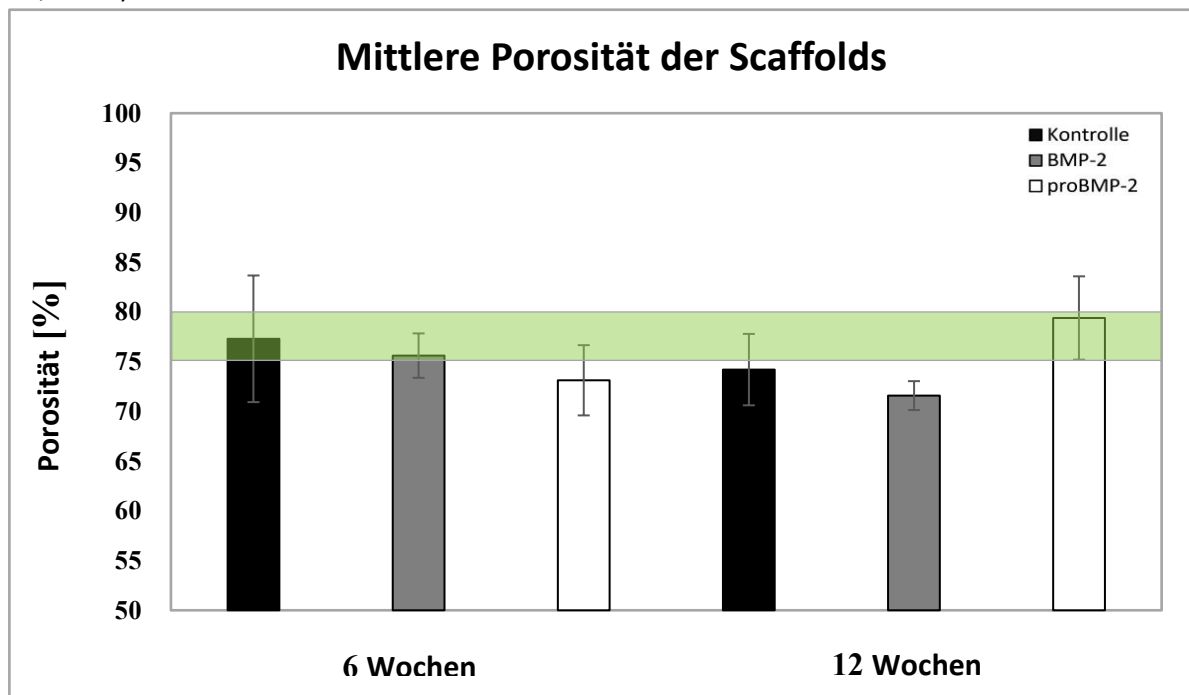


Abbildung 19: Mittlere Porosität der verwendeten KEM-Zylinder nach Gruppen unterteilt. Die Fehlerbalken stehen dabei für die variablen Werte, der grün hinterlegte Balken für die in der Literatur beschriebenen mittleren Bereich für die Porosität des KEM BioOss®.

Das Porenvolumen des KEM unterliegt auf Grund der biologischen Provenienz natürlichen Schwankungen. In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert des Volumens der 6 Wochen Gruppe bei $137,04 \pm 21,3 \text{ mm}^3$ und $97,65 \pm 9,05 \text{ mm}^3$ in der 12 Wochen Gruppe. Bei der BMP-2 Gruppe 6 Wochen waren es $168,37 \pm 7,48 \text{ mm}^3$ und $132,92 \pm 10,75 \text{ mm}^3$ in der 12 Wochen Gruppe. Auch in der proBMP-2-Gruppe zeigte sich ein ähnliches Bild. So lag das Porenvolumen in der

6 Wochen Gruppe mit $185,07 \pm 19,9 \text{ mm}^3$ ebenfalls höher als in der 12 Wochen Gruppe mit $138,38 \pm 13,5 \text{ mm}^3$ (Abbildung 20).

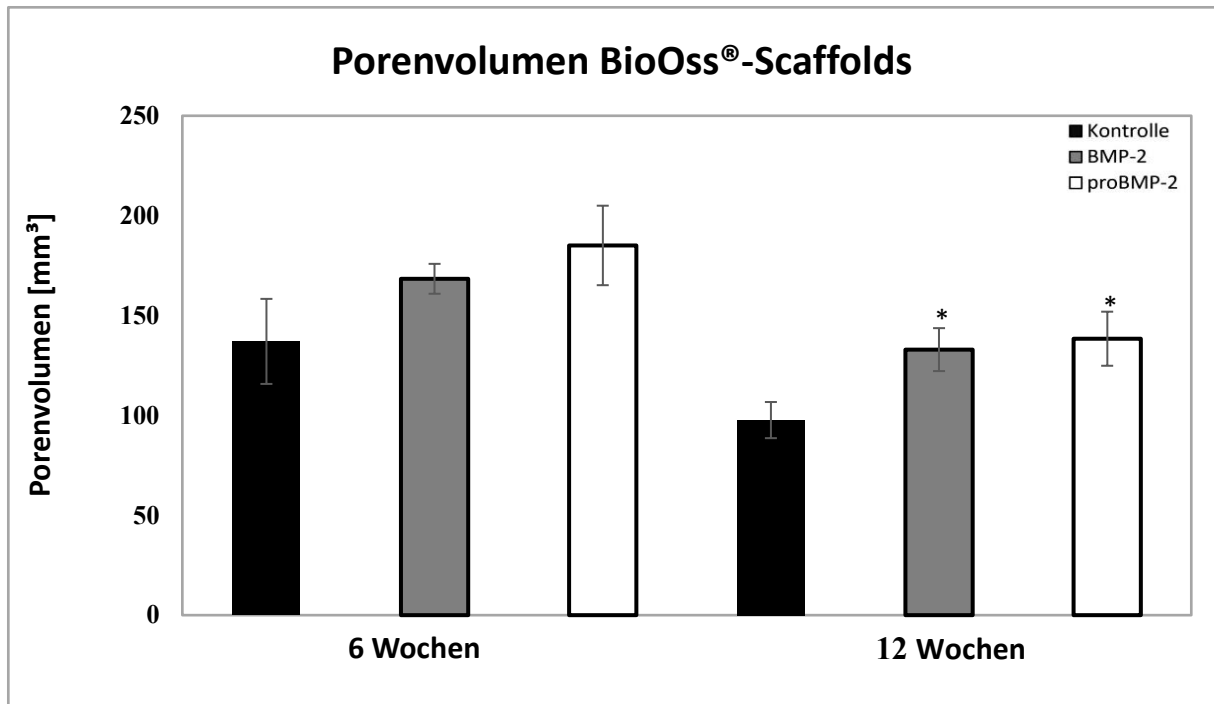


Abbildung 20: Das Porenvolumen nach Gruppen unterteilt, zeigte einen schwach signifikanten Unterschied innerhalb der 12 Wochen - Gruppen. (* $p < 0,05$)

Das unterschiedliche Porenvolumen der 12 Wochen-Gruppen im Vergleich untereinander wies bei dem verwendeten ungepaarten studentischen t-Test eine schwache statistische Signifikanz auf (Tabelle 6).

Tabelle 6: Porenvolumen in mm^3 : Übersicht der Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) und der Signifikanz (ungepaarter studentischer t-Test, $n = 3$) entsprechend der Gruppeneinteilung

Gruppen	6 Wochen		12 Wochen	
	M ± SD	Signifikanz	M ± SD	Signifikanz
BMP-2	168,37 ± 7,48	$p = 0,16$	132,92 ± 10,75	$p = 0,02$
Kontrolle	137,04 ± 21,29		97,65 ± 9,05	
proBMP-2	185,07 ± 19,90	$p = 0,08$	138,38 ± 13,53	$p = 0,03$
Kontrolle	137,04 ± 21,29		97,65 ± 9,05	
BMP-2	168,37 ± 7,48	$p = 0,36$	132,92 ± 10,75	$p = 0,04$
proBMP-2	185,07 ± 19,90		185,07 ± 19,90	

3.1.2 Knochenvolumen

Wie an den μ CT-Daten in der Abbildung 21 zu sehen, ergab sich in diesem Versuch im Mittel das höchste Knochenvolumen durch die proBMP-2 Applikation, nach 6 Wochen leicht besser (BMP-2: $3,43 \pm 0,86 \text{ mm}^3$; proBMP-2: $7,14 \pm 2,57 \text{ mm}^3$) und nach 12 Wochen deutlich mehr als beim BMP-2 (BMP-2: $6,01 \pm 4,20 \text{ mm}^3$; proBMP-2: $19,24 \pm 11,24 \text{ mm}^3$). Zu beiden Zeitpunkten also induziert proBMP-2 ein höheres Knochenvolumen als BMP-2. In den Kontrollen zeigte sich, wie erwartet, weder nach 6 Wochen ($0,06 \pm 0,02 \text{ mm}^3$) noch nach 12 Wochen ($0,06 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) signifikante Knochenbildung. Der Median (Abbildung 21) der proBMP-2 Gruppe ist zum Vergleich nach 6 Wochen leicht (BMP-2: $3,05 \text{ mm}^3$; proBMP-2: $5,52 \text{ mm}^3$) und nach 12 Wochen deutlich höher (BMP-2: $4,82 \text{ mm}^3$; proBMP-2: $13,02 \text{ mm}^3$). Lediglich das Knochenvolumen der BMP-2 6 Wochen Gruppe im Vergleich zur 6 Wochen Kontrollgruppe wies bei dem verwendeten ungepaarten studentischen t-Test eine schwache statistische Signifikanz auf (Tabelle 7). Die Einzelergebnisse befinden sich in Anlage 6.4.

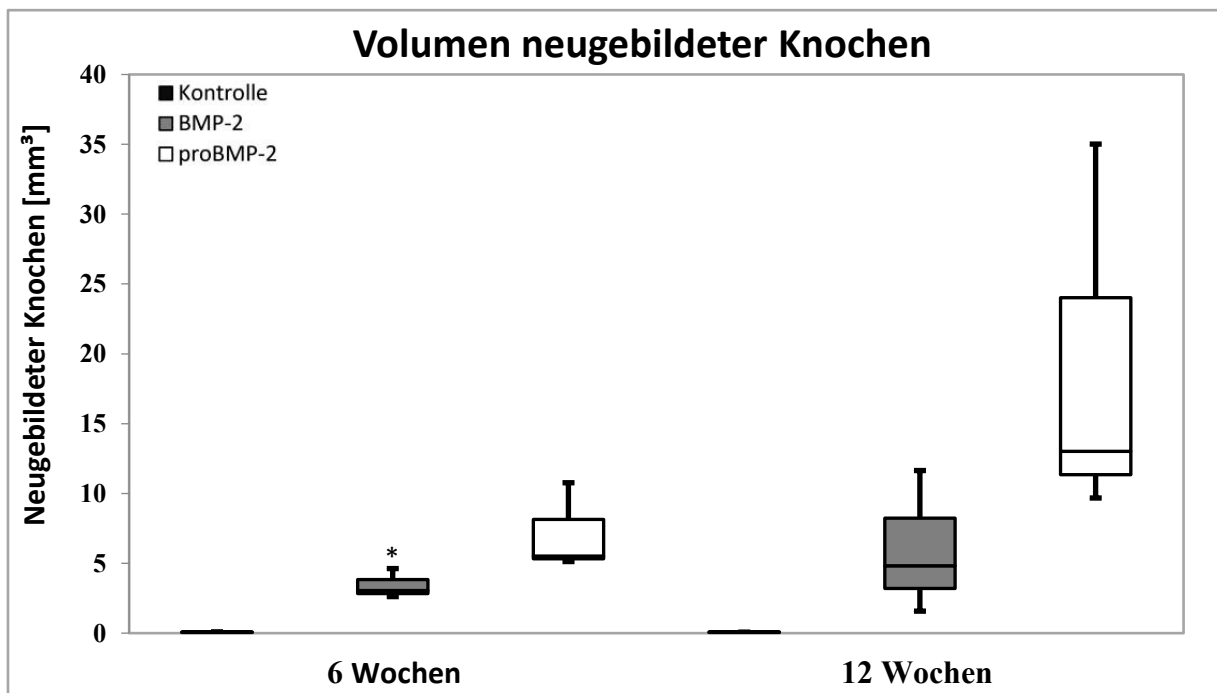


Abbildung 21: Das Knochenvolumen nach Gruppen unterteilt (* $p < 0,05$).

Tabelle 7: Knochenvolumen in mm³: Übersicht der Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) und der Signifikanz (ungepaarter studentischer t-Test, n=3) entsprechend der Gruppeneinteilung

Gruppen	6 Wochen		12 Wochen	
	M ± SD	Signifikanz	M ± SD	Signifikanz
BMP-2	3,43 ± 0,86	p = 0,03	6,01 ± 4,20	p = 0,18
Kontrolle	0,06 ± 0,02		0,06 ± 0,01	
proBMP-2	7,14 ± 2,57	p = 0,06	19,24 ± 11,24	p = 0,13
Kontrolle	0,06 ± 0,02		0,06 ± 0,01	
BMP-2	3,43 ± 0,86	p = 0,17	6,01 ± 4,20	p = 0,23
proBMP-2	7,14 ± 2,57		19,24 ± 11,24	

Wie in 2.3.1.2 erwähnt, wurden die rekonstruierten Datensätze vorab rein visuell, also subjektiv, auf das Vorhandensein von Knochen bewertet. Die Ergebnisse (Tabelle 8) korrelierten hierbei größtenteils mit der CT-Untersuchung.

Tabelle 8: Ergebnisse der semiquantitativen subjektiven Betrachtung der rekonstruierten Datensätze auf das Vorhandensein von Knochen innerhalb des KEM. Dafür wurde die Knochenmenge in Kategorien eingeteilt: 0 = kein Knochen, + = Spuren von Knochen, ++ = Knochen deutlich sichtbar vorhanden, +++ = viel Knochen, ++++ = Poren größtenteils mit Knochen durchbaut.

