

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
Klinikum der Universität München
Chirurgisches Forschungslabor
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Knochenneubildung und Knochendefektheilung
durch den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor
Osteogenic Protein-1 (BMP-7)**

Tierexperimentelle Untersuchungen am Problemdefektmodell der Schafstibia

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Universität zu München

vorgelegt von

Markus Peter Regauer
aus Rosenheim

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Mechthild Stöckelhuber

Prof. Dr. Stephan Kellnar

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2009

Meiner Tochter Daniela

in Liebe und Dankbarkeit

| | | |
|-------------|---|----|
| 1. | Einführung in die Thematik | 10 |
| 1.1. | Problematik Knochenersatz | 10 |
| 1.1.1. | Induktion als neue Dimension in der Chirurgie | 10 |
| 1.1.2. | Klinische Relevanz und volkswirtschaftlicher Aspekt | 11 |
| 1.1.3. | Anforderungsprofil für Knochenersatzmaterialien | 12 |
| 1.1.4. | Kritische Beurteilung der Standardverfahren | 15 |
| 1.1.4.1. | Autogene Knochentransplantation | 16 |
| 1.1.4.2. | Allogene und xenogene Knochentransplantation | 18 |
| 1.1.4.3. | Segmenttransport durch Kallusdistraction | 19 |
| 1.2. | Historische Entwicklung | 20 |
| 1.2.1. | Primitive Arbeiten | 20 |
| 1.2.2. | Erste Knochentransplantationen | 20 |
| 1.2.3. | Pioniere des modernen Knochenersatzes | 21 |
| 1.2.3.1. | Schleichender Ersatz | 21 |
| 1.2.3.2. | Osteoblastentheorie | 22 |
| 1.2.3.3. | Bindegewebelehre | 22 |
| 1.2.3.4. | Induktionstheorie | 23 |
| 1.2.3.5. | Zwei-Phasen-Modell der Knochenregeneration | 23 |
| 1.2.4. | Osteoinduktive Wachstumsfaktoren | 24 |
| 1.2.4.1. | Knochenmatrixpräparationen | 24 |
| 1.2.4.2. | Die Entdeckung des Bone Morphogenetic Protein (BMP) | 25 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1.2.4.3. | Rekombinante Einzelfaktoren | 26 |
| 1.3. | Stand der Forschung | 27 |
| 1.3.1. | Definitionen und Terminologie | 27 |
| 1.3.2. | Bone Morphogenetic Proteins und die TGF- β Superfamily | 27 |
| 1.3.3. | Osteogenic Protein-1 | 29 |
| 1.3.3.1. | Struktur und Funktion | 29 |
| 1.3.3.2. | Tierexperimentelle Studienergebnisse | 32 |
| 1.3.3.3. | Humane Pilotstudien | 32 |
| 1.3.3.4. | Probleme und offene Fragen | 33 |
| 1.4. | Fragestellung | 35 |
| 2. | Material und Methoden | 36 |
| 2.1. | Versuchsmodell | 36 |
| 2.1.1. | Segmentdefektmodell der Schafstibia | 36 |
| 2.1.2. | Rotationsinstabilität | 37 |
| 2.1.3. | Entlastungsmodell | 38 |
| 2.2. | Implantate und Gruppeneinteilung | 41 |
| 2.2.1. | Testsubstanz | 41 |
| 2.2.2. | Trägersubstanz | 41 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.2.3. | Autogene Spongiosa | 43 |
| 2.2.4. | Gruppeneinteilung | 43 |
| 2.3. | Versuchsdurchführung | 44 |
| 2.3.1. | Versuchstierhaltung | 44 |
| 2.3.2. | Operationsvorbereitung | 45 |
| 2.3.3. | Operatives Vorgehen | 47 |
| 2.3.4. | Postoperative Nachsorge | 50 |
| 2.3.5. | Postoperative Verlaufskontrollen | 51 |
| 2.3.6. | Polychrome sequentielle Fluoreszenzmarkierung | 52 |
| 2.3.7. | Materialentnahme, -lagerung und -aufbereitung | 54 |
| 2.3.8. | Zeitschema des Versuchsablaufs | 55 |
| 2.4. | Auswertung | 56 |
| 2.4.1. | Klinischer Verlauf | 56 |
| 2.4.2. | Manuelle Testung post explantationem | 56 |
| 2.4.3. | Röntgenverlaufskontrollen | 56 |
| 2.4.4. | 3D-CT-Volumetrie | 58 |
| 2.4.5. | Biomechanik | 59 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4.6. | Unentkalkte Knochenhistologie | 60 |
| 2.4.6.1. | Einbettverfahren | 61 |
| 2.4.6.2. | Herstellung der Schnittpräparate | 64 |
| 2.4.6.3. | Mikroradiographie | 66 |
| 2.4.6.4. | Fluoreszenzmikroskopie | 68 |
| 2.4.6.5. | Histologische Färbungen | 69 |
| 2.4.7. | Statistik | 70 |
| 3. | Ergebnisse | 72 |
| 3.1. | Klinischer Verlauf | 72 |
| 3.2. | Manuelle Testung post explantationem | 73 |
| 3.3. | Röntgenverlaufskontrollen | 73 |
| 3.4. | 3D-CT-Volumetrie | 78 |
| 3.5. | Biomechanik | 80 |
| 3.6. | Unentkalkte Knochenhistologie | 81 |
| 3.6.1. | Mikroradiographie | 81 |
| 3.6.2. | Lichtmikroskopie | 88 |
| 4. | Diskussion | 96 |
| 4.1. | Versuchsmodell | 96 |

| | | |
|-------------|-------------------------------------|------------|
| 4.1.1. | Versuchsdesign | 96 |
| 4.1.2. | Versuchstieranzahl | 106 |
| 4.1.3. | Versuchsdauer | 107 |
| 4.2. | Auswertungsverfahren | 108 |
| 4.2.1. | Röntgenverlaufskontrollen | 108 |
| 4.2.2. | 3D-CT-Volumetrie | 109 |
| 4.2.3. | Biomechanik | 109 |
| 4.2.4. | Unentkalkte Knochenhistologie | 110 |
| 4.3. | Ergebnisse | 111 |
| 4.3.1. | Röntgenverlaufskontrollen | 111 |
| 4.3.2. | 3D-CT-Volumetrie | 115 |
| 4.3.3. | Biomechanik | 116 |
| 4.3.4. | Unentkalkte Knochenhistologie | 118 |
| 5. | Zusammenfassung | 124 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 129 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 7. | Anhang | 145 |
| 7.1. | Definitionen und Terminologie | 145 |
| 7.2. | Operationsprotokoll | 150 |
| 7.3. | Anästhesieprotokoll | 151 |
| 7.4. | Verlaufsprotokoll | 152 |
| 7.5. | Tabellen | 153 |
| 7.6. | Protokolle der biomechanischen Auswertung | 161 |
| | Danksagung | 171 |
| | Lebenslauf | 174 |
| | Publikationen | 177 |

1. Einführung in die Thematik

1.1. Problematik Knochenersatz

1.1.1. Induktion als neue Dimension in der Chirurgie

*"Practically all classical operations of surgery have now been explored, and unless some revolutionary discovery is made which will put the control of osteogenesis in the surgeon's power, no great advance is likely to come from modification of their detail."*¹

J. CHARNLEY (1951)

Bereits vor mehr als einem halben Jahrhundert erkannte CHARNLEY, der Begründer der modernen Endoprothetik, daß die Entwicklung der Chirurgie nach den Phasen der Exzision, der Rekonstruktion und der Transplantation schließlich in eine Phase der Induktion münden werde ¹. Anlässlich der 49. Internationalen Nobelpreisträger-tagung 1999 betonte Harvard-Professor J. MURRAY, der 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation durchgeführt hatte, daß das Zeitalter der Induktion bereits Realität sei und die Chirurgie der Jahrtausendwende maßgeblich prägen werde ².

Heute ist die hochentwickelte Transplantationschirurgie zu einer Selbstverständlichkeit geworden, aber auch an ihre Grenzen gelangt. Routinemäßig werden lebenswichtige Organe wie Herz, Lunge, Leber, Nieren oder Pankreas transplantiert, der Ersatz der Gewebe des Bewegungsapparates, insbesondere der Knochen- und Knorpelersatz, stellt aber nach wie vor noch ein Problem dar, welches auch durch Transplantation noch nicht befriedigend gelöst werden konnte. Die operativ-technischen Möglichkeiten erscheinen zwar optimiert, so daß die autogene und allogene Knochentransplantation auch die heutigen Standardverfahren in der Orthopädie und Unfallchirurgie zur Überbrückung und Ausheilung von knöchernen Substanzdefekten nach Trauma, Infektion oder Tumorresektion darstellen. Beide

Methoden sind jedoch auch mit erheblichen Problemen behaftet, welche insbesondere bei massiven segmentalen Substanzdefekten zum Tragen kommen und nachfolgend noch ausführlich erörtert werden sollen.

Alternativ rückt somit die Verwendung von Knochenersatzstoffen immer mehr in den Vordergrund, wobei ein ideales Verfahren noch in weiter Ferne liegt und Gegenstand intensiver Forschung ist. Eine vielversprechende Option eröffnete sich 1965 mit der Postulierung des sogenannten Bone Morphogenetic Protein (BMP) durch Marshal URIST³. Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich dabei um mindestens 15 einzelne osteogene Wachstumsfaktoren, wobei sich in ersten Tierversuchen neben dem BMP-2 auch insbesondere das BMP-7, welches vom Hersteller auch als Osteogenic Protein-1 (OP-1) oder Osigraft[®] bezeichnet wird, als stark osteoinduktiv wirksam erwiesen hat^{4-8,141-142}.

Anhand eines Extremmodells sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht werden, die Möglichkeiten und Grenzen des klinischen Einsatzes des bisher als sehr vielversprechend geltenden rekombinanten humanen osteogenen Wachstumsfaktors Osteogenic Protein-1 (rhOP-1) als Bestandteil von Bioimplantaten zur Überbrückung langstreckiger segmentaler Knochendefekte aufzuzeigen.

1.1.2. Klinische Relevanz und volkswirtschaftlicher Aspekt

Die aktuelle Relevanz der Problematik Knochenersatz wird auch durch die WHO-Deklaration der *Bone and Joint Decade 2000-2010* zum Beginn des neuen Jahrtausends symbolisch akzentuiert⁹. Knöcherne Substanzdefekte stellen ein häufiges und nach wie vor auch schwieriges klinisches Problem dar¹⁰. Derartige Defekte resultieren in erster Linie nach Trauma, Infektion oder Tumorresektion, aber auch nach Alloimplantation oder als angeborene Deformitäten. In den Bereichen der Orthopädie und Unfallchirurgie, der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie, Neurochirurgie, Kinderchirurgie sowie auch der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie ergibt sich somit bei etwa 15% aller Operationen am Skelettsystem die Notwendigkeit zum Knochenersatz, um Form und Funktion des betroffenen Skelettabschnitts wiederherstellen zu können¹¹. Infolge von Arbeits-, Sport- oder Verkehrsunfällen

sowie aufgrund der Natur maligner Knochentumore sind dabei auch zu einem hohen Prozentsatz sehr junge Patienten betroffen, so daß nicht nur die teilweise sehr hohen primären Behandlungskosten, sondern auch Folgekosten wie Arbeitsausfall, Rehabilitation, Umschulungen oder Rentenzahlungen zu berücksichtigen sind. Durch die stetige Zunahme der durchschnittlichen Lebenserwartung werden aber auch immer mehr Menschen mit dem Problem von knöchernen Substanzdefekten infolge von osteoporotischen Frakturen oder auch von Knochenmetastasen konfrontiert. So werden in den USA jährlich etwa 200 000 bis 400 000 autogene und allogene Knochentransplantate benötigt, in Deutschland ist nach einer Umfrage aus dem Jahre 1990 pro Jahr von rund 20 000 vorgenommenen Knochentransplantationen auszugehen¹¹⁻¹³. Im Jahre 1993 wurden in Deutschland rund 10 000 autogene Knochentransplantationen durchgeführt¹⁴. Die jährlich anfallenden Kosten für autogenen und allogenen Knochenersatz belaufen sich alleine in den USA aktuell auf über zwei Mrd. US-Dollar¹⁰. Somit sind Investitionen in innovative Behandlungsstrategien schon rein aus volkswirtschaftlichen Gründen sicherlich gerechtfertigt.

1.1.3. Anforderungsprofil für Knochenersatzmaterialien

Ein ideales Knochenersatzmittel sollte prinzipiell bei allen Indikationen eingesetzt werden können, bei welchen heute autogener oder allogener Knochen verwendet wird. Darüber hinaus sind weitere Eigenschaften und Fähigkeiten wünschenswert, die das auto- bzw. allogene Gewebe nicht besitzt, wie z.B. freie Verfügbarkeit und Infektionssicherheit.

Ein Biomaterial, das zum Aufbau von knöchernen Defekten bzw. zur positiven Beeinflussung der Osteoreparation benutzt wird, trifft nach der Implantation auf ein unterschiedliches, in der Regel inhomogenes Lager. In diesem Lager muß es den gewünschten Effekt der Knochenheilung erzielen. Handelt es sich um ein ungeeignetes Lager, so muß das Knochenersatzmaterial Eigenschaften besitzen, welche das Implantatbett derart konditionieren, daß die angestrebte optimale Reaktion erreichbar wird. Die Osteoreparation unter dem Einfluß eines Knochenersatzmaterials ist daher ein Wechselspiel zwischen dem Lager und dem

eingebrachten Material ¹⁵. LEXER unterschied drei verschiedene Lagertypen: ein ersatzunfähiges, ein ersatzschwaches und ein ersatzstarkes Lager ¹⁶. Die Bedeutung des Lagertyps für das Einwachsverhalten eines Knochentransplantates wurde insbesondere von SCHWEIBERER untersucht ¹⁷⁻¹⁹. In diesen Arbeiten wurde für den Erfolg einer Knochentransplantation die Fähigkeit des Lagers, das eingebrachte Material vaskulär zu erschließen, als eine der Hauptbedingungen hervorgehoben. Nach neueren Gesichtspunkten bestimmen zusätzlich auch die folgenden Faktoren das Ergebnis einer Knochentransplantation:

- die Vitalität und die proliferative Kapazität des Lagers,
- das Volumen des Defektes, der durch die Transplantation aufgefüllt werden soll,
- die Konzentration an osteoinduktiven Faktoren an den Grenzflächen des Lagerknochens,
- der metabolische Aktivitätsindex des betroffenen Organismus ²⁰.

Für ein optimales Ergebnis wird in Bezug auf das Transplantat dessen Struktur, seine Kompatibilität, biomechanische Konstellation und im Besonderen auch seine Vitalität und sein Gehalt an osteoinduktiven Faktoren betont ¹⁹⁻²⁰. Die mechanische Stabilität und Infektfreiheit des Lagers bei einer ansonsten ungestörten Homöostase des Organismus sind weitere Grundvoraussetzungen. Unter diesen vorgegebenen und teilweise nicht beeinflussbaren Bedingungen muß ein Knochenersatzmaterial die Osteoreparation einleiten, unterhalten, möglicherweise auch beenden und nach der knöchernen Heilung bzw. Defektüberbrückung in einer vierten Phase den knöchernen Umbau zu osteonalem, belastungsfähigem und trajektorieell strukturiertem Knochen erlauben ¹⁵. Im Hinblick auf die Optimierung von Knochenersatzmaterialien gelten aus heutiger Sicht für ein ideales Knochenersatzmaterial folgende allgemeinen Kriterien ^{11,15}:

- Freie Verfügbarkeit
- Lagerbarkeit
- Sterilisierbarkeit
- Kostengünstige Herstellung
- Keine lokal zelluläre oder systemische Toxizität ²¹
- Keine Kanzerogenität oder Mutagenität ²²

- Keine oder nur passagere Antigenität²³
- Keine oder nur vorübergehende Auslösung einer Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion

Unter speziellen Gesichtspunkten sollte ein ideales Knochenersatzmaterial in unterschiedlichen Formen hergestellt werden können und auch intraoperativ bearbeitbar bzw. formbar sein. Ferner sollte ein derartiges Knochenersatzmaterial bei gleichbleibend positiver Beeinflussung der Osteoreparation auch mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften produziert werden können, um in Abhängigkeit von der geplanten Implantationslokalisation und den dort vorherrschenden Belastungen jeweils ein mechanisch adäquates Material einsetzen zu können. Die Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial variieren auch sehr stark in Abhängigkeit von dem operativen Fachgebiet, innerhalb dessen es eingesetzt werden soll. Ist beispielsweise unter bestimmten Indikationen in der ästhetisch-plastischen Chirurgie oder in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eine vollständige Resorption des Materials sogar unerwünscht, so erscheint diese z.B. in der Traumatologie bei der Auffüllung von Defekten an hochbelasteten Röhrenknochen der unteren Extremität absolut erforderlich, um in der Folge vitales Knochengewebe entstehen zu lassen, das allen mechanisch oder metabolisch bedingten Umbauprozessen unterworfen werden kann. Daher sollte auch die Resorptionscharakteristik von Knochenersatzmaterialien steuerbar sein.

Ein Knochenersatzmaterial sollte nach der Implantation am ortho- und am heterotopen Ort ein ähnliches Reaktionsmuster auslösen²⁴. Hinsichtlich der erwünschten Wirkung auf die Knochenneubildung bedeutet dies, daß das Material osteostimulativ, osteokonduktiv und osteoinduktiv sein soll. Im Vergleich zur physiologischen Reparatur bzw. zu Knochenformationsraten nach autogener Knochentransplantation sollte ein ideales osteostimulatives Knochenersatzmaterial die Knochenheilung nicht nur in Bezug auf die Quantität und Qualität des zu bildenden Knochens stimulieren, sondern es sollte darüber hinaus die entsprechenden Prozesse auch beschleunigen. Dies kann nicht nur über eine rein osteokonduktive Wirkung im Sinne eines lediglich passiven Angebotes einer Leitstruktur an den einwachsenden Knochen erfolgen. Vielmehr sollte ein ideales Knochenersatzmaterial daher vor allem auch einen starken osteoinduktiven Effekt

haben, d.h. es sollte eine Osteogenese an einem heterotopen Ort außerhalb des Knochenlagers herbeiführen können. Dies muß über Chemotaxis zirkulierender Zellen erfolgen, die nachfolgend zusammen mit ortsständigen kompetenten Zellen durch den Einfluß des osteoinduktiven Knochenersatzmittels zu knochenbildungsfähigen Zellen umgewandelt werden²⁶⁻²⁶.

Speziell bei der Behandlung großer segmentaler Knochendefekte trifft ein Knochenersatzmaterial nicht auf ein homogenes Lager. Es finden sich die proximalen und distalen Kontaktstellen mit dem orthotopen Knochen sowie die dazwischen liegende knochenfreie Strecke, wo nur Kontakt zu Muskel- oder Narbengewebe möglich ist. Daher erscheint der osteoinduktive Effekt eines Knochenersatzmaterials gerade bei derartigen Indikationen von besonderer Bedeutung zu sein, da bei der Implantation eines Knochenersatzmaterials in segmentale Defekte der überwiegende Anteil der Osteoreparation im Muskellager und damit in einem bestenfalls ersatzschwachen Lager erfolgen muß. Die Knochenheilung ist daher unter diesen Bedingungen zumindest primär eher als eine Osteoinduktion zu verstehen.

Zusammenfassend lassen sich die folgenden Beurteilungskriterien für die Wertigkeit eines Knochenersatzmaterials formulieren²⁷:

- Quantitative osteogenetische Potenz
- Qualitative osteogenetische Potenz
- Zeitfaktor
- Anwendungssicherheit
- Komplikationsgefahr

1.1.4. Kritische Beurteilung der Standardverfahren

Zur Verdeutlichung der Notwendigkeit innovativer Knochenersatzverfahren sollen nun unter Berücksichtigung des Anforderungsprofils für Knochenersatzmaterialien die grundsätzlichen verfahrensimmanenten Probleme der derzeitigen Standard-Methoden dargestellt werden.

1.1.4.1. Autogene Knochentransplantation

Bei der autogenen Knochentransplantation wird körpereigenes Knochengewebe an eine andere Stelle des Skeletts transplantiert. Diese Methode hat daher den bedeutenden Vorteil, daß das Transplantat nicht abgestoßen wird und kein relevantes Infektionsrisiko birgt. Ferner ist diese Methode vergleichsweise preiswert. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit stellt aber die Defektgröße einen entscheidenden limitierenden Faktor dar. Zudem ist die autogene Knochentransplantation stets mit einem zusätzlichen operativen Eingriff zur Transplantatentnahme verbunden, woraus wiederum Kontraindikationen sowie zusätzliche Risiken und Komplikationen resultieren. So ist speziell bei Polytrauma, Kindern oder Patienten in kritischem Allgemeinzustand die Entnahme von großen Knochentransplantaten durch die damit verbundene Ausweitung von Operations- und Gewebetrauma oftmals nicht vertretbar. Aber auch in der Standardsituation bedingt die Transplantatentnahme längere Operationszeiten, eine größere intra- und postoperative Belastung sowie eine erhöhte postoperative Morbidität, denn die Entnahmeoperationen gehen mit einer relativ hohen Komplikationsrate einher. So wird die Hämatomrate mit bis zu 64% angegeben ¹¹. Relativ häufig sind auch Nervenläsionen und Infektionen zu verzeichnen ²⁸⁻²⁹. Gelegentlich kommt es als Folge der Entnahme großer Transplantate auch zu Frakturen ³⁰⁻³². Selbst über Organverletzungen und Eingeweide-Herniationen wird im Zusammenhang mit der Beckenspanentnahme in der Literatur berichtet ^{30,33}. Ferner besteht bei Kindern auch die Gefahr der Verletzung offener Fugen an den Entnahmestellen.

Hinsichtlich der biologischen Wertigkeit ist die autogene Spongiosa allen anderen derzeit verfügbaren Knochenersatzmaterialien überlegen. Insbesondere bei vorliegen eines ersatzschwachen Lagers gilt somit das autogene Spongiosa-Transplantat nach wie vor als Goldstandard ¹⁶. Der schnelle Einbau von Spongiosa beruht auf der kombinierten Eigenschaft, direkte Verbindungen mit den Kapillaren des Empfängergewebes zu bilden und die Knochenneubildung zu stimulieren. Mit ihren Eigenschaften wird die autogene Spongiosa somit insgesamt den Anforderungen an ein ideales Knochentransplantat am ehesten gerecht.

Das spongiöse Element verleiht auch dem autogenen kortikospongiösen Transplantat viele Eigenschaften, die für ein reines Spongiosatransplantat charakteristisch sind, so daß in vielen Fällen kortikospongiöser Knochen in Verbindung mit einem Spongiosa-Transplantat oder auch stattdessen verwendet werden kann. Insbesondere dann, wenn es auf die mechanische Festigkeit ankommt, können zwei kortikospongiöse Blöcke so angeordnet werden, daß ihre kortikalen Flächen aneinandergelegt sind, während die spongiösen Flächen Kontakt mit dem vaskularisierten Gewebe des Transplantatlagers haben. Dies ermöglicht einen schnellen Einbau des spongiösen Anteils der Transplantate bei gleichzeitiger Ausnutzung der mechanischen Stabilität der Kortikalis.

Ein besseres Verständnis der lokalen Blutversorgung hat es ermöglicht, bestimmte Gewebsareale zu identifizieren, welchen die Versorgung durch eine einzige Arterie und Vene zum Überleben ausreicht. Diese Erkenntnisse haben die Erforschung der speziellen Anatomie angeregt, was sich in den Beschreibungen verschiedener gestielter Lappen niederschlug. Bei manchen Lappen ist der Gefäßstiel in der Lage, außer Knochen auch noch unterschiedliche Anteile an Weichteilgewebe zu ernähren. Dies führte dazu, daß vaskularisierter Knochen zur Überbrückung von Defekten an entfernte Stellen des Körpers transplantiert werden kann. Die gestielte Transplantation kann dabei auf zwei Arten erfolgen: Das Transplantat kann an seinem Gefäßstiel mobilisiert und auf eine benachbarte Stelle geschwenkt werden, ohne daß die Gefäße durchtrennt werden müssen³⁴⁻³⁵. Freie Gewebetransplantationen sind möglich, wenn der Gefäßstiel durchtrennt und die Gefäße des Stiels unter dem Mikroskop mit Gefäßen an der Empfängerstelle anastomosiert werden. Auf diese Weise können Rippen, die Fibula³⁶ und Beckenkammknochen³⁷ transplantiert werden.

Der Erfolg dieser Methoden hängt im Gegensatz zu den anderen Verfahren nicht von der osteogenetischen Potenz des Transplantates ab. Die Einheilung des in dieser Weise transplantierten Knochens in den Empfängerknochen ist identisch mit der normalen Frakturheilung, das Remodeling des transplantierten Knochens erfolgt nach dem WOLFFSchen Gesetz³⁸. Die freie Gewebetransplantation ist besonders bei schweren Verletzungen mit Knochen- und Weichteilverlusten indiziert. Beide Techniken sind zeitaufwendig, erfordern spezielle chirurgische Fähigkeiten und

müssen regelmäßig ausgeübt werden, wenn gute Ergebnisse erzielt werden sollen. Die Anwendung dieser Verfahren bleibt daher entsprechenden Zentren vorbehalten. Ferner können die Hebedefekte auch zu nicht unerheblichen kosmetischen Problemen führen.

1.1.4.2. Allogene und xenogene Knochentransplantation

In den Fällen, in denen nun die autogene Knochentransplantation quantitativ unzureichend oder aufgrund der beschriebenen Risikoabwägungen kontraindiziert erscheint, kann man auf allogene Knochentransplantate zurückgreifen. Neben dem Vorteil der größeren Verfügbarkeit besitzen aber auch diese erhebliche Nachteile hinsichtlich der vorhandenen Antigenität sowie der Gefahr der Infektionsübertragung.

Durch bakterielle Kontamination der Transplantate sowie durch beim Spender bestehende und nicht restlos auszuschließende Infektionen mit HBV, HCV oder auch HIV ist der Empfänger einer nicht unerheblichen Gefährdung durch Infektionsübertragung ausgesetzt³⁹⁻⁴². Um das Infektionsrisiko zu minimieren ist ein immenser Aufwand bezüglich Spenderselektion und Knochenbankmanagement erforderlich. Trotz großer Bemühungen, die Qualität allogener Transplantate durch Einführung von Knochenbanken mit den damit verbundenen Richtlinien bezüglich der Entnahme, Lagerung und Untersuchung von Knochenpräparaten zu verbessern, bleiben die erwähnten Probleme bestehen und kommen insbesondere im sogenannten großen Problemdefekt zur Geltung. Die Verwendung von großen massiven Fremdtransplantaten erbringt nur sehr unbefriedigende Ergebnisse. So ist mit einem Versagen von etwa 40-50% der herkömmlich verwendeten tiefgefrorenen Massivtransplantate zu rechnen⁴³. Dies beruht darauf, daß solche Transplantate einerseits eine, wenn auch im Vergleich zum frischen Fremdgewebe verminderte, immunologische Abstoßungsreaktion erfahren, aber aufgrund des fehlenden primären vaskulären Anschlusses erst über Jahre bzw. Jahrzehnte vom Empfängerorganismus erschlossen und in eigenen Knochen umgebaut werden können⁴⁴. Frisch übertragene mikrovaskulär angeschlossene Fremdtransplantate können als vitales Gewebe vom Wirtsorganismus zwar besser und schneller integriert werden, weisen jedoch gerade aufgrund ihrer Vitalität eine hohe Antigenität und damit starke Abstoßungsreaktionen auf. Wie auch bei anderen

Organempfängern lassen sich diese nur durch eine entsprechende Immunsuppression verhindern, und es konnten hierdurch gute Einheilungsergebnisse erzielt werden⁴⁵⁻⁴⁷. Im Gegensatz zu Herz-, Lungen- und Nierentransplantation besteht bei der Knochentransplantation aber keine vitale lebensrettende bzw. lebensverlängernde Indikation, so daß die aufwändige und typischerweise nephrotoxische Immunsuppression sowie das aufgrund fehlender Quarantänezeit und Wiederholungstestung des Spenders erhöhte Risiko der Infektionsübertragung daher nicht gerechtfertigt erscheinen.

Xenogene Knochentransplantate finden aufgrund hoher Antigenität und Infektionsgefahr keine klinische Anwendung⁴⁸.