6 Wochen			12 Wochen		
Gruppe	Probe	Knochenmenge	Gruppe	Probe	Knochenmenge
Kontrolle	K03BioO	+	Kontrolle	K01BioO	+
Kontrolle	K04BioO	+	Kontrolle	K05BioO	++
Kontrolle	K22BioO	0	Kontrolle	K06BioO	+
BMP-2	B07BioO	++	BMP-2	B11BioO	+++
BMP-2	B08BioO	+++	BMP-2	B10BioO	++
BMP-2	B09BioO	+++	BMP-2	B12BioO	++
proBMP-2	P25BioO	+++	proBMP-2	P28BioO	+++
proBMP-2	P26BioO	+++	proBMP-2	P29BioO	++++
proBMP-2	P38BioO	+++	proBMP-2	P30BioO	+++

Bei der Berechnung des mittleren prozentualen Anteils des neugebildeten Knochenvolumens innerhalb des KEM-Zylinders fand eine Relativierung des prozentualen Anteils der Menge des neugebildeten Knochens im Verhältnis zum Porenvolumen statt, da dieses bei jeder Probe ungleich ist. Wie beim Knochenvolumen ergab sich in diesem Versuch der höchste prozentuale Anteil durch die proBMP-2 Applikation (Abbildung 22), nach 6 Wochen leicht besser (BMP-2: 2,07 ± 0,62 %; proBMP-2: 4,07 ± 1,96 %) und nach 12 Wochen deutlich mehr als beim BMP-2 (BMP-2: 4,61 ± 3,15 %; proBMP-2: 14,73 ± 9,97 %). Zu beiden Zeitpunkten also induziert proBMP-2 ein höheres Knochenvolumen als BMP-2. In den Kontrollen zeigte sich, wie

erwartet, weder nach 6 ($0,04 \pm 0,03$ %) noch nach 12 Wochen ($0,06 \pm 0,01$ %) eine signifikante Knochenbildung. Der Median der proBMP-2 Gruppe ist nach 6 Wochen leicht (BMP-2: 1,8 %; proBMP-2: 2,9 %) und nach 12 Wochen deutlich höher (BMP-2: 4 %; proBMP-2: 8,4 %).

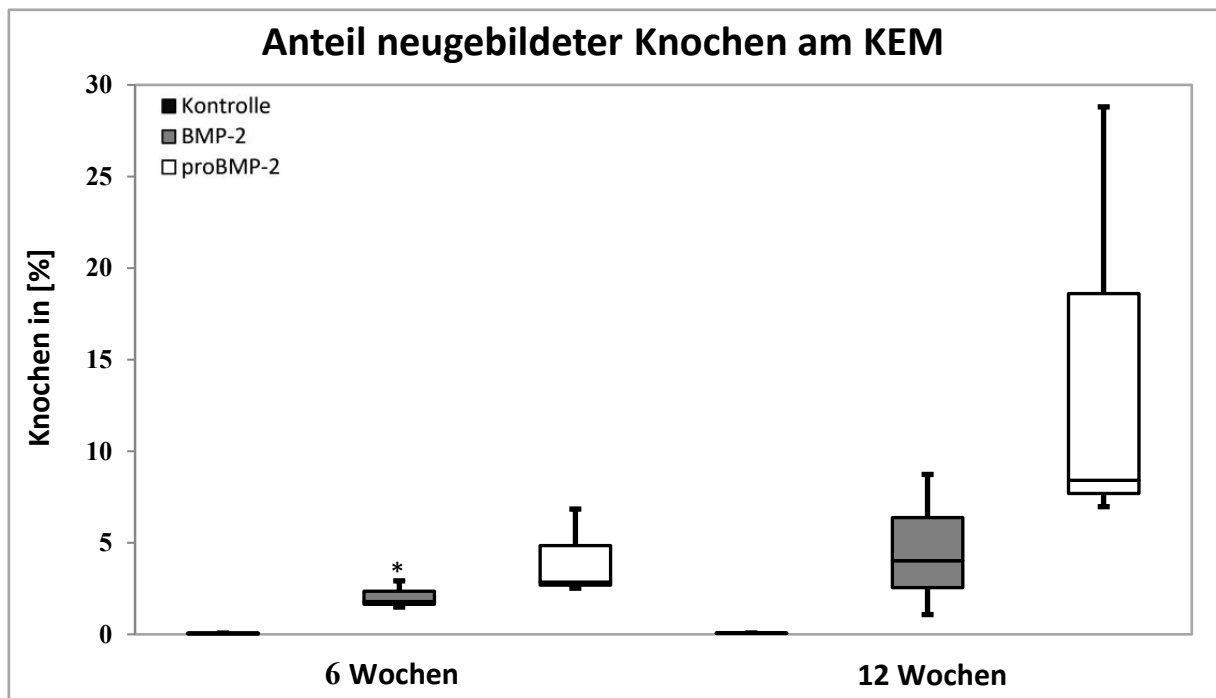


Abbildung 22: Prozentualer Anteil des neugebildeten Knochens innerhalb des KEM nach Gruppen unterteilt

Tabelle 9: Prozentualer Anteil des neugebildeten Knochens am KEM in Prozent. Übersicht der Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) und der Signifikanz (ungepaarter studentischer t-Test, n=3) entsprechend der Gruppeneinteilung

Gruppen	6 Wochen		12 Wochen	
	M ± SD	Signifikanz	M ± SD	Signifikanz
BMP-2	2,07 ± 0,62	p = 0,04	4,61 ± 3,15	p = 0,18
Kontrolle	0,04 ± 0,03		0,06 ± 0,01	
proBMP-2	4,07 ± 1,96	p = 0,10	14,73 ± 9,97	p = 0,17
Kontrolle	0,04 ± 0,03		0,06 ± 0,01	
BMP-2	2,07 ± 0,62	p = 0,28	4,61 ± 3,15	p = 0,29
proBMP-2	4,07 ± 1,96		14,73 ± 9,97	

3.2 Zweidimensionale Auswertung mittels Micro-CT

3.2.1 Axiale Schnittrichtung

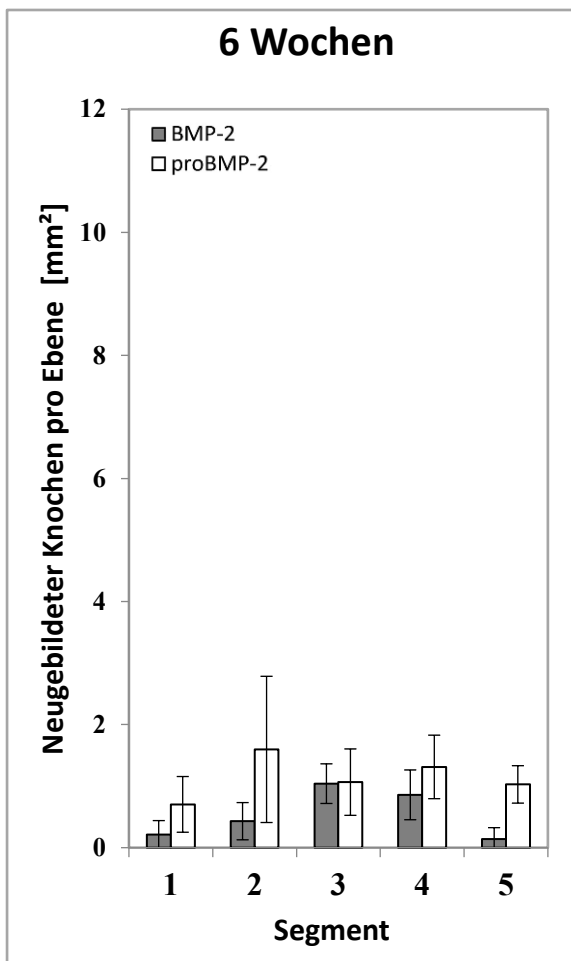


Abbildung 11a: Knochenfläche der Segmente in axialer Schnittrichtung nach 6 Wochen

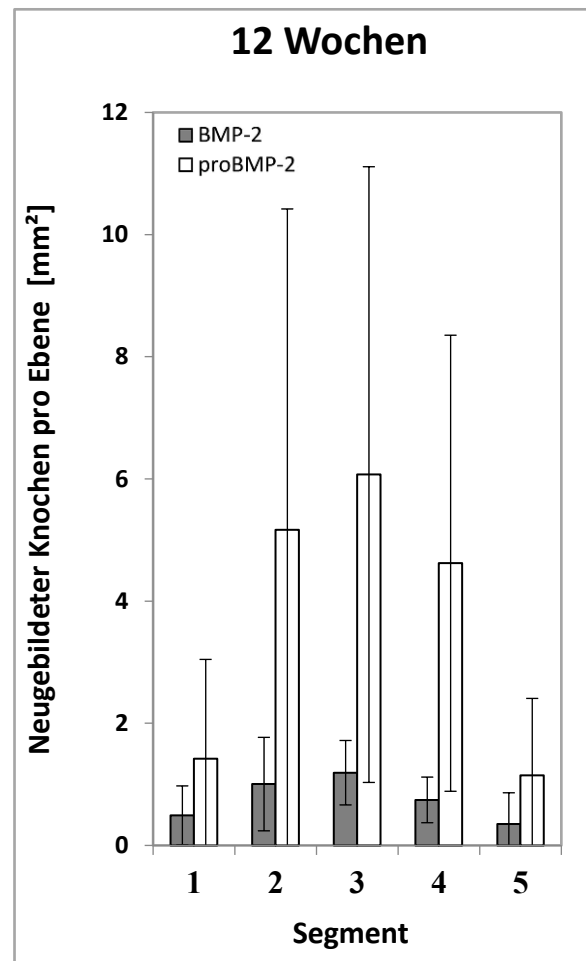


Abbildung 23b: Knochenfläche der Segmente in axialer Schnittrichtung nach 12 Wochen

Wie in 2.3.1.4 beschrieben, erfolgte die Zusammenfassung einzelner Schnitte aus Gründen der Vergleichbarkeit zu 5 Segmenten in axialer Schnittrichtung, um einen Vergleich der Knochenverteilung innerhalb der Proben durchführen zu können. Die ursprüngliche Erwartung, dass wie in dem Versuch von Gruber *et al.* gezeigt, sich mehr Knochen peripher bilden würde, wurde nicht bestätigt. Entgegen dieser Annahme bildete sich sowohl in der BMP-2 als auch in der proBMP-2 Gruppe zu beiden Zeitpunkten im Zentrum der KEM-Gerüste mehr Knochen. Dabei fällt auf, dass in der proBMP-2-Gruppe zu beiden Zeitpunkten zentral mehr Knochen gebildet wird als in der BMP-2-Gruppe. Die summierten Mittelwerte der Gesamtknochenfläche (Anlage 6.5) der untersuchten Schnitte sind nach 6 Wochen (BMP-2: $2,68 \pm 1,44 \text{ mm}^2$; proBMP-2: $5,71 \pm 3 \text{ mm}^2$) in der proBMP-2-Gruppe bereits mehr als doppelt und nach 12 Wochen (BMP-2: $3,78 \pm 2,66 \text{ mm}^2$; proBMP-2: $18,4 \pm 16,91 \text{ mm}^2$) fast fünf Mal

höher als in der BMP-2 Gruppe. Ebenfalls ist die peripher gebildete Knochenmenge zu beiden Zeitpunkten bei Applikation von proBMP-2 höher als bei BMP-2. Der statistische Vergleich der Mittelwerte, die aus den erwähnten summierten Mittelwerten gebildet wurden ergab bei der proBMP-2 Gruppe in der axialen Schnittrichtung nach 6 Wochen eine signifikant höhere Knochenneubildung (Tabelle 10).

3.1.2 Koronale Schnittrichtung

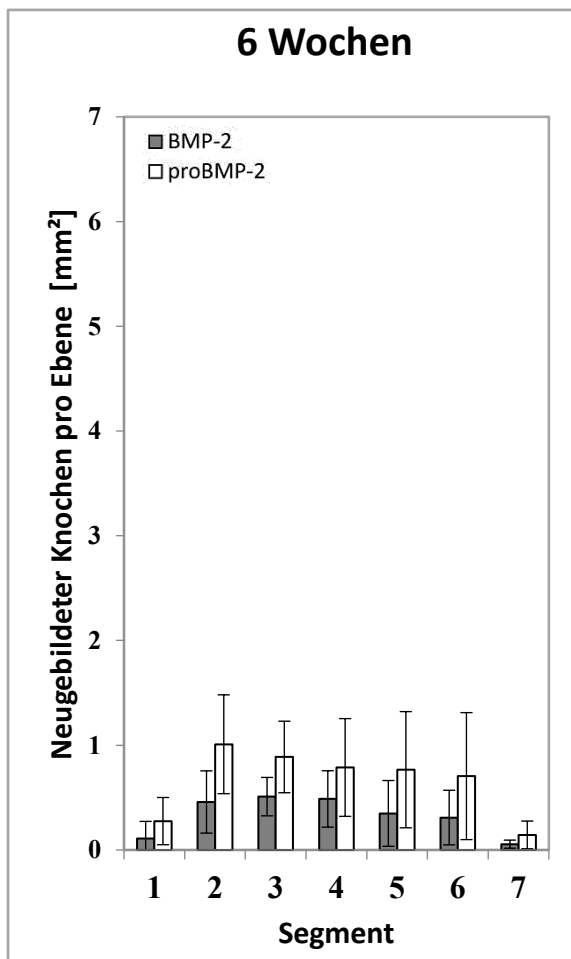


Abbildung 24a: Knochenfläche der Segmente in koronaler Schnittrichtung nach 6 Wochen

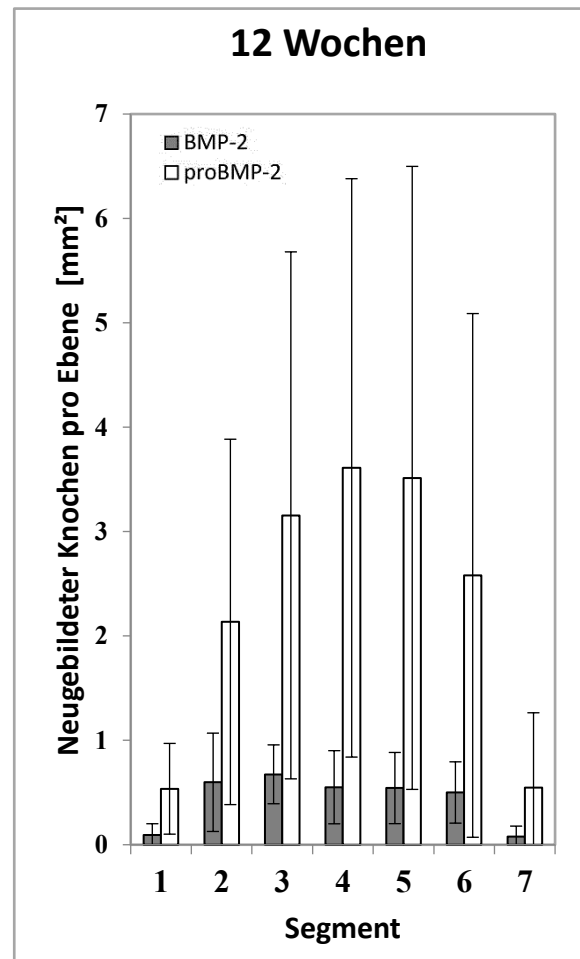


Abbildung 24b: Knochenfläche der Segmente in koronaler Schnittrichtung nach 12 Wochen

In koronaler Schnittrichtung erfolgte die Zusammenfassung einzelner Schnitte zu 7 Segmenten. Wie bereits in der axialen Schnittrichtung, bildete sich sowohl in der BMP-2 als auch in der proBMP-2 Gruppe zu beiden Zeitpunkten im Zentrum der KEM-Gerüste mehr Knochen. Im Mittel ist die Gesamtknochenfläche der untersuchten Schnitte nach 6 in der proBMP-2-Gruppe bereits fast doppelt Wochen (BMP-2: $2,28 \pm 1,53 \text{ mm}^2$; proBMP-2: $4,57 \pm 2,80 \text{ mm}^2$) und nach 12 Wochen mehr als fünf Mal höher als in der BMP-2 Gruppe (BMP-2: $3,04 \pm 1,95 \text{ mm}^2$; proBMP-2: $16,08 \pm 13,69 \text{ mm}^2$). Ebenfalls ist die peripher gebildete

Knochenmenge zu beiden Zeitpunkten bei Applikation von proBMP-2 höher als bei BMP-2. Der statistische Vergleich der Mittelwerte, die aus den erwähnten summierten Mittelwerten gebildet wurden, ergab bei der proBMP-2 Gruppe auch in der koronalen Schnittrichtung nach 12 Wochen eine signifikant höhere Knochenneubildung (Tabelle 10).

Tabelle 10: Knochenfläche in mm²: Übersicht der Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) und der Signifikanz (ungepaarter studentischer t-Test, n=3) entsprechend der Gruppeneinteilung

Gruppen	6 Wochen		12 Wochen	
	M ± SD	Signifikanz	M ± SD	Signifikanz
BMP-2 axial	0,54 ± 0,29	p = 0,03	0,76 ± 0,53	p = 0,04
proBMP-2 axial	1,14 ± 0,60		3,68 ± 3,38	
BMP-2 koronal	0,33 ± 0,22	p = 0,04	0,43 ± 0,28	p = 0,01
proBMP-2 koronal	0,65 ± 0,40		2,30 ± 1,96	

3.3 Histomorphometrie

Die Schliffe wurden wie in 2.4.3 bereits beschrieben in ein 9-Felder-Raster aufgeteilt, um die Frage beantworten zu können, ob die Knochenneubildung innerhalb bestimmter Bereiche des KEM-Zylinders stärker ist. Da alle Flächen sich durch den Verarbeitungsprozess in der Größe und Form unterschieden, wurden die Mittelwerte der Knochenmenge (Anlage 6.6, Abbildung 25) auf den prozentualen Anteil an den Flächen relativiert, um einen Vergleich herstellen zu können (Anlage 6.7). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten die proBMP-2 Gruppen nach 6 Wochen rippenseitig und nach 12 Wochen hautseitig eine signifikant höhere Knochenneubildung (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mittelwerte des prozentualen Knochenanteils nach Lokalisation. Übersicht der Mittelwerte (M), Standardabweichungen (SD) und der Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe (ungepaarter studentischer t-Test, n=3) entsprechend der Gruppeneinteilung.

	Knochen rippenseitig M ± SD	Signifikanz	Knochen zentral M ± SD	Signifikanz	Knochen hautseitig M ± SD	Signifikanz
Kontrolle 6W	0,05 % ± 0,04 %		0,04 % ± 0,07 %		0,09 % ± 0,12 %	
BMP-2 6W	3,29 % ± 2,52 %	p = 0,16	3,76 % ± 2,23 %	p = 0,1	6,67 % ± 5,15 %	p = 0,16
proBMP-2 6W	10,46 % ± 5,86 %	p = 0,10	2,12 % ± 5,07 %	p = 0,24	3,28 % ± 1,52 %	p = 0,04
Kontrolle 12W	0,23 % ± 0,25 %		0,09 % ± 0,08 %		0,15 % ± 0,14 %	
BMP-2 12W	7,51 % ± 6,49 %	p = 0,19	15,65 % ± 9,87 %	p = 0,11	10,91 % ± 9,01 %	p = 0,17
proBMP-2 12W	25,03 % ± 5,46 %	p = 0,02	22,71 % ± 12,50 %	p = 0,09	23,54 % ± 15,41 %	p = 0,12

In der Kontrollgruppe bildete sich wie auch in der μ CT-Auswertung zu beiden Zeitpunkten nahezu kein Knochen. Nach 6 Wochen zeigte sich bei der BMP-2 Gruppe hautseitig eine höhere Knochenneubildung. Im Gegensatz dazu zeigte die proBMP-2 Gruppe eine deutlich höhere Knochenneubildung auf der zu den Rippen gewandten Seite. Nach 12 Wochen zeigten die BMP-2 Proben wieder eine höhere Knochenneubildungsrate hautseitig, jedoch war hier

der Anteil des zentral gebildeten Knochens am höchsten. Wiederum zeigte sich entsprechend zu den μ CT Daten die weitaus beste Knochenbildung in allen Abschnitten in der proBMP-2 Gruppe nach 12 Wochen.

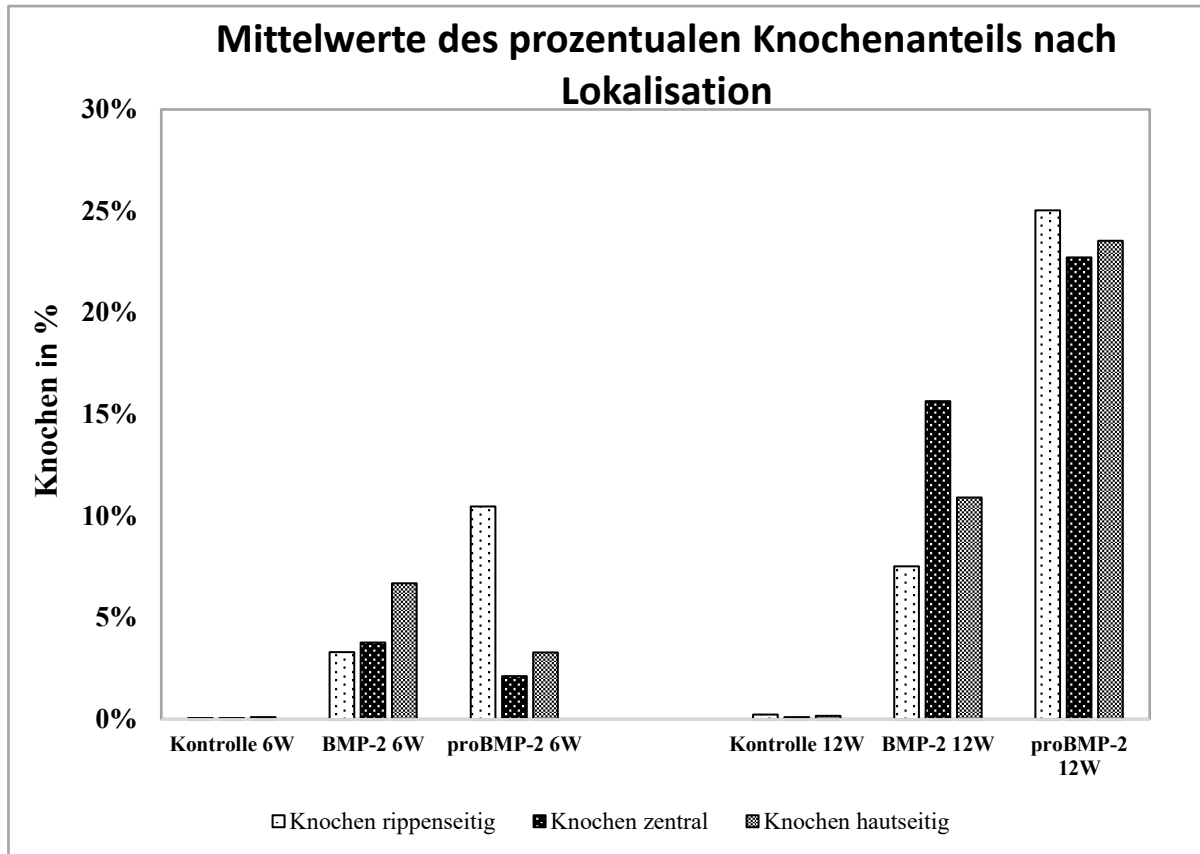


Abbildung 25: Histomorphometrie. Prozentualer Anteil des neugebildeten Knochens innerhalb der eingeteilten KEM-Flächen nach Lokalisationen „rippenseitig“, „zentral“ und „hautseitig“ unterteilt.

Die histologische Darstellung der 12-Wochen Ergebnisse in der Abbildung 26 zeigt in der Kontrolle keine Knochenbildung. Etwas bessere, zentral und hautseitig betonte Knochenbildung in der BMP-2-Gruppe und in der proBMP-2-Gruppe die weitaus stärkste Knochenneubildung sind zu erkennen.

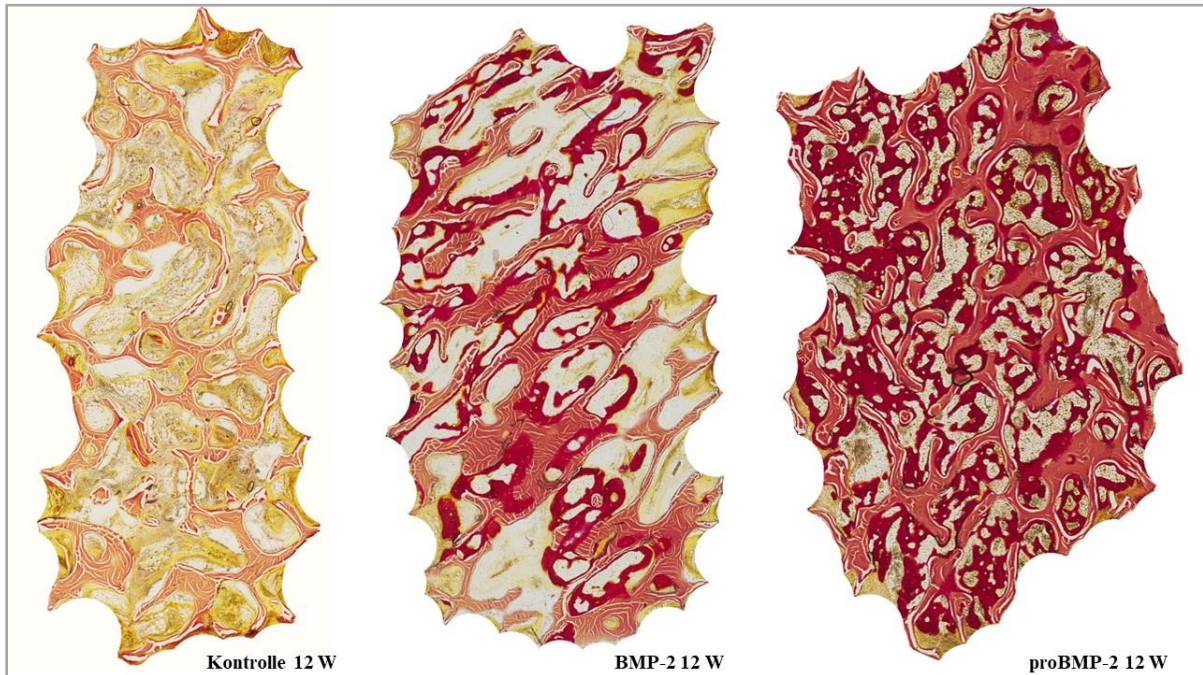


Abbildung 26: Histologischer Vergleich einzelner Schriffe nach 12 Wochen. Es sind deutliche Unterschiede bei der neugebildeten Knochenmenge zu erkennen.

4. Diskussion

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel das rhproBMP-2 im Vergleich zum rhBMP-2 auf die osteoinduktive Potenz zu untersuchen. Dieses wurde bisher noch nicht in einem etablierten xenogenen KEM bei der ektopen i.m. Implantation untersucht und sollte daher den prinzipiellen Nachweis für die Wirksamkeit des proBMP-2 in einem solchen Modell bringen. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit einer halbautomatischen, non-destruktiven Verarbeitung von μ CT-Datensätzen mit einem Auswertungsalgorithmus anhand spezifischer Grenzwerte untersucht werden. Es existieren bereits zahlreiche Studien die die Kombination von rhBMP-2 und einem BioOss[®]-Carrier untersucht haben (Wikesjö et al., 2001; Jung et al., 2003; Huh et al., 2015). Bei dem vorangegangenen Versuch wurde nur die Gesamtknochenmenge anhand histologischer Schnitte bestimmt. Dagegen sollte in diesem Versuch auch die lokale Distribution des Knochens untersucht werden. Daher ist unseres Wissens nach, dies die erste Arbeit die eine *de novo* Knochenbildung in einem mit rhproBMP-2 beladenem BioOss[®]-Carrier bei i.m. Implantation untersucht.