1.1.4.3. Segmenttransport durch Kallusdistraktion

Als neuere Behandlungsmethode von größeren Knochendefekten hat sich auch die von ILIZAROV erstmals 1950 inaugurierte Segmentverschiebung etabliert⁴⁹⁻⁵⁰. Mittels Verschiebung eines ortsfestigen Knochensegments und der Distraktion des sich bildenden Kallus können längerstreckige Knochendefekte durch autogen entstandene Knochenregenerate überbrückt werden. Dabei ist die Osteoregeneration unter Distraktion dann erfolgreich, wenn die Distraktionsgeschwindigkeit das Regenerationsvermögen aus den Knochenschnittflächen und aus dem Periost nicht überfordert. Das heißt, die Gefäßeinsprossung und die sie begleitende, durch Osteoinduktion gesteuerte Osteoblastenaktivität dürfen nicht durch zu schnelle und abrupte Distraktion gestört werden. Dies bedingt eine maximale Distraktionsstrecke von etwa 1 mm pro Tag. Bei einem Diaphysendefekt von beispielsweise 5 cm ist daher mit einer Distraktionszeit von mindestens 50 Tagen zu rechnen, wobei frühestens eine Woche nach Apparateanlage mit der Distraktion begonnen werden kann. Nach erfolgreicher Distraktion ist dann mit einer mindestens ebenso langen Konsolidierungszeit und eventuellen weiteren Operationen wie z.B. Osteosyntheseverfahrenswechseln zu rechnen. In etwa 10-30 % der Fälle werden zusätzlich Operationen mit Übertragung von Eigenknochen wegen Pseudarthrosen der Andockstellen notwendig⁵¹⁻⁵³.

Berücksichtigt man neben der vorzüglichen Eigenschaft der Eigenregeneratbildung die zuletzt genannten Nachteile, so muß die Kallusdistraktion als eine technisch und

medizinisch sehr aufwändige und langwierige Behandlungsmethode betrachtet werden, welche für den Patienten mit mehreren operativen Eingriffen, gesteigerter Morbidität, langer Dauer mit Arbeitsunfähigkeit und erheblichem Unkomfort bei Verwendung von externen Fixationen verbunden ist.

Aufgrund der bestehenden Nachteile der in diesem Kapitel beschriebenen Standardverfahren wird nun verständlich, daß Arbeitsgruppen in aller Welt schon seit Jahrzehnten intensiv nach einem geeigneten Knochenersatzverfahren suchen, bislang aber noch ohne durchschlagenden Erfolg. Wie bereits erwähnt entwickelte sich die Forschung dabei in zwei divergente Hauptrichtungen, was vorwiegend durch die Geschichte des Knochenersatzes begründet ist. Zum besseren Verständnis soll daher die entsprechende historische Entwicklung noch einmal rekapituliert werden.

1.2. Historische Entwicklung

1.2.1. Primitive Arbeiten

Das Interesse an Frakturbehandlung und Knochenersatz reicht weit in die Menschheitsgeschichte zurück. So gibt es Beweise dafür, daß bereits in der frühen neolithischen peruanischen Medizin geschmiedete Goldplatten dazu verwendet wurden, knöcherne Defekte der Schädelkalotte zu rekonstruieren⁵⁴. Mohammed AL GAFEQUI von Cordoba soll 1265 die Verwendung von Fischgräten zur spinalen Fusion propagiert haben, aber es ist letztlich nicht sicher, ob er dieses Verfahren auch tatsächlich angewendet hat⁵⁵.

1.2.2. Erste Knochen transplantationen

Die erste dokumentierte xenogene Knochen transplantation wurde 1668 in Moskau durch Job van MEEKEREN aus Amsterdam durchgeführt. Er deckte den Schädeldefekt eines Soldaten namens BUTTERLYN mit einem Knochenstück aus einer Hundekalotte. Die Operation war erfolgreich, wurde aber von der Kirche nicht gebilligt, weshalb der Patient unter Androhung der Exkommunikation um die Entfernung des Implantates

bat. Dabei zeigte sich bereits eine gute Einheilung des Knochentransplantates⁵⁶⁻⁵⁷. Im Jahre 1821 gelang Philips von WALTER die Reimplantation eines Kalottendeckels nach Schädelreparation, welche somit als erste erfolgreiche autogene Knochentransplantation beschrieben wurde⁵⁸.

1867 formulierte OLLIER in seinem Werk über die Knochenregeneration die experimentell-wissenschaftlichen Grundlagen der Knochentransplantation und definierte das unterschiedliche Einheilungsverhalten autogener, allogener und xenogener Transplantate⁵⁹. Dabei stellte er fest, daß frisch entnommener Knochen im Spendertier oder einem Tier gleicher Spezies bei erhaltener Vitalität einheilen kann, während toter Knochen sowie Knochen einer anderen Spezies abgestoßen, resorbiert oder bindegewebig eingekapselt wurde. Ollier unterschied als erster klar zwischen autogener, allogener und xenogener Transplantation und führte den Begriff der *heterotopen Transplantation* ein. Er begründete die sogenannte *Vital School* der Knochentransplantation und vertrat die Ansicht, daß lebender Knochen mit noch intaktem Periost und Knochenmark das beste Knochentransplantat darstellte.

Für die weitere klinische Etablierung der Knochentransplantation waren die Entwicklung von Anästhesie (1846) und Antisepsis (1864) wesentlich. Beide Verfahren standen MACEWEN als Student LISTERS in Glasgow zur Verfügung. So konnte MACEWEN 1881 zum ersten mal die klinische Anwendung der allogenen Knochentransplantation beschreiben⁶⁰. Er rekonstruierte bei einem dreijährigen Jungen erfolgreich einen 11 cm langen osteomyelitischen Defekt der Humerus-Diaphyse mit allogenen Knochenfragmenten von insgesamt sechs anderen Kindern, welche im Rahmen von Umstellungsosteotomien zur Korrektur von Tibia-Antekurvationen entnommen wurden.

1.2.3. Pioniere des modernen Knochenersatzes

1.2.3.1. Schleichender Ersatz

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts gelangte BARTH zu der Ansicht, daß weder frisch replantierte autogene Knochenfragmente (mit oder ohne erhaltenem Periost) noch

avitaler mazerierter Knochen den knöchernen Defektschluß aktiv förderten⁶¹⁻⁶². Seiner Meinung nach starben nach Transplantation alle Knochenelemente ab und dienten lediglich als Leitschiene für den vom Transplantatlager neugebildeten Knochen. Er prägte damit den Begriff des *schleichenden Ersatzes* und der Leitschienenfunktion des Transplantates. Zeitgleich machte CURTIS in den USA unabhängig von BARTH entsprechende Beobachtungen⁶³, und PHEMISTER bezeichnete später diese dynamischen Umbauvorgänge bei Knochentransplantaten als *Creeping Substitution*⁶⁴. Im Widerspruch zu OLLIERS Schlußfolgerungen über die Vitalität von transplantiertem Knochen begründete BARTH nun 1893 die sogenannte *Non-vital School* des Knochenersatzes und sprach sich entschieden gegen eine qualitative Unterscheidung autogener, allogener oder xenogener Transplantate aus.

1.2.3.2. Osteoblastentheorie

G. AXHAUSEN und E. LEXER widersprachen BARTHS radikaler Auffassung. In umfassenden Experimenten an Ratten, Hasen und Hunden konnten sie zeigen, daß Knochenneubildung vom Transplantat selbst ausging⁶⁵⁻⁶⁹. Damit begründeten sie die Anfang des 20. Jahrhunderts vorherrschende *Osteoblastentheorie*. Sie dokumentierten die eindeutige Überlegenheit von frischem vitalem gegenüber totem mazeriertem Gewebe und schrieben die Fähigkeit zum Knochenersatz „den Transplantationskräften der lebend bleibenden Osteoblasten des mitverpflanzten Periostes und Markendostes“ zu⁶⁹.

1.2.3.3. Bindegewebelehre

Aber auch die Osteoblastentheorie wurde in der Folgezeit angezweifelt, da die Bedeutung des Bindegewebes bei der Knochenregeneration nun immer mehr Eingang in wissenschaftliche Überlegungen fand. Die beiden bedeutendsten Vertreter der 1926 formulierten humoral orientierten *Bindegewebelehre*, die beiden französischen Forscher LERICHE und POLICARD, bestritten das Vorhandensein periostaler Osteoblasten völlig und glaubten stattdessen an eine Umwandlung von angrenzendem Bindegewebe in Knochengewebe⁷⁰.

1.2.3.4. Induktionstheorie

Entsprechend der Lehre BARTHS kam 1938 auch der schwedische Chirurg G. LEVANDER zu der Erkenntnis, daß bei der „Knochenüberpflanzung“ neben dem Knochenhartgewebe auch das „mitverpflanzte“ Periost und Knochenmark absterbe. Die resultierende Knochenneubildung wurde von ihm als indirekte Metaplasie gedeutet ⁷¹. Dabei nahm er an, daß der neue Knochen ausschließlich dem mesenchymalen Gewebe des Lagers entstamme, welches „von den vom toten Knochengewebe ausgehenden Kräften“ zur Knochenneubildung angeregt bzw. induziert werde ⁷². Diese *Induktionstheorie* stellte schließlich die Forderung nach Substanzen im Sinne eines spezifischen Stimulus zur Knochenneubildung, welche durch das Transplantat mitübertragen werden. Diese Forderung unterstrich auch ANNERSTEN durch seine Versuche mit zellfreien alkoholischen Knochenextrakten, die er heterotop in die Muskulatur von Kaninchen applizierte ⁷³. Am Applikationsort konnte ANNERSTEN dabei Knorpel- sowie auch Knochenbildung beobachten. Später verglich er sowohl autogene und allogene sowie auch xenogene Extrakte und stellte fest, daß allogene Extrakte ebenso aktiv waren wie xenogene.

Aufbauend auf diese Versuche sah OBERDALHOFF 1947 nur die extrazelluläre Knochengrundsubstanz als knochenneubildendes Agens an ⁷⁴. Periost, Knochenmark und Knochenzellen schrieb er keinerlei Wirkung zu. Der Vorgang der Verknöcherung konnte seiner Meinung nach nicht als zellulärer Prozeß betrachtet werden. Vielmehr ging er davon aus, daß ein in der Knochengrundsubstanz vorhandener K-Faktor, ein zellfreier, extrazellulär wirksamer biochemischer Stoff, in die mesenchymale Grundsubstanz des Keimgewebes eindringe und eine Kalkausfällung bewirke. In diesem Sinne lieferte G. AXHAUSEN bereits 1908 einen Beweis, als er Periost verpflanzte, dessen Kambiumschicht reichlich Osteoblasten enthält, aber nur Osteogenese sah, wenn anhängendes Knochenhartgewebe mitübertragen wurde ⁷⁵.

1.2.3.5. Zwei-Phasen-Modell der Knochenregeneration

1952 faßte W. AXHAUSEN die Osteoblastenlehre seines Vaters G. AXHAUSEN und die Induktionstheorie von LEVANDER, ANNERSTEN und OBERDALHOFF zu einer Einheit zusammen. Er erkannte, daß die Knochenregeneration in zwei osteogenetischen

Phasen verläuft. Die erste, zelluläre Phase erfolgt demnach durch präexistente, spezifisch osteogenetisch potente Zellen und setzt bereits nach wenigen Tagen ein, während das Ingangkommen der zweiten Phase, welche vom unspezifischen Bindegewebe ausgeht, mehrere Wochen in Anspruch nimmt⁷⁶⁻⁷⁷.

Diese Ansicht kann auch M.R. URIST 1965 in seinem bedeutenden Werk *“Bone: formation by autoinduction“* bestätigen³. Die anorganischen Knochenbestandteile sind für die Knochenneubildung unbedeutend. Vielmehr stören diese sogar aufgrund einer erschwerten Resorption des Transplantates die Umwandlung einwandernder pluripotenter Stammzellen des Wirtes zu neuen Osteoblasten. Diese Differenzierung vollzieht sich unter dem Einfluß der ungeformten Interzellulärsubstanzen. Werden einem Transplantat präoperativ die anorganischen Bestandteile herausgelöst, so entfällt der Vorgang der langwierigen Knochenresorption, und die Interzellulärsubstanzen, aus denen URIST später schließlich die sogenannten *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) isolierte, können direkt auf die Stammzellen des Wirtes einwirken, wodurch die Knochenneubildung beschleunigt wird.

Dies ist nach L. SCHWEIBERER auch auf das allogene Transplantat übertragbar, wobei die allogenen Zellelemente infolge der Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde gehen. Nach Abschluß dieses Abstoßungsprozesses bewirkt das allogene Transplantat eine Differenzierung von Stammzellen zu knochenbildenden Zellen. Der Anstoß zu dieser Differenzierung geht von der Grundsubstanz und damit von der erhaltenen Interzellulärsubstanz aus¹⁷.

1.2.4. Osteoinduktive Wachstumsfaktoren

1.2.4.1. Knochenmatrixpräparationen

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse sah man folglich auch alternative Möglichkeiten zum Knochenersatz in der entsprechenden Aufbereitung allogenen Knochens. Durch gezielte Extraktion schwer resorbierbarer Mineralsalze sowie immunologisch aktiver Bestandteile konnten die Eigenschaften von Transplantaten erheblich verbessert werden. Die Behandlung mit Salzsäure bzw. eine Abschluß-

Sterilisation garantierten zudem ein infektsicheres Transplantat. Infektsicherheit bei erhaltener Osteoinduktivität waren hierbei die wesentlichen Kriterien für die Qualität der gewonnenen Präparate. Demineralisierte bzw. teildemineralisierte Knochenmatrixpräparate durchlaufen solche Extraktions- und Sterilisationsprozesse. Aufgrund der osteoinduktiven Eigenschaften der angereicherten Matrixfaktoren kann die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Knorpel- und Knorpelgewebe erfolgen⁷⁸⁻⁸¹. Obwohl die Vorteile demineralisierter Matrixpräparate gegenüber allogener Spongiosa in einer Vielzahl tierexperimenteller Studien nachgewiesen werden konnten, hat sich eine breite klinische Anwendung in Europa nicht durchsetzen können^{78, 82-83}.

1.2.4.2. Die Entdeckung des Bone Morphogenetic Protein (BMP)

In der weiteren Entwicklung war nun die gezielte Isolierung einzelner osteogener Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix eine logische Konsequenz. Es ist hierbei vor allem das Verdienst von M.R. URIST, der durch die systematische Untersuchung der Knochenmatrix die herausragende Bedeutung der induktiven Knochenneubildung darlegen konnte. Ursprünglicher Ausgangspunkt seiner Arbeit waren umfangreiche Studien über das Rekalzifizierungsverhalten verschiedenster Gewebe nach Bestrahlung im Auftrag der amerikanischen Armee. Durch Zufall gelangte er dabei zu der Erkenntnis, daß die heterotope Implantation dekalzifizierten Knochengewebes in Muskulatur und Subkutangewebe regelmäßig zur Knochenneubildung führte^{3,78}. Bereits 1965 postulierte er somit die hypothetische Existenz eines osteoinduktiven Faktors in der Knochenmatrix. Weiterführende Experimente mit jeweils höher extrahierten Matrixfraktionen bestärkten URIST in der Annahme, daß dieser aktive Bestandteil der Matrix ein Protein sein müsse. Er prägte damit 1971 den Begriff des sogenannten *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)⁸⁴.

Diese Substanz wurde, noch an andere, nicht-kollagene Proteine in komplexer Form gebunden, erstmals 1979 von URIST aus dem Knochen von Ratten und Kaninchen isoliert⁸⁵. Im weiteren Verlauf wurde das BMP in Dentin und murinem bzw. humanem Osteosarkom-Gewebe nachgewiesen. Die erfolgreiche Extraktion von humanem BMP aus nicht tumorös verändertem menschlichem Knochen wurde 1983 von URIST publiziert, das Protein war jedoch noch nicht vollständig isoliert. Die

Reindarstellung von bovinem BMP erfolgte schließlich 1984⁸⁶. Humanes BMP ist ein saures, hydrophobes, schlecht lösliches, an Hydroxylapatit bindendes, kohlenhydratfreies Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kD, welches durch Hitze, Ultraschall und durch im Knochen enthaltene BMPasen inaktiviert werden kann. In kortikalem Knochen hat es eine gewichtsbezogene Konzentration von 0,001%. Diese Konzentration nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab⁸⁷.

1.2.4.3. Rekombinante Einzelfaktoren

Noch bis vor wenigen Jahren konnten osteogene Wachstumsfaktoren nur durch chemische Extraktion aus dem Knochengewebe hergestellt werden. Dabei waren immense Mengen an Knochen notwendig, so daß diese Forschungen nicht mehr an Ratten durchgeführt werden konnten. Man verwendete bovinen Knochen, und 1988 extrahierten WOZNEY et al. 40 µg des osteoinduktiven Proteins aus 40 kg Knochen⁵. Chromatographische Analysen zeigten, daß der Extrakt verschiedene Proteine enthielt, aber eine weitere Aufschlüsselung des BMP-Gemisches war damals technisch nicht möglich. Schließlich war mehr als eine Tonne an bovinem Knochen notwendig, um ausreichende Proteinmengen für die Bestimmung der Aminosäuresequenzen zu erhalten⁸⁸. Unterschiedliche Reinigungsverfahren führten zur Isolierung spezifischer Proteinfractionen mit unterschiedlichen physikalischen und induktiven Eigenschaften. Diese Unterschiede bezüglich Zusammensetzung und Reinheitsgrad hatten die Charakterisierung und Definition einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren zur Folge⁸⁹. Es zeigte sich, daß hochaufgeschlüsselte Matrixfraktionen ihre Osteoinduktivität verlieren und erst nach Rekombination mit höhermolekularen Glykophosphoproteinen wiedergewinnen. Auch hochgereinigtes BMP aggregiert unmittelbar mit Osteonectin, Calmodulin, Histonen, Osteocalcin und weiteren glutamathaltigen und nichtkollagenen Proteinen zu einem hydrophoben Komplex, wodurch die Osteoinduktivität im Vergleich zur Reinsubstanz deutlich gesteigert wird. Da eine Isolierung des BMP aus diesem Komplex schwierig ist, wurde zunächst vorwiegend zu 95% gereinigtes BMP für experimentelle Untersuchungen eingesetzt. Erst moderne molekularbiologische und gentechnologische Methoden der jüngsten Zeit ermöglichten eine weitere Aufschlüsselung des BMP in Einzelfaktoren sowie auch deren rekombinante Herstellung.

1.3. Stand der Forschung

1.3.1. Definitionen und Terminologie

Die Definitionen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten relevanten Termini orientieren sich an den Vorschlägen einer Konsensus-Konferenz der *European Society for Biomaterials* ⁹⁰ sowie an den von M.R. URIST und R.G. BURWELL angegebenen Begriffsbestimmungen (siehe 7.1.) ⁹¹.

1.3.2. Bone Morphogenetic Proteins und die TGF- β -Superfamily

Nach Klonierung der cDNA konnten in Ovarialzellen von chinesischen Hamstern rekombinante humane Peptide hergestellt werden. Dieser Ansatz ermöglichte WOZNEY et al. die Klonierung von BMP-2, BMP-2B (heute BMP-4) und BMP-3 (auch als osteogenin bezeichnet) ⁵. Zwei weitere BMPs, BMP-7 und BMP-8 (heute als *Osteogenic Protein-1* und *-2* bezeichnet), konnten 1990 von OZKAYNAK und Kollegen kloniert werden ⁹². Bis heute konnten mindestens 18 verschiedene BMPs identifiziert werden, wobei 15 davon beim Menschen vorkommen ^{4,122}. Dabei zeigten die Analysen der Aminosäuresequenzen eine auffällige Homologie zu *transforming growth factor* (TGF)- β_1 ⁹³. Die BMPs wurden daher als Mitglieder der *TGF- β superfamily* identifiziert, wobei die *BMP superfamily* eine Untergruppe darstellt, welche in Abhängigkeit der Ähnlichkeit der primären Aminosäuresequenzen wiederum in mindesten vier separate Untergruppen eingeteilt wird (Tab. 1-1) ⁸⁸. Dabei gilt BMP-1 nicht als Mitglied der *TGF- β superfamily*, da es nicht die konservierte Struktur der *TGF- β superfamily* aufweist. Es wurde kürzlich als eine Prokollagen C-Proteinase beschrieben, die Prokollagen zu Kollagen prozessiert. BMP-5, BMP-6 und BMP-7 zeigen eine enge Verwandtschaft mit einer mittleren Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 89% in den korrespondierenden Regionen ⁹⁴.

| BMP subfamily | Generic name | BMP designation |
|----------------------|--|--|
| BMP-2/-4 | BMP-2A BMP-2B | BMP-2 BMP-4 |
| BMP-3 | Osteogenin Growth/differentiation factor-10 (GDF-10) | BMP-3 BMP-3B |
| OP-1 / BMP-7 | BMP-5 Vegetal related-1 (Vgr-1) Osteogenic protein-1 (OP-1) Osteogenic protein-2 (OP-2) Osteogenic protein-3 (OP-3) Growth/differentiation factor-2 (GDF-2) BMP-10 Growth/differentiation factor-11 (GDF-11) | BMP-5 BMP-6 BMP-7 BMP-8 BMP-8B BMP-9 BMP-10 BMP-11 |
| GDF-5,-6,-7 | Growth/differentiation factor-7 (GDF-7) bzw. Cartilage-derived morphogenetic protein-3 (CDMP-3) Growth/differentiation factor-6 (GDF-6) bzw. Cartilage-derived morphogenetic protein-2 (CDMP-2) Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) bzw. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP-1) BMP-15 | BMP-12 BMP-13 BMP-14 BMP-15 |

Tab. 1-1 Die BMP superfamily

Wie auch andere Mitglieder der *TGF- β superfamily* teilen die meisten der BMPs ein konserviertes Aminosäuremuster an der C-terminalen 7-Cystein-Domäne. Nach ihrem Verwandtschaftsgrad werden die Mitglieder der *TGF- β superfamily* in drei große Untergruppen eingeteilt (Abb. 1-1) ⁹⁵.

Mehrere BMPs, darunter BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 und BMP-7, konnten die Differenzierung verschiedener pluripotenter mesenchymaler Zell-Linien in Richtung osteoblastärer Zell-Linien induzieren. In Abhängigkeit von Potential und Stadium der Zielzellen kann BMP-7 (OP-1) verschiedene pluripotente mesenchymale Zell-Linien sowohl zu chondro- als auch zu osteoblastären Zellen differenzieren ⁹⁶.

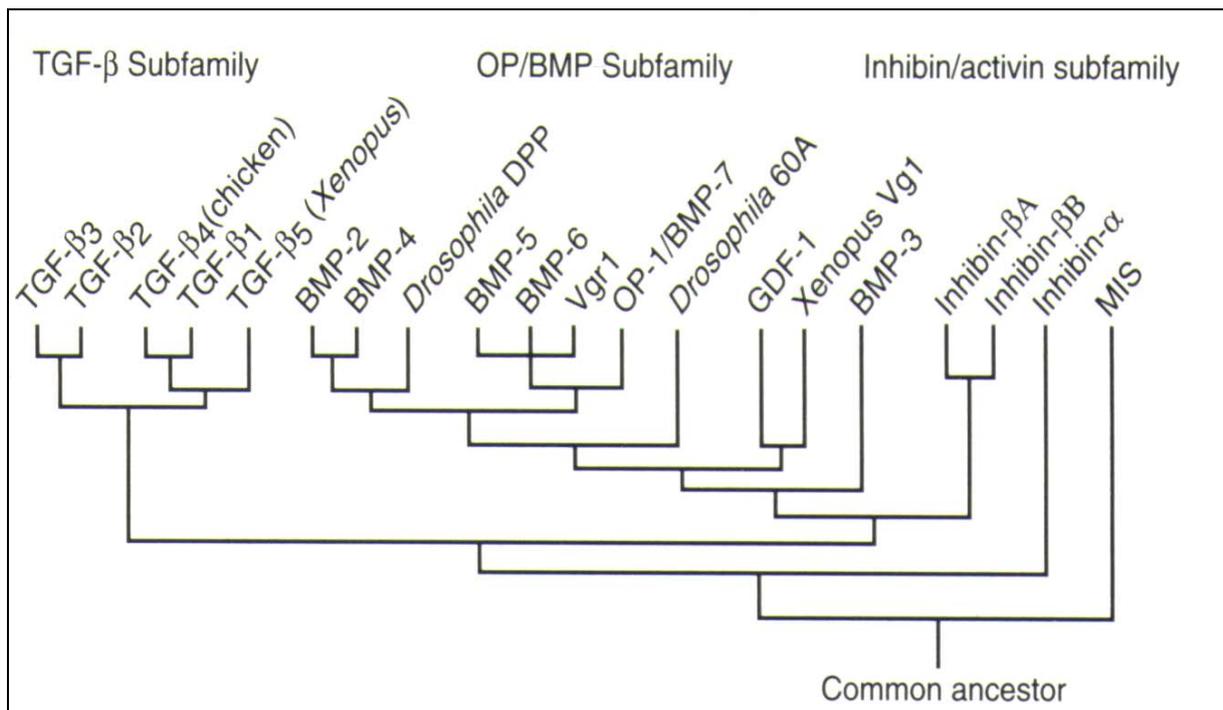


Abb. 1-1 Die TGF- β superfamily

1.3.3. Osteogenic Protein-1

1.3.3.1. Struktur und Funktion

Das Precursor-Protein von humanem OP-1 ist ein Polypeptid mit einer Länge von 431 Aminosäuren, beginnend mit einer Signalsequenz von 29 Aminosäuren (Abb. 1-2). Nach proteolytischer Aufschlüsselung zwischen Arginin 292 und Serin 293 resultiert das rekombinant exprimierte Protein als Homodimer, welches an einer weiteren Signalsequenz (Arg-X-X-Arg) proteolytisch prozessiert wird. Diese Signalsequenz scheinen alle Mitglieder der TGF- β Superfamilie aufzuweisen. Das prozessierte Homodimer mit einem Molekulargewicht von 32-36 kd besteht aus zwei Untereinheiten mit einer Länge von jeweils 139 Aminosäuren. Von vier möglichen N-Glykosylierungsstellen sind vermutlich lediglich zwei tatsächlich glykosyliert, eine davon in der Prodomäne⁹⁵. C-terminal findet sich eine unter allen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie streng konservierte Domäne mit sieben Cystein-Resten (TGF- β Domäne). Die Monomere sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden⁹⁵.

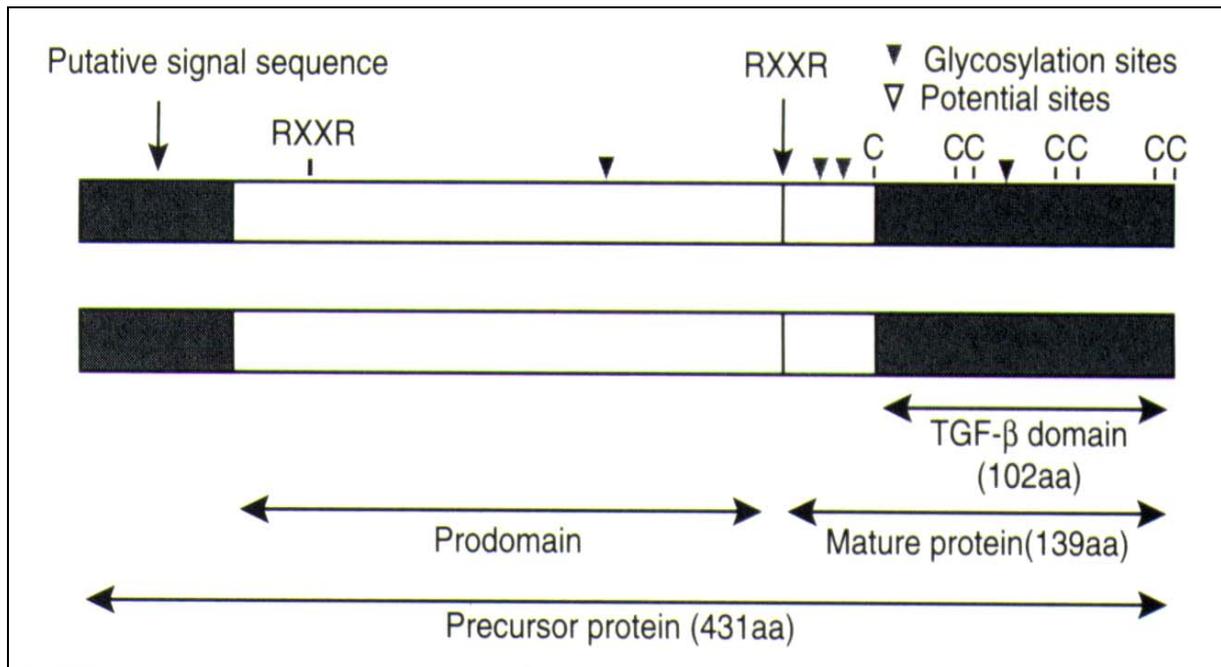


Abb. 1-2 Struktur von humanem OP-1 ⁹⁵

In Abb. 1-3 wird die Aminosäuresequenz von OP-1 mit den Sequenzen anderer Mitglieder der TGF-β Superfamilie im Bereich der konservierten 7-Cystein-Domäne verglichen. Dabei zeigt sich eine sehr enge Verwandtschaft zu den Genprodukten von BMP-5 und BMP-6 mit 86% bzw. 88% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz.