Das *Tissue engineering* hat zum Ziel, biologischen Ersatz zur Wiederherstellung, Aufrechterhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion zu entwickeln (Lanza et al., 2000; O'brien, 2011). Die Tissue engineering Triade besteht aus 1. der Kombination von Zellen, 2. einem Signal das entweder chemisch durch Wachstumsfaktoren oder physikalisch durch einen Bioreaktor geboten wird, 3. dem Gerüst das als Schablone zur Gewebsbildung gebraucht wird um den Zellen die Migration, Anheftung und Produktion von neuem Gewebe zu ermöglichen (O'brien, 2011). Die Gewebsregeneration und -reparatur erfolgt unter Einbeziehung von Vorgängen auf zellulärer Ebene die ähnlich zu den Vorgängen während der Embryogenese sind. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Umbauvorgänge in einem adulten Organismus deutlich verlangsamt. Ebenfalls ist die Abnahme der Stammzellen sowie das Fehlen der Signale zur Anregung eben dieser dafür verantwortlich, dass eine effektive Regeneration des Gewebes verhindert wird (Schultz et al., 2000). Daher ist die Optimierung eines bewährten osteokonduktiven KEM durch Biologisierung mit einem Knochendifferenzierungsfaktor eine Möglichkeit die Osteoblastenproliferation und damit die Osteoneogenese zu erwirken. Die langsame Freisetzung des rhBMP-2 über einen längeren Zeitraum steht im Fokus vieler Forschungsgruppen (Uludag et al., 1999; Haidar et al., 2009b; Motamedian et al., 2015). Dabei kamen sowohl anorganische Materialien (HA, β -TCP) als auch synthetische und

natürliche Polymere zum Einsatz (Gao et al., 1997; Seeherman et al., 2002; Issa et al., 2008; Gruber et al., 2009). Die antigene Potenz von Xenografts und Allografts, sowie eine mögliche HLA-Sensibilisierungsrates allogener Transplantate von bis zu 57 %, ist immer noch nicht eindeutig geklärt (Fishman and Patience, 2004; Vandevord et al., 2005; Bergler and Kessler, 2007; Ward et al., 2008; Kim et al., 2013; Fretwurst et al., 2014; Kim et al., 2016). Daher ist die Modifikation synthetischer KEM und der Einsatz von Kompositen, die Vorteile einzelner Materialien kombinieren, von großem Interesse (Miron and Zhang, 2012; Liu et al., 2014; Migliorini et al., 2016). Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Herstellung optimierter bioaktiver Carrier für verschiedene Wachstumsfaktoren und Medikamente (Gao et al., 1997; Uludag et al., 1999; Winn et al., 1999; Kim and Valentini, 2002; Seeherman et al., 2002; Kamakura et al., 2004; Meinel et al., 2004). Die Bioaktivität eines KEM als aktiver biologischer Prozess wurde bereits 1988 bei Biogläsern beschrieben (Hench, 1988). Die langsame kontinuierliche Freisetzung des BMP-2 aus dem KEM ist dabei der entscheidende Faktor für erfolgreiche Osteoinduktion (Richardson et al., 2001; Issa et al., 2008; Gruber et al., 2009; Liu et al., 2014). Die Versuche von Liu et al., Gruber et al. und anderer Autoren verfolgen dabei den Ansatz einer langsamen Freisetzung des rhBMP-2 bedingt durch die vorherige Kopplung an das Biomaterial, dessen Abbau und somit kontinuierlichen Freisetzung des gebundenen Proteins (Haidar et al., 2009a; Migliorini et al., 2016).

Im Gegensatz dazu geht es bei der Anwendung des rhproBMP-2 in unserem Versuch darum, ohne aufwendige KEM-Fabrikationsmethoden primär den natürlichen Vorteil des proBMP-2 zu nutzen. Das proBMP-2 wird intrazellulär aufgenommen. Dort erfolgt die notwendige intrazelluläre Proteolyse des Propeptids durch Proteasen zum reifen BMP-2. Dieses wird in der ECM abgespeichert und dann von der Zelle sezerniert. Somit ergibt sich ein gewünschter Retard Effekt allein durch den zeitverzögerten Wirkungseintritt des erst notwendigerweise in die aktive Form überführten BMP-2 (Kuhfahl and Schwarz, 2015). Ebenfalls ist in diesem Versuch auch einfaches Durchtränken des KEM durch Aufpipettieren des Wachstumsfaktors ausreichend, um Osteogenese zu induzieren. Neben eines stabilen Scaffolds, ist die adäquate Angiogenese, die von der Porenarchitektur maßgeblich abhängt, für die Migration osteogener Zellen und das funktionelle Remodelling entscheidend (Avila et al., 2010). Diese Anforderungen konnten durch das verwendete etablierte KEM BioOss® erfüllt werden (Klein et al., 2009). Ebenfalls ist dieses KEM in weiteren Versuchen mit einfachem Aufpipettieren des

rhBMP-2 getränkt worden (Warnke et al., 2010). Das verwendete Tiermodell und die Verweildauer (6 und 12 Wochen) der KEM-Scaffolds ist aus anderen Arbeiten bekannt (Miron and Zhang, 2012). Durch die natürlichen Mineralisierungs- und Porositätsunterschiede innerhalb des Materials, ergaben sich durch die mechanische Einwirkung beim Ausstanzen, leichte Unterschiede bei den Probengrößen. Die Ergebnisse wurden auf den prozentualen Anteil des Knochens innerhalb der Poren relativiert, da absolute Zahlen bei dem verwendeten Studiendesign, zu falschen Schlussfolgerungen führen könnten. Die verwendete Dosis von 0,1 mg/mL rhBMP-2 zeigte in manchen Arbeiten auch hypertrophes Knochenwachstum (Valentin-Opran et al., 2002). Gleichzeitig zeigte der Versuch von Gruber *et al.* mit 96 und 48 µg/mL rhBMP-2, dass die niedrige Dosierung des rhBMP-2, in einem ektopen i.m. Rattenmodell mit einem PLA-Carrier, keine langfristige Knochenbildung induzierte. Der anfänglich gebildete Knochen wurde nach einigen Wochen wieder abgebaut. Bei der höheren Dosis infiltrierte der neugebildete Knochen auch die Poren des KEM (Gruber et al., 2009). Uludag *et al.* und andere AG zeigten, dass mit rhBMP-2 beladene Carrier bei langsamer Abgabe über längeren Zeitraum höhere Osteogenese Raten zu Folge haben (Woo et al., 2001). Die initiale hohe Freisetzung führt daher *de facto* zu mehr potenziellen Nebenwirkungen, aber weniger neugebildetem Knochen.

Was die Auswertungsmethodik angeht, so hat die in unserem Versuch verwendete µCT-Auswertung wesentliche Vorteile. Die Proben werden zerstörungsfrei und vor allem dreidimensional untersucht. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu der zweidimensionalen Histomorphometrie für die die Probe eingebettet, geschnitten, geschliffen, gefärbt und/oder entkalkt werden muss. Eine solche Bearbeitung geht immer mit einem irreversiblen Informationsverlust einher. Ebenfalls ist dabei nur eine zweidimensionale Untersuchung möglich. Die hohe Korrelation und die geringen Unterschiede zwischen der konventionellen Histomorphometrie und der µCT-Quantifizierung sind sehr vielversprechend (Müller et al., 1998). Dies ist vor allem durch die hohe Auflösung des µCT möglich. Eine mit Lichtmikroskopie vergleichbare Untersuchung von Strukturen im Mikrometerbereich ist dadurch möglich. Eine non-destruktive und zeitlich deutlich beschleunigte Analyse ist für die Forschung von großem Vorteil, da größere Probemengen teilweise automatisiert ausgewertet werden könnten. Probleme wie Strahlenaufhärtung, -streuung, Bildrauschen, Artefakte, die nicht vorhandene Möglichkeit auch pathologische und physiologische Vorgänge auf zellulärer Ebene zu untersuchen, stellen jedoch die Grenzen der µCT-Auswertung dar. Deshalb kann die

Histomorphometrie nicht vollkommen durch die μ CT-Analyse substituiert werden (Schouten et al., 2009; Vandeweghe et al., 2013). Die dreidimensionale Darstellung der zweidimensionalen Aufnahmen ist durch spezielle Algorithmen möglich (Feldkamp et al., 1984). Der μ CT nutzt das Datenmaterial der unterschiedlich abgeschwächten Röntgenstrahlung, welches aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen wird, zur Rekonstruktion einer dreidimensionalen Darstellung (Bouxsein et al., 2010). Im Gegensatz zum Vorversuch, wurde eine teilautomatisierte Auswertung anhand der ermittelten Grenzwerte etabliert. Dazu wurde ein Algorithmus verwendet der im Rahmen der vorher ermittelten und eingestellten Parameter und Schwellenwerte teilautomatisiert die Auswertung durchführte. Es mussten hierfür unterschiedliche Grenzwerte für einzelne Gruppen gewählt werden. Der Grund dafür ist die Graustufenverteilung der eingescannten Proben die je nach Mineralisierungsgrad und damit der Strahlenaufhärtung, unterschiedlich ausfällt. Da es sich bei dem bovinen KEM um ein Naturprodukt handelt, unterliegt es natürlichen Schwankungen. Dies zeigte sich auch in der untersuchten schwankenden Porosität des Materials. Ebenfalls erhöht sich der Mineralisierungsgrad der Proben durch den neugebildeten Knochen. Dadurch ergibt sich die höhere Ablenkung der Röntgenstrahlung und desto geringer fallen dadurch die Graustufenwerte aus. Grundsätzlich dienen angewandte Rekonstruktionsalgorithmen der rohen Scandateien der Kompensierung dieser physikalisch bedingten systematischen Fehler. Dennoch war bei diesem Versuch die manuelle, subjektive Grenzwertanpassung notwendig, um Bildinformationen, die anderenfalls die Ergebnisse verfälscht hätten, korrekt auszuwerten. Um zu prüfen ob durch die Anwendung eines synthetischen KEM mit homogeneren Eigenschaften auch ein Grenzwert ausreichen würde, wurden einige Proben aus dem Parallelversuch mit dem nanoporösem biphasischen HAP durch den Autor untersucht. Es konnte jedoch nach durchgeführter Rekonstruktion der Daten, auf Grund fehlender optischer Graustufenunterschiede zwischen Knochen und KEM, keine Schwellenwerte gefunden werden.

Die Färbung der zuvor in Kunststoff eingebetteten Schiffe erfolgte mit der van Gieson-Färbung die, im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Färbungen bei diesem Versuch, den deutlichsten Kontrast zwischen dem Knochen und Bindegewebe zeigte. Diese ursprünglich bindegewebspezifische Färbung für Knochenpräparate ist auch aus der Literatur bekannt (De Lange et al., 1990). Da die Proben unregelmäßige Ränder und divergierende Formen hatten, musste, um eine standardisierte histologische Vermessung durchführen zu können, die

Außengrenze zunächst vom Bindegewebe beschnitten und festgelegt werden. Das Umfahren des Grenzbereichs mit einem Kreis gleicher Größe erzeugte einerseits Verschnitt, gleichzeitig reduzierte dies aber auch die Leerbereiche, die auf Grund der peripher offenen Poren vorhanden waren. Da keine Einteilung mit exakt gleich großen geometrischen Formen oder Zonen gemacht werden konnte, wurde ein variables rechteckiges 9-Felder-Gitter über jede Probe gelegt. Da dies anhand festgesetzter Regel erfolgte, war so eine standardisierte Auswertung möglich. Der Nachteil dieses Verfahrens war der Verschnitt in Randbereichen oder auch Leerbereiche innerhalb der eingeteilten Zonen. Auf Grund der divergierenden KEM-Formen bot dieses Auswertungsverfahren jedoch die beste Vergleichsmöglichkeit. Da für unsere Fragestellung der prozentuale Knochenanteil in einzelnen Bereichen und nicht die absolute Menge bestimmt werden sollte, war der genannte Nachteil für diesen Versuch vertretbar.

Der Vergleich der isomolaren i.m. Implantation des rhBMP-2 und rhproBMP-2 Scaffolds ergab, dass die rhproBMP-2 Anwendung in dem gewählten Zeit- und Versuchsrahmen sogar eine bessere *de novo* Knochenbildung bewirkt als die Anwendung des rhBMP-2. Einerseits könnte die bessere Durchblutungssituation bei einer i.m. Implantation im Gegensatz zu einer s.c. Implantation eine Rolle spielen. Gleichzeitig muss erwähnt werden, dass die in diesem Versuch verwendete Gesamtdosis der Wachstumsfaktoren im Verhältnis zum Scaffold auch höher als im Vorversuch (KEM-Volumen 1 cm³, 57 µg BMP-2 und 200 µg proBMP-2) lag. Da es sich um den prinzipiellen Beweis in einem präklinischen Tiermodell handelte, sind Gruppen mit $n = 3$ Tieren gewählt worden. Unsere Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche von Hillger *et al.* und des Vorversuchs. Eine Probe aus der proBMP-2-Gruppe nach 12 Wochen zeigte einen sehr hohen Knochenanteil in den Poren (28,8 %). Jedoch selbst beim Ausschluss dieser Probe, zeigten die anderen proBMP-2 Proben im Vergleich zum BMP-2 einen durchschnittlich höheren Knochenanteil im Vergleich zu der BMP-2 Gruppe (BMP-2 4,61 %, proBMP-2 7,69 %). Die verwendete Konzentration von 0,35 mg / mL proBMP-2 könnte einerseits als verantwortlicher Faktor für das hohe Knochenwachstum gesehen werden, da das hypertrophe Knochenwachstum bei der angewendeten Dosis bereits aus anderen Versuchen bekannt ist (Valentin-Opran *et al.*, 2002). Im Verlauf des Versuchs nahm das besagte Tier jedoch auch 192 g zu, im Gegensatz zu den im Mittel 51 g aller Tiere und Zeitpunkte. Ob dies in einem Zusammenhang mit dem verwendeten Faktor steht oder durch

die starke Gewichtszunahme bedingt ist, konnte im Rahmen dieses Versuchs nicht abschließend geklärt werden.

Obwohl das Porenvolumen und die Porosität aller Proben natürlichen Schwankungen unterliegen, ist dieser Faktor für unsere Untersuchung nicht primär ausschlaggebend. Jedoch gab es vor allem bei den KEM-Zylindern der 12 Wochen Gruppe (BMP-2 und proBMP-2) beim Porenvolumen statistisch signifikante Unterschiede (Tabelle 6). Im Allgemeinen wird BioOss® als sehr resorptionsstabil angesehen. Manche Autoren kritisieren es dahingehend, dass es größtenteils als Füller dient und anstatt zu resorbieren, ein keramoossäres Regenerat bildet (Merkx et al., 2003). Die Anwendung des BioOss® ist seit Langem wissenschaftlich dokumentiert. Histologische Untersuchungen zeigen, dass dieses auch durch Osteoklasten resorbiert wird (Hämmerle et al., 1998). Durch den Niedrigtemperatur-Reinigungsprozess wird diesem Material eine dem nativen Knochen ähnelnde innere Porenstruktur bescheinigt. Da die Schwankungen des Porenvolumens in unserem Versuch mit der Dauer des Versuchs zunehmen und eine schnelle Resorption des verwendeten KEM nicht sehr wahrscheinlich ist, könnte auch die Zunahme der Knochenmenge in den Poren und die daraus resultierende Ablenkung der Röntgenstrahlen eine Rolle spielen. Diese Möglichkeit konnte im Rahmen dieses Versuchs nicht abschließend geklärt werden.

Gleichzeitig weist dieses Material nach rezenter Studienlage lediglich osteokonduktive Eigenschaften auf. Somit hatte das KEM keinen osteoinduktiven Einfluss auf die Osteogenese. Die vorteilhafte innere Porenarchitektur diente jedoch als Leitschiene und auf Grund der beschriebenen möglichen Affinität des rhBMP-2 für mineralische KEM auch als Wirkstoffreservoir (Winn et al., 1999). Konträr zu den Beobachtungen anderer Autoren bildete sich im Zentrum unserer Gerüste sowohl in der BMP-2 als auch vor allem der proBMP-2 Gruppe mehr Knochen als peripher. Das ist insofern interessant, da die von uns angewendete Konzentration des rhBMP-2 und die isomolare Konzentration des rhproBMP-2 mit der verwendeten Menge in anderen Arbeiten (0,1 und 0,096 mg/mL) korrelierte (Gruber et al., 2009; Warnke et al., 2010). Bereits geringe Mengen von BMP-2 können bei guter Durchblutungssituation für die *de novo* Osteogenese ausreichen. Gleichzeitig geht eine höhere Konzentration von BMP-2 mit höherer Knochenneubildungsrate einher (Marden et al., 1994). Mit rhBMP-2 beladenes KEM wird nach der Implantation von mesenchymalen Stammzellen und Gefäßen infiltriert sodass die Knochenbildung aus der Peripherie zum

Zentrum hin stattfindet (Valentin-Opran et al., 2002). Die initial hohe Abgabe des rhBMP-2 aus dem Scaffold mit einer Halbwertszeit von weniger als 10 Minuten bis 10 Tagen bewirkt zunächst eine Anregung mesenchymaler Stammzellen und deren Differenzierung zu Chondroblasten und Osteoblasten (Winn et al., 1999; Haidar et al., 2009b). Jedoch sind Osteozyten erst nach 21 - 28 Tagen nach der Applikation des Scaffolds nachweisbar und produzieren ihrerseits erst dann das endogene BMP-2 (Nakagawa et al., 2001). Durch die bessere periphere Durchblutungssituation könnte dort zunächst die bessere Osteoneogenese erwartet werden. In dem von uns verwendeten Zeit- und Versuchsrahmen war genau das Gegenteil der Fall. Möglicherweise spielen in unserem Versuch auch Auswaschungseffekte im Randbereich eine Rolle. Sowohl in der BMP-2 als auch der proBMP-2 Gruppe findet sich zu beiden Zeitpunkten in der μ CT-Auswertung weniger Knochen im Randbereich der Scaffolds. Wobei zu beiden Zeitpunkten die proBMP-2 Proben auch peripher eine höhere Knochenmenge aufweisen. Ebenfalls fällt deutlich auf, dass die Distribution und die Knochenmenge der BMP-2 Gruppe sich zwischen beiden Zeitpunkten nicht signifikant unterscheidet. Bei der Anwendung des proBMP-2 ist es jedoch sowohl im Vergleich der beiden Zeitpunkte als auch im Vergleich zum BMP-2 der Fall. Entgegen der möglichen Annahme, dass durch die bessere Durchblutungssituation im Randbereich mehr Knochen gebildet werden könnte, scheint die höhere Knochenmenge zentral darauf hinzudeuten, dass die retardierte Wirkung von proBMP-2 und dessen langsamere Freisetzung vor allem im Zentrum der Gerüste, aber auch peripher, zu *de facto* höherer Knochenneubildung führt.

Die aus dem zentralen Anteil des Zylinders gewonnenen histologischen Schliffe zeigten teilweise stark schwankende Ergebnisse. Die Distribution des Knochens innerhalb aller Proben war bis auf die proBMP-2 Gruppe nach 12 Wochen inhomogen. So unterschieden sich die Proben innerhalb der Gruppe in Bezug auf die Knochenmenge innerhalb der hautseitigen, zentralen und rippenseitigen Bereiche. Der im Mittel höhere Knochenanteil der proBMP-2 Proben im Vergleich zu BMP-2 Proben nach 6 und 12 Wochen korreliert jedoch mit den μ -CT Ergebnissen. Limitiert durch das experimentelle Design und die geringe Probenanzahl zeigt sich tendenziell bei den proBMP-2 Proben zu beiden Zeitpunkten rippenseitig eine stärkere Knochenbildung. Im Gegensatz dazu ist dies bei den BMP-2 Proben hautseitig und damit von der potenziell besseren Durchblutungssituation weiter entfernt. Möglicherweise hängt dies mit dem zuvor beschriebenen sofortigen Wirkungseintritt des BMP-2 im Vergleich zu dem verzögertem Wirkungseintritt des proBMP-2 zusammen. Für eine abschließende Aussage ist

die geringe Probenanzahl, die divergierenden KEM-Schliffe und damit das histologische Vermessungsmodell jedoch nicht ausreichend. Die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der μ -CT- und histologischen Ergebnisse in Bezug auf die zentral vorhandene Knochenmenge ergeben sich aus dem 9-Felder-Modell. So wurde zentral nur ein Feld berücksichtigt. Dies erfolgte bewusst aus der Intention heraus, den zentralen Bereich der Probe für sich allein zu überprüfen. Bei manchen Proben gab es jedoch in den beiden nicht berücksichtigten Feldern im Vergleich zu dem zentralen Feld deutlich mehr Knochen, was sich auch in den μ CT-Ergebnissen widerspiegelt. Die Einzelschichtbilder könnten ebenfalls dazu genutzt werden, die Übereinstimmung der Ergebnisse mit den histologischen Präparaten durch ein direktes *matching* zu überprüfen. Dazu könnte die Binarisierung des in Frage kommenden histologischen Bildes zur Auffindung des korrelierenden μ CT-Schichtbildes genutzt werden, um die Korrelation der detektierten Knochenmenge zu überprüfen. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen des stattgefundenen Versuchs nicht weiter untersucht.

Eine Limitation des Versuchs stellt die Abhängigkeit der Untersuchung von der auswertenden Person dar. Eine völlige Objektivität der Untersuchung kann nicht gewährleistet werden, da die einzelnen Auswertungsschritte von der untersuchenden Person zuvor ermittelt und eingestellt werden müssen. Die Bearbeitung der Bilder, die Schwellenwertfestlegung sowie die histologische Bestimmung von neugebildetem Knochen unterliegt trotz festgelegter Kriterien immer einer subjektiven Beurteilung des Untersuchenden. Es wäre von Vorteil, wenn vom Programm festgelegte Schwellenwerte für einzelne Materialien, die sich durch ihre Struktur erheblich unterscheiden können, sowie Korrekturalgorithmen bereits implementiert sein könnten, um eben eine rein automatisierte und somit objektive Beurteilung gewährleisten zu können.

Auf Grund der variierenden Formen des KEM wäre die Gewinnung der Zylinder mittels eines Trepanbohrers u. U. von Vorteil. Gleichgroße Scaffolds würden die Auswertung erleichtern und die Möglichkeit bieten, absolute Werte miteinander vergleichen zu können. Somit könnte die Aussagekraft der Ergebnisse verbessert werden. Auf Grund der geringen Anzahl der Versuchstiere ist eine abschließende Einschätzung schwierig. Die Teststärke und statistische Trennschärfe sind gering. Wie bei den Ergebnissen zu sehen, führt dies zu einem Fehler zweiter Art. Denn, obwohl die 12 Wochen Proben beider Gruppen einen deutlich höheren Mittelwert aufweisen, wird die statistische Signifikanz bei dem verwendeten t-Test nicht

eindeutig bestätigt. Für eine statistische Analyse wären mindestens 6 Tiere je Zeitpunkt und Gruppe notwendig. Innerhalb des gegebenen Studiendesigns ist der Trend, dass zu beiden Zeitpunkten rhproBMP-2 mehr neugebildeten Knochen erzeugt jedoch eindeutig zu erkennen. Durch den fehlenden *burst release* und die mögliche Dosisreduktion in der klinischen Anwendung im Vergleich zu rhBMP-2, könnten unerwünschte Nebenwirkungen durch die Anwendung des rhproBMP-2 vermieden werden.

Somit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass in diesem Versuchsrahmen das proBMP-2 in äquimolarer Dosierung die Knochenbildung effektiver induziert als reifes BMP-2. Entgegen der ursprünglichen Erwartung, die auf Ergebnissen anderer AG beruhte, war die Knochenbildung in den zentralen Scaffoldanteilen sogar besser als in den Randbereichen. Die teilautomatisierte μ CT-Analyse konnte etabliert werden. Bezüglich der Ergebnisse korrelierten die μ CT Analyse und die Histomorphometrie. Damit sehen wir uns in unserer Hypothese bestätigt, dass durch den verzögerten Wirkungseintritt des proBMP-2, der mit der notwendigen intrazellulären Proteolyse zum reifen BMP-2 zusammenhängt, eine höhere Osteogeneserate möglich ist. Die Ergebnisse sind im Hinblick auf die potenzielle klinische Anwendung vielversprechend. Weiterführende Studien werden auch den Einsatz von synthetischem KEM einschließen.

5. Zusammenfassung

Bisher ist kein ideales Knochenersatzmaterial (KEM) bekannt. Eine Verbesserung der biologischen Wertigkeit von KEM kann jedoch durch die Kombination mit osteoinduktiven Wachstumsfaktoren erreicht werden.

Rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) ist ein Wachstumsfaktor, der nachweislich mit den KEMs kombiniert werden kann. Jedoch ist dessen Anwendung mit potenziell lebensgefährlichen Komplikationen im Kopf-Hals-Bereich verbunden.

Die Vergleichbarkeit der osteoinduktiven Potenz von rhBMP-2 und dessen Pro-Faktor (rhproBMP-2) wurde bisher noch nicht in einem etablierten xenogenen KEM bei der ektopen i.m. Implantation und isomolaren Anwendung in einem Rattenmodell untersucht und sollte daher den prinzipiellen Nachweis für die Wirksamkeit des rhproBMP-2 in einem solchen Modell bringen.

Falls die Hypothese, der langsamen, kontinuierlichen Abgabe des zunächst intrazellulär prozessierten und anschließend exprimierten BMP-2 korrekt wäre, wäre dieser Ansatz von einer signifikanten klinischen Relevanz. Prinzipiell wäre eine vergleichbare Knochenneubildung bei Proben die mit rhproBMP-2 beladen wurden, verbunden mit geringeren Nebenwirkungen, denkbar.

Darüber hinaus könnte die Etablierung der teilautomatisierten, non-destruktiven Auswertung von μ CT-Datensätzen mit einem Auswertungsalgorithmus anhand spezifischer Grenzwerte, eine hilfreiche Methode sein, um solche Versuchsmodelle zu untersuchen.

Die Bindung von rhBMP2 an das KEM und dessen langsame Freigabe ist Gegenstand vieler Studien. Im Gegensatz zu Versuchen anderer Autoren, konnte die Anwendung des rhproBMP-2 im vorliegenden Versuch ohne aufwendige KEM-Fabrikationsmethoden die Vorteile des proBMP-2 nicht nur nutzen, sondern im Vergleich zur BMP-2 Anwendung, in diesem Versuch, ein noch besseres Ergebnis erzielen.

Das neugebildete Knochenvolumen kann mit Hilfe einer 3-D Auswertung der μ CT Daten erfolgen. Eine vergleichbar hohe Knochenmenge nach Anwendung von rhproBMP-2 wäre denkbar. Die Ergebnisse unseres Versuchs zeigen eine höhere Knochenneubildung, besonders nach 12 Wochen.

Anhand der Ergebnisse der 2-D-Auswertung anderer Autoren wäre zu erwarten, dass in peripheren Anteilen der Scaffolds mehr Knochen gebildet wird. In unserem Versuch war genau das Gegenteil der Fall und es wurde zentral mehr Knochen gebildet.

Bei dem rhBMP-2 scheint die Nähe zu größeren Gefäßen keine primäre Rolle für die Osteoneogenese zu spielen. Bei dem rhproBMP-2 dagegen ist eine höhere Knochenbildung rippenseitig zu beobachten.