The diagram shows the structure of OP-1 protein with a putative signal sequence, RXXR motif, and C-terminal region containing four cysteine (C) residues and three potential glycosylation sites. Below the diagram is a table comparing the amino acid identity of OP-1 with other members of the TGF-β superfamily.

| OP/BMP Group | Amino Acid Identity | DPP/Vg1 Group & Others | Amino Acid Identity |
|--------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
| OP-1 (BMP-7) | 100% | DPP | 56% |
| OP-2 (BMP-8) | 70% | 60A | 71% |
| Vgr-1 (BMP-6) | 88% | Vg-1 | 62% |
| BMP-5 | 86% | ADF | 30% |
| BMP-2b (BMP-4) | 58% | Activin | 42% |
| Osteogenin (BMP-3) | 42% | Inhibin | 41% |
| BMP-2a (BMP-2) | 60% | TGF-β1 | 31% |

Abb. 1-3 Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mitgliedern der TGF-β superfamily ¹⁵⁵

In wesentlich geringerem Ausmaß besteht Ähnlichkeit zu BMP-3 (42%) oder zu TGF- β selbst (31%).

In zahlreichen präklinischen sowie klinischen Studien wurde rekombinant hergestelltes humanes Osteogenic Protein-1 bisher vorwiegend in Form des von der Firma STRYKER BIOTECH (Natick, U.S.A.) angebotenen sogenannten *OP-1 Device* verwendet⁶⁻⁸.

OP-1 wird dabei gentechnologisch durch Ovarialzellen von chinesischen Hamstern mit einem Reinheitsgrad von über 95% produziert und anschließend in einem Massenverhältnis von 1:400 an bovines, BSE-freies Typ-1-Kollagen konjugiert. Eine Einheit OP-1-Device enthält somit 2,5 mg OP-1/ 1 g Kollagen. Die Zubereitung liegt als feines weißes Pulver vor, das in zweifach eingeschweißten sterilen Gläsern anwendungsgerecht abgepackt ist.

Die subkutane Implantation von gereinigtem humanem OP-1 induziert in Ratten eine Sequenz zellulärer Vorgänge, welche zur Knochenneubildung führen⁹⁵. Diese Vorgänge sind identisch mit denjenigen, welche bei Implantation von gereinigtem natürlichem bovinem OP-1 zu beobachten waren.

OP-1 rekrutiert mesenchymale Stammzellen und triggert deren Differenzierung zu Chondrozyten innerhalb von 5-7 Tagen. Nach anschließender Kapillareinsproßung kommt es zur Kalzifizierung und Hypertrophie des Knorpels, welcher schließlich nach 9-12 Tagen durch neuen Knochen ersetzt wird. Der mineralisierte Knochen unterliegt nun extensiven Umbauvorgängen, und es bilden sich Ossikel, welche nach 14-21 Tagen bereits funktionelle Elemente des Knochenmarks beinhalten⁹⁵.

Das aus bovinem Knochen gewonnene Kollagen dient als Trägersubstanz mit Leitschiene-funktion. Diese ermöglicht die Adhäsion und Proliferation mesenchymaler Stammzellen, welche unter dem Einfluß von OP-1 nun weiter differenzieren und neuen Knochen im Implantatbereich produzieren. Der Kollagenträger fungiert nur temporär und wird vollständig resorbiert, wenn der Prozeß der Knochenneubildung abgeschlossen ist. In Abwesenheit von OP-1 wird die Kollagenmatrix ohne Anzeichen einer Knochenneubildung langsam resorbiert⁹⁵.

1.3.3.2. Tierexperimentelle Studienergebnisse

In einer Vielzahl präklinischer Studien wurde bereits das beschriebene Potential zur Knochenneubildung von rhOP-1 untersucht. Großes Aufsehen erregten dabei insbesondere Berichte über die erfolgreiche Ausheilung kritischer segmentaler Kontinuitätsdefekte an lasttragenden Extremitätenknochen⁶⁻⁸. So konnte in einer Studie an Kaninchen acht Wochen nach Implantation von OP-1 in einen 1,5 cm langen Defekt der Ulna in der radiologischen Auswertung regelmäßig eine vollständige knöcherne Defektüberbrückung verzeichnet werden. In der biomechanischen Auswertung zeigten sich die operierten Knochen vergleichbar stabil wie die intakten Ulnae der Gegenseite⁶. Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch eine Studie an Hunden, in der ein 2,5 cm langer Defekt der Ulna regelmäßig durch OP-1 ausgeheilt werden konnte⁷. In der ersten an Primaten durchgeführten Studie mit kritischem Segmentdefektmodell konnte sogar gezeigt werden, daß 2,0 cm lange Defekte der Ulna, in denen die Therapie mit autogener Spongiosa versagte, durch OP-1 innerhalb von sechs bis acht Wochen vollständig knöchern überbrückt werden können. Die ebenfalls 2,0 cm langen Tibiadefekte konnten dagegen sowohl durch OP-1 als auch durch autogene Spongiosa ausgeheilt werden⁸.

1.3.3.3 Humane Pilotstudien

Die erste prospektive randomisierte klinische Studie über ein Mitglied der BMP-Familie diente dem Vergleich von rhOP-1 mit autogener Spongiosa bei der Behandlung therapierefraktärer Tibiapseudarthrosen⁹⁷. Diese Studie wurde als Sicherheits- und Wirksamkeitsprüfung von OP-1 nach FDA-Kriterien in Form einer Multi-Center-Studie in den USA durchgeführt. Einschlußkriterium war eine seit mindestens neun Monaten bestehende Tibiapseudarthrose, für welche die Indikation zur Marknagelung in Kombination mit einer Spongiosaplastik bestand. Straffe hypertrophe Pseudarthrosen mit guter Führung wurden ausgeschlossen, da bei diesen Patienten eine alleinige Marknagelung zur Ausheilung für ausreichend erachtet wurde. An 18 Zentren wurden 122 Patienten mit 124 Tibiapseudarthrosen für die Studie rekrutiert. Die Patienten der OP-1 Gruppe erhielten das *OP-1 Device* der neuen Generation (3,5 mg OP-1 + 1 g Kollagen), die Kontrollgruppe wurde

konventionell mit autogener Spongiosa versorgt. Der Nachbeobachtungszeitraum betrug zwei Jahre. Die Studie wertete die Implantation von OP-1 als sichere und effektive Behandlungsmethode bei therapierefraktären Tibiapseudarthrosen. Nach Bewertung von klinischen Verlaufsparemern einschließlich der Notwendigkeit von weiteren operativen Eingriffen war die Ergebnisqualität vergleichbar mit der bei Transplantation von autogener Spongiosa. Als Vorteil der Verwendung von OP-1 wurde dagegen die Vermeidung von Komplikationen durch die Entnahme von Eigenknochen einschließlich geringerer intraoperativer Blutverluste und geringerer Infektionsraten beschrieben⁹⁷. In einer weiteren klinischen Studie berichten SHIMMIN und RUFF aus Australien über die erfolgreiche Therapie mit OP-1 bei 44 Patienten mit verschiedenen therapierefraktären Pseudarthrosen. Dabei kam es lediglich bei drei Patienten nicht zu einer erfolgreichen Ausheilung innerhalb von fünf Monaten, obwohl sich alle Patienten zuvor bereits vergeblich mehrfachen konventionellen orthopädischen Therapieversuchen unterzogen hatten⁹⁸⁻⁹⁹. Auch an der Klinik für Orthopädie der Universität von Zagreb sind bereits mehr als 20 Patienten mit therapierefraktären Pseudarthrosen erfolgreich mit OP-1 therapiert worden¹⁰⁰. In einer prospektiven randomisierten Doppelblindstudie berichten GEESINK et al. sogar über den erfolgreichen klinischen Einsatz von OP-1 in einem sogenannten kritischen Segmentdefektmodell an der humanen Fibula¹⁰¹. Bei 24 Patienten wurde im Rahmen einer hohen tibialen Osteotomie ein standardisierter segmentaler Defekt von kritischem Ausmaß an der Fibula gesetzt. Bei vier von sechs Patienten kam es nach Implantation von OP-1 zu einer Defektüberbrückung innerhalb von vier Monaten. In der Vergleichsgruppe wurde mit dem gleichen Erfolg demineralisierte Knochenmatrix implantiert. Seit dem 17. Mai 2001 ist OP-1 im Arzneimittelregister der Europäischen Gemeinschaft zur Behandlung von therapierefraktären traumatischen Tibiapseudarthrosen des Erwachsenen zugelassen.

1.3.3.4. Probleme und offene Fragen

Dem Stand der Forschung entsprechend können im Tierversuch kritische diaphysäre Segmentdefekte lasttragender Extremitätenknochen durch OP-1 offensichtlich erfolgreich ausgeheilt werden⁶⁻⁸. Beim Menschen beschränkt sich die klinische Erfahrung bisher auf die Pseudarthrosentherapie^{97-99,102}. Die erste und bisher

einzigste humane Studie mit einem kritischen Segmentdefektmodell wurde an der Fibula und damit an einem nicht lasttragenden Extremitätenknochen durchgeführt und spiegelt somit nicht die klinisch relevante Problemdefektsituation wieder ¹⁰¹.

Aktuell konzentrieren sich erfolgreiche OP-1-Studien vorwiegend auf die Bereiche Wirbelkörperfusion ¹⁰³⁻¹⁰⁵, Alloimplantation ¹⁰⁶ und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie ¹⁰⁷, wobei auffällig ist, daß in allen diesen Bereichen wie auch bei der Pseudarthrosentherapie keine großen Defektvolumina aufgefüllt werden müssen. Speziell der ausgedehnte segmentale Kontinuitätsdefekt an lasttragenden Röhrenknochen stellt aber im klinischen Alltag nach wie vor ein schwerwiegendes Problem dar, welches dringlich ein alternatives Behandlungskonzept erforderlich erscheinen läßt. Entsprechend den Kriterien nach HEIPLE und JOHNSON ist dabei die sogenannte *kritische Defektgröße* definiert durch eine segmentale Defektstrecke, welche mehr als das Zweifache des entsprechenden Knochendurchmessers bzw. mehr als ein Viertel der Gesamtlänge des betroffenen Röhrenknochens beträgt ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

Hinsichtlich der Relevanz des absoluten Volumens eines Knochendefektes wurden bisher ausnahmslos Versuchsmodelle mit kleinen Defektvolumina verwendet. Selbst bei den Studien an Primaten hatten die Versuchstiere nur ein Körpergewicht von bis zu 30 kg ⁸. Es bleibt also bis dato unklar, ob die bisher gewonnenen tierexperimentellen Erkenntnisse auch auf die in der Humanmedizin üblichen Dimensionen übertragbar sind. Dies gilt insbesondere auch für die in Tierversuchen ermittelten optimalen Dosierungen von OP-1 ⁶⁻⁸. Damit stellt sich auch die Frage nach der Vergleichbarkeit des Knochenstoffwechsels von Versuchstier und Mensch. Untersuchungen zur Wertigkeit verschiedener Versuchstier-Spezies bei osteologischen Fragestellungen bescheinigen in dieser Hinsicht großen Versuchstieren wie z.B. dem Schaf eindeutig günstigere Eigenschaften ¹¹⁰.

Letztlich stellt sich die Frage, ob sich bei langen diaphysären Defektstrecken die bisher als sehr vielversprechend beschriebene Verwendung von OP-1 auch tatsächlich zu einem ernsthaften Konkurrenzverfahren für die klinisch etablierten Verfahren der Eigenknochen transplantation oder der Kallusdistraction entwickeln kann.

1.4. Fragestellung

Hinsichtlich der Anwendung von rekombinantem humanem OP-1 bei der Behandlung kritischer Segmentdefekte scheitert die direkte Übertragbarkeit der bisher gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen derzeit entweder an der Verwendung klinikferner Untersuchungsmodelle oder an dem Umstand, daß die bisherigen tierexperimentellen Studien an Kleintieren durchgeführt wurden, welche dem Menschen weder hinsichtlich der Größenverhältnisse noch des Knochenaufbaus und Knochenstoffwechsels vergleichbar sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, anhand eines der Humansituation entsprechenden, klinisch realistischen, segmentalen Problemdefektmodells an der Schafstibia die Möglichkeiten bzw. Grenzen des klinischen Einsatzes von OP-1 zur Überbrückung langstreckiger segmentaler Knochendefekte aufzuzeigen. Dabei wurde der rekombinante humane Wachstumsfaktor OP-1 im direkten Vergleich mit autogener Spongiosa untersucht, welche bei der Defektauffüllung derzeit nach wie vor als Therapie der Wahl gilt. Entsprechend den unter Punkt 1.1.3. angegebenen Beurteilungskriterien für die Wertigkeit von Knochenersatzmaterialien wurden folgende Fragestellungen formuliert:

1. Kann ein klinisch relevanter segmentaler Problemdefekt am lasttragenden Röhrenknochen durch den Einsatz von rekombinantem humanem OP-1 überbrückt werden?
2. Zeigt rekombinantes humanes OP-1 dabei eine der autogenen Spongiosa vergleichbare quantitative bzw. qualitative osteogenetische Potenz?
3. Kann dabei der zeitliche Heilungsverlauf durch den Einsatz von rekombinantem humanem OP-1 im Vergleich zur Anwendung autogener Spongiosa beschleunigt werden?
4. Gibt es bei der Therapie derartiger Segmentdefekte relevante Unterschiede zwischen rekombinantem humanem OP-1 und autogener Spongiosa hinsichtlich Anwendungssicherheit und Komplikationsgefahr?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsmodell

*" (...) the compositions of body fluids are too complex to expect a synthetic solution to be a valid substitute for circulating fluids of the body."*¹¹¹

M.R. URIST (1966)

*" Our view was that because synthetic solutions lack innumerable organic constituents, i.e. inhibitors and accelerators which could affect the local mechanism, we modified the tissue in vitro and tested for mineralisation by implantation in vivo."*¹¹²

M.R. URIST (1966)

2.1.1. Segmentdefektmodell der Schafstibia

Als Versuchsmodell diente ein 5,0 cm langer segmentaler Defekt der linken Tibiadiaphyse von skelettal ausgewachsenen weiblichen Merinoschafen (Abb. 2-1).

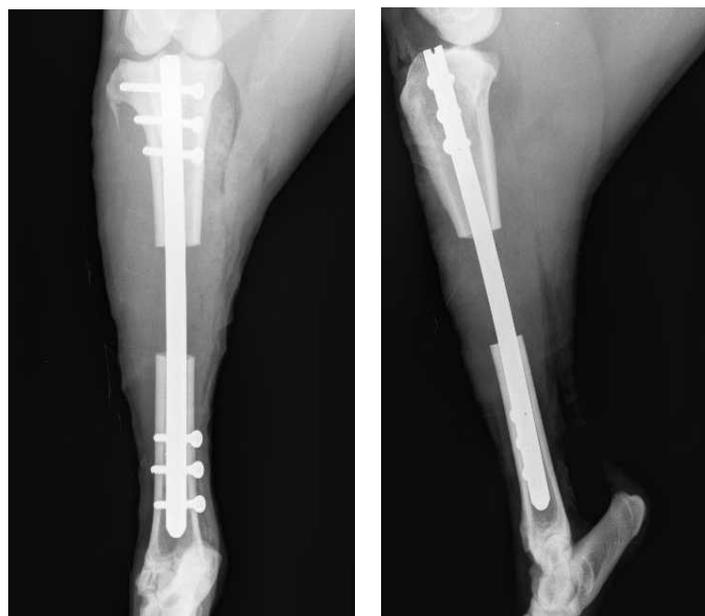


Abb. 2-1 Defektmodell. Postoperative Röntgenkontrolle der Marknagel-Osteosynthese bei 5,0 cm langem diaphysärem Segmentdefekt an der Schafstibia.

Das mittlere Defektvolumen betrug 20 ml. Der Defekt wurde mit unterschiedlichen Implantaten aufgefüllt (Tab. 2-2). Die Osteosynthese wurde als aufgebohrte Tibiamarknagelung durchgeführt, wobei die Verriegelung des Marknagels unter einer beabsichtigten kontrollierten Rotationsinstabilität von etwa 10° erfolgte.

2.1.2. Rotationsinstabilität

Eine kontrollierbare und einheitliche Rotationsinstabilität der Osteosynthese ließ sich hierbei dadurch erzielen, daß bei der Osteosynthese zur Verriegelung des Marknagels Kortikalisschrauben verwendet wurden, die einen für den eingebrachten Marknagel zu geringen Durchmesser aufwiesen (Abb. 2-2). Wir verwendeten 4,5 mm Kortikalisschrauben bei einem Schraubenlochdurchmesser von 5,0 mm.

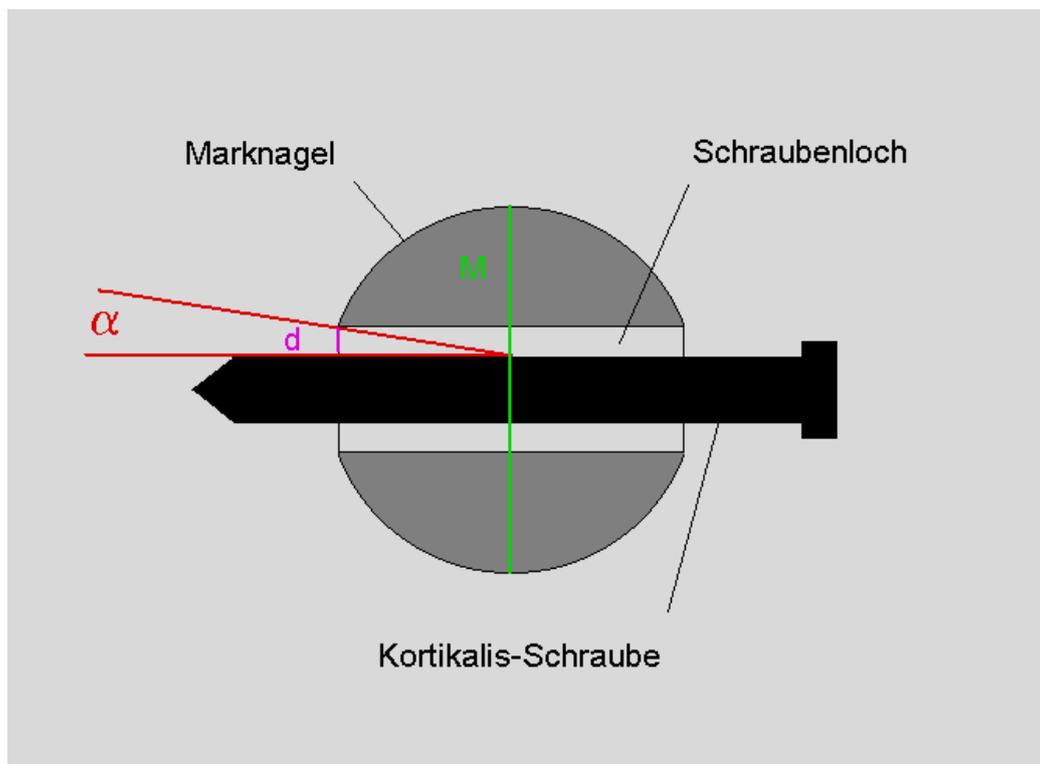


Abb. 2-2 Modell der kontrollierten Rotationsinstabilität der Marknagel-Osteosynthese

Gemäß der Gleichung

$$U / d = M \pi / d = 360^\circ / \alpha = 31,42 / 0,25$$

ergab sich somit ein einfacher maximaler Rotationswinkel der Schraube von der Neutralstellung bis zum Anschlag von $\alpha = 360^\circ / 125,68 = 2,86^\circ$. U steht dabei für Umfang und M für Durchmesser des Marknagels, mit d wird der halbe Unterschied zwischen Schraubenlochdurchmesser und Schraubendurchmesser bezeichnet. π ist die Kreiszahl.

Da die Schraube in beide Richtungen um den Winkel α rotieren konnte und sich die Bewegungen der proximalen und distalen Verriegelung addierten, errechnete sich für die Marknagel-Osteosynthese nun eine maximale Rotationsinstabilität von 4α entsprechend 11° .

2.1.3. Entlastungsmodell

Postoperativ sollten die Versuchstiere in ihrer Bewegungsfreiheit nicht durch eine etwaige Gips-, Orthesen- oder Bauchgurtanlage eingeschränkt werden. Um die aus ethischen Gründen stets suffizient analgesierte Tiere dennoch an einer spontanen Vollbelastung der frisch operierten Extremität zu hindern, wurde bei der Operation eine Tenotomie des Ligamentum patellae durchgeführt (Abb. 2-3 bis 2-5). Die dadurch primär eingeschränkte Streckfähigkeit im Kniegelenk konnten die Tiere durch die zunehmende Ausbildung und Aktivierung des Reservestreckapparates voll kompensieren, so daß nach etwa vier Wochen wieder eine ungehinderte Lokomotion möglich war.

Dieses Verfahren der operativ induzierten stetig zunehmenden Teilbelastung bis hin zur Vollbelastung der operierten Extremität hatte sich bereits in der Vergangenheit bewährt, um die vormals aufgetretene hohe postoperative Fraktur- und damit Ausfallsrate deutlich zu senken ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Als Reservestreckler zusätzlich zum M. quadriceps femoris fungieren am Schafsknie folgende Muskeln ¹¹³:

- M. biceps femoris (Insertion an der proximalen ventralen Tibia)
- M. semitendinosus (Insertion am Margo cranialis tibiae)
- M. semimembranosus (Insertion am Margo cranialis tibiae)
- M. fibularis tertius und M. extensor digitorum longus (Ursprung am Condylus lateralis femoris mit gemeinsamer Sehne, die durch die Fossa extensoria am ventralen Tibiaplateau in den distalen ventralen Unterschenkelbereich zieht)

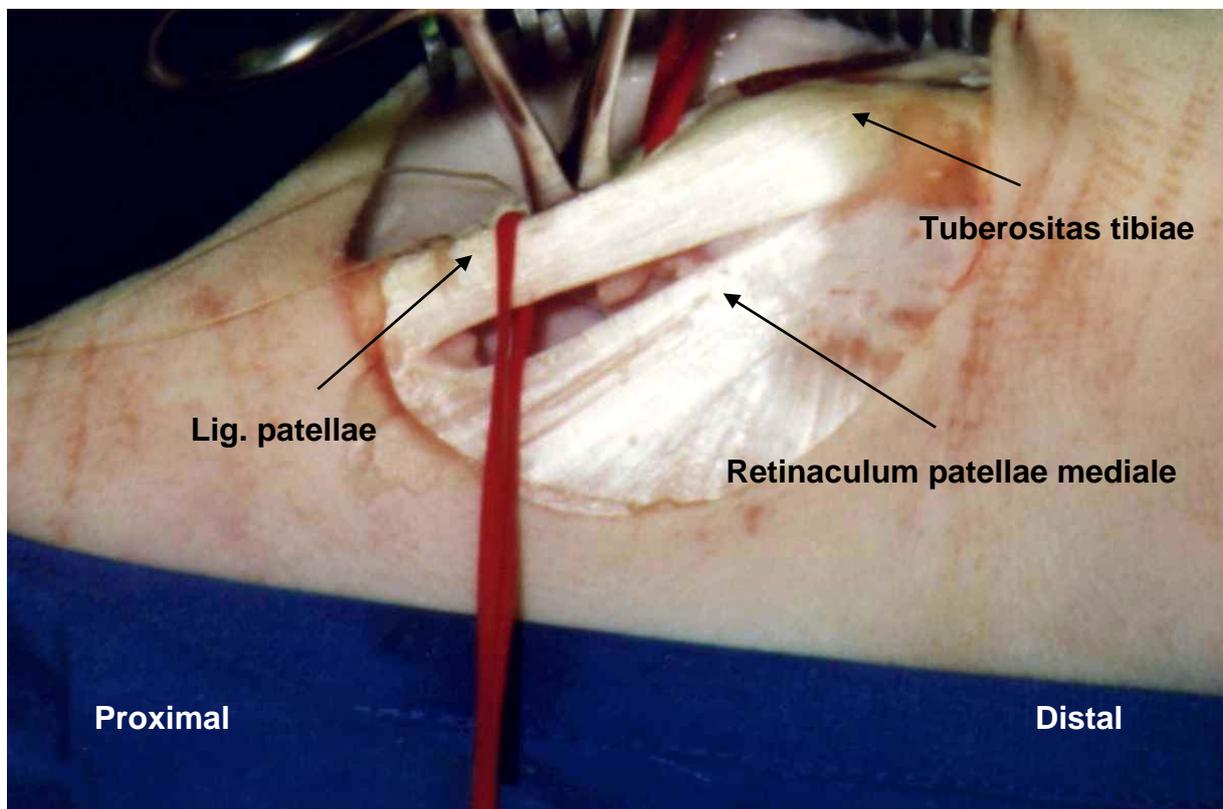


Abb. 2-3 Entlastungsmodell durch Tenotomie der Patellarsehne. Ansicht des linken Knies von medial.

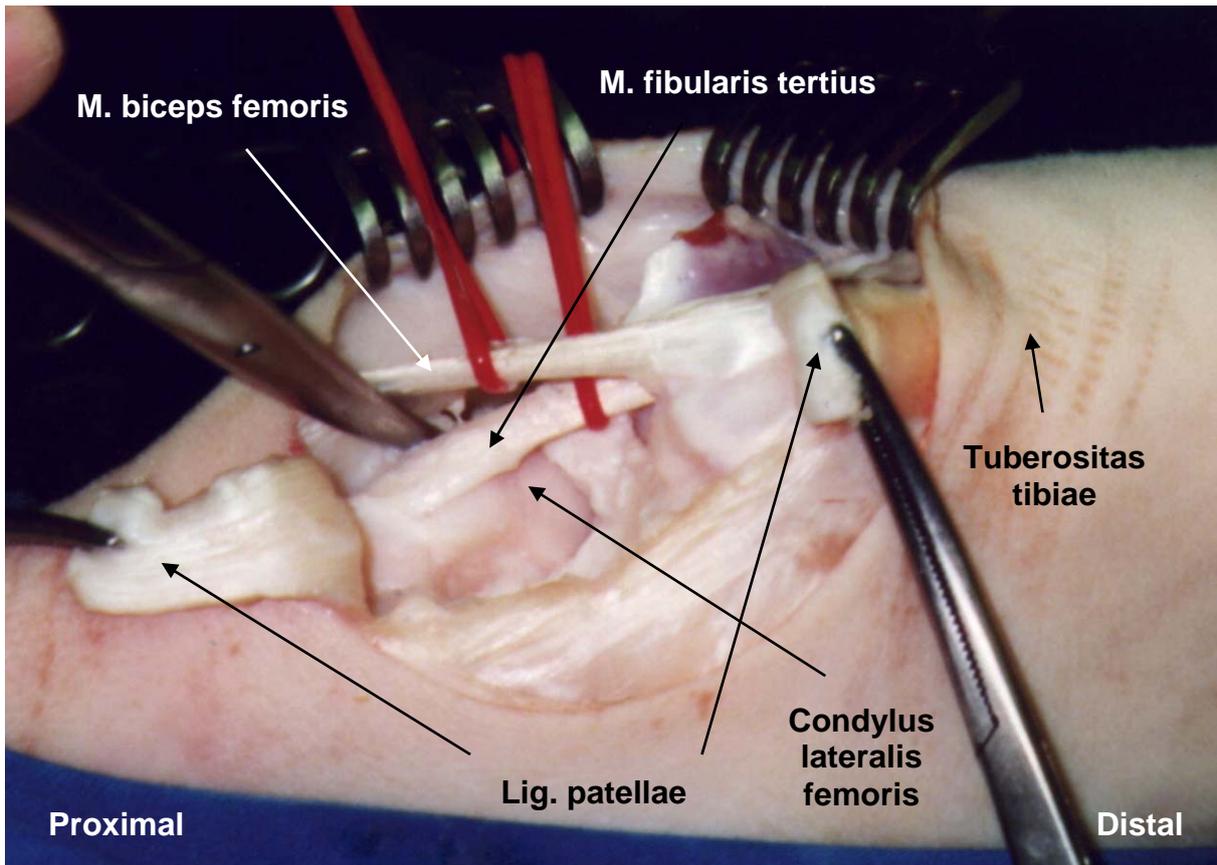


Abb. 2-4 Ansicht des linken Kniegelenks von medial nach Tenotomie der Patellarsehne.