Auf Grund der geringen Anzahl der Versuchstiere ($n = 3$) ist eine abschließende Einschätzung schwierig. Die Teststärke und statistische Trennschärfe sind gering.

Innerhalb des gegebenen Studiendesigns ist der Trend, dass zu beiden Zeitpunkten rhproBMP-2 mehr Knochenneubildung induzieren kann, zu erkennen. Damit konnte die Hypothese bestätigt werden.

Ebenfalls konnte eine teilautomatisierte, non-destruktive Auswertung von μ CT-Datensätzen mit einem Auswertungsalgorithmus anhand spezifischer Grenzwerte mit einer hohen Korrelation zwischen den zertörungsfrei erworbenen μ CT- und histomorphometrischen Daten etabliert werden.

6. Literaturverzeichnis

- ABHAY, S. & HAINES, S. J. 1997. Repairing Holes in the Head: A History of Cranioplasty. *Neurosurgery*, 40, 588-603.
- AL-NAWAS, B. & SCHIEGNITZ, E. 2014. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone—a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol*, 7, S219-S234.
- ALBREKTSSON, T. & JOHANSSON, C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 10, S96-S101.
- ARAÚJO, M. G. & LINDHE, J. 2005. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 212-218.
- AVILA, G., WANG, H.-L., GALINDO-MORENO, P., MISCH, C. E., BAGRAMIAN, R. A., RUDEK, I., BENAVIDES, E., MORENO-RIESTRA, I., BRAUN, T. & NEIVA, R. 2010. The influence of the bucco-palatal distance on sinus augmentation outcomes. *Journal of periodontology*, 81, 1041-1050.
- BARTH, A. 1895. *Histologische untersuchungen über knochenimplantationen*, Fischer.
- BERGLER, M. & KESSLER, P. 2007. *Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen*, Georg Thieme Verlag.
- BISHOP, G. B. & EINHORN, T. A. 2007. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *International Orthopaedics*, 31, 721-727.
- BLANES, R. J., BERNARD, J. P., BLANES, Z. M. & BELSER, U. C. 2007. A 10-year prospective study of ITI dental implants placed in the posterior region. II: Influence of the crown-to-implant ratio and different prosthetic treatment modalities on crestal bone loss. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 707-714.
- BODEN, S. D., MARTIN JR, G. J., MORONE, M. A., UGBO, J. L. & MOSKOVITZ, P. A. 1999. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite–tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine*, 24, 1179-1185.
- BOHNER, M. 2010. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today*, 13, 24-30.
- BOUXSEIN, M. L., BOYD, S. K., CHRISTIANSEN, B. A., GULDBERG, R. E., JEPSEN, K. J. & MÜLLER, R. 2010. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25, 1468-1486.
- BOYNE, P. J., MARX, R. E., NEVINS, M., TRIPLETT, G., LAZARO, E., LILLY, L. C., ALDER, M. & NUMMIKOSKI, P. 1997a. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 17, 11-25.
- BOYNE, P. J., MARX, R. E., NEVINS, M., TRIPLETT, G., LAZARO, E., LILLY, L. C., ALDER, M. & NUMMIKOSKI, P. 1997b. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *International journal of periodontics & restorative dentistry*, 17.
- BOYNE, P. J., NATH, R. & NAKAMURA, A. 1998. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 36, 84-90.
- BRAUT, V., BORNSTEIN, M. M., BELSER, U. & BUSER, D. 2011. Thickness of the anterior maxillary facial bone wall—a retrospective radiographic study using cone beam computed tomography. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 31, 125.
- BUCKWALTER, J. A., GLIMCHER, M. J., COOPER, R. R. & RECKER, R. 1995. Bone Biology. PART I: Structure, Blood Supply, Cells, Matrix, and Mineralization *. *JBJS*, 77, 1256-1275.
- BULAQI, H. A., MASHHADI, M. M., SAFARI, H., SAMANDARI, M. M. & GERAMIPANAH, F. 2015. Effect of increased crown height on stress distribution in short dental implant components and their surrounding bone: A finite element analysis. *The Journal of prosthetic dentistry*, 113, 548-557.
- BUTTSTEDT, A., PAOLETTI, F. & SCHWARZ, E. 2011. Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und ihre Pro-Formen. *BIOspektrum*, 17, 150.

- CARRAGEE, E. J., HURWITZ, E. L. & WEINER, B. K. 2011. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J*, 11, 471-491.
- CHEN, G., DENG, C. & LI, Y.-P. 2012. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences*, 8, 272-288.
- CHIAPASCO, M., ZANIBONI, M. & BOISCO, M. 2006. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clinical oral implants research*, 17, 136-159.
- DE LANGE, G. L., DE PUTTER, C. & DE WIJS, F. L. J. A. 1990. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite–bone interface. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, 829-845.
- EINHORN, T. A. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21.
- FELDKAMP, L. A., DAVIS, L. & KRESS, J. W. 1984. Practical cone-beam algorithm. *Josa a*, 1, 612-619.
- FERRI, J. & HUNZIKER, E. 2011. *Preprosthetic and maxillofacial surgery: Biomaterials, bone grafting and tissue engineering*, Cambridge, UK, Elsevier, 1-52.
- FICKL, S., ZUHR, O., WACHTEL, H., BOLZ, W. & HUERZELER, M. 2008. Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 356-363.
- FISHMAN, J. A. & PATIENCE, C. 2004. Xenotransplantation: Infectious Risk Revisited. *American Journal of Transplantation*, 4, 1383-1390.
- FRETWURST, T., AL-AHMAD, A., NAHLES, S., SCHMELZEISEN, R., STRICKER, A. & NELSON, K. 2014. Allogene Augmentate in der klinischen Anwendung. *wissen kompakt*, 8, 35-43.
- GAO, T. J., LINDHOLM, T. S., KOMMONEN, B., RAGNI, P., PARONZINI, A., LINDHOLM, T. C., JALOVAARA, P. & URIST, M. R. 1997. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *International Orthopaedics*, 21, 194-200.
- GARG, A. K. 2006a. *Knochen: Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie*, Quintessenz-Verlag-GmbH, 3-20.
- GARG, A. K. 2006b. *Knochen: Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie*, Berlin, Quintessenz-Verlag-GmbH, 3-52.
- GONNERMAN, K. N., BROWN, L. S. & CHU, T. 2006. Effects of growth factors on cell migration and alkaline phosphatase release. *Biomed Sci Instrum*, 42, 60-65.
- GRUBER, R., WEICH, H. A., DULLIN, C. & SCHLIEPHAKE, H. 2009. Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactid acid and rhBMP-2. *Clinical Oral Implants Research*, 20, 24-30.
- GUIZZARDI, S., MONTANARI, C., MIGLIACCIO, S., STROCCHI, R., SOLMI, R., MARTINI, D. & RUGGERI, A. 2000. Qualitative assessment of natural apatite in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53, 227-234.
- HAIDAR, Z. S., HAMDY, R. C. & TABRIZIAN, M. 2009a. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnology Letters*, 31, 1817.
- HAIDAR, Z. S., HAMDY, R. C. & TABRIZIAN, M. 2009b. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnology Letters*, 31, 1825-1835.
- HÄMMERLE, C. H. F., CHIANTELLA, G. C., KARRING, T. & LANG, N. P. 1998. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants®. *Clinical Oral Implants Research*, 9, 151-162.
- HAUBURGER, A., VON EINEM, S., SCHWAERZER, G. K., BUTTSTEDT, A., ZEBISCH, M., SCHRAML, M., HORTSCHANSKY, P., KNAUS, P. & SCHWARZ, E. 2009. The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J*, 276, 6386-6398.
- HEIMKE, G. 2018. Tissue interactions to bone replacement materials. *Bioceramics Calcium Phosphate*. CRC Press.
- HENCH, L. L. 1988. Bioactive Ceramics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 523, 54-71.

- HENCH, L. L. & POLAK, J. M. 2002. Third-generation biomedical materials. *Science*, 295, 1014-1017.
- HERFORD, A. S. & BOYNE, P. J. 2008. Reconstruction of Mandibular Continuity Defects With Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66, 616-624.
- HERFORD, A. S. & NGUYEN, K. 2015. Complex Bone Augmentation in Alveolar Ridge Defects. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, 27, 227-244.
- HILLGER, F., HERR, G., RUDOLPH, R. & SCHWARZ, E. 2005. 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*, 280, 14974-14980.
- HOGAN, B. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & development*, 10, 1580-1594.
- HUH, J.-B., YANG, J.-J., CHOI, K.-H., BAE, J., LEE, J.-Y., KIM, S.-E. & SHIN, S.-W. 2015. Effect of rhBMP-2 immobilized anorganic bovine bone matrix on bone regeneration. *International journal of molecular sciences*, 16, 16034-16052.
- ISSA, J., BENTLEY, M. V. L. B., IYOMASA, M. M., SEBALD, W. & DE ALBUQUERQUE, R. 2008. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anatomia, histologia, embryologia*, 37, 181-187.
- JANICKI, P. & SCHMIDMAIER, G. 2011. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42, S77-S81.
- JENSEN, S. S., AABOE, M., PINHOLT, E. M., HJØRTING-HANSEN, E., MELSEN, F. & RUYTER, I. 1996. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 11.
- JUNG, R. E., GLAUSER, R., SCHÄRER, P., HÄMMERLE, C. H. F., SAILER, H. F. & WEBER, F. E. 2003. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 14, 556-568.
- KAMAKURA, S., NAKAJO, S., SUZUKI, O. & SASANO, Y. 2004. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A*, 71, 299-307.
- KAO, S. T. & SCOTT, D. D. 2007. A review of bone substitutes. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 19, 513-521.
- KENLEY, R. A., YIM, K., ABRAMS, J., RON, E., TUREK, T., MARDEN, L. J. & HOLLINGER, J. O. 1993. Biotechnology and Bone Graft Substitutes. *Pharmaceutical Research*, 10, 1393-1401.
- KHOURY, F. & HANSER, T. 2015. Mandibular bone block harvesting from the retromolar region: a 10-year prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 30, 688-697.
- KHOURY, F. & HIDAJAT, H. 2012. Stabilization of bone grafts: A clinical retrospective study. *IMPLANTOLOGIE*, 20, 299-307.
- KIM, H. D. & VALENTINI, R. F. 2002. Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 59, 573-584.
- KIM, Y., NOWZARI, H. & RICH, S. K. 2013. Risk of Prion Disease Transmission through Bovine-Derived Bone Substitutes: A Systematic Review. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 15, 645-653.
- KIM, Y., RODRIGUEZ, A. E. & NOWZARI, H. 2016. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 18, 1095-1102.
- KLEIN, M. & AL-NAWAS, B. 2011. Eigenschaften und Einsatzgebiete von Knochenersatzmaterialien. *wissen kompakt*, 5, 33-39.
- KLEIN, M., GOETZ, H., PAZEN, S., AL-NAWAS, B., WAGNER, W. & DUSCHNER, H. 2009. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clinical Oral Implants Research*, 20, 67-74.
- KOLK, A., HANDSCHEL, J., DRESCHER, W., ROTHAMEL, D., KLOSS, F., BLESSMANN, M., HEILAND, M., WOLFF, K.-D. & SMEETS, R. 2012. Current trends and future perspectives of bone substitute materials—from space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40, 706-718.

- KÜBLER, N. 1997. Osteoinduktion und-reparation. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 1, 2-25.
- KUHFAHL, S. & SCHWARZ, E. 2015. A core domain of the BMP2 proregion is sufficient for the biogenesis of mature homodimeric growth factor. *Biological chemistry*, 396, 215-223.
- LANZA, R., LANGER, R. & VACANTI, J. P. 2000. *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier.
- LISSENBERG-THUNNISSEN, S. N., DE GORTER, D. J., SIER, C. F. & SCHIPPER, I. B. 2011. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International orthopaedics*, 35, 1271.
- LIU, T., WU, G., ZHENG, Y., WISMEIJER, D., EVERTS, V. & LIU, Y. 2014. Cell-mediated BMP-2 release from a novel dual-drug delivery system promotes bone formation. *Clinical Oral Implants Research*, 25, 1412-1421.
- LO, K. W. H., ULERY, B. D., ASHE, K. M. & LAURENCIN, C. T. 2012. Studies of Bone Morphogenetic Protein based Surgical Repair. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 1277-1291.
- MARDEN, L. J., HOLLINGER, J. O., CHAUDHARI, A., TUREK, T., SCHAUB, R. G. & RON, E. 1994. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *Journal of biomedical materials research*, 28, 1127-1138.
- MCKIBBIN, B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 60, 150-162.
- MEINEL, L., KARAGEORGIU, V., FAJARDO, R., SNYDER, B., SHINDE-PATIL, V., ZICHNER, L., KAPLAN, D., LANGER, R. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2004. Bone Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells: Effects of Scaffold Material and Medium Flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 112-122.
- MERKX, M. A. W., MALTHA, J. C. & STOELINGA, P. J. W. 2003. Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 32, 1-6.
- MIGLIORINI, E., VALAT, A., PICART, C. & CAVALCANTI-ADAM, E. A. 2016. Tuning cellular responses to BMP-2 with material surfaces. *Cytokine & growth factor reviews*, 27, 43-54.
- MIRON, R. & ZHANG, Y. 2012. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 91, 736-744.
- MISCH, C. E. 2008. Bone density: a key determinant for treatment planning. *Contemporary implant dentistry*. Mosby, St. Louis.
- MOTAMEDIAN, S. R., HOSSEINPOUR, S., AHSAIE, M. G. & KHOJASTEH, A. 2015. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World journal of stem cells*, 7, 657-668.
- MÜLLER, R., VAN CAMPENHOUT, H., VAN DAMME, B., VAN DER PERRE, G., DEQUEKER, J., HILDEBRAND, T. & RÜEGSEGG, P. 1998. Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography. *Bone*, 23, 59-66.
- NAKAGAWA, T., SUGIYAMA, T., KAMEI, T., MURATA, T. & TAGAWA, T. 2001. An immuno-light- and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Archives of Oral Biology*, 46, 403-411.
- NEVINS, M., KIRKER-HEAD, C., NEVINS, M., WOZNEY, J. A., PALMER, R. & GRAHAM, D. 1996. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 16, 8-19.
- NISSAN, J., GHELFAN, O., GROSS, O., PRIEL, I., GROSS, M. & CHAUSHU, G. 2011. The effect of crown/implant ratio and crown height space on stress distribution in unsplinted implant supporting restorations. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 69, 1934-1939.
- O'BRIEN, F. J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14, 88-95.
- PROUSSAEFS, P., LOZADA, J., KLEINMAN, A. & ROHRER, M. D. 2002. The use of ramus autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation and implant placement: a pilot study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17.