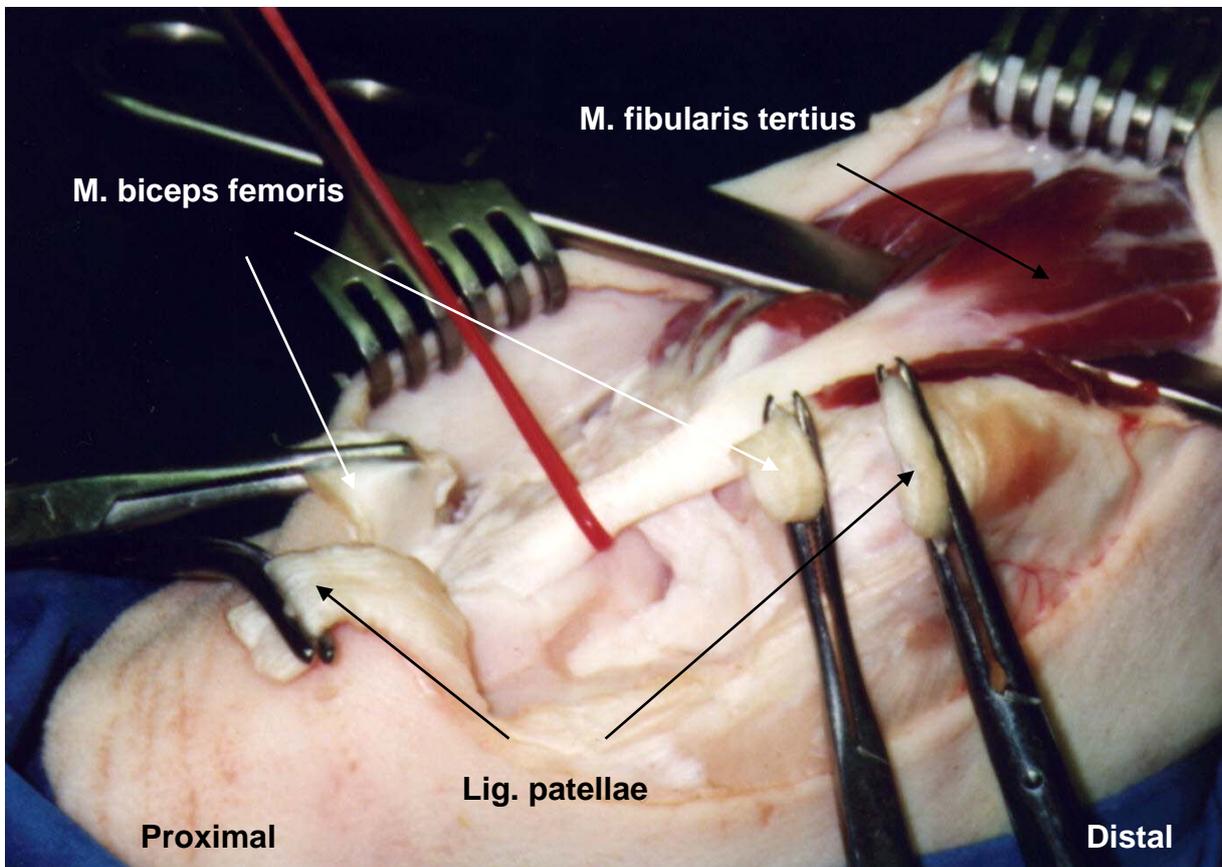


Abb. 2-5 Ansicht von ventro-medial nach Tenotomie von Patellarsehne und Bizepssehne.

2.2. Implantate und Gruppeneinteilung

2.2.1. Testsubstanz

Als Testsubstanz wurde rekombinant hergestelltes humanes Osteogenic Protein-1 in Form des von der Firma STRYKER BIOTECH (Natick, U.S.A.) angebotenen OP-1-Device verwendet. Das verwendete OP-1 wurde gentechnologisch durch Ovarialzellen von chinesischen Hamstern mit einem Reinheitsgrad von über 95% produziert und anschließend in einem Massenverhältnis von 1:400 an bovines Typ-1-Kollagen konjugiert. Eine Einheit OP-1-Device enthielt somit 2,5 mg OP-1 und 1 g Kollagen. Die Zubereitung lag als feines weißes Pulver vor, das in zweifach eingeschweißten sterilen Gläsern anwendungsgerecht abgepackt war. Ausgehend von einer erfolgsversprechenden Studie an Primaten, in welcher u.a. auch verschiedene Dosierungen von OP-1 getestet worden waren, wurde die als am günstigsten beschriebene Dosierung (500 µg OP-1/ 1,5 ml Defektvolumen) auf das mittlere effektive Defektvolumen (Defektvolumen minus Volumen des innerhalb des Defektes befindlichen Marknagels) der vorliegenden Untersuchung (15 ml) hochgerechnet, so daß pro Versuchstier der Testgruppen zwei Einheiten OP-1-Device entsprechend 5,0 mg OP-1 als Wirksubstanz verwendet wurden⁸.

2.2.2. Trägersubstanz

Da der Inhalt von zwei Einheiten OP-1-Device auch in rehydriertem Zustand nur ein Volumen von maximal 5 ml aufweist, war eine Trägersubstanz erforderlich, um das effektive Defektvolumen von 15 ml vollständig auszufüllen und die Wirksubstanz dabei möglichst gleichmäßig zu verteilen. Im Hinblick auf eine möglichst realistische Einschätzung der Effektivität der Testsubstanz sollte dabei von der Trägersubstanz keine zusätzliche osteoinduktive Eigenaktivität zu erwarten sein. Des Weiteren ist von der Trägersubstanz auch ein neutrales Verhalten hinsichtlich immunologischer oder inflammatorischer Prozesse zu fordern. Als geeignet erschien daher die Verwendung von allogener inaktivierter demineralisierter Knochenmatrix (IDKM), welche vorwiegend aus Typ-1-Kollagen besteht.

Für die Herstellung von inaktivierter demineralisierter Knochenmatrix standen bereits aus vorausgehenden Untersuchungen allogene Merinoschafsknochen zur Verfügung. Diese wurden nach der Entnahme entsprechend den Empfehlungen nach SATO und URIST¹¹⁷ folgendermaßen behandelt:

Zunächst wurden die langen Röhrenknochen an den Diaphysen-Metaphysen-Grenzen durchtrennt, da nur diaphysärer kortikaler Knochen verwendet werden sollte. Dieser wurde sodann von sämtlichem Weichteilgewebe gereinigt und in kleine Teile zersägt. Der so gesäuberte und zerkleinerte kortikale Knochen wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Bei Bedarf wurde der Knochen aus der Tiefkühlung entnommen und noch im tiefgefrorenen Zustand mit einer Schneidemühle (Typ SM-1, Firma Retsch GmbH) auf eine Partikelgröße von 750 µm gemahlen, da bereits angetauter Knochen durch seine Lipide beim Mahlvorgang zur Verseifung tendiert, wodurch das Sieb verstopft und somit die Knochenausbeute erheblich reduziert werden kann. Die weiteren Behandlungsschritte dienten der gezielten Extraktion schwer resorbierbarer Mineralsalze, der Inaktivierung immunologisch oder osteogenetisch aktiver organischer Bestandteile sowie der Sterilisation und Gefriertrocknung (Tab. 2-1).

| Vorgang | Lösung | Konzentration | Zeitraum | Temperatur |
|---------------------|--------------------|---------------|----------|------------|
| 1. Entfettung | Chloroform-Ethanol | 1:1 | 4 h | 20°C |
| 2. Dekalzifizierung | HCl | 0,6 N | 24 h | 4°C |
| 3. Entfettung | Chloroform-Ethanol | 1:1 | 4 h | 20°C |
| 4. Dephosphatierung | CaCl | 2,0 M | 24 h | 4°C |
| 5. Ionenbindung | EDTA (pH 7,4) | 0,5 M | 4 h | 4°C |
| 6. Zytolyse | LiCl | 8,0 M | 24 h | 4°C |
| 7. Waschen | Aqua destillata | - | - | 20°C |
| 8. Lyophilisation | - | - | 24 h | - |
| 9. Sterilisation | - | - | 24 h | 105°C |
| 10. Lyophilisation | - | - | 24 h | - |

Tabelle 2-1 Herstellung inaktivierter demineralisierter Knochenmatrix

Am Ende dieses Prozesses lag die inaktivierte demineralisierte Knochenmatrix als grobes weißes Pulver vor, welches für die Operationen in Portionen zu je 10 g steril

abgepackt und bis zur Verwendung bei -20°C zwischengelagert wurde. Voruntersuchungen hatten bereits ergeben, daß eine Menge von 10 g der auf diese Weise hergestellten Matrix im rehydrierten Zustand ein Volumen von etwa 20 –25 ml einnimmt.

2.2.3. Autogene Spongiosa

Als Standardvergleich diene die Defektauffüllung mit autogener Spongiosa. Da bei der geplanten Defektgröße davon auszugehen war, daß eine einseitige Entnahme am ipsilateralen Beckenkamm möglicherweise kein suffizientes Volumen an implantierbarer Spongiosa ergeben könnte, wurden als weitere mögliche Entnahmestellen auch der kontralaterale Beckenkamm sowie Femurkondylen und Tibiaplateau der operierten Extremität in Betracht gezogen.

2.2.4. Gruppeneinteilung

Eine Kontrollgruppe diene dem Ausschluß bzw. der Einschätzung einer eventuellen Eigenaktivität der Trägersubstanz. Insgesamt ergaben sich somit aus der Testgruppe, der Standardvergleichsgruppe und der Kontrollgruppe drei Versuchsgruppen mit einer der Minimalstprobenanzahl entsprechenden Gruppengröße zu je vier Versuchstieren (Tab. 2-2).

| Versuchsgruppe | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------|----------------|----------|----------|----------|
| Implantat | OP-1 + IDKM | AS | IDKM | Reserve |
| Versuchstierzahl | 4 | 4 | 4 | 3 |

Tabelle 2-2 Versuchsgruppeneinteilung.

OP-1 = 2 Einheiten OP-1-Device entsprechend 5 mg Osteogenic Protein-1

IDKM = Inaktivierte demineralisierte Knochenmatrix

AS = Autogene Spongiosa

Hinsichtlich eventueller Versuchstierausfälle stand eine Reservegruppe von drei Versuchstieren zur Verfügung.

2. 3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Versuchstierhaltung

Die Versuchstierhaltung sowie sämtliche notwendigen medizinischen Interventionen erfolgten unter Berücksichtigung der Richtlinien des Tierschutzgesetzes in aktueller Fassung (TierSchG 25.05.1998) unter fortlaufender Supervision durch einen lizenzierten Veterinärmediziner. Die Empfehlungen der GV-SOLAS wurden berücksichtigt. Die Genehmigung der Versuchsdurchführung wurde unter dem AZ 211-2531 von der zuständigen Landesbehörde erteilt.

Als Versuchstiere verwendeten wir 3-5 Jahre alte und damit ausgewachsene weibliche Merinoschafe mit einem mittleren Körpergewicht (KG) von $63,5 \pm 6,1$ kg. Die Auswahl der Versuchstiere erfolgte nach folgenden Eingangs- und Ausschlußkriterien:

Eingangskriterien:

- Alter 3-5 Jahre
- Gewicht 55-75 kg
- Größenverhältnisse mit möglichst geringer Streubreite

Ausschlußkriterien:

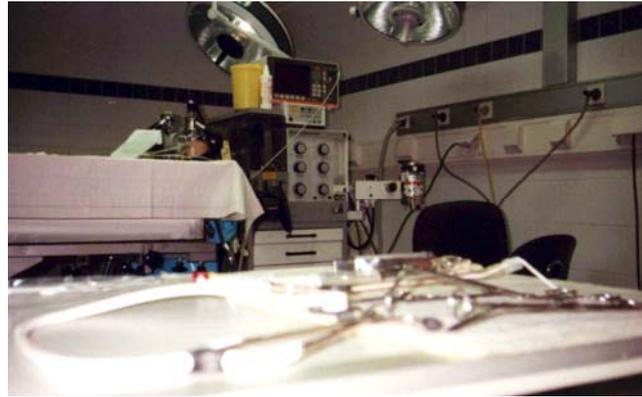
- Knochenpathologien jeglicher Art
- Präoperative Krankheitsanzeichen
- Schlechter Allgemein- oder Ernährungszustand
- Gravidität
- Sonstige Kontraindikationen für einen operativen Eingriff

Da Schafe als Herdentiere auf Gemeinschaft angewiesen sind, wurden die Versuchstiere grundsätzlich vorwiegend in vertrauter Umgebung bei ihrer angestammten Herde auf einem amtlich überwachten landwirtschaftlichen Betrieb gehalten. Bei der zeitweiligen Unterbringung im Tierlabor der Chirurgischen Klinik und den entsprechenden Transporten wurde stets auf die Anwesenheit von Begleitschafen geachtet. Die postoperativ für einige Tage notwendige Unterbringung in Einzelboxen mit einer Grundfläche von 1,5 m x 2,0 m wurde von den jeweiligen Tieren problemlos toleriert, da ein jederzeitiger Sicht- und Schnauzenkontakt zu den anderen Tieren möglich war. Diese passagere Einzelhaltung diente dem Schutz der operierten Tiere, da diese aufgrund der in der Konsolidierungsphase vorhandenen Gang- und Standbehinderung von den anderen Tieren versehentlich überrannt und dabei verletzt werden hätten können. Ferner sollten die invalidisierten Tiere in dieser Phase keinem Nachteil bei der Nahrungskonkurrenz gegenüber den anderen Tieren ausgesetzt sein.

Zur Reduktion des Risikos einer Aspiration mit möglicher Folgepneumonie bis hin zum Lungenversagen erfolgte ein präoperativer Nahrungsentzug von 24 Stunden Dauer. Dieser gestaltete sich durch die besondere Situation bei Wiederkäuern und durch die bis 6 Stunden präoperativ gewährte Wasserzufuhr ad libitum als unproblematisch. Vor sämtlichen streßauslösenden Maßnahmen wurden die Versuchstiere in adäquater Form sediert, um die Belastungen auf ein Minimum zu reduzieren.

2.3.2. Operationsvorbereitung

Zu Beginn der Operationsvorbereitungen erfolgte die Prämedikation mit Atropin 0,015 mg/kg KG i.m. und Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2%) 0,3 mg/kg KG i.m. Nach ausreichender Sedierung wurde das Versuchstier an der linken Halsseite und am linken Hinterlauf sowie an beiden Beckenkämmen geschoren, und zwar zunächst mit einem konventionellen Schafschergerät und anschließend noch mit einem sehr feinschneidenden Kleintierschergerät (Abb.2-6). Nach Reinigung des Tieres erfolgte der Transport in den Operationssaal und die Lagerung in Rechtsseitenlage (Abb. 2-7).

**Abb. 2-6** Scheren des Schafes**Abb. 2-7** Lagerung und Narkoseführung

Nun wurde ein zentralvenöser Katheter in die linke Vena jugularis externa gelegt, über welchen eine Kurzinfusion von Cefuroxim 1,5 g als perioperative Antibiotikaprophylaxe sowie kristalline Infusionslösungen für die Dauer der Operation zugeführt wurden. Als Narkoseeinleitung erfolgte die Gabe von Narcoren[®] 5 ml 1:1 entsprechend Pentobarbital 12,5 mg /kg KG. Nach Ausbleiben der Schutzreflexe auf entsprechende Reize wurde das Versuchstier mit einem Tubus der Größe 8-0 laryngoskopisch orotracheal intubiert und zur Entlastung der Magenblase mit einem Magenschlauch versorgt (Abb. 2-7). Anschließend wurde das Operationsgebiet gewaschen, desinfiziert und steril abgedeckt. Die Kreislauffunktion wurde über einen EKG-Monitor und durch indirekte Blutdruckmessung nach Riva-Rocci überwacht. In allgemeiner Kombinationsnarkose mit Halo-than bzw. Enfluran 0,8 % Vol., Lachgas 3 l/min und Sauerstoff 6 l/min bei einer Atemfrequenz von 14 /min und Hubvolumina von 500-800 ml wurde mit der Operation begonnen. Sowohl Narkoseführung als auch Operationsverlauf wurden protokolliert (siehe Protokolle unter 7.2 und 7.3).

2.3.3. Operatives Vorgehen

Der Hautschnitt erfolgte zunächst bogenförmig vom Bereich der Patellarsehnenmitte bis über die proximale mediale Tibiametaphyse. Nach teils stumpfer und teils scharfer Präparation von subkutanem Gewebe und Faszie erfolgte die Darstellung des Ligamentum patellae und der Sehne des M. fibularis tertius sowie die Freilegung des ventralen Tibiaplateaus und der Tuberositas tibiae mit distalem Ansatzbereich des Ligamentum patellae. Nach eindeutiger Identifizierung des Ligamentum patellae wurde dieses unter Schonung des Reservestreckapparates durchtrennt.

Unter Verwendung eines Pfriems wurde eine Öffnung im Bereich des ventralen Tibiaplateaus geschaffen, um sodann mit einem 7 mm Handbohrer den Tibiamarkraum zu eröffnen, welcher nun nach Einbringen des Führungsdrahtes mit einem maschinengetriebenen Markraumborner in 0,5 mm-Schritten stufenweise bis auf 11 mm aufgebohrt wurde. Dann erfolgte die Längenausmessung des Markraumes zur Bestimmung der Marknagelgröße.

Anschließend wurde der Hautschnitt entlang der medialen Tibiakante bis auf Höhe des Malleolus medialis erweitert. Nach Durchtrennung der Faszien erfolgte die Darstellung des Knochens in seiner gesamten Länge. Als Anhaltspunkt für die spätere Rotationskontrolle wurde mit dem Skalpell eine gerade Strecke entlang des medialen Tibiaschaftes markiert. Senkrecht zu dieser Strecke erfolgte eine entsprechende Markierung jeweils 2,5 cm proximal und distal der Tibiamitte für die nachfolgenden Osteotomien. Zu beider Seiten etwas über den markierten 5,0 cm langen Defektbereich hinausgehend wurden nun unter Schonung des Periostes sämtliche Muskeln vom Knochen abgelöst und die lateroventral verlaufende Arteria tibialis dargestellt.

Mittels der oszillierenden Säge erfolgten dann unter Weichteilgewebeschutz und spannungsfreier Fixierung des Hinterlaufs zunächst die distale und anschließend die proximale Osteotomie. Beim Setzen des segmentalen Knochendefektes wurde größter Wert darauf gelegt, daß keine Periostanteile im Bereich des Defektraumes oder an den Defektkanten sistierten (Abb. 2-8).

Im folgenden Operationsabschnitt wurde der zuvor bestimmte Marknagel mit aufgeschraubter Bohrlehre spannungsfrei in den Markraum eingebracht. Es wurden speziell angefertigte Marknägel mit massivem Innenraum (Institut Straumann, Waldenburg, Schweiz) verwendet. Mit je drei 4,5 mm Kortikalisschrauben erfolgte sodann unter Rotationskontrolle zunächst die proximale und dann die distale Verriegelung des Marknagels. Dabei wurde das zuvor herausgesägte 5,0 cm lange Knochenstück als Platzhalter verwendet, so daß die Tibia exakt in ihrer ursprünglichen Länge fixiert wurde. Bei der Verriegelung des Marknagels wurde darauf geachtet, daß alle Schrauben exakt lotrecht zum Marknagel und genau in die Mitte der Schraubenlöcher eingebracht wurden. Noch in situ wurde die beabsichtigte Rotationsinstabilität kontrolliert.



Abb. 2-8 Situs nach Durchführung der Osteotomien. Ausschnitt: Knochenresektat mit Periostschlauch.

Dann wurde vom proximalen und distalen Wundrand ausgehend auf den Defektbereich zu mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 3-0) die Fasziennaht in fortlaufender Technik durchgeführt. Im Defektbereich selbst wurde eine Faszien- bzw. Muskeltasche angelegt, wobei im Bereich der Defektkanten eine möglichst

dichte Verbindung zwischen Knochen und Weichteilen angestrebt wurde. Diese Faszientasche wurde nun von proximal und distal her soweit geschlossen, daß sie in der Mitte nur noch für eine vorne abgeschnittene 5-ml-Spritze zugänglich war. Dieser Zugangsweg konnte durch Fadenzug tabaksbeutelartig gegenüber dem eingeführten Implantat-Applikator abgedichtet werden, so dass nun alle Vorbereitungen für die Applikation auch nichtfester Implantate getroffen waren (Abb. 2-9).

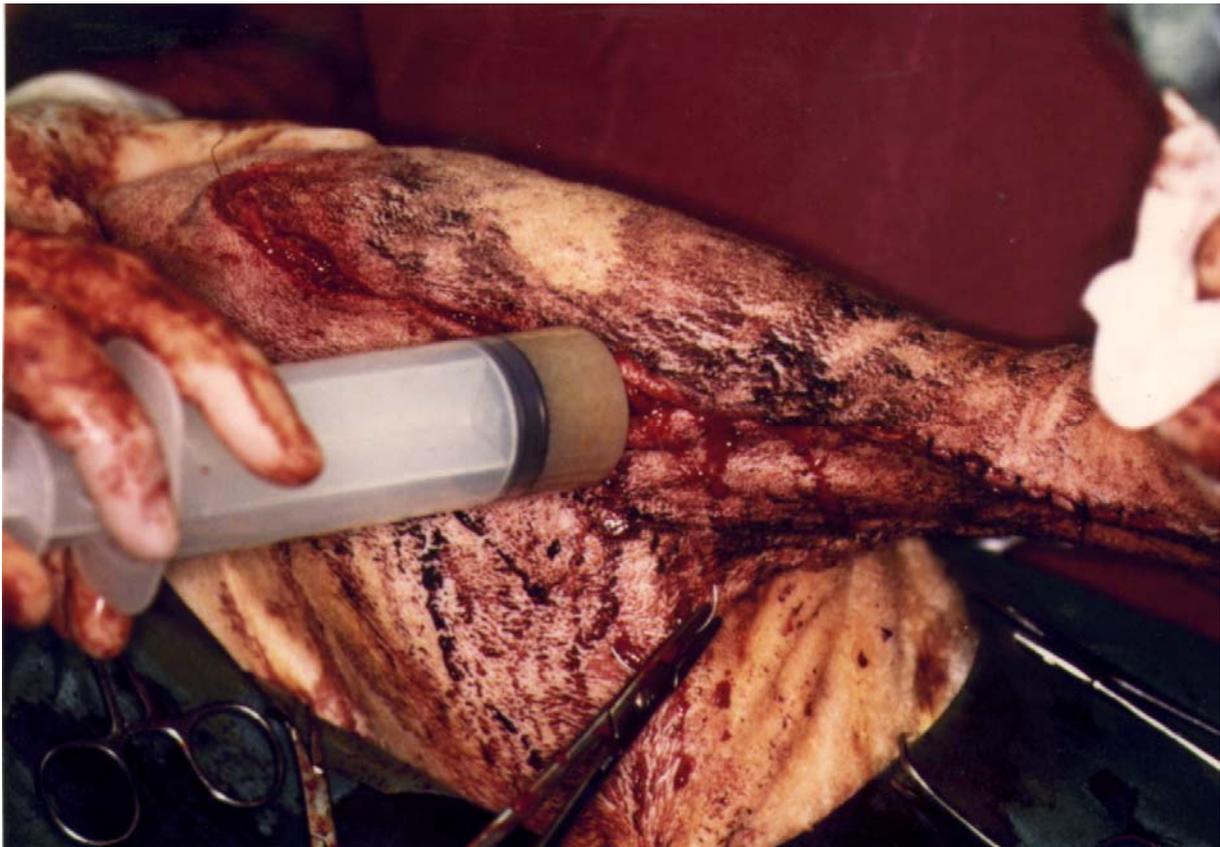


Abb. 2-9 Implantat-Applikation nach Anlage der Faszientasche.

Der nun folgende Operationsabschnitt der Implantat-Applikation sowie die parallel zu den bisherigen Operationsschritten durchgeführte Gewinnung bzw. Zubereitung von autogener Spongiosa erfolgten gemäß der Versuchsplanung gruppenspezifisch:

Gruppe 1:

In Versuchsgruppe 1 wurden bereits zu Beginn der Operation jeweils zwei Einheiten OP-1-Device und 10 g IDKM getrennt von einander mit einer ausreichenden Menge an NaCl versetzt, bis die lyophilisierten Substanzen vollständig rehydriert waren.

Nach Verwerfen der Überstände wurde zum OP-1-Device eine entsprechende Menge an IDKM zugegeben, bis die Mischung ein Gesamtvolumen von 15 ml erreichte. Nach ausgiebiger Durchmischung wurde das gelartige Implantat mit dem oben beschriebenen Applikator in 5-ml-Portionen in den Defektraum eingebracht und gleichmäßig verteilt.

Gruppe 2:

In Versuchsgruppe 2 erfolgte parallel zum Osteosyntheseverfahren die Entnahme autogener Spongiosa. Nach Inzision am linken Beckenkamm wurde dieser mit einem Stemmeisen eröffnet, so dass mit dem scharfen Löffel eine dem Defektvolumen entsprechende Menge an autogener Spongiosa gewonnen werden konnte. In denjenigen Fällen, in denen dieser eine Zugang nicht ergiebig genug war, wurde auch der rechte Beckenkamm und gegebenenfalls auch noch die laterale Femurkondyle (Tier-Nr. 8) bzw. das Tibiaplateau (Tier-Nr. 9 und 10) der operierten Extremität zur Spongiosagewinnung herangezogen. Die Implantation der Spongiosa erfolgte ebenfalls mit dem oben beschriebenen Applikator, um auch in dieser Gruppe das Implantatvolumen registrieren und dokumentieren zu können.

Gruppe 3:

In der Kontrollgruppe erfolgte die Rehydrierung der IDKM analog zu Gruppe 1 mit NaCl. Das Volumen des Implantates betrug 15 ml.

Nach Applikation des jeweiligen Implantates wurde die Faszientasche mit Hilfe des bereits vorgelegten Fadens dicht geschlossen. Abschließend erfolgte die Hautnaht in Einzelknotentechnik mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene 3-0) sowie die Versorgung der Wunde mit Wundspray (Nobecutan[®]) und sterilem Verband.

2.3.4. Postoperative Nachsorge

Unmittelbar nach Operationsende erhielt das Versuchstier 5 ml Novalgin[®] entsprechend Metamizol 40 mg/kg KG i.m. als Schmerzmedikation. Nach Extubation wurden noch im Operationssaal postoperative Röntgenkontrollaufnahmen in zwei

Ebenen angefertigt (Abb. 2-10). Hierfür wurde ein stationäres Röntgengerät (EF-300, Blach-Röntgen Apparatebau) verwendet, wobei die in Vorversuchen ermittelten optimalen Einstellungen (Belichtungszeit 0,04 s bei 8,0 mAs und 60 bzw. 75 kV, Objektabstand 100 cm) bei allen Versuchstieren einheitlich vorgenommen wurden. Anschließend wurde das Versuchstier in die Einzelbox transportiert und zur Tympanieprophylaxe in aufrechter Körperposition gelagert. Aus demselben Grunde erfolgte eine Provokation von Kaubewegungen, Wasser und Heu wurden angeboten.

Zur genauen Verlaufskontrolle und optimalen medizinischen Versorgung verblieben die Versuchstiere während der Wundheilungsphase in der Tierhaltung der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München. Bis einschließlich zum zehnten postoperativen Tag wurden regelmäßig zweimal täglich 40 mg/kg KG Metamizol per os mittels Applikator als Analgetikum verabreicht. Dabei erfolgten auch routinemäßig körperliche Kontrolluntersuchungen sowie gegebenenfalls Mobilisierungsmaßnahmen sowie sonstige indizierte medizinische Interventionen.

Nach Abschluß der Wundheilung wurden die Tiere in ihren heimischen Stall zurücktransportiert und ihrer dort gehaltenen angestammten Herde wieder angegliedert.

2.3.5. Postoperative Verlaufskontrollen

Bis zum Versuchsende nach 12 Wochen erfolgten nun im Abstand von 14 Tagen die postoperativen Verlaufskontrollen im landwirtschaftlichen Stall. Dabei wurden die Versuchstiere zunächst nach ihrem Verhalten sowie nach ihrem Allgemein- und Ernährungszustand beurteilt. Dann erfolgten unter Sedierung mit Xylazinhydrochlorid 0,3 mg/kg KG (Rompun[®] 2%) i.m. die Röntgenkontrollaufnahmen der operierten Extremität in zwei Ebenen (Abb. 2-11). Diese wurden mit Hilfe eines mobilen Röntgengerätes (Complex 2075, Blach-Röntgen Apparatebau) standardisiert ausgeführt (Belichtungszeit 0,05 s bei 6,0 mAs und 60 kV, Objektabstand 100 cm). Anschließend erfolgten eine orientierende allgemeine körperliche Untersuchung sowie eine genaue Beurteilung der operierten Extremität. Hierbei wurde insbesondere der Defektbereich nach neugebildeten Strukturen ausgetastet sowie die Rotationsinstabilität der Osteosynthese ausgemessen.



Abb. 2-10 Postoperative Röntgenkontrolle im OP.

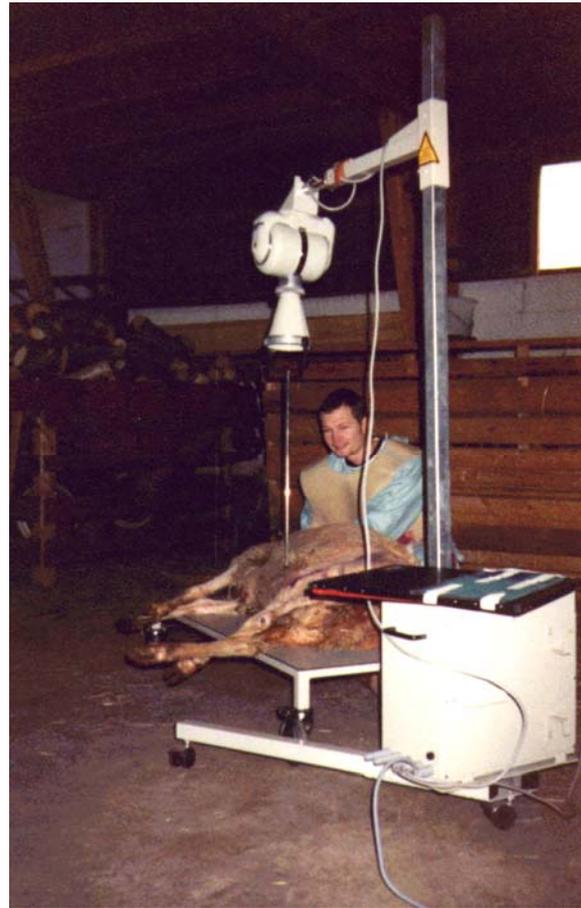


Abb. 2-11 Mobiles Röntgengerät im Stall.

Abschließend wurden je nach Bedarf noch medizinische bzw. physiotherapeutische Maßnahmen wie z.B. Verbandswechsel oder Mobilisationen durchgeführt.

2.3.6. Polychrome sequentielle Fluoreszenzmarkierung

Für die geplante fluoreszenzoptische Auswertung wurden vier und acht Wochen postoperativ sowie unabhängig davon 24 Stunden vor Versuchsende jeweils unmittelbar nach Anfertigung der entsprechenden Röntgenkontrollaufnahmen verschiedene Fluorochrome zur intravitalem Sequenzfluoreszenzmarkierung des Knochens appliziert. Dabei wurden Fluorochrome verwendet, die sich bei der Auswertung erfahrungsgemäß jeweils gegeneinander möglichst gut optisch abgrenzen lassen. Entsprechend den Empfehlungen des Labors für experimentelle Chirurgie in Davos wurde nach vier Wochen Xylenolorange, nach acht Wochen Calceingrün und nach zwölf Wochen ein Tetracyclin verabreicht (Tab. 2-3).

| Fluorochrom | Dosierung | Applikationszeitpunkt |
|---------------|------------------|-------------------------|
| Xylenolorange | 90 mg/kg KG s.c. | 4. postoperative Woche |
| Calceingrün | 5 mg/kg KG s.c. | 8. postoperative Woche |
| Tetracyclin | 3 mg/kg KG i.m. | 12. postoperative Woche |

Tabelle 2-3 Polychrome Fluoreszenzmarkierung. Reihenfolge und Dosierung.

Als Tetracyclin wurden jeweils zwei 5 ml-Ampullen Vibravenös[®] entsprechend einer Gesamtmenge von 200 mg Doxycyclin i.m. verabreicht. Die beiden anderen Fluorochrome wurden subkutan injiziert und mußten am Tage der Verwendung aus der Trockensubstanz unter sterilen Kautelen hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 titriert werden (Tab. 2-4). Nach Sterilfiltration wurden jeweils 50 ml Lösung verabreicht.

| Substanz | Bezugsquelle | Lösung | Spezielle Eigenschaften | Emission im Knochen |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|---------------------|
| Xylenolorange-Natriumsalz (XO) | SYNOPHARM GmbH (22882 Barsbüttel) | 5,4 g in 48 ml Aqua dest. | zuverlässig bester Kontrast zu CG | 615 nm |
| Calceingrün-Natriumsalz (CG) | SYNOPHARM GmbH (22882 Barsbüttel) | 0,3 g in 48 ml Aqua dest. | zuverlässig bester Kontrast zu XO | 540 nm |

Tabelle 2-4 Intravitale Fluorochrome. Herstellung und Eigenschaften.

2.3.7. Materialentnahme, -lagerung und -aufbereitung

Am Ende der Versuchsdauer von 12 Wochen wurden die Versuchstiere erneut in die Tierhaltung der Chirurgischen Klinik transportiert. Dort wurde dann unter Sedierung mit Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) 0,3 mg/kg KG i.m. über eine periphere Vene T 61® zur Euthanasie der Tiere verabreicht.

Nach Eintritt des Todes wurden beide Tibiae zur Auswertung entnommen und mit Ausnahme des Defektbereiches vollständig von Weichgewebe isoliert. Die abschließenden Röntgenkontrollen in zwei Ebenen erfolgten nun bei adaptierten Einstellungen (Tab. 2-5) mit und ohne Osteosynthesematerial und auch im Seitenvergleich zur kontralateralen Tibia. Bis zur weiteren Auswertung wurden die entnommenen Knochen schließlich bei -70°C tiefgefroren und zwischengelagert.

| Untersuchung | Spannung (kV) | Stromstärke (mAs) | Belichtung (s) |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|----------------|
| Stationär postoperativ | 75 (p.a.) 60 (l.m.) | 8 | 0,05 |
| Mobil postoperativ | 60 | 6 | 0,05 |
| Stationär post explantationem | 60 | 5 | 0,05 |

Tabelle 2-5 Einstellungen zur Durchführung der Röntgenkontrollen.

2.3.8. Zeitschema des Versuchsablaufs

Tabelle 2-6 veranschaulicht noch einmal das genaue Zeitschema des gesamten Versuchsablaufs im Überblick.

| Zeitpunkt | Maßnahmen |
|---------------------------|---|
| 3 Tage präoperativ | Aufnahmeuntersuchung Aufnahme in der Tierhaltung der Chirurgischen Klinik |
| 1 Tag präoperativ | Beginn der Nahrungskarenz |
| Operationstag | Versuchsoperation in Allgemeinnarkose 1. postoperative Röntgenkontrolluntersuchung |
| 0.-14. postoperativer Tag | Mehrfach tägliche Kontrolluntersuchungen, Verbandswechsel, Schmerzmedikation nach Schema bis einschließlich 10. postoperativer Tag, danach bei Bedarf |
| 14. postoperativer Tag | 2. Röntgenkontrolluntersuchung und anschließender Transport in den landwirtschaftlichen Stall |
| 4 Wochen postoperativ | 3. Röntgenkontrolluntersuchung und Injektion des Fluorochroms Xylenolorange |
| 6 Wochen postoperativ | 4. Röntgenkontrolluntersuchung |
| 8 Wochen postoperativ | 5. Röntgenkontrolluntersuchung und Injektion des Fluorochroms Calceingrün |
| 10 Wochen postoperativ | 6. Röntgenkontrolluntersuchung |
| 12 Wochen postoperativ | Wiederaufnahme in die Tierhaltung der Chirurg. Klinik Injektion des Fluorochroms Doxycyclin ein Tag vor Versuchsende |
| Versuchsende | Euthanasie und Materialentnahme 7. Röntgenkontrolluntersuchung |

Tabelle 2-6 Zeitschema des Versuchsablaufs.

2. 4. Auswertung

2.4.1. Klinischer Verlauf

Alle Versuchstiere wurden regelmäßig klinisch untersucht und die Ergebnisse wurden protokolliert (siehe Protokollschema unter 7.4). Neben dem Allgemein- und Ernährungszustand wurden auch das Mobilisierungsverhalten sowie der Zustand der operierten Extremität beurteilt.

2.4.2. Manuelle Testung post Explantationem

Nach Explantation und Entfernung des Osteosynthesematerials wurden die operierten Tibiae manuell auf ihre Biegefestigkeit geprüft. Nur die Knochen mit ausreichender Stabilität wurden der biomechanischen Auswertung zugeführt.

2.4.3. Röntgenverlaufskontrollen

Die Auswertung der Röntgenverlaufskontrollen erfolgte durch Bewertung anhand eines Score-Systems (Abb. 2-12 und 2-13 und Tab. 2-7).

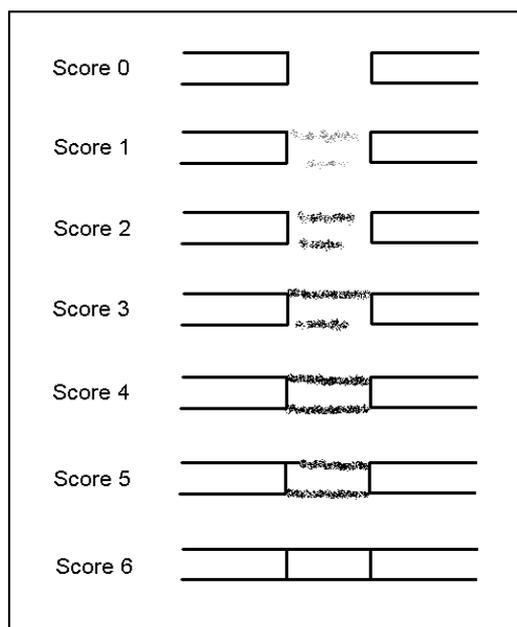


Abb. 2-12 Score-System modifiziert nach COOK.



Abb. 2-13 Gruppe 2 (AS). Score-Wert 5.

Dazu wurde das von COOK bei vergleichbaren tierexperimentellen Studien mit Segmentdefektmodellen angewandte und bereits veröffentlichte Score-System in modifizierter Form benutzt⁶⁻⁸. Die Untersucher waren dabei in Bezug auf Zeitpunkt der Untersuchung, Tiernummer und Gruppenzugehörigkeit verblindet.

Da sich nach Transplantation von autogener Spongiosa zwangsläufig radiodenses Material im Defektbereich befindet, wurden die Röntgenverlaufskontrollen jeweils im Vergleich zur unmittelbar postoperativen Aufnahme bewertet. Die Vergabe der Score-Werte erfolgte nach den in Abb. 2-12 und Tab. 2-7 dargestellten Kriterien. Der Defekt galt ab Score-Wert 4 als durchbaut und damit als ausgeheilt.

| Score-Wert | Kriterien |
|------------|--|
| 0 | Keine Veränderung zur unmittelbar postoperativen Aufnahme innerhalb des Defektbereichs. |
| 1 | Gerade erkennbare Darstellung von neugebildetem radiodensem Material innerhalb des Defektbereichs. |
| 2 | Fleckige radiodense Verdichtungen innerhalb des Defektbereichs ohne Defektüberbrückung. |
| 3 | Defektüberbrückung an einer Stelle mit Material von inhomogener Radiodensität. |
| 4 | Defektüberbrückung an zwei mehr als 90° voneinander entfernten Stellen mit Material von homogener Radiodensität. Alle Defektkanten noch deutlich erkennbar. |
| 5 | Defektüberbrückung an zwei mehr als 90° voneinander entfernten Stellen mit Material von homogener Radiodensität. Verschwinden einer Defektkante durch neugebildeten Knochen. |
| 6 | Defekt vollständig und gleichmäßig durchbaut. Defektkanten nicht mehr erkennbar. |

Tabelle 2-7 Score-System modifiziert nach COOK. Kriterien für die Vergabe der Score-Werte.

2.4.4. 3D-CT-Volumetrie

Mit einem Somatom 4 Plus CT Scanner (Fa. Siemens, Erlangen, Deutschland) wurden von jeder operierten Tibia in tiefgekühltem Zustand axiale Spiral-CT Scans hergestellt. Die Untersuchungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen (77 kV, 5 mA, Rotationszeit 0,75 s für jede Spirale). Die Schichtdicke betrug 5 mm bei einem Tischvorschub von 7,5 mm. Die axiale Länge des untersuchten Bereichs betrug insgesamt 70 mm (50 mm Defektbereich plus je 10 mm proximale und distale Defektkante). Mit Hilfe einer Software Workstation Typ Prominence (Fa. Siemens, Erlangen, Deutschland) zur 3D-Nachbearbeitung wurden 3D-Rekonstruktionen aus den Rohdaten errechnet (Abb. 2-14).



Abb. 2-14 3D-Rekonstruktion der Tibia von Tier Nr. 8 aus Gruppe 2 (AS)

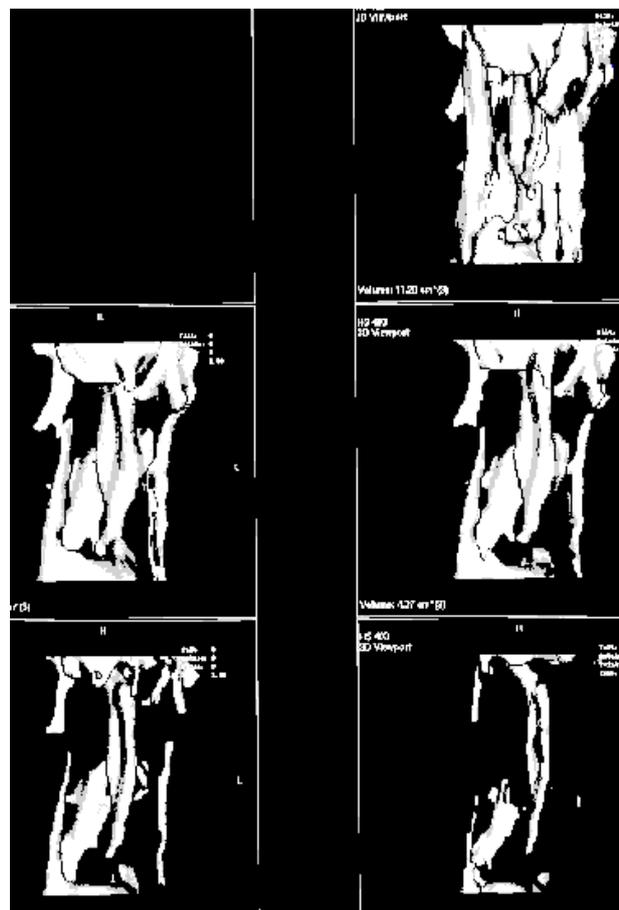


Abb. 2-15 3D-CT-Volumetrie. Darstellung des Defektbereiches bei zunehmenden Dichtewerten (HU = Hounsfield-Units). Oben rechts >100 HU. Mitte links > 300 HU. Mitte rechts > 600 HU. Unten links > 900

Die quantitative Analyse erfolgte als Volumenbestimmung in Abhängigkeit von der Gewebedichte. Dabei wurde Gewebe mit einer Dichte von mehr als 100 Hounsfield-Units (HU) als Knochen gewertet. Ferner erfolgte noch eine Aufschlüsselung des so vermessenen Knochens in Fraktionen unterschiedlichen Reifegrades entsprechend Dichtewerten von mehr als 300, 600, 900 und 1200 HU (Abb. 2-15).

2.4.5. Biomechanik

Die biomechanische Auswertung wurde als 4-Punkt-Biegeversuch unter Verwendung einer speziellen Materialprüfmaschine (Fa. ZWICK, Deutschland) durchgeführt. Der Versuchsaufbau erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Kraftsensor 10 kN, Traversenwegaufnehmer 13592, lage geregelter Vorschub). Die zu untersuchende Tibia wurde mit der Ventralseite nach oben am proximalen und distalen Ende auf breiten konkaven Auflagern gelagert (Abb. 2-16).

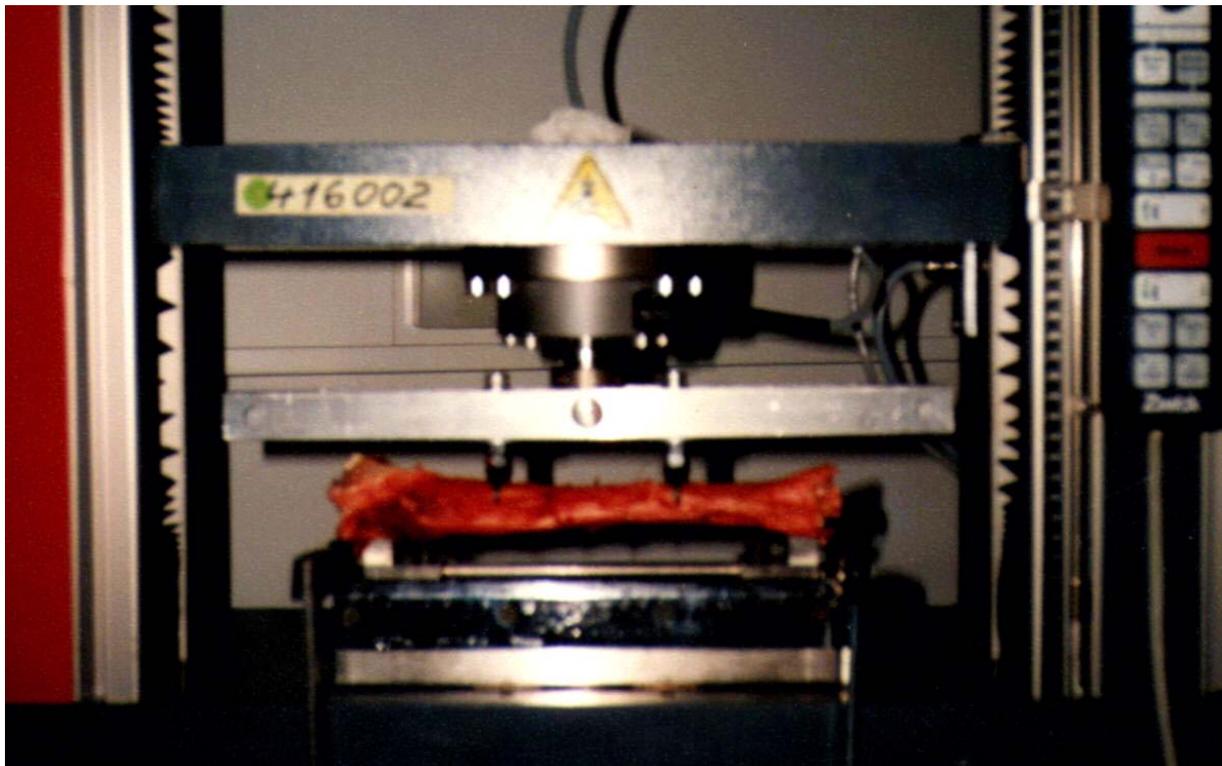


Abb. 2-16 Biomechanische Auswertung im 4-Punkt-Biegeversuch. Versuchsaufbau.

Die Biegedruckübertragung erfolgte an der Ventralseite je 2 cm proximal und distal des Defektbereiches simultan über zwei Flügelschrauben. Gemessen wurde die Auslenkung in Defektmittle in Abhängigkeit von der Druckkraft bis zum Bruch bzw. zur plastischen Deformation (Abb. 2-17). Auswertung und graphische Darstellung erfolgten unter Verwendung einer Analyse-Software (test expert V. 3-0). Untersucht wurden alle nach Explantation und Entfernung des Osteosynthesematerials als stabil bewerteten operierten Tibiae und die entsprechenden unversehrten kontralateralen Tibiae. Die Bruchlast einer operierten Tibia wurde dann jeweils in Relation zu der Bruchlast der kontralateralen Tibia gesetzt und als relativer Parameter als Prozentwert angegeben.

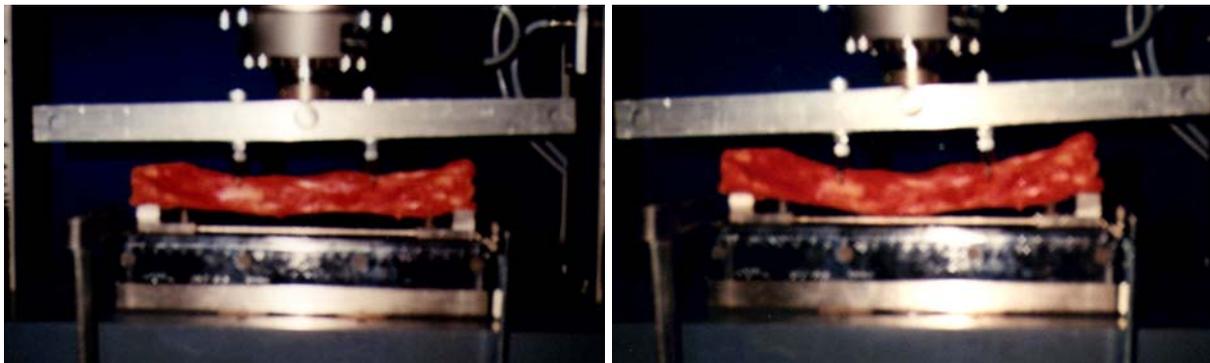


Abb. 2-17 Biomechanische Auswertung im 4-Punkt-Biegeversuch. Zunehmende Auslenkung des Defektbereiches in Abhängigkeit von der Zunahme der Druckkraft bis zum Bruch bzw. zur plastischen Deformation (rechts).

2.4.6. Unentkalkte Knochenhistologie

Aus den folgenden Gründen wurde die Knochenhistologie unentkalkt durchgeführt:

- Geringe Schrumpfung der Gewebe
- Erhaltung des Minerals als wichtigen Knochenbestandteil
- Bessere Unterscheidung mineralisierter von nicht mineralisierten Knochenstrukturen
- Bessere Erhaltung auch der Weichteilstrukturen und ihrer Lagebeziehung durch Vermeidung von Entkalkungssäuren bei der Präparation

- Möglichkeit mikroradiographischer Untersuchungen
- Möglichkeit der Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung und des Knochenumbaus durch sequentielle polychrome Fluoreszenz-Markierung¹¹⁸

2.4.6.1. Einbettverfahren

Bei allen operierten Tibiae wurde in tiefgekühltem Zustand der Defektbereich durch zwei Osteotomien mit einem Sicherheitsabstand von jeweils 1,5 cm über die proximale und distale Defektkante hinaus isoliert und sodann in einem verschließbaren Flachbodenglas in Formaldehyd 5% fixiert.

An den Gläsern mit den Präparaten wurden zur sicheren Identifikation zusätzlich zur Außenbeschriftung auch an der Glasinnenseite bleistiftbeschriftete Markierungszettel angebracht. Nach Fixierung in Formaldehyd 5% für eine Woche wurde das Formaldehyd verworfen. Die Gläser mit den Präparaten wurden dann an deren Öffnungen mit fest fixierter Verbandgaze sicher abgedeckt und in einem Wasserbecken gelagert, um das verbliebene Formaldehyd drei Stunden lang unter fließendem Leitungswasser möglichst vollständig auszuwaschen.

Da für eine erfolgreiche Kunststoffeinkbettung das vollständige Eindringen des Einbettmediums in das Knochenpräparat erforderlich ist, mußte nun eine gründliche Entwässerung und Entfettung der Knochenpräparate durchgeführt werden. Zunächst erfolgte die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe. Aufgrund der erheblichen Größe der Präparate und der zum Teil notwendigerweise zu belassenden Weichteilstrukturen erfolgte dabei jeder Schritt für eine Woche. Da die Präparate durch die Formaldehydwaschung stark wassergetränkt waren, wurde Schritt 1 (Methanol 70%) zweimal durchgeführt, zunächst für 12 Stunden und mit neuem Ansatz dann für eine Woche. Die jeweiligen Methanolkonzentrationen wurden durch Verdünnung von Methanol 100% mit Aqua bidestillata hergestellt. Anschließend erfolgte die Entfettung in Methanol und Aceton in einem Mischungsverhältnis von 1:1 für eine Woche. Da eine unvollständige Entfettung auch die spätere Polymerisation stören kann, wurde dieser Schritt je nach verbliebenem Fettgehalt gegebenenfalls wiederholt, bevor die Präparate dann für eine Woche mit

reinem Aceton versetzt wurden. Da Reste von Aceton im Knochen zu einer Blasenbildung führen können, wurde das Aceton dann zwei Tage lang durch Methanol 100% wieder vollständig herausgelöst (Tab. 2-8).

| Vorgang | Zeitdauer | Funktion |
|----------------------------------|--|--|
| Methanol 70% | 12 Stunden 1 Woche | Formaldehydauswaschung Entwässerung |
| Methanol 80% | 1 Woche | Entwässerung |
| Methanol 96% | 1 Woche | Entwässerung |
| Methanol 100% | 1 Woche | Entwässerung |
| Methanol : Aceton 1:1 | 1 Woche | Entfettung |
| Aceton 100% | 1 Woche | Entfettung |
| Methanol 100% | 2 Tage | Acetonauslösung |
| MMA I (monomer) | 1 Woche 1 Woche 1 Woche 1 Woche | Einbettung |
| MMA II (MMA + Nonylphenol + BPO) | 1 Woche | Polymerisation |

Tabelle 2-8 Knocheneinbettverfahren. MMA = Methylmethacrylat. BPO = Benzoylperoxid.

Die Einbettung der Präparate in monomeres Methylmethacrylat (Fa. Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrunn) erfolgte aufgrund der überdurchschnittlichen Dimensionen für vier Wochen, wobei in wöchentlichem Abstand das Einbettmedium komplett erneuert wurde. Zur Vermeidung von Blasenbildungen wurde der Einbettvorgang in den letzten zwei Wochen im Exsikkator durchgeführt, um eventuelle Luftreste vollständig zu entfernen.

Für den Vorgang der Polymerisation wurde das Methylmethacrylat nun im Volumenverhältnis 4:1 mit Nonylphenol versetzt. Nonylphenol (Nonylphenyl-polyethylenglycol-acetate for histology, Fa. Fluka BioChemika) ist ein Weichmacher, der das spätere Schneiden der Präparate erleichtert. Um den Polymerisationsvorgang zu

beschleunigen wurden zusätzlich zu je 1000 ml dieses Polymerisationsmediums 2,8 g Benzoylperoxid als Katalysator beigefügt (Tab. 2-8).

Herstellung des Polymerisationsmediums:

- Methylmethacrylat 800 ml
- Nonylphenol 200 ml
- Benzoylperoxid 2,8 g

Mit diesem Polymerisationsmedium erfolgte nun nach Abschluß der Einbettung und noch vor dem eigentlichen Polymerisationsvorgang die Vorpolymerisation von Flachbodengläsern geeigneter Größe. Dabei wurden die Flachbodengläser bis zu einer Höhe von maximal 10 mm mit dem Polymerisationsmedium aufgefüllt, da bei großzügigerer Auffüllung wegen extremer Druckentwicklung das Zersprengen der Gläserböden droht. Nachdem das Polymerisationsmedium im Verlaufe von Stunden schließlich eine plastisch-deformierbare Konsistenz erreicht hatte, konnten nun die Präparate zentriert und exakt lotrecht ausgerichtet in den vorpolymerisierten Gläsern fixiert werden. An diese Vorpolymerisation durfte sich nun keine weitere Einbettung mit monomerem Methylmetacrylat anschließen, da durch monomeres Methylmethacrylat die Vorpolymerisation wieder aufgehoben worden wäre.

Zur definitiven Polymerisation wurden die Gläser nun mit dem Polymerisationsmedium so weit aufgefüllt, daß die Präparate mindestens zu 5 mm bedeckt wurden. Wegen der zu erwartenden Druckentwicklung wurden die Gläser so dimensioniert, daß dabei ein maximales Füllvolumen von 67% gewährleistet werden konnte.