- RAGGATT, L. J. & PARTRIDGE, N. C. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 25103-25108.
- RAHMATI, M., KHAN, A. H., RAZAVI, S., KHORRAMIZADEH, M. R., RASAEI, M. J. & SADRODDINY, E. 2016. Cloning and expression of human bone morphogenetic protein-2 gene in *Leishmania tarentolae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 199-203.
- RICCARDI, D. & GAMBA, G. 1999. The Many Roles of the Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. *Archives of Medical Research*, 30, 436-448.
- RICHARDSON, T. P., PETERS, M. C., ENNETT, A. B. & MOONEY, D. J. 2001. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 19, 1029-1034.
- SCHLIEPHAKE, H. 2002. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31, 469-484.
- SCHOUTEN, C., MEIJER, G. J., VAN DEN BEUCKEN, J. J., SPAUWEN, P. H. & JANSEN, J. A. 2009. The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials*, 30, 4539-4549.
- SCHROPP, L., WENZEL, A., KOSTOPOULOS, L. & KARRING, T. 2003. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 23.
- SCHULTZ, O., SITTINGER, M., HAEUPL, T. & BURMESTER, G. R. 2000. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Research & Therapy*, 2, 433.
- SCUTELLÀ, F., WEINSTEIN, T., LAZZARA, R. & TESTORI, T. 2015. Buccolingual implant position and vertical abutment finish line geometry: two strictly related factors that may influence the implant esthetic outcome. *Implant dentistry*, 24, 343-348.
- SEEHERRMAN, H., WOZNEY, J. & LI, R. 2002. Bone Morphogenetic Protein Delivery Systems. *Spine*, 27, S16-S23.
- SENN, N. 1889. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*, 98, 219.
- SFEIR, C., HO, L., DOLL, B. A., AZARI, K. & HOLLINGER, J. O. 2005. Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications. In: LIEBERMAN, J. R. & FRIEDLAENDER, G. E. (eds.) *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Totowa, NJ: Humana Press.
- SIMS, N. A. & MARTIN, T. J. 2014. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Rep*, 3.
- SMEETS, R., HANKEN, H., BECK-BROICHSITTER, B., GRÖBE, A., PRECHT, C., HEILAND, M. & JUNG, O. 2016. Knochenersatzmaterialien. *Der MKG-Chirurg*, 9, 2-11.
- SMEETS, R., HANKEN, H., JUNG, O., ROTHAMEL, D., HANDSCHEL, J., AL-DAM, A., BLESSMANN, M., HEILAND, M. & KOLK, A. 2014. Knochenersatzmaterialien. *Der Freie Zahnarzt*, 58, 78-88.
- SPRAY, J. R., BLACK, C. G., MORRIS, H. F. & OCHI, S. 2000. The Influence of Bone Thickness on Facial Marginal Bone Response: Stage 1 Placement Through Stage 2 Uncovering. *Annals of Periodontology*, 5, 119-128.
- TERHEYDEN, H. 2011. Synopsis: Tissue Engineering in Implant Dentistry. *IMPLANTOLOGIE*, 19, 27-35.
- TERHEYDEN, H., LANG, N. P., BIERBAUM, S. & STADLINGER, B. 2012. Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res*, 23, 1127-1135.
- TROELTZSCH, M., TROELTZSCH, M., KAUFFMANN, P., GRUBER, R., BROCKMEYER, P., MOSER, N., RAU, A. & SCHLIEPHAKE, H. 2016. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 44, 1618-1629.
- ULUDAG, H., D'AUGUSTA, D., PALMER, R., TIMONY, G. & WOZNEY, J. 1999. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 46, 193-202.
- URIST, M. R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, 893-899.
- URIST, M. R. 1997. Bone Morphogenetic Protein: The Molecularization of Skeletal System Development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12, 343-346.

- VALENTIN-OPRAN, A., WOZNEY, J., CSIMMA, C., LILLY, L. & RIEDEL, G. E. 2002. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 395, 110-120.
- VANDEVORD, P. J., NASSER, S. & WOOLEY, P. H. 2005. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 1059-1064.
- VANDEWEGHE, S., COELHO, P. G., VANHOVE, C., WENNERBERG, A. & JIMBO, R. 2013. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101, 1259-1266.
- VERBORGT, O., TATTON, N. A., MAJESKA, R. J. & SCHAFFLER, M. B. 2002. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res*, 17, 907-914.
- VON EINEM, S., ERLER, S., BIGL, K., FRERICH, B. & SCHWARZ, E. 2011. The pro-form of BMP-2 exhibits a delayed and reduced activity when compared to mature BMP-2. *Growth Factors*, 29, 63-71.
- WANG, E. A., ROSEN, V., CORDES, P., HEWICK, R. M., KRIZ, M. J., LUXENBERG, D. P., SIBLEY, B. S. & WOZNEY, J. M. 1988. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 9484-9488.
- WANG, E. A., ROSEN, V., D'ALESSANDRO, J. S., BAUDUY, M., CORDES, P., HARADA, T., ISRAEL, D. I., HEWICK, R. M., KERNS, K. M. & LAPAN, P. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 2220-2224.
- WARD, W. G., GAUTREAU, M. D., LIPPERT, D. C., 2ND & BOLES, C. 2008. HLA sensitization and allograft bone graft incorporation. *Clinical orthopaedics and related research*, 466, 1837-1848.
- WARNKE, P. H., BOLTE, H., SCHÜNEMANN, K., NITSCHKE, T., SIVANANTHAN, S., SHERRY, E., DOUGLAS, T., WILTFANG, J. & BECKER, S. T. 2010. Endocultivation: Does delayed application of BMP improve intramuscular heterotopic bone formation? *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 38, 54-59.
- WELSCH, U. 2006. *Lehrbuch Histologie*, München, Urban Fischer.
- WIKESJÖ, U. M. E., SORENSEN, R. G. & WOZNEY, J. M. 2001. Augmentation of Alveolar Bone and Dental Implant Osseointegration: Clinical Implications of Studies with rhBMP-2 : A Comprehensive Review. *JBJS*, 83, S136-S145.
- WINN, S. R., ULUDAG, H. & HOLLINGER, J. O. 1999. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 367, S95-S106.
- WOLFF, J. 1893. Das Gesetz der Transformation der Knochen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 19, 1222-1224.
- WOO, B. H., FINK, B. F., PAGE, R., SCHRIER, J. A., JO, Y. W., JIANG, G., DELUCA, M., VASCONEZ, H. C. & DELUCA, P. P. 2001. Enhancement of Bone Growth by Sustained Delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Polymeric Matrix. *Pharmaceutical Research*, 18, 1747-1753.
- WU, M., CHEN, G. & LI, Y.-P. 2016. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research*, 4, 16009.
- ZHOU, A. J., ZHU, Z., CLOKIE, C. M. L. & PEEL, S. A. F. 2012. Mutation of a cleavage site adjacent to the mature domain leads to increase in secreted mature BMP-2 with reduced activity. *Growth Factors*, 30, 267-275.

7. Anlagen

7.1 Aufnahmeparameter

Scanner=Skyscan1172

Instrument S/N=07D01082

Hardware version=B

Software=Version 1. 5 (build 16)

Home directory=C:\Skyscan

Source Type=Hamamatsu 80/100

Camera=Hamamatsu 1.3Mp camera

Camera Pixel Size (um)= 22.95

CameraXYRatio=0.9989

Incl.in lifting (um/mm)=1.0400

[Acquisition]

Datadirectory=C:\results\xy0815

Filename Prefix=xy0815

Number of Files= 386

Source Voltage (kV)= 80

Source Current (uA)= 100

Number of Rows= 1024

Number of Columns= 1280

Image crop origin X= 0

Image crop origin Y=0

Camera binning=1x1

Image Rotation=0.3000

Gantry direction=CC

Image Pixel Size (um)= 13.78

Object to Source (mm)=168.580

Camera to Source (mm)=280.875

Vertical Object Position (mm)=50.000

Optical Axis (line)= 490

Filter=Al+Cu

Image Format=TIFF

Depth (bits)=16

Screen LUT=0

Exposure (ms)= 8712

Rotation Step (deg)=0.500

Frame Averaging=ON (3)

Random Movement=ON (10)

Use 360 Rotation=NO

Geometrical Correction=ON

Camera Offset=OFF

Median Filtering=ON

Flat Field Correction=ON

Rotation Direction=CC

Scanning Trajectory=ROUND

Type Of Motion=STEP AND SHOOT

Study Date and Time=Mar 19, 2015 11:33:22

Scan duration=03:49:37

Maximum vertical TS=5.0

7.2 Rekonstruktionsparamater

Reconstruction Program=NRecon

Program Version=Version: 1.6.10.2

Program Home Directory=I:\Daten\Zahnmedizin\NRecon\NreconServerLocal64

Reconstruction engine=NReconServer

Engine version=Version: 1.6.10

Reconstruction from batch=Yes

Postalignment=5.50

Reconstruction servers= SILVER

Reconstruction mode=Standard

Dataset Origin=Skyscan1172

Dataset Prefix=b07b

Dataset Directory=I:\ xy0815

Output Directory=I:\ xy0815_Rec

Time and Date=Jul 28, 2015 14:01:04

First Section=300

Last Section=829

Reconstruction duration per slice (seconds)=0.201887

Total reconstruction time (530 slices) in seconds=107.000000

Section to Section Step=1

Sections Count=530

Result File Type=BMP

Result File Header Length (bytes)=1134

Result Image Width (pixels)=888

Result Image Height (pixels)=888

Pixel Size (um)=13.78189

Reconstruction Angular Range (deg)=192.50

Use 180+=OFF

Angular Step (deg)=0.5000

Smoothing=0

Ring Artifact Correction=5

Draw Scales=OFF

Object Bigger than FOV=OFF

Reconstruction from ROI=ON

ROI Top (pixels)=1029

ROI Bottom (pixels)=138

ROI Left (pixels)=267

ROI Right (pixels)=1158

ROI reference length=1280

Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100

Filter type=0

Filter type description=Hamming (Alpha=0.54)

Undersampling factor=1

Threshold for defect pixel mask (%)=0

Beam Hardening Correction (%)=41

CS Static Rotation (deg)=0.00

Minimum for CS to Image Conversion=0.000000

Maximum for CS to Image Conversion=0.031000

HU Calibration=OFF

BMP LUT=0

Cone-beam Angle Horiz.(deg)=5.990174

Cone-beam Angle Vert.(deg)=4.793710

7.3 Auswertungsalgorithmus

CT Analyser, Version: 1.15.4.0

Pixel size (um), 13.781888

[1] Thresholding (3D space)

Mode, Adaptive (mean of min and max values)

Kernel, Round

Radius, 4

Constant, 0

Background, Dark

Pre-threshold, on

Lower grey threshold, 112

Upper grey threshold, 220

[1] Thresholding done

[2] Despeckle

Type: Remove white speckles (2D space)

Area: less than 10 pixels

Apply to: Image

37763 speckles removed

[2] Despeckle done

[3] Morphological operations

Type: Closing (3D space)

Kernel: Round

Radius: 4

Apply to: Image

[3] Morphological operations done

[4] Save bitmaps(only image):

Destination folder: I:\Daten**xy0815**

File format: bmp

Number of saved files: 459

[5] 3D analysis

[6] ROI shrink-wrap

Mode : Adaptive (2D space)

Stretch over holes with a diameter in 80 pixels

[7] Bitwise operations

<Image> = <Image> XOR <Region of Interest>

[7] Bitwise operations done

[8] Despeckle

Type: Remove white speckles (2D space)

Area: less than 50 pixels

Apply to: Image

46405 speckles removed

[8] Despeckle done

[9] Morphological operations

Type: Erosion (3D space)

Kernel: Round

Radius: 4

Apply to: Image

[9] Morphological operations done

[10] Bitwise operations

<Region of Interest> = <Image> AND <Region of Interest>

[10] Bitwise operations done

[11] Reload Image

[11] Reload done

[12] Bitwise operations

<Image> = <Image> AND <Region of Interest>

[12] Bitwise operations done

[13] Thresholding (3D space) inside VOI

Mode, Adaptive (mean of min and max values)

Kernel, Round

Radius, 4

Constant, 0

Background, Dark

Pre-threshold, on

Lower grey threshold, 70

Upper grey threshold, 112

[13] Thresholding done

[14] Despeckle

Type: Remove white speckles (2D space)

Area: less than 20 pixels

Apply to: Image

43770 speckles removed

[14] Despeckle done

[15] Despeckle

Type: Remove white speckles (3D space)

Volume : less than 100 voxels

Apply to: Image

454 speckles removed

[15] Despeckle done

[16] 3D analysis

[17] Save bitmaps(only image):

Destination folder: I:\Daten\ **xy0815**

File format: bmp

Number of saved files: 459

Anlage 7.4 Ergebnisse der dreidimensionalen μ CT-Auswertung. Darstellung des Knochen- und Porenvolumens

Tabelle 12a: Für die Untersuchung verwendeten Werte aus der Ergebnistabelle der dreidimensionalen Auswertung mit CTAnalyzer. Knochen- und Porenvolumen wurden auf den prozentualen Anteil relativiert, da die absoluten Werte auf Grund divergierender KEM-Blöcke nicht direkt miteinander zu vergleichen wären. 6 Wochen Gruppe.

Tier	Gruppe	Zeit	VOI_VOL in μm	KEM_VOL in μm	Poren_VOL in μm	Knochen_VOL in μm	Porenvolumen in mm^3	Knochenvolumen in mm^3	Anteil Knochen an Poren in %
N03	Kontrolle	6 W	5,61E+11	8,59E+10	1,29E+11	9,36E+07	128,76	0,09	0,07
N04	Kontrolle	6 W	5,89E+11	6,85E+10	1,16E+11	5,93E+07	116,11	0,06	0,05
N22	Kontrolle	6 W	8,71E+11	9,25E+10	1,66E+11	3,49E+06	166,25	0,03	0
N07	BMP-2	6 W	7,46E+11	9,65E+10	1,76E+11	2,62E+09	176,07	2,62	1,49
N08	BMP-2	6 W	8,18E+11	1,01E+11	1,71E+11	3,05E+09	170,81	3,05	1,79
N09	BMP-2	6 W	9,18E+11	1,28E+11	1,58E+11	4,62E+09	158,23	4,62	2,92
N25	proBMP-2	6 W	9,42E+11	1,31E+11	1,94E+11	5,52E+09	193,98	5,52	2,85
N26	proBMP-2	6 W	7,81E+11	1,44E+11	1,58E+11	1,08E+10	157,5	10,77	6,84
N38	proBMP-2	6 W	9,24E+11	1,30E+11	2,04E+11	5,13E+09	203,74	5,13	2,52

Tabelle 12b: Für die Untersuchung verwendeten Werte aus der Ergebnistabelle der dreidimensionalen Auswertung mit CTAnalyzer. Knochen- und Porenvolumen wurden auf den prozentualen Anteil relativiert, da die absoluten Werte auf Grund divergierender KEM-Blöcke nicht direkt miteinander zu vergleichen wären. 12 Wochen Gruppe.

Tier	Gruppe	Zeit	VOI_VOL in μm	KEM_VOL in μm	Poren_VOL in μm	Knochen_VOL in μm	Porenvolumen in mm^3	Knochenvolumen in mm^3	Anteil Knochen an Poren in %
N01	Kontrolle	12 W	5,78E+11	9,71E+10	1,10E+11	6,88E+07	110,37	0,06	0,06
N05	Kontrolle	12 W	5,29E+11	6,21E+10	9,25E+10	6,12E+07	92,45	0,07	0,07
N06	Kontrolle	12 W	6,08E+11	1,04E+11	9,01E+10	4,55E+07	90,12	0,05	0,05
N11	BMP-2	12 W	7,16E+11	1,18E+11	1,32E+11	1,16E+10	132,46	11,65	8,79
N10	BMP-2	12 W	7,14E+11	1,26E+11	1,20E+11	4,82E+09	119,99	4,82	4,02
N12	BMP-2	12 W	7,34E+11	1,28E+11	1,46E+11	1,58E+09	146,31	1,58	1,08
N28	proBMP-2	12 W	8,21E+11	1,15E+11	1,55E+11	1,30E+10	154,72	13,02	8,41
N29	proBMP-2	12 W	7,29E+11	8,77E+10	1,22E+11	3,50E+10	121,58	35,02	28,8
N30	proBMP-2	12 W	8,61E+11	7,94E+10	1,39E+11	9,68E+09	138,85	9,68	6,97

Anlage 7.5 Ergebnisse der zweidimensionalen μ CT-Auswertung. Darstellung der summierten mittleren Knochenfläche je Schnittebene in axialer und koronaler Schnittrichtung

Tabelle 13: Summierte Mittelwerte (je 3 Tiere pro Gruppe) und Standardabweichungen (STABW) der einzelnen Ebenen der 2-D-Auswertung in axialer und koronaler Schnittrichtung in mm².

Ebene	BMP-2 6 W	STABW	proBMP-2 6 W	STABW	BMP-2 12 W	STABW	proBMP-2 12 W	STABW
axial								
1	0,21	0,23	0,70	0,45	0,49	0,48	1,42	1,63
2	0,43	0,30	1,60	1,19	1,00	0,77	5,17	5,25
3	1,04	0,32	1,06	0,54	1,19	0,53	6,07	5,04
4	0,86	0,40	1,31	0,52	0,75	0,37	4,62	3,73
5	0,14	0,18	1,03	0,30	0,35	0,51	1,15	1,26
koronal								
1	0,11	0,16	0,28	0,23	0,09	0,11	0,54	0,43
2	0,46	0,30	1,01	0,47	0,60	0,47	2,13	1,75
3	0,51	0,18	0,89	0,34	0,67	0,28	3,16	2,52
4	0,49	0,27	0,79	0,47	0,55	0,35	3,61	2,77
5	0,35	0,31	0,77	0,55	0,54	0,34	3,51	2,98
6	0,31	0,26	0,71	0,61	0,50	0,29	2,58	2,51
7	0,06	0,04	0,14	0,13	0,08	0,10	0,55	0,72

Anlage 7.6 Histomorphometrie. Summen der Knochenmenge und Flächen unterteilt nach Lokalisation

Tabelle 14a: Summen der absoluten Messwerte der Knochenmenge und der Flächen in mm². 6 Wochen Gruppe.

Gruppe	Zeit	Probe	Summe		Summe		Summe		Summe		Fläche	
			Knochen rippenseitig	Knochen zentral	Knochen hautseitig	Knochen gesamt	rippenseitig	zentral	hautseitig			
										Fläche	Fläche	Fläche
Kontrolle	6 W	K03	0,01	0	0	0,01	6,74	2,62	9,51			
Kontrolle	6 W	K04	0	0	0,02	0,03	7,31	2,84	9,26			
Kontrolle	6 W	K22	0	0	0	0	8,03	3,24	11,09			
BMP-2	6 W	B07	0,26	0,12	0,26	0,65	12,41	4,55	14,2			
BMP-2	6 W	B08	0,12	0,07	1,08	1,27	7,32	3,06	8,96			
BMP-2	6 W	B09	0,75	0,25	0,69	1,69	12,05	4,02	11,44			
proBMP-2	6 W	P25	0,62	0,01	0,61	1,24	13,08	5,11	16,7			
proBMP-2	6 W	P26	1,48	0,17	0,41	2,05	9,15	4,18	13,94			
proBMP-2	6 W	P38	0,75	0,38	0,7	1,83	9,3	3,75	12,03			

Tabelle 14b: Summen der absoluten Messwerte der Knochenmenge und der Flächen in mm². 12 Wochen Gruppe.

Gruppe	Zeit	Probe	Summe		Summe		Summe		Fläche		Fläche	
			Knochen rippenseitig	Knochen zentral	Knochen hautseitig	Gruppen gesamt	Fläche rippenseitig	Fläche zentral	Fläche hautseitig			
Kontrolle	12 W	K01	0,01	0	0,01	0,03	8,16	2,98	9			
Kontrolle	12 W	K05	0,03	0	0,02	0,06	6,52	2,48	6,98			
Kontrolle	12 W	K06	0	0	0	0	10,27	3,65	10,48			
BMP-2	12 W	B11	1,42	1,12	2,54	5,09	11,55	4,18	12,35			
BMP-2	12 W	B10	1,29	0,5	1,13	2,92	12,78	4,14	12,03			
BMP-2	12 W	B12	0,02	0,34	0,38	0,73	11,66	4,26	13,73			
proBMP-2	12 W	P28	3,44	0,86	2,05	6,35	15,11	4,7	12,74			
proBMP-2	12 W	P29	2,73	1,23	4,37	8,33	8,75	3,34	10,59			
proBMP-2	12 W	P30	1,4	0,39	1,29	3,09	6,66	3,02	9,73			

Anlage 7.7 Histomorphometrie. Prozentualer Anteil der Knochenmenge unterteilt nach Lokalisation

Tabelle 15: Summen der prozentual relativierten Knochenmenge innerhalb der abgegrenzten Flächen, die Mittelwerte und Standardabweichungen innerhalb der Gruppen.

Probe	%-Anteil Knochen rippenseitig	%-Anteil Knochen zentral	%-Anteil Knochen hautseitig
6 Wochen			
K03	0,09	0,01	0,03
K04	0,05	0,12	0,23
K22	0,01	0,00	0,01
Mittelwert Kontrolle	0,05	0,04	0,09
Standardabweichung Kontrolle	0,04	0,07	0,12
B07	2,08	2,73	1,86
B08	1,61	2,23	12,10
B09	6,19	6,32	6,05
Mittelwert BMP-2	3,29	3,76	6,67
Standardabweichung BMP-2	2,52	2,23	5,15
P25	4,77	0,21	3,64
P26	16,15	4,02	2,93
P38	8,04	10,25	5,83
Mittelwert proBMP-2	10,46	2,12	3,28
Standardabweichung proBMP-2	5,86	5,07	1,52
K01	0,17	0,15	0,16
K05	0,50	0,13	0,30
K06	0,01	0,00	0,01
12 Wochen			
Mittelwert Kontrolle	0,23	0,09	0,15
Standardabweichung Kontrolle	0,25	0,08	0,14
B11	12,34	26,79	20,58
B10	10,06	12,14	9,41
B12	0,13	8,00	2,74
Mittelwert BMP-2	7,51	15,65	10,91
Standardabweichung BMP-2	6,49	9,87	9,01
P28	22,74	18,27	16,13
P29	31,26	36,83	41,26
P30	21,10	13,04	13,25
Mittelwert proBMP-2	25,03	22,71	23,54
Standardabweichung proBMP-2	5,46	12,50	15,41

8. Danksagung

Soli Deo Gloria – „Ihm, dem einzigen und weisen Gott, sei durch Jesus Christus Ehre in Ewigkeit!“ (Römer 16,27).

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit in den letzten Jahren unterstützt, begleitet und gefördert haben. Mein besonderer Dank gilt dabei an erster Stelle Prof. Dr. Dr. Bernhard Frerich für die Überlassung des Promotionsthemas, seine Betreuung, Beratung und die vielen förderlichen Hinweise während der gesamten Promotionszeit. Ebenso gilt mein besonderer Dank Dr. Jan Liese und Dr. Annika Kasten für die Einweisung in das Themengebiet, die fachspezifische Beratung, und die Betreuung auch außerhalb ihrer regulären Arbeitszeiten sowie den Beistand bei den Problemlösungen, die sich im Laufe der Auswertung ergeben haben. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. -Ing. habil. Martin für seine Einweisung in die Thematik der Mikro-CT-Funktionsweise sowie das Einscannen der Proben bedanken. Den technischen Assistenten des Histologie Labors Fr. Dorothea Gütschow und Hr. Daniel Wolter möchte ich für die Erstellung der Schliffe, und Bilddateien sowie für die Einweisung in die Histomorphometrie bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei PD Dr. Nadja Engel für Ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und stets motivierenden Worte. Ohne die genannten Personen wäre mir die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht unerwähnt sollten auch meine ehemaligen Arbeitgeber und Kollegen bleiben, die mir die Möglichkeit gaben, meine Arbeits- und Urlaubszeiten so zu gestalten, dass ich mich um die Erstellung dieser Arbeit kümmern, sowie die Präsenzphasen in Rostock haben durfte.

Abschließend möchte ich meiner Familie für alle Liebe, unaufhörliche Unterstützung, Rücksichtnahme, Gebete und den Glauben an die Fertigstellung der Arbeit danken. Auch wenn ich bei der Erstellung dieser Arbeit oft an die Bibelstelle denken musste: „Denn wo viel Weisheit ist, da ist auch viel Enttäuschung, und wer sein Wissen mehrt, der mehrt seinen Schmerz“ (Pred 1,18), so bin ich doch dankbar für diese sehr lehrreiche und zeitweise sehr arbeitsintensive Erfahrung, die mich in erster Linie Demut und Durchhaltevermögen gelehrt hat, sowie erneut die Erkenntnis brachte, dass das Aufgeben keine Option ist.

9. Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Universität Rostock unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Bernhard Frerich selbstständig und ohne andere, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift Leon Schneider

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Leon Schneider
Geburtsdatum: 07. 09.1987
Geburtsort: Leningrad jetzt St. Petersburg / Russland
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Adresse: Schubertstraße 9, 26219 Bösel

Schulbildung:

2001 - 2005: Albertus-Magnus-Gymnasium, Friesoythe
2005 - 2008: Fachgymnasium Wirtschaft, Friesoythe
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

06.2008 - 08.2009: Zahntechnikerausbildung, Wardenburger Zahntechnik GmbH,
Wardenburg

Hochschulausbildung:

08.2009 - 06.2014: Rīgas Stradiņa Universitāte (RSU) in Riga / Lettland, Studium der
Zahnmedizin
01.2014: Abschlussarbeit: "Biomaterials for replacement of alveolar bone
defect"
Note: "*with distinction*" - 10 / 10 Punkten
06.2014: Staatsexamen. Note 8,8 / 10 Punkten

Beruflicher Werdegang:

08.2014: Erteilung der Approbation durch die Zahnärztekammer Niedersachsen
09.2014 - 01.2017: Angestellter Zahnarzt, Praxis Dr. Greten, Cloppenburg

08.2015 - 03.2021: Immatrikulation, Doktorand an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock (Prof. Dr. Dr. B. Frerich)

02.2017 - 03.2018: Angestellter Zahnarzt, Praxis Dental Perfection, Bad Zwischenahn

04.2018 - 12.2018: Angestellter Zahnarzt, Praxis Dr. Becker, Westerstede

01.2019 - 05.2019: Praxissuche, Übernahmeverhandlungen Praxis in Bielefeld

06.2019 - 07.2019: Übernahmeverhandlungen Praxis in Brake (Unterweser)

10.2019: Eröffnung der Praxis „Schneider & Zähne“, Brake (Unterweser)

Sonstiges:

05.2017 - 07.2018: Curriculum Implantologie, Deutsche Gesellschaft für Implantologie (DGI)

11.2020: Zertifizierung in Zahnärztlicher Implantologie (DGI)

Bösel, den 06.05.2021

Leon Schneider