Da der Polymerisationsvorgang einerseits zum Reaktionsstart ein Mindestmaß an Aktivierungsenergie benötigt, dann aber als stark exotherme Reaktion abläuft, wurden die Gläser zur Wärmeabfuhr und zur Konstanthaltung der Temperatur in einem Wasserbad bei 25°C temperiert, um dadurch einen gleichmäßigen Aushärtungsvorgang zu gewährleisten, welcher nach etwa einer Woche abgeschlossen war. Abb. 2-18 zeigt einen ausgehärteten Präparateblock.



Abb. 2-18 Ausgehärteter Präparateblock

2.4.6.2. Herstellung der Schnittpräparate

Nach Zerschlagen der Gläser wurden die ausgehärteten Präparateblöcke entnommen und von Glasresten gesäubert. Zur genauen Orientierung erfolgte nun mittels einer Diamant-Bandsäge (EXAKT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) ein Klarschnitt parallel zur Längsrichtung des Präparates, ohne dieses dabei zu tangieren. Somit konnten die Blöcke nun unter optischer Kontrolle mit einer handelsüblichen Bandsäge (emco BS-2, Fa. Maier u. Co, Austria) weiter zugetrimmt und exakt in Defektmittelpunkt halbiert werden, da die kompletten Präparate für die weitere Bearbeitung mit der Innenlochsäge zu groß waren.

Entsprechend dem Schnittschema (siehe Abb. 2-19) wurden durch die proximale und distale Defektkante und die dazwischenliegenden Viertelpunkte fünf transversale Schnittebenen festgelegt. Mit Hilfe mehrerer Innenlochsägen (Typ 1600, Fa. Leitz) wurden aus diesen Schnittebenen jeweils mehrere Schnitte von 100 μm bzw. 500 μm Dicke hergestellt (siehe Abb. 2-20 bis 2-22).

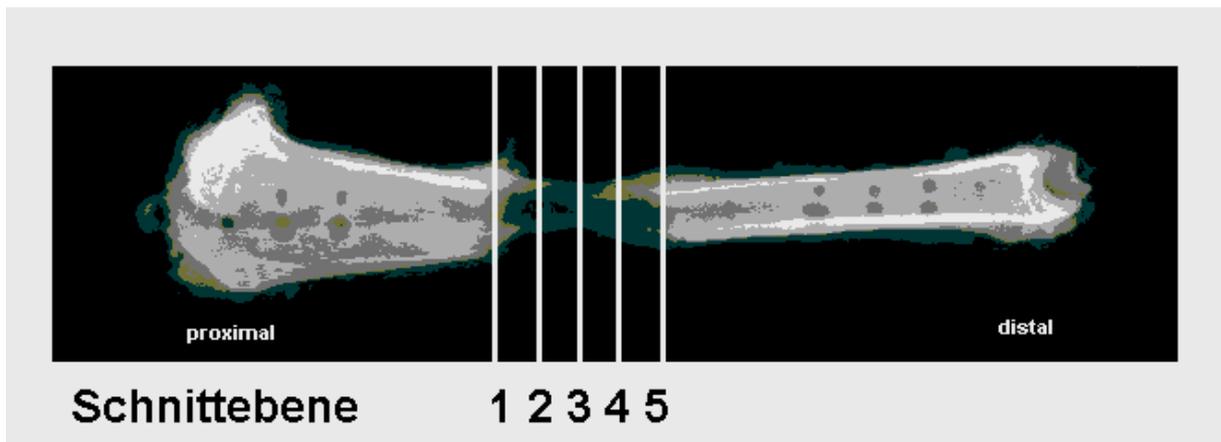


Abb. 2-19 Schnittschema zur Herstellung der Präparate.



Abb. 2-20 Histologie. Innenlochsäge mit Präparateblock.

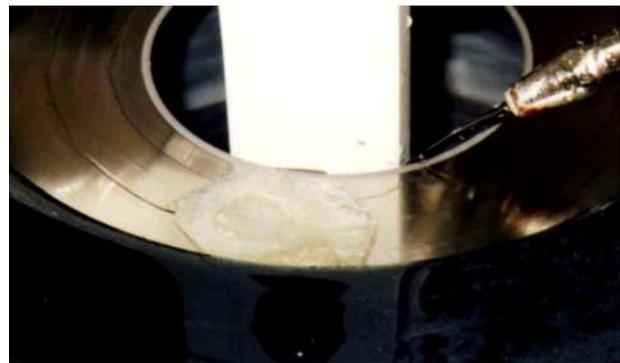


Abb. 2-21 Histologie. Fertiger Schnitt auf der Innenlochsäge.



Abb. 2-22 Histologie. Fertige Schnitte unter Glasplatten.

2.4.6.3. Mikroradiographie

Von den 100 μm dicken MMA-Knochenschnitten wurden Mikroradiographien auf hochauflösenden Fotoplatten (Fa. IMTEC, Californien, USA) mit einem Faxitron Mikrofocus X-Ray-System (Fa. Hewlett-Packard, Californien, USA) hergestellt. Die Expositionszeit betrug 80 Minuten bei einer Spannung von 21 kV und einer Stromstärke von 2 mA.

Die Entwicklung der Filmplatten erfolgte im Fotolabor der Anatomischen Anstalt der Universität München unter Deckenrotlicht für 10 Minuten in einem speziellen Entwicklerbad (1 Teil Tetanal Röntgen-Rapid-Entwickler Art. 103486 und 3,5 Teile Wasser). Anschließend folgte ein Stoppbad in Wasser für 10 Sekunden und die 10 Minuten lange Fixierung (1 Teil Tetanal Röntgen-Superfix Art. 103590 und 4 Teile Wasser). Abschließend erfolgten Wässerung und Trocknung¹¹⁹. Die Schnitte wurden entsprechend ihrer Orientierung exakt nach ventral, dorsal, medial und lateral ausgerichtet. Unter Verwendung eines Fadenkreuzes auf einer durchsichtigen dünnen Folie wurden die Schnitte jeweils in vier Quadranten eingeteilt. Dabei zeigte das Fadenkreuz ebenfalls in die Hauptrichtungen ventral, dorsal, medial und lateral. Zusätzlich wurden die Winkelhalbierenden eingezeichnet (siehe Abb. 2-23).

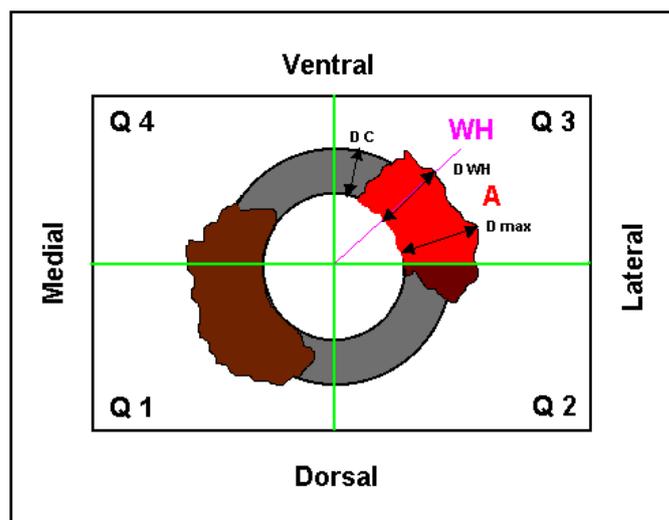


Abb. 2-23 Mikroradiographie. Auswertungsschema.

Die Betrachtung der Schnitte erfolgte unter einem Makroskop M 420 (Fa. Wild) mit einem Vergrößerungsfaktor von $0,5 \times 5,8 \times 1,25 = 3,625$. Die Bilder der Schnitte wurden mittels einer Videokamera (3 CCD Colour-View-Camera, Fa. Sony) über eine Grafikkarte in den Computer eingespeist. Nach Kalibrierung erfolgte die maßstabsgetreue Vermessung mit Hilfe einer Bildanalyse-Software (Kontron KS 400, Windows-NT-basiert, Fa. Zeiss).

In jedem Quadranten wurden jeweils folgende Messungen im Freehand-Modus von einer an den Versuchen nicht beteiligten verblindeten Untersucherin durchgeführt:

- Gesamtfläche des neugebildeten Knochens (A)
- Maximale Dicke des neugebildeten Knochens (D max)
- Dicke des neugebildeten Knochens in der Winkelhalbierenden (D WH)
- Dicke der Kortikalis, sofern im jeweiligen Schnitt vorhanden (D C)

In der mikroradiographischen Auswertung wurde als relevanter Parameter die Fläche des neugebildeten Knochens ausgewertet, und zwar im Unterschied zur CT-Auswertung zusätzlich auch in Abhängigkeit von der Lokalisation, einerseits entlang der Longitudinalebene entsprechend den 5 Schnittebenen und andererseits auch in der Tansversalebene entsprechend der Aufschlüsselung nach Quadranten (Abb. 2-24 und 2-25).

Der als *mittlere Gesamtfläche* bezeichnete Parameter errechnet sich aus den Gesamtflächen des neugebildeten Knochens aller Versuchstiere einer Gruppe in der jeweils gleichen Schnittebene geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten Versuchstiere der Gruppe (Summe aller Quadranten aller Versuchstiere einer Gruppe in einer Ebene geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten Versuchstiere). Dieser Parameter dient der Beurteilung der Knochenneubildungsrate in Abhängigkeit von der Lokalisation entlang der Longitudinalebene.

Der als *mittlere Quadrantenflächensumme* bezeichnete Parameter errechnet sich aus den Gesamtflächen des neugebildeten Knochens aller Versuchstiere einer Gruppe im jeweils gleichen Quadranten geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten

Versuchstiere der Gruppe (Summe aller 5 Schnittebenen aller Versuchstiere einer Gruppe innerhalb eines Quadranten geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten Versuchstiere). Dieser Parameter dient der Beurteilung der Knochenneubildungsrate in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb der Transversalebene.



Abb. 2-24 Mikroradiographie. 100 μm -Schnitt aus Schnittebene 1. Deutlich erkennbarer Kortikalisanschnitt.

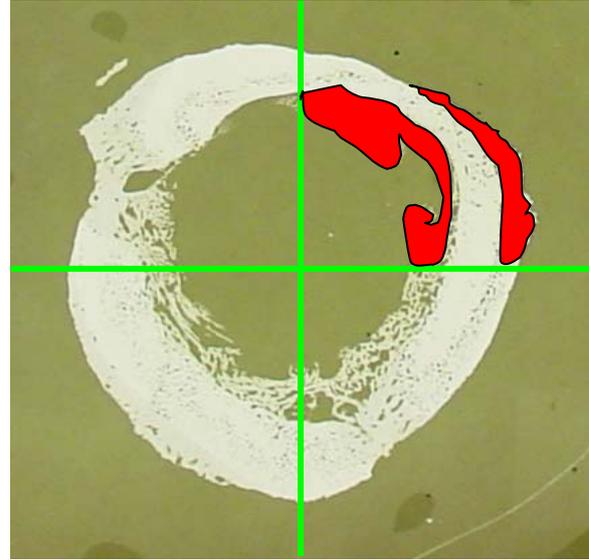


Abb. 2-25 Mikroradiographie. 100 μm -Schnitt aus Schnittebene 1. Quadranteneinteilung und Markierung der Fläche des neugebildeten Knochens (rot).

2.4.6.4. Fluoreszenzmikroskopie

Unter Verwendung einer integrierten Analogkamera (Axiphot Zeiss) wurden von den 500 μm -Schnitten in der Dunkelkammer Fluoreszenzaufnahmen angefertigt (Film Fujichrome 64T Type II). Bei 25-facher Vergrößerung und Einschub von Rot- bzw. Grünfiltern erfolgte die Belichtungszeit programmgesteuert (15-226 s bei Rotfilter bzw. 4,5-44 s bei Grünfilter).

Die Auswertung der intravital durchgeführten sequentiellen Fluoreszenzmarkierungen ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

2.4.6.5. Histologische Färbungen

Für die histologischen Färbungen nach Laczko-Levai (Tab. 2-9) und mit Alizarin-Toluidinblau (Tab. 2-10) wurden die MMA-Schnitte zunächst entsprechend folgendem Schema vorbehandelt:

1. Abwischen der Schnitte mit Ethanol 100%
2. Anätzen der Schnitte mit Ameisensäure 0,1% für 2-5 Minuten
3. Spülen mit Aqua destillata
4. Bad in Methanol 20-40% für 60-120 Minuten
5. Spülen mit Aqua destillata

Die eigentlichen Färbungen erfolgten dann gemäß den nachfolgenden Protokollen:

| Nr. | Vorgang | Material | Zeitraum |
|-----|-----------------|---|------------|
| 1 | Farblösung A | 0,25 g Azur II (Fa. Merck) + 0,25 g Methylene Blue (Fa. Merck) gelöst in 100 ml Soda (Na ₂ CO ₃) 0,5 % | 2-5 min. |
| 2 | Spülung | Soda (Na ₂ CO ₃) 0,5 % | 2-5 min. |
| 3 | Farblösung B | 0,5 g basisches Fuchsin (Fa. Serva, C.I. Basic Red 9, Nr. 42500) gelöst in 100 ml Aqua dest. | 3-5 min. |
| 4 | Differenzierung | Soda (Na ₂ CO ₃) 0,5 % | 60 min. |
| 5 | Auswaschen | Ethanol 96% (überschüssige Farbe) | fakultativ |
| 6 | Pressen | Glasplatten mit Gewichten | 14 Tage |

Tabelle 2-9 Färbung nach Laczko-Levai. Färbevorschrift.

Die Färbung nach Laczko-Levai ist eine Gegenfärbung für in Formaldehyd fixierte unentkalkte Knochenschnitte. Dabei gilt folgende Farben-Strukturen-Zuordnung¹²⁰:

- Knochen: pinkfarben-rötlich
- Knorpel: violett
- Kollagenfasern: blau-violett
- Elastische Fasern: rot
- Muskelfasern: grün-blau

| Nr. | Vorgang | Material | Zeitraum |
|-----|-----------------|---|----------|
| 1 | Toluidinblau O | 0,3 g Toluidinblau O + 2,5 g Soda (Na_2CO_3) 0,5 % in 100 ml Aqua dest. gelöst und filtriert | 5 min. |
| 2 | Spülung | Aqua dest. | 5 min. |
| 3 | Alizarinrot S | 0,5 g Alizarinrot S gelöst in 45 ml Aqua dest. und 5 ml Amoniaklösung 0,28% bei pH 6,36-6,40 | 5 min. |
| 4 | Differenzierung | 250 ml Ethanol 96% + 1 Tropfen Eisessig | 1 min. |

Tabelle 2-10 Färbung mit Alizarin und Toluidinblau. Färbevorschrift.

Die Färbung mit Alizarinrot S und Toluidinblau O dient insbesondere der Differenzierung von Knorpelgewebe und mineralisiertem oder verkalktem Hartgewebe. Alizarinrot S färbt dabei Kalziumsalze intensiv rötlich-orange. Es gilt folgende Farben-Strukturen-Zuordnung:

- Kalziumsalze bzw. mineralisierte Hartgewebematrix: intensiv rötlich-orange
- Zellen und Weichgewebe: unterschiedlich blau
- Knorpelmatrix: metachromatisch rotviolett
- Verkalkte Knorpelmatrix: dunkelblau

Die Betrachtung der gefärbten Schnitte erfolgte unter einem Mikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss) bei bis zu 200-facher Vergrößerung. Die Bilder der Schnitte wurden digital über Videokamera (3 CCD Colour-View-Camera, Fa. Sony) und Grafikkarte in den Computer eingespeist. Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach qualitativ-morphologischen Gesichtspunkten.

2.4.7. Statistik

Die Gruppengrößen entsprechen der Mindest- bzw. Minimalstprobenzahl, um eine wissenschaftliche Aussage bezüglich der Heilung oder Nicht-Heilung großer Knochendefekte mittels der verwendeten Implantate machen zu können. Eine den Ansprüchen der vergleichenden Statistik genügende Versuchsgruppengröße von 18 Tieren wird im Rahmen dieser Untersuchung als unrealistisch und als nicht

durchführbar betrachtet. Zur Klärung der Fragestellung können hierdurch im Verhältnis zum Aufwand, zur Zeitverzögerung und zur ethischen Problematik keine bedeutenden zusätzlichen Informationen gewonnen werden. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte daher deskriptiv unter Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen.

3. Ergebnisse

3.1. Klinischer Verlauf

Insgesamt wurden 15 Merino-Schafe operiert, davon konnten 12 in die Auswertung eingehen (Tab. 3-1 und 7-2). Intraoperativ gab es keine nennenswerten Komplikationen. Postoperativ kam es zu drei Versuchstierausfällen. Tier-Nr. 6 aus Gruppe 1 starb in der Nacht des dritten postoperativen Tages an Tympanie, einer typischen Komplikation bei Wiederkäuern. Tier-Nr. 12 aus Gruppe 3 mußte am sechsten postoperativen Tag nach einer dislozierten Marknagel-Ausrißfraktur euthanasiert werden. Tier-Nr. 15 aus Gruppe 3 wurde bei therapieresistenten infizierten Dekubitalulcera der beiden Vorderläufe in der fünften postoperativen Woche ebenfalls eingeschläfert.

| Versuchsgruppe | 1 | 2 | 3 |
|----------------|-------------|----|------|
| Implantat | OP-1 + IDKM | AS | IDKM |
| Operationen | 6 | 4 | 5 |
| Ausfälle | 1 | 0 | 2 |
| Auswertungen | 5 | 4 | 3 |

Tabelle 3-1 Klinischer Verlauf. Gesamtüberblick.

OP-1 = 2 Einheiten OP-1-Device entsprechend 5 mg Osteogenic Protein-1

IDKM = Inaktivierte demineralisierte Knochenmatrix

AS = Autogene Spongiosa

Das Mobilisationsverhalten war insgesamt uneinheitlich. Manche Tiere standen sofort nach der Operation ohne Probleme selbst auf, andere benötigten während der

gesamten Wundheilungsphase intensive physiotherapeutische Intervention. Wieder andere Tiere waren zwar in ihrer Mobilität nicht eingeschränkt, verhielten sich aber spontan passiver als andere. Hinsichtlich des Entlastungsmodells ist festzustellen, daß alle Tiere während der ersten zwei postoperativen Wochen die operierte Extremität kaum belasteten. Sowohl Aufstehen als auch Lokomotion erfolgten in dieser Phase dreibeinig im Sinne eines Entlastungslahmens. Nach zunehmender Teilbelastung konnten alle Tiere die operierte Extremität ab der sechsten postoperativen Woche voll belasten, so daß so manches Tier sogar über eine 1,2 m hohe Absperrung sprang (Tab. 7-2).

3.2. Manuelle Testung post Explantationem

Nach Explantation und Entfernung des Osteosynthesematerials waren eine Tibia aus Gruppe 1 (Tier-Nr. 3) und alle vier Tibiae aus Gruppe 2 (Tier-Nr. 7-10) klinisch stabil. Diese Tibiae konnten in die biomechanische Auswertung eingehen (Tab. 7-6). Alle anderen Tibiae waren bereits klinisch wackelinstabil.

3.3. Röntgenverlaufskontrollen

In den Röntgenverlaufskontrollen zeigten vier von fünf mit OP-1 behandelten Versuchstieren der Gruppe 1 deutliche Anzeichen Implantat-induzierter Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches (Tab. 7-3). Erste Anzeichen einer Knochenneubildung fanden sich bereits in der zweiten postoperativen Woche in Form von feinen radiodensen Wolken innerhalb des Defektbereiches (Tab. 7-3). Bei einem Versuchstier (Tier-Nr. 3) kam es bereits in der sechsten Woche zu einer ersten Defektüberbrückung an einer Stelle mit Material von noch inhomogener Radiodensität (Abb. 3-1). 12 Wochen postoperativ waren in dieser Gruppe bei zwei Tieren (Tier-Nr. 1 und 3) die Defekte vollständig knöchern überbrückt (Tab. 7-3, Abb. 3-2 und 3-3). Die durch OP-1 induzierte Knochenneubildung wurde in dieser Gruppe vor allem dorsolateral beobachtet (Abb. 3-2). Nach Implantation von OP-1 war bei der Auswertung der Röntgenbilder bei vier von fünf Versuchstieren eine teilweise erhebliche Dislokation des osteoinduktiven Implantates aus dem Defektbereich

heraus in die umgebenden Weichteile auffällig. Als Folge entstanden mitunter sehr ausgedehnte heterotope Ossifikationen (Abb. 3-2 und 3-3). Nur bei dem Versuchstier, bei dem es durch OP-1 ohnehin zu keiner relevanten Knochenneubildung kam (Tier-Nr. 5), wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

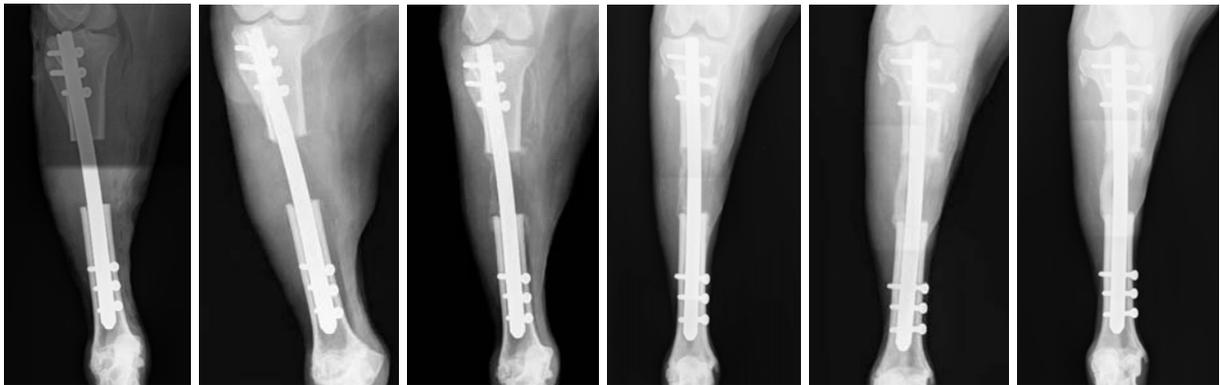


Abb. 3-1 Röntgenverlaufskontrollen im Abstand von 2 Wochen bei Tier-Nr. 3 (Gruppe 1, OP-1) von Woche 0 (links) bis Woche 10 (rechts). Defektüberbrückung lateral ab Woche 6 (Score-Wert 3).



Abb. 3-2 Defektüberbrückung (Score-Wert 5) dorsolateral bei Tier-Nr. 3 (OP-1) nach 12 Wochen. Heterotope Ossifikationen (Pfeile).



Abb. 3-3 Defektüberbrückung (Score-Wert 4) bei Tier-Nr. 1 (OP-1) nach 12 Wochen. Ausgedehnte heterotope Ossifikationen (Pfeile).

Nach Transplantation von autogener Spongiosa zeigten sich in Gruppe 2 ebenfalls bereits in der zweiten postoperativen Woche erste Veränderungen gegenüber dem postoperativem Befund im Sinne neu aufgetretener zusätzlicher feiner radiodenser Strukturen (Tab. 7-3). Ebenfalls in der sechsten postoperativen Woche kam es zu einer ersten Defektüberbrückung, nach Versuchsende waren alle vier Defekte an einer Stelle überbrückt (Tab. 7-3). Bei zwei dieser Defekte zeigte sich wiederum eine vollständige Defektüberbrückung. Wie bei den Versuchstieren aus Gruppe 1 fand die Knochenneubildung auch in Gruppe 2 verstärkt im dorsolateralen Bereich statt (Abb. 3-4 b-d). Durch das Implantat bedingte heterotope Ossifikationen wie in Gruppe 1 beschrieben wurden nach autogener Spongiosatransplantation nicht beobachtet. Dagegen kam es in dieser Gruppe bei zwei von vier Tieren (Tier-Nr. 7 und 9) in der zweiten postoperativen Woche zu kleinen Defektkantenausrisen (Tab. 7-2).

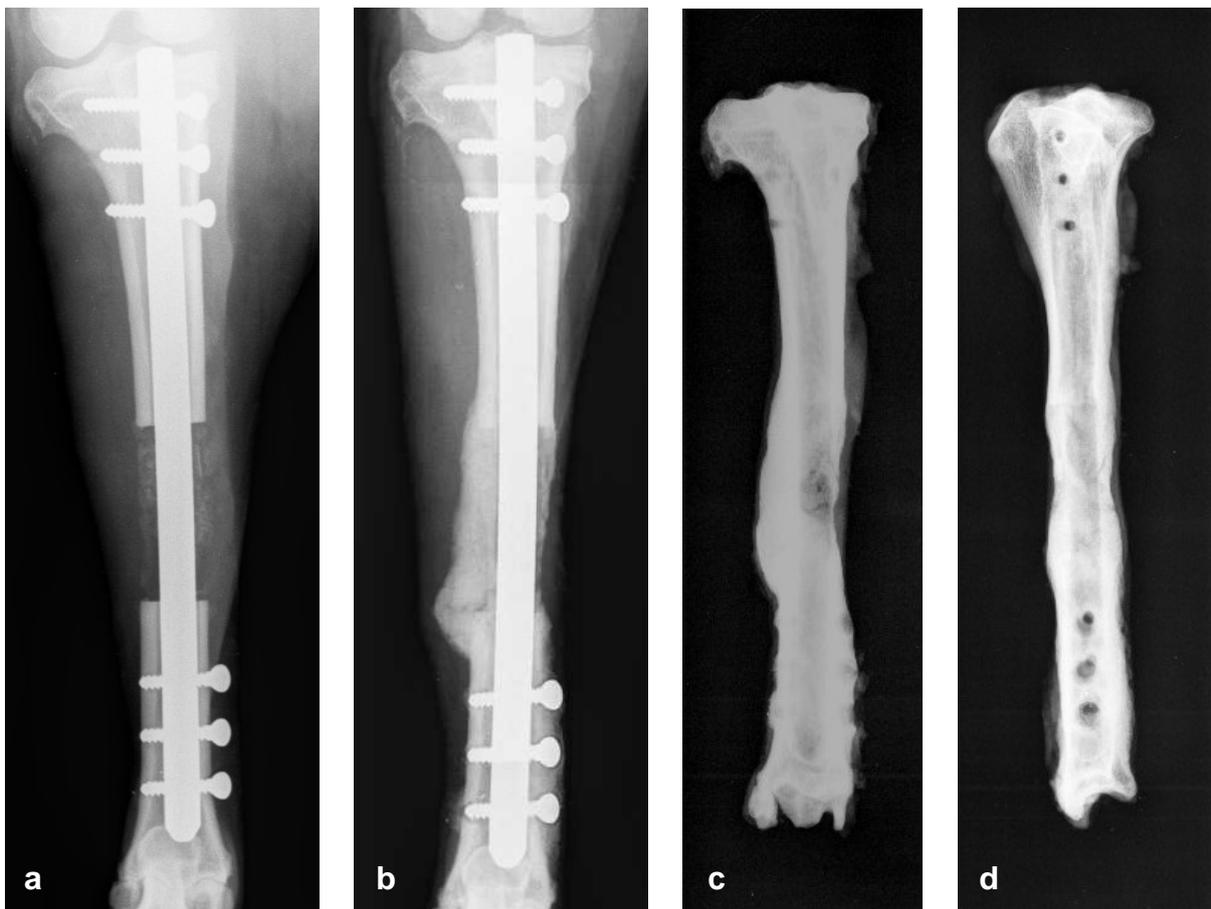


Abb. 3-4 Röntgenverlaufskontrollen bei Tier-Nr. 7 (Gruppe 2, AS) in Woche 0 (a), Woche 8 (b) und Woche 12 (c und d). Die eingebrachte Spongiosa ist bereits unmittelbar postoperativ als radiodenses Material innerhalb des Defektes erkennbar (a). Ausgeprägte Knochenneubildung v.a. dorsolateral (b-d). Keine durch das Implantat bedingten heterotopen Ossifikationen.

Nach Implantation des Kollagenträgers (Gruppe 3, IDKM) zeigte sich erst vier Wochen nach der Operation eine erste von den Defektkanten ausgehende Reaktion im Sinne einer Spontanregeneration (Abb. 3-5). In dieser Gruppe kam es auch nach 12 Wochen zu keiner Defektüberbrückung und auch nicht zu heterotopen Ossifikationen (Abb. 3-6, Tab. 7-3). Allerdings waren auch in Gruppe 3 bei zwei von drei ausgewerteten Versuchstieren Defektkantenausrisse in der zweiten postoperativen Woche zu erkennen (Abb. 3-5, Tab. 7-2). Im Bereich dieser Defektkantenausrisse war im weiteren Verlauf dann eine verstärkte lokale Kallusbildung auffällig (Abb. 3-5 c-e).

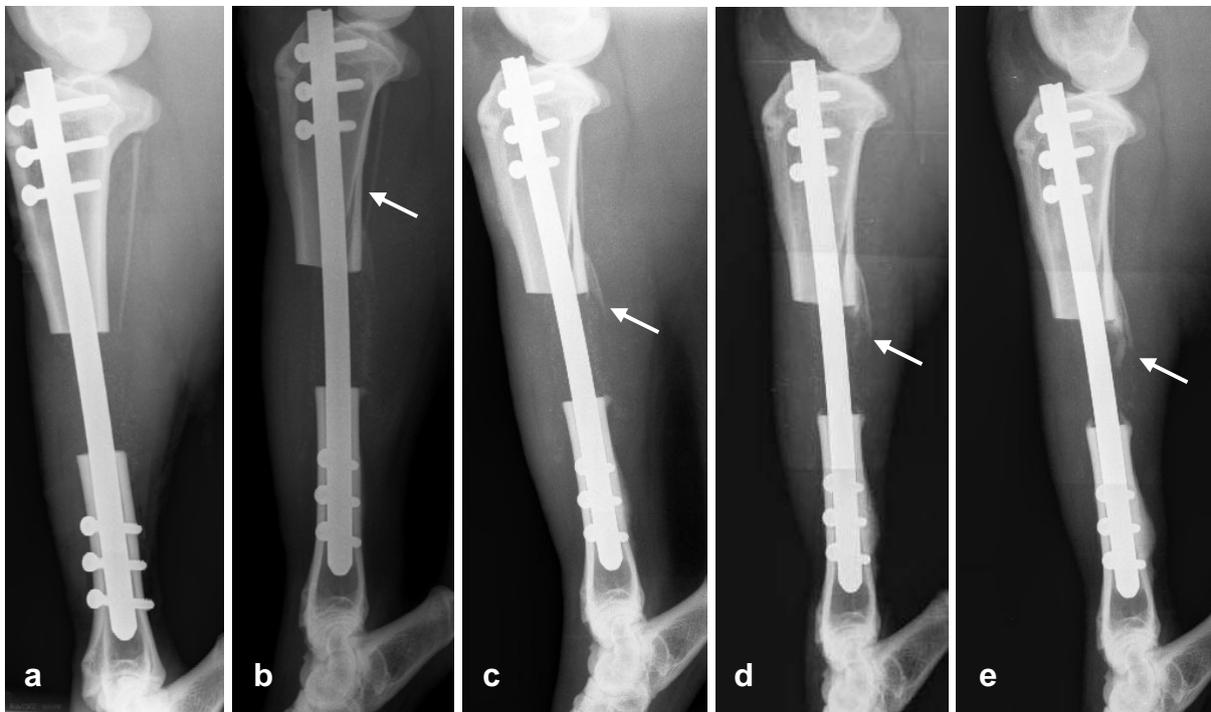


Abb. 3-5 Röntgenverlaufskontrollen im Abstand von 2 Wochen bei Tier-Nr. 14 (Gruppe 3, IDKM) von Woche 0 (a) bis Woche 8 (e). Defektkantenausriß dorsal proximal in Woche 2 (b, Pfeil). Im weiteren Verlauf von diesem Defektkantenausriß ausgehende verstärkte Knochenneubildung (c-e, Pfeile). Ansonsten nur von den Defektkanten ausgehende minimale Knochenneubildung i.S. einer zunehmenden Abrundung der Defektkanten erkennbar, beginnend dorsal distal in Woche 4 (c).

Die Knochenneubildung erfolgte in Gruppe 3 im Wesentlichen im Bereich der Defektkanten im Sinne einer Spontanregeneration mit im Verlauf zunehmender Abrundung der Defektkanten. In den zentralen Zonen des Defektbereiches fand keine Knochenneubildung statt (Abb. 3-5 und 3-6).

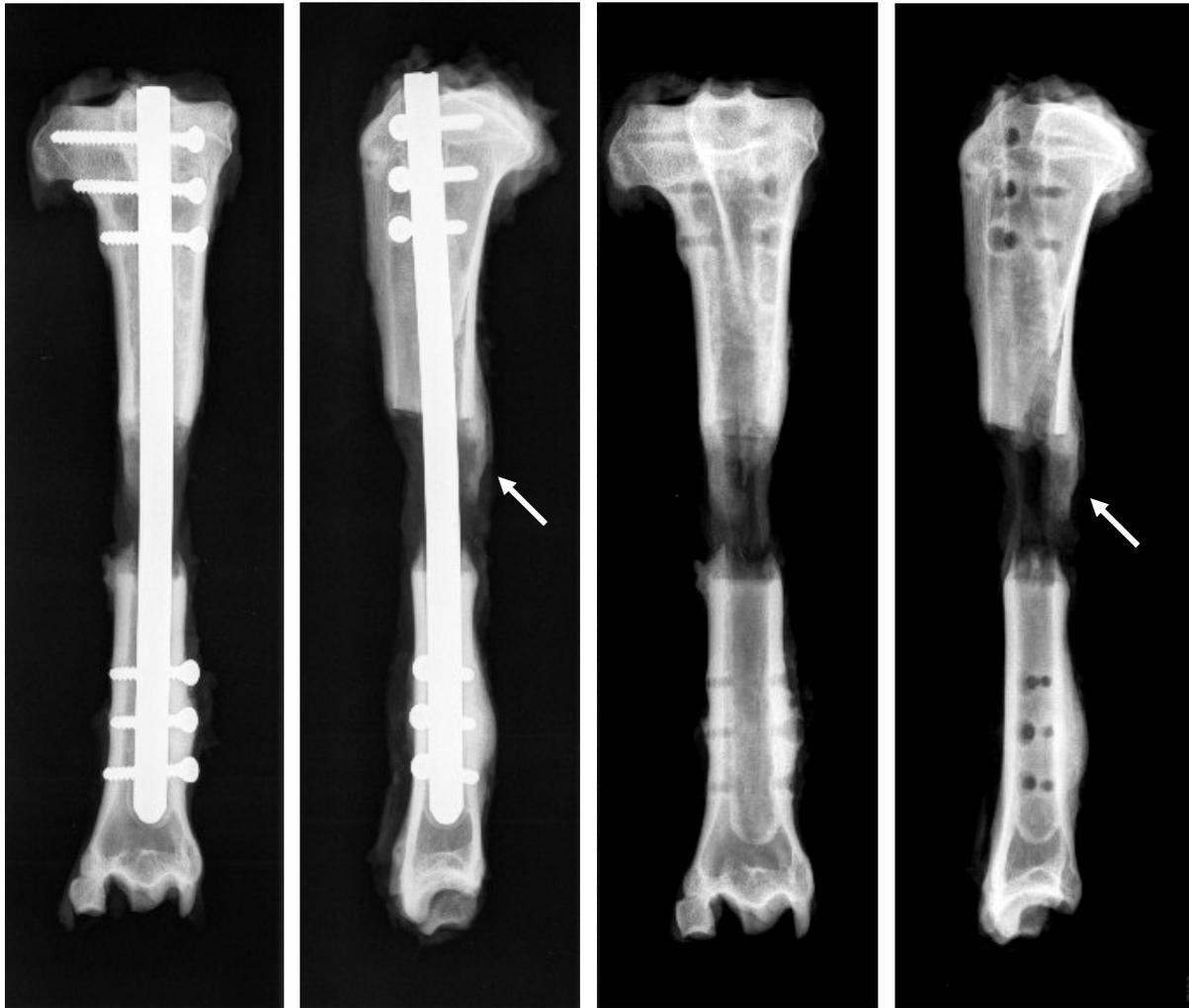


Abb. 3-6 Röntgenkontrollen nach 12 Wochen bei Tier-Nr. 14 (Gruppe 3, IDKM) nach Explantation mit und ohne Marknagel. Defektkantenausriß dorsal proximal und von dort ausgehende verstärkte Knochenneubildung (Pfeile). Ansonsten nur von den Defektkanten ausgehende minimale Knochenneubildung i.S. einer Abrundung der Defektkanten erkennbar.

Insgesamt wurden gemäß der Beurteilung der Röntgenverlaufskontrollen mittels des beschriebenen Score-Systems bei Versuchsende nach 12 Wochen in den Gruppen 1 und 2 jeweils zwei Defekte als geheilt gewertet. In Gruppe 3 kam es zu keiner Heilung (Tab. 7-4). Aufgrund relativ großer Streuung der Werte bei nur geringer Fallzahl sind bei der Betrachtung der Gruppenmittelwerte kaum signifikante Unterschiede darstellbar. Signifikante Unterschiede bestehen lediglich in Woche 4 zwischen Gruppe 1 und 3 sowie zwischen Gruppe 2 und 3 und in Woche 12 zwischen Gruppe 2 und 3 (Abb. 3-7). Der Trend zeigt jedoch insgesamt deutlich, daß die Gruppen 1 und 2 besser abschneiden als Gruppe 3 und daß Gruppe 2 mit Ausnahme von Woche 2 der Gruppe 1 tendentiell überlegen ist.

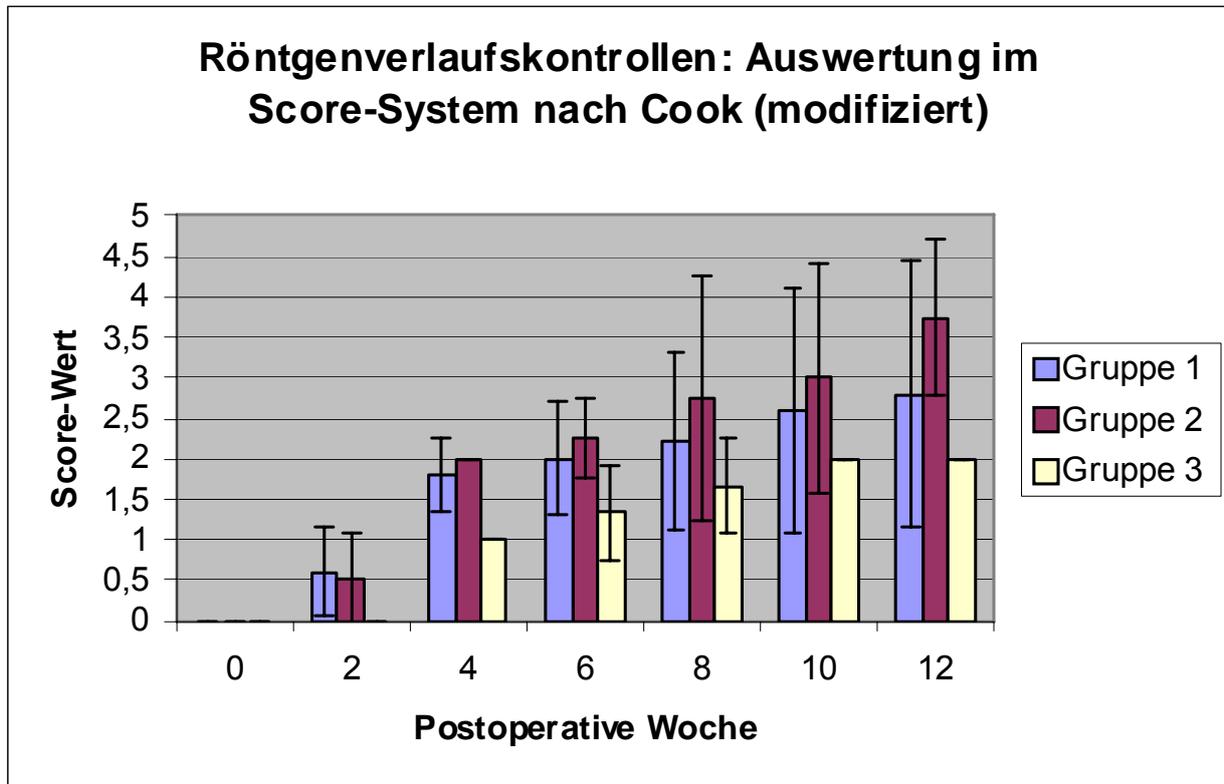


Abb. 3-7 Graphische Darstellung der Auswertung der Röntgenverlaufskontrollen. In Woche 4 schneidet Gruppe 3 signifikant schlechter ab als die Gruppen 1 und 2. In Woche 12 ist Gruppe 2 signifikant besser als Gruppe 3. Aufgrund der geringen Fallzahlen besteht eine große Streuung der Werte.

3.4. 3D-CT-Volumetrie

Bei der quantitativen Bestimmung des Volumens von neu gebildetem Knochen innerhalb des Defektbereiches entsprechend Dichtewerten über 100 Hounsfield-Einheiten (HU) zeigte sich 12 Wochen nach Operation mittels 3D-CT-Volumetrie in Gruppe 2 (AS) ein Knochenneubildungspotential, das das der Gruppe 1 (OP-1) um mehr als das Doppelte übertraf (Abb. 3-8 und Tab. 7-5).

Das mittlere Knochenneubildungspotential in Gruppe 2 (AS) betrug dabei $21,5 \pm 9,2$ ml, das von Gruppe 1 (OP-1) $9,4 \pm 2,5$ ml. Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 ist statistisch signifikant. Das mittlere quantitative Knochenneubildungspotential von Gruppe 3 (IDKM) betrug $6,3 \pm 1,9$ ml. Dabei ist der Unterschied zu Gruppe 2 (AS) statistisch signifikant, der Unterschied zu Gruppe 1 (OP-1) jedoch nicht (Abb. 3-8). In Gruppe 2 (AS) ist mit Tier-Nr. 8 ein Ausreißer auffällig, bei dem mit 35,2 ml doppelt

so viel neuer Knochen gebildet wurde wie bei den anderen Tieren der Gruppe im Durchschnitt. Dementsprechend zeigt sich in dieser Gruppe mit 9,2 ml eine sehr hohe Standardabweichung der Werte.

Die Relationen der Fraktionen unterschiedlich dichten bzw. mineralisierten Knochens sind in allen Gruppen vergleichbar (Abb. 3-8, Tab. 7-5). Auffällig ist jedoch, daß im Bereich der hohen Dichtewerte über 900 und über 1200 HU der Unterschied zwischen allen drei Gruppen nicht mehr signifikant ist, wohingegen im Bereich der niedrigen Dichtewerte die Unterschiede von Gruppe 2 zu den Gruppen 1 und 3 jeweils signifikant sind.

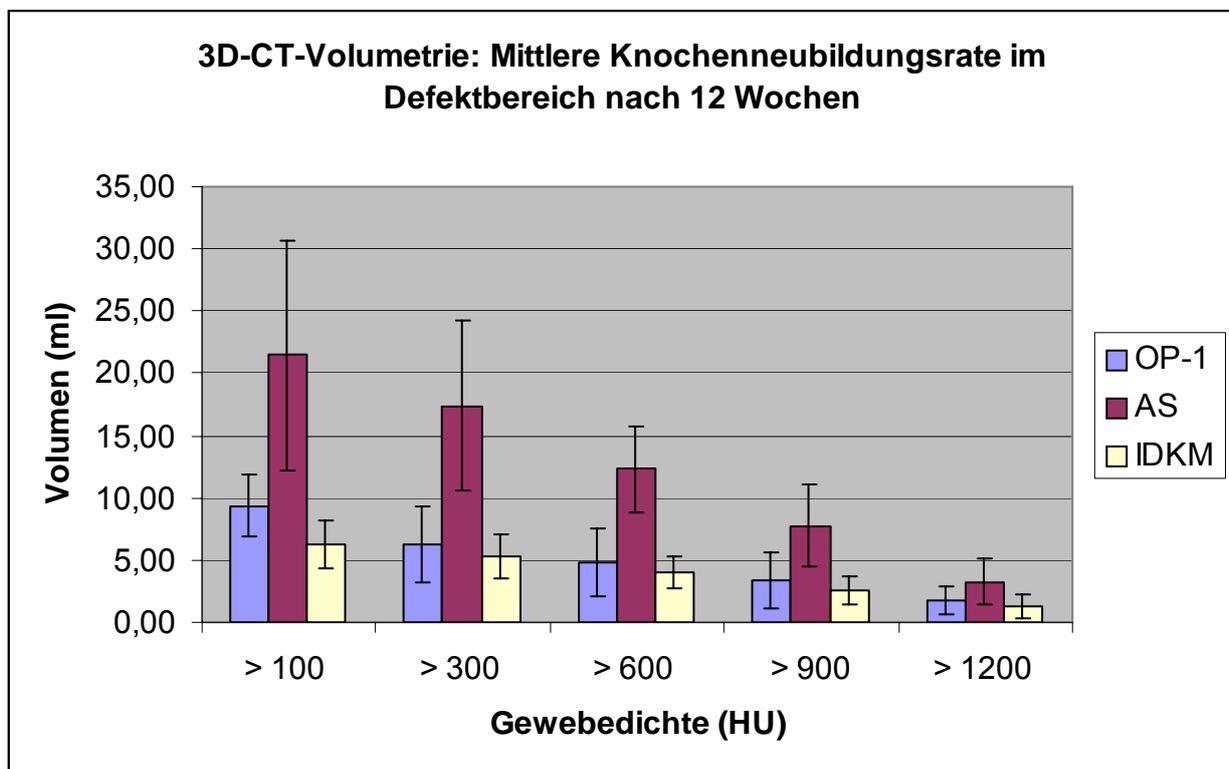


Abb. 3-8 Ergebnisse der 3D-CT-Volumetrie. HU = Hounsfield-Units. Die Relationen der Fraktionen unterschiedlich dichten Knochens sind in allen Gruppen vergleichbar.

Der Maximalwert in Gruppe 1 betrug 12,5 ml (Tier-Nr. 3) und entsprach damit annähernd dem effektiven Defektvolumen von 15 ml (Tab. 7-5). Der Maximalwert in Gruppe 3 betrug 8,5 ml (Tier-Nr. 13).

3.5. Biomechanik

Insgesamt erreichten nur 5 von 12 explantierten Tibiae ausreichende Stabilität für die Durchführung des 4-Punkt-Biegeversuchs. In der Kontrollgruppe war keine operierte Tibia ausreichend stabil für die biomechanische Auswertung, in Gruppe 1 (OP-1) konnte eine Tibia (Tier-Nr. 3) und in Gruppe 2 (AS) konnten alle vier Tibiae (Tier-Nr. 7-10) getestet werden (Tab. 7-6).

Dabei reflektierten alle getesteten operierten Tibiae lediglich Charakteristika bindegewebig organisierter Pseudarthrosen mit einer relativen Bruchlast von 9,6-18,4% gegenüber der jeweiligen unversehrten kontralateralen Tibia. Der Verlauf der Graphen entspricht dabei bei allen operierten Tibiae mehr einer plastischen Deformation als einem tatsächlichen Bruch, wie er bei den unversehrten kontralateralen Tibiae zu beobachten war (Abb. 3-9 und 3-10).

Die Protokolle aller biomechanischen Auswertungen finden sich im Anhang (7.6). Hinsichtlich der mittleren relativen Bruchlast bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 ($9,6 \pm 0\%$) und Gruppe 2 ($13,1 \pm 4,6\%$).

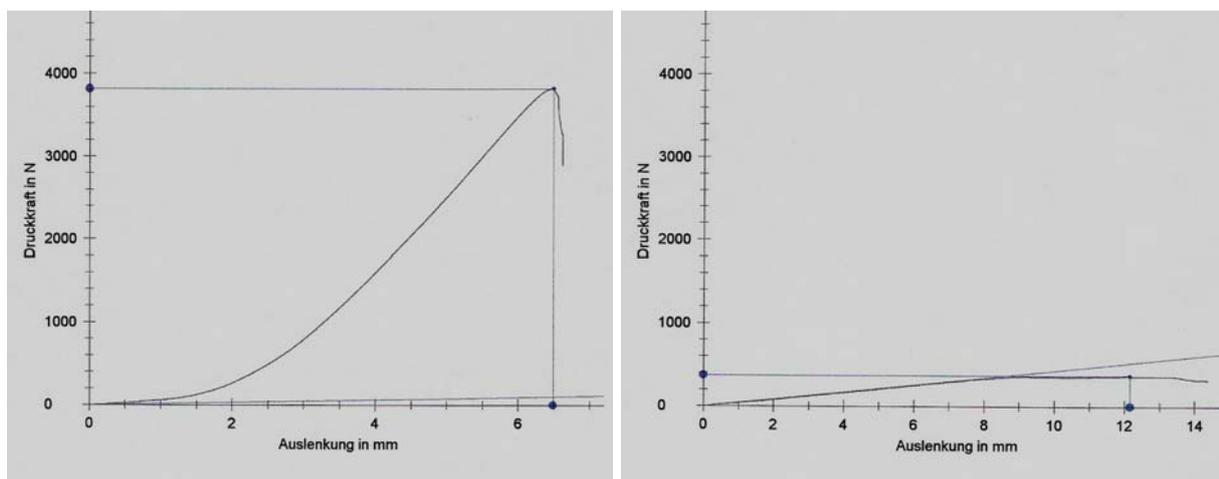


Abb. 3-9 Biomechanische Auswertung bei Tier-Nr. 3 aus Gruppe 1 (OP-1). Kontralaterale Tibia mit Bruch-Charakteristik (links), operierte Tibia (rechts) mit Charakteristik einer plastischen Deformation. Die kontralaterale Tibia brach bei einer Auslenkung von 6,5 mm und einer Bruchlast von 3818 N. Bei der operierten Tibia betrug die maximal erreichte Bruchlast 367 N, wobei die plastische Deformation bei einer Auslenkung von 8 mm einsetzte.

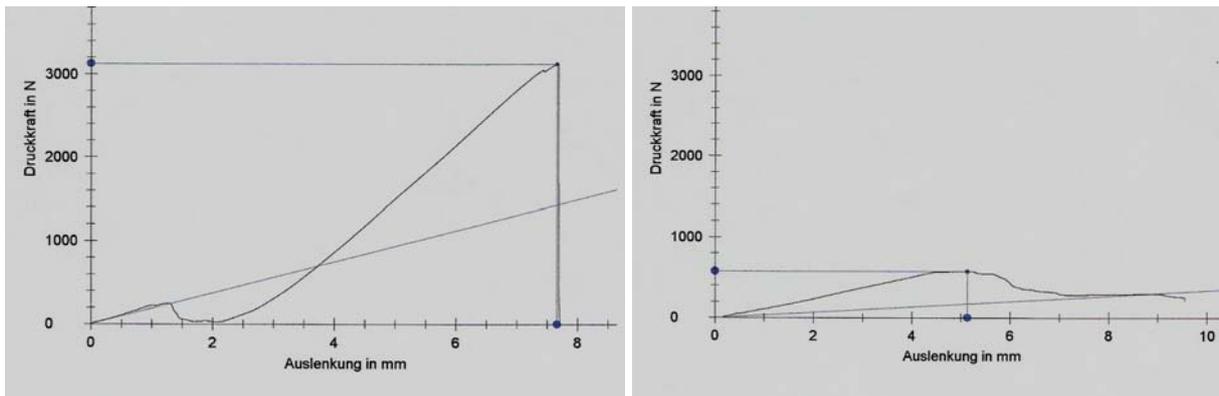


Abb. 3-10 Biomechanische Auswertung bei Tier-Nr. 7 aus Gruppe 2 (AS). Kontralaterale Tibia (links) mit Bruch-Charakteristik, operierte Tibia (rechts) mit Charakteristik einer plastischen Deformation. Die kontralaterale Tibia brach bei einer Auslenkung von 7,6 mm und einer Bruchlast von 3122 N. Bei der operierten Tibia betrug die maximal erreichte Bruchlast 575 N, wobei die plastische Deformation bereits bei einer Auslenkung von 4,5 mm einsetzte.

3.6. Unentkalkte Knochenhistologie

3.6.1. Mikroradiographie

Hinsichtlich der qualitativen Beurteilung der Knochenneubildung wurde anhand der Mikroradiographie in allen Gruppen unreifer Geflechtknochen registriert (Abb. 3-11).

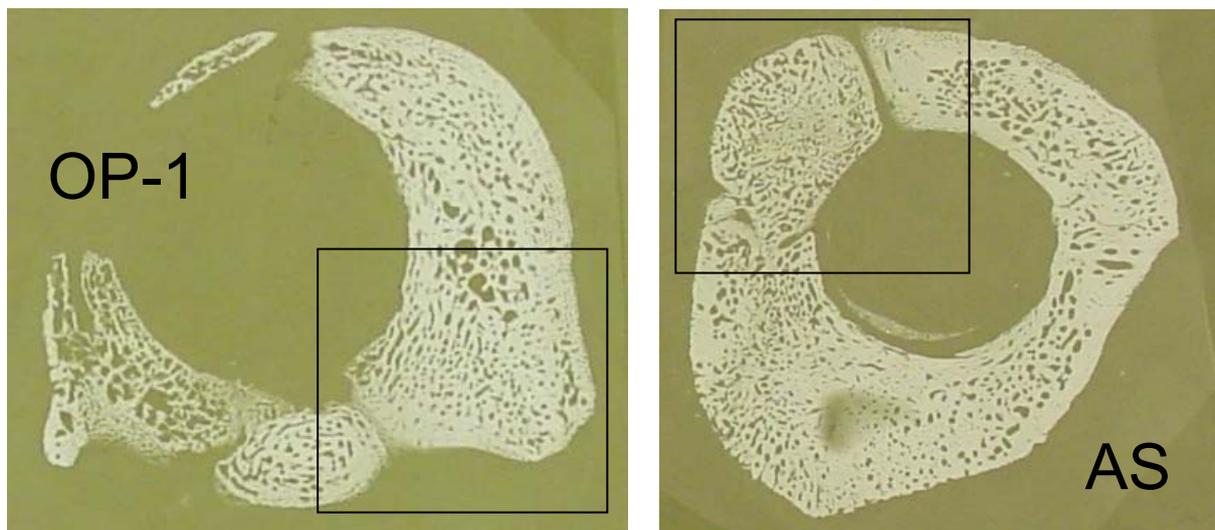


Abb. 3-11 Mikroradiographien aus Schnittebene 3 von Tier-Nr. 3 aus Gruppe 1 (OP-1, links) und Tier-Nr. 10 aus Gruppe 2 (AS, rechts). Es kommt jeweils unreifer Geflechtknochen zur Darstellung.

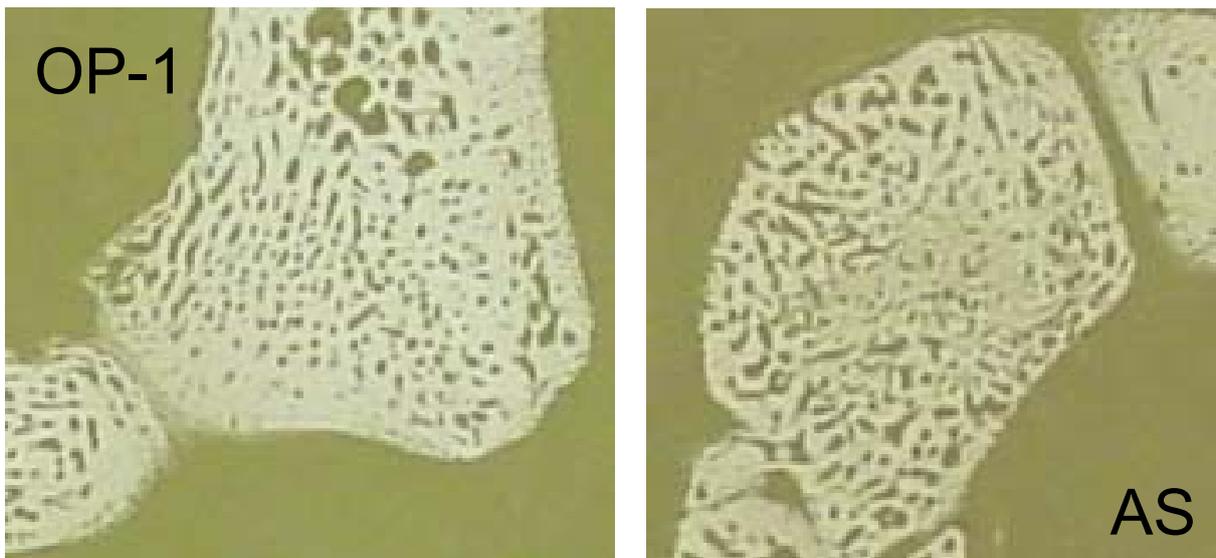


Abb. 3-12 Ausschnittsvergrößerungen der schwarzen Kästen aus Abb. 3-11. Auch bei starker Vergrößerung finden sich keine morphologischen Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2.

Histomorphologisch ergaben sich dabei keine Unterschiede zwischen der Knochenneubildung nach Induktion durch OP-1 oder nach Transplantation autogener Spongiosa (Abb. 3-11 und 3-12). In Gruppe 2 war die eingebrachte Spongiosa nach 12 Wochen vollständig resorbiert und nicht mehr nachweisbar.

Die Abbildungen 3-13 bis 3-15 zeigen für Beispiele aus jeder Gruppe jeweils von links nach rechts die Schnittebenen 1-5. Dabei findet sich in den Gruppen 1-2 jeweils eine durchgehende Knochenneubildung in allen Ebenen innerhalb des Defektbereiches. In Gruppe 3 fand lediglich eine von den Defektkanten ausgehende Knochenneubildung im Sinne einer Spontanregeneration statt, in der Mitte des Defektes zeigte sich jedoch keine durchgehende Knochenneubildung (Abb. 3-15).

In Abbildung 3-16 sind ausgeprägte heterotope Ossifikationen nach Implantation von OP-1 dargestellt. Dabei fand ein erheblicher Anteil der durch OP-1 induzierten Knochenneubildung weit außerhalb des eigentlichen Defektbereiches in der umgebenden Muskulatur statt. In Schnittebene 2 wurde sogar deutlich mehr neuer Knochen außerhalb des Defektbereiches produziert als innerhalb des Defektbereiches. Dies läßt vermuten, daß es bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Implantation von OP-1, nämlich noch vor Anlaufen der osteogenetischen

Kaskade, zu einer Dislokation des osteoinduktiven Implantates aus dem Defektbereich heraus in die umgebende Muskulatur gekommen sein mußte.



Abb. 3-13 Mikroradiographien von Tier-Nr. 3 aus Gruppe 1 (OP-1). In der Abbildung sind von links nach rechts die Schnittebenen 1-5 dargestellt. Auch innerhalb des Defektes zeigt sich eine durchgehende Knochenneubildung.

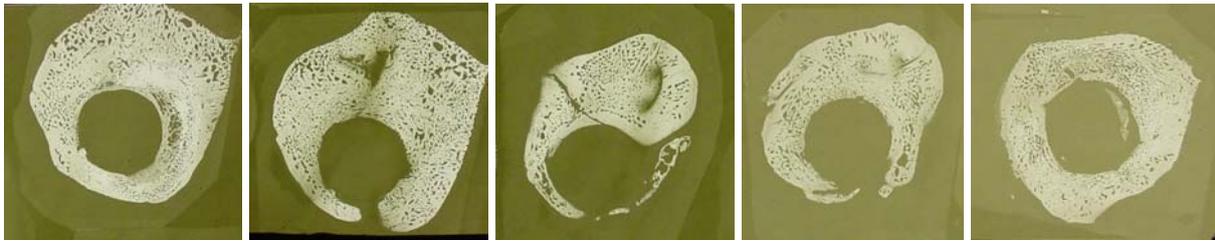


Abb. 3-14 Mikroradiographien von Tier-Nr. 7 aus Gruppe 2 (AS). In der Abbildung sind von links nach rechts die Schnittebenen 1-5 dargestellt. Auch innerhalb des Defektes zeigt sich eine durchgehende Knochenneubildung.

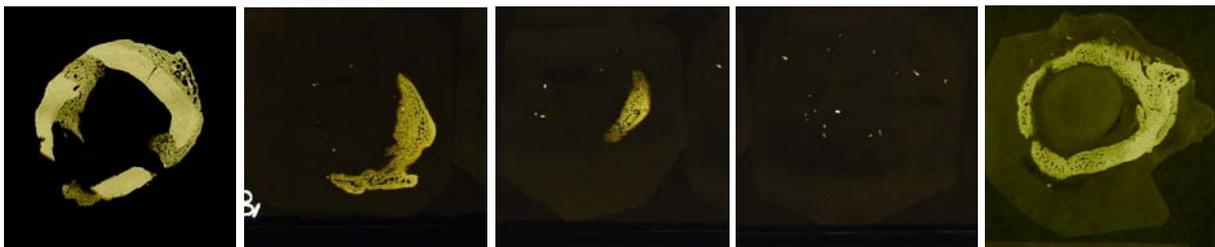


Abb. 3-15 Mikroradiographien von Tier-Nr. 14 aus Gruppe 3 (IDKM). In der Abbildung sind von links nach rechts die Schnittebenen 1-5 dargestellt. Innerhalb des Defektes zeigt sich keine durchgehende Knochenneubildung.

In Abbildung 3-17 ist bei Tier-Nr. 8 eine exzessive Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches nach Implantation von autogener Spongiosa zu erkennen. Auch hier erstreckt sich die Knochenneubildung bis in die umgebende Muskulatur, allerdings geht die Knochenneubildung hierbei eindeutig von der Defektzone aus.

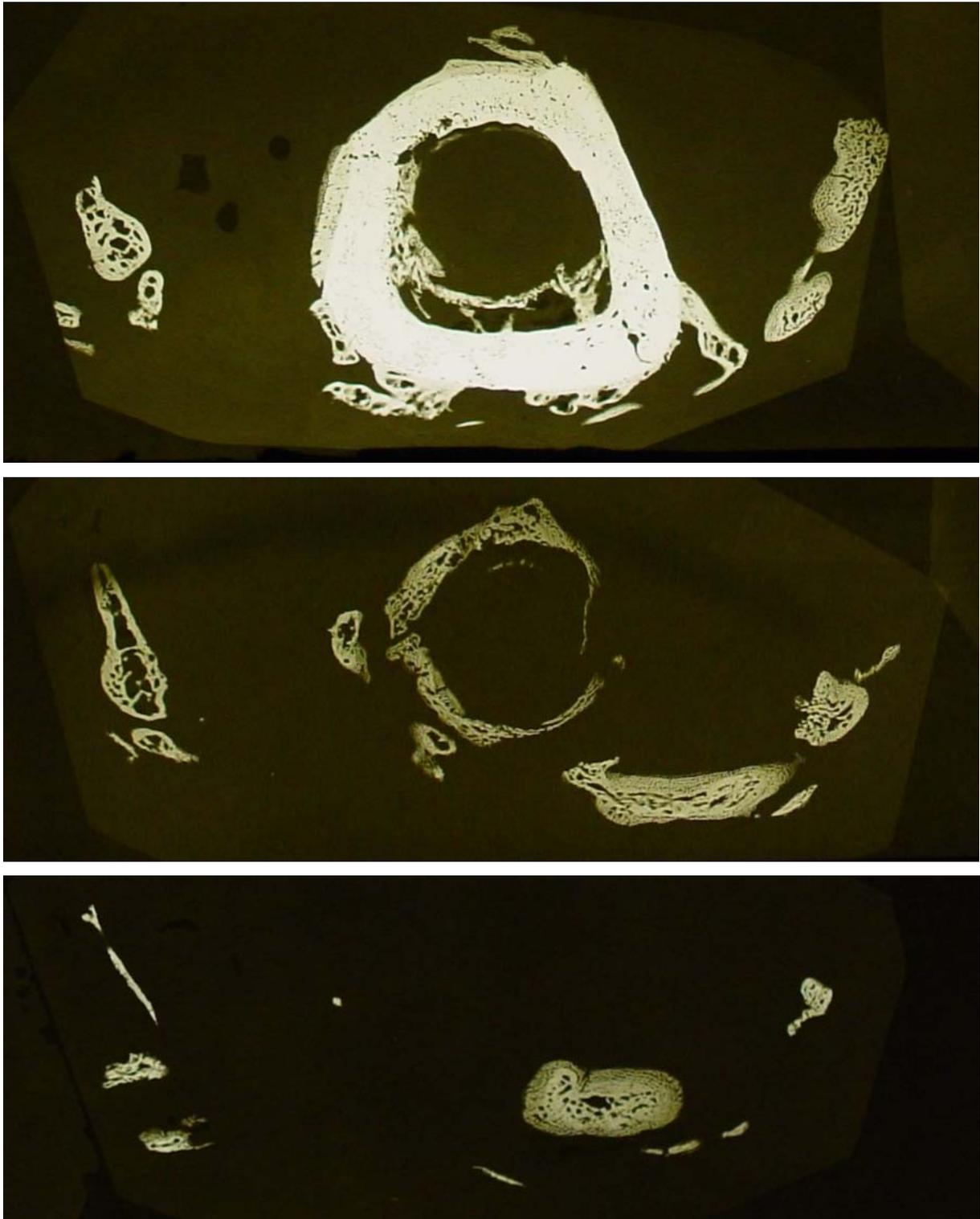


Abb. 3-16 Mikroradiographien von Tier-Nr. 1 aus Gruppe 1 (OP-1). Oben ist Schnittebene 1 mit dem Anschnitt der Kortikalis an der proximalen Defektkante dargestellt, in der Mitte Schnittebene 2 und unten Schnittebene 3. Es finden sich in allen Ebenen ausgeprägte heterotope Knochenneubildungen weit außerhalb des eigentlichen Defektbereiches in der umgebenden Muskulatur.

Ursächlich für diese außergewöhnlich starke Knochenneubildung, die bei keinem anderen Versuchstier in diesem Ausmaß beobachtet werden konnte, scheint das Vorliegen einer durch die bestehende Rotationsinstabilität begünstigten hypertrophen Pseudarthrose zu sein.



Abb. 3-17 Mikroradiographie von Tier-Nr. 8 aus Gruppe 2 (AS). Schnitt Ebene 3. Exzessive Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches bei Vorliegen einer hypertrophen Pseudarthrose. Zentrale und periphere Knochenanteile sind durch eine bindegewebige Schicht (Pfeile) voneinander getrennt.

Dementsprechend fällt bei genauerer Betrachtung auf, daß der neugebildete Knochen im unteren Anteil des Bildes durch eine bindegewebige Schicht vom zentralen Anteil des neugebildeten Knochens abgetrennt erscheint.

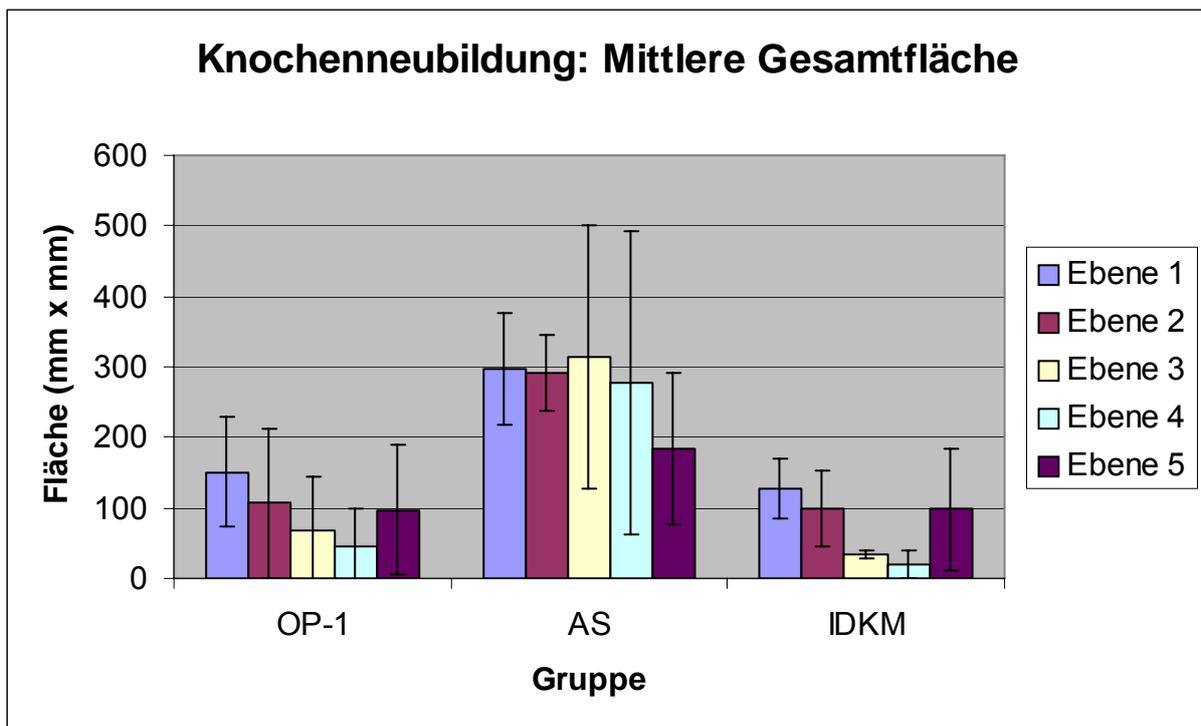


Abb. 3-18 Mikroradiographie. Quantitative Auswertung in der Longitudinalebene.

Bei der quantitativen histomorphometrischen Auswertung wurde die Knochenneubildung sowohl in der Longitudinalebene als auch in der Transversalebene betrachtet. Entlang der Longitudinalebene zeigte sich in Gruppe 1 (OP-1) innerhalb des Defektes in den Schnittebenen 2-4 eine von proximal nach distal abnehmende Knochenneubildungsrate (Abb. 3-18). Am meisten Knochen wurde durchschnittlich an der proximalen Defektkante (Schnittebene 1) gebildet ($150,7 \pm 78,2 \text{ mm}^2$), am wenigsten in Schnittebene 4 ($45,8 \pm 53,2 \text{ mm}^2$).

In Gruppe 2 (AS) zeigte sich dagegen mit $314,7 \pm 186,4 \text{ mm}^2$ die stärkste Knochenneubildung in der Defektmittle in Schnittebene 3 (Tab. 7-7). Die geringste Knochenneubildungsrate zeigte sich in dieser Gruppe mit $184,1 \pm 108,8 \text{ mm}^2$ an der

distalen Defektkante in Schnittebene 5. In Gruppe 2 ist mit Tier-Nr. 8 ein Ausreißer auffällig, bei dem in den Schnittebenen 3 und 4 mehr als doppelt so viel Knochen gebildet wurde wie bei allen anderen Versuchstieren dieser Gruppe. Ursächlich hierfür scheint wie bereits erwähnt eine hypertrophe Pseudarthrosenbildung zu sein.

In Gruppe 3 (IDKM) zeigte sich ähnlich wie in Gruppe 1 (OP-1) innerhalb des Defektes in den Schnittebenen 2-4 eine von proximal nach distal abnehmende Knochenneubildungsrate bei jedoch insgesamt deutlich geringerer Knochenneubildung innerhalb des Defektes als bei Gruppe 1 (Abb. 3-18). Am meisten Knochen wurde auch in Gruppe 3 mit $127,4 \pm 41,5 \text{ mm}^2$ an der proximalen Defektkante (Schnittebene 1) gebildet, am wenigsten in Schnittebene 4 ($19,7 \pm 19,4 \text{ mm}^2$). Auffällig ist dabei, daß die Knochenneubildungsraten in den Schnittebenen 1, 2 und 5 mit denjenigen in der Gruppe 1 (OP-1) vergleichbar sind, während die Knochenneubildungsraten in den Schnittebenen 3 und 4 nur etwa halb so groß sind wie diejenigen in Gruppe 1.

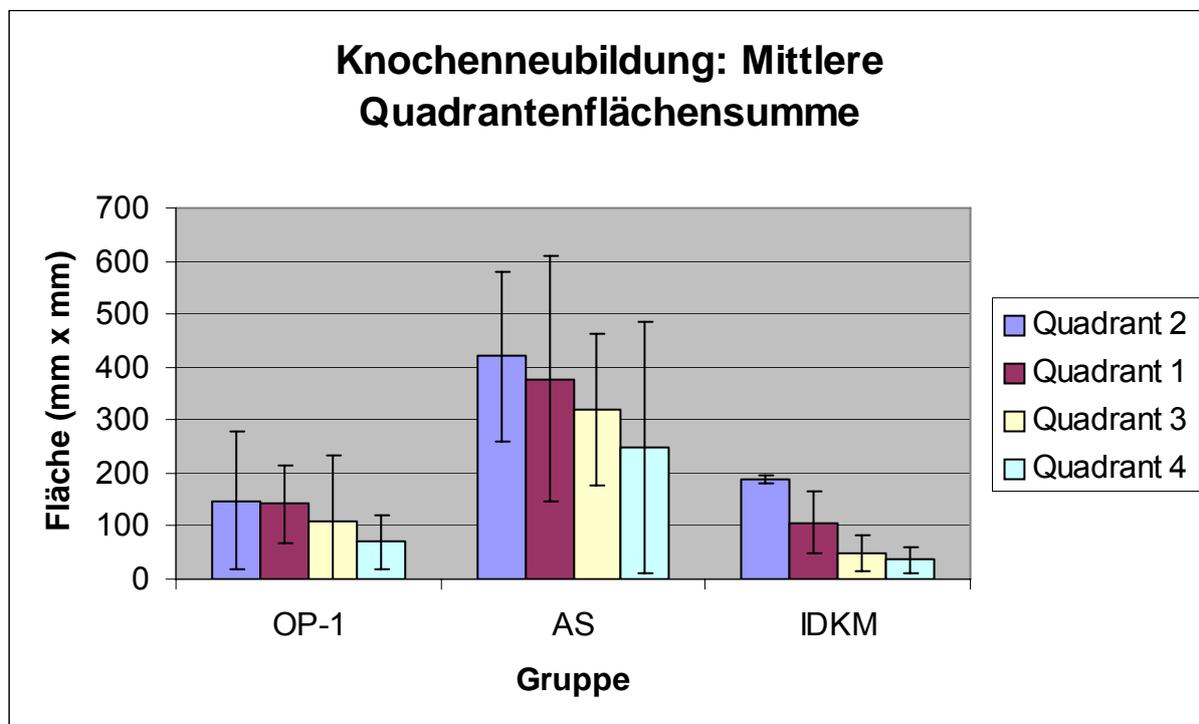


Abb. 3-19 Mikroradiographie. Auswertung in der Transversalebene.

Bei der quantitativen Auswertung in der Transversalebene zeigte sich bei allen drei Gruppen ein vergleichbarer Verlauf mit der größten Knochenneubildungsrate in Quadrant 2 (dorsolateral), gefolgt von Quadrant 1 (dorsomedial) und Quadrant 3 (anterolateral). In Quadrant 4 (anteromedial) war bei allen drei Gruppen die geringste Knochenneubildungsrate zu verzeichnen (Abb. 3-19). In der graphischen Darstellung in Abb. 3-19 wurde die Reihenfolge der Quadranten nach abnehmender Lagerqualität geordnet. Dadurch wird nun offensichtlich, daß in allen Gruppen die Knochenneubildung entsprechend der Lagerqualität verstärkt dorsolateral erfolgt und anteromedial am geringsten ist. Dabei scheint der Einfluß der Lagerqualität in Gruppe 2 (AS) und Gruppe 3 (IDKM) größer zu sein als in Gruppe 1 (OP-1).

In Gruppe 1 (OP-1) betrug die Knochenneubildungsrate in Quadrant 2 (dorsolateral) $148,1 \pm 128,8 \text{ mm}^2$ und in Quadrant 4 (anteromedial) $70,0 \pm 50,1 \text{ mm}^2$, also knapp der Hälfte aus Quadrant 2. In Gruppe 2 (AS) betrug die Knochenneubildungsrate in Quadrant 2 (dorsolateral) $420,5 \pm 159,6 \text{ mm}^2$ und in Quadrant 4 (anteromedial) $247,0 \pm 236,7 \text{ mm}^2$, also mehr als der Hälfte aus Quadrant 2. In Gruppe 3 (IDKM) betrug die Knochenneubildungsrate in Quadrant 2 (dorsolateral) $188,5 \pm 6,2 \text{ mm}^2$ und in Quadrant 4 (anteromedial) $36,6 \pm 23,9 \text{ mm}^2$, also weniger als ein Fünftel aus Quadrant 2. In Gruppe 1 (OP-1) ist die Knochenneubildung bei der schlechtesten Lagerqualität (Quadrant 4) fast doppelt so groß wie in Gruppe 3 (IDKM).

3.6.2. Lichtmikroskopie

In der Färbung nach Laczko-Levai konnte in allen Versuchsgruppen innerhalb des Defektbereiches unreifer Geflechtknochen dargestellt werden (Abb. 3-20 bis 3-23). Dabei konnten keine qualitativen morphologischen Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 3-22 und 3-23). Zur Verdeutlichung der ungerichteten Struktur des unreifen Geflechtknochens ist in Abb. 3-24 die Grenzzone zwischen gerichtetem Lamellenknochen der Kortikalis und neu gebildetem unreifem Geflechtknochen dargestellt.

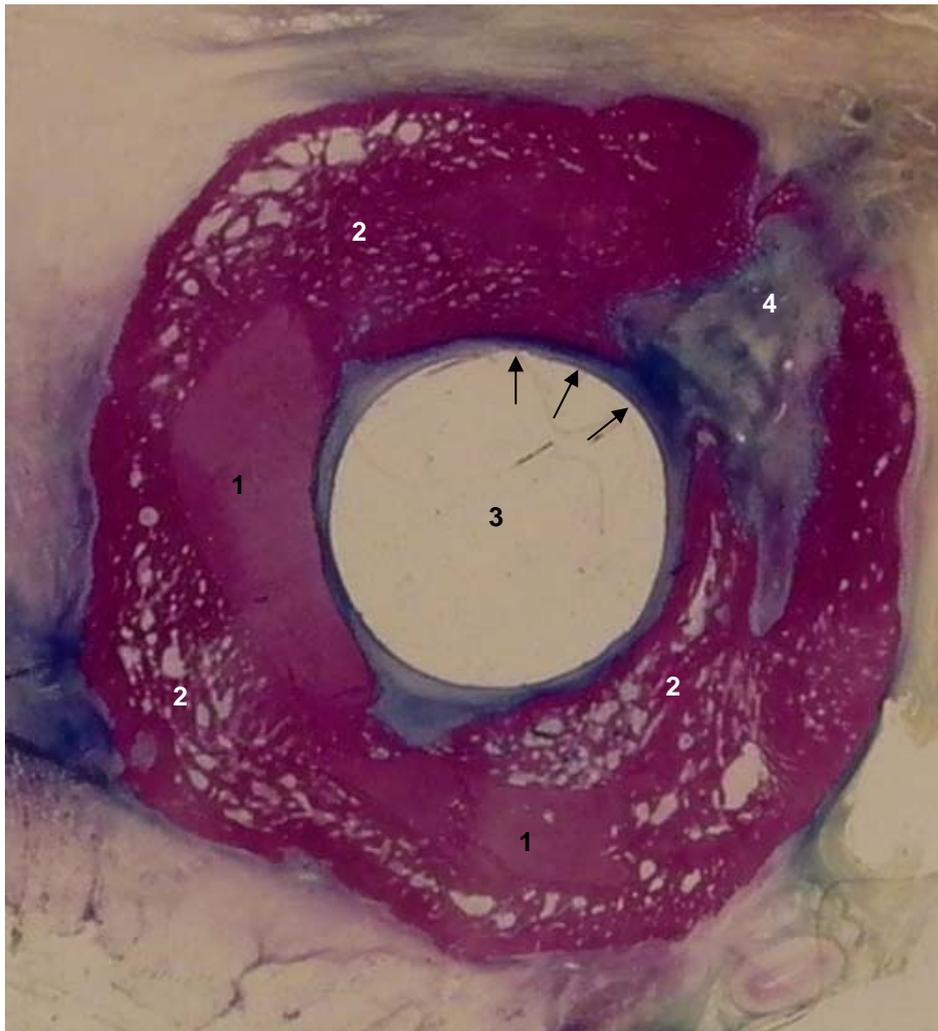


Abb. 3-20 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 8 (AS) aus Schnittebene 1 in der Färbung nach Laczko-Levai. Makroaufnahme des gesamten Schnittes. Links und unten ist kortikaler Knochen mit angeschnitten (1), dieser ist umgeben von ungerichtetem Geflechtknochen (2). Im zentralen Loch (3) lag der geringfügig rotationsinstabile Marknagel. Rechts oben befindet sich eine kleine knöcherne Defektzone mit eingewachsenem hellblau bis grau gefärbtem Bindegewebe (4). Oben ist an der Grenzzone zwischen neu gebildetem Geflechtknochen und Marknagellager eine dunkelblau-violette Zone mit gelenktypischem Knorpelgewebe (Pfeile) zu erkennen.

Als unerwarteter und interessanter Nebenbefund war bei mehreren Versuchstieren eine lokalisationsabhängige Ausbildung von aus histomorphologischer Sicht betrachtet gelenktypischem Knorpelgewebe am Interface zwischen dem geringgradig rotationsinstabilen Marknagel und dem neu gebildeten Knochen auffällig (Abb. 3-20 und 3-25 bis 3-28).

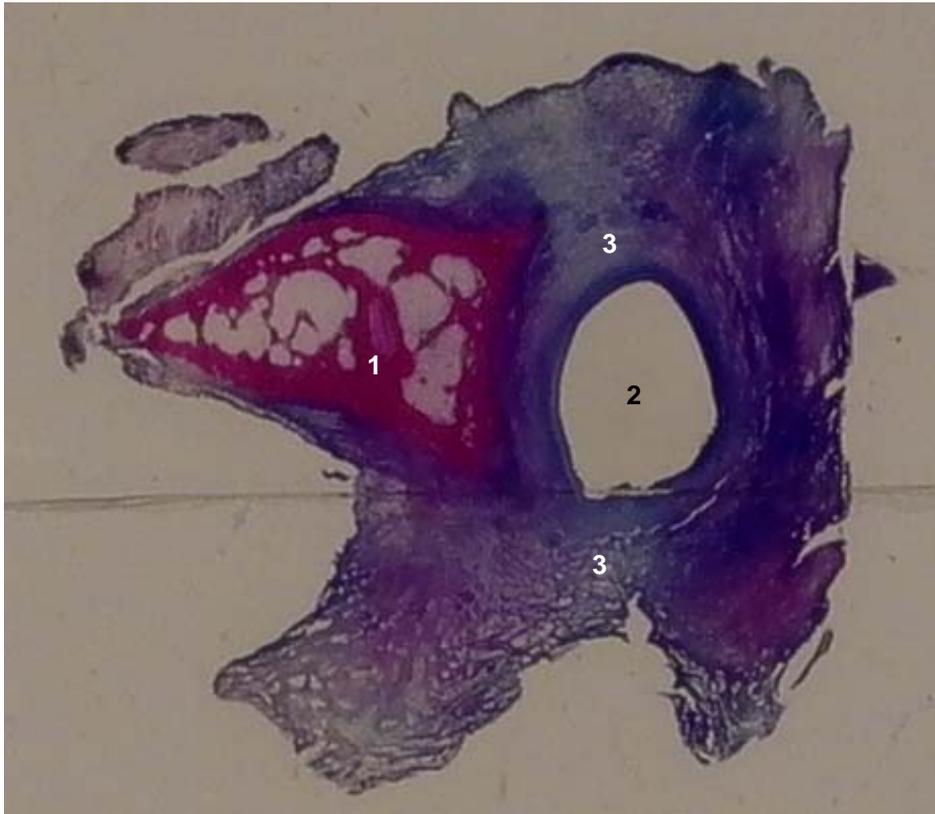


Abb. 3-21 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 13 (IDKM) aus Schnittebene 3 in der Färbung nach Laczko-Levai. Makroaufnahme des gesamten Schnittes. Links ist neu gebildeter ungerichteter Geflechtknochen zu erkennen (1). Das zentrale Loch (2), in dem der Marknagel lag, ist deutlich entrundet, da es fast in der gesamten Zirkumferenz nur von weichem Bindegewebe (3) umgeben ist.

Dieser neugebildete gelenktypische Knorpel fand sich auffälligerweise insbesondere an Lokalisationen, wo in unmittelbarer Nähe simultan auch neuer Knochen gebildet wurde (Abb. 3-25). Wie bei einer echten hyalinen Gelenkfläche befand sich der neugebildete Knorpel dabei an der Grenzzone zum mobilen Marknagel hin und stand über eine regelrechte subchondrale Platte in fester Verbindung mit dem darunter liegenden simultan gebildeten Knochen (Abb. 3-26). Bei starker Vergrößerung konnten die in charakteristischen Zellgruppen (Chondronen) formierten rundlich-ovalen Knorpelzellen nachgewiesen werden (Abb. 3-27).

In einigen Fällen war sogar eine offensichtlich belastungsabhängige Ausrichtung der Knorpelzellen und Kollagenfasern auffällig.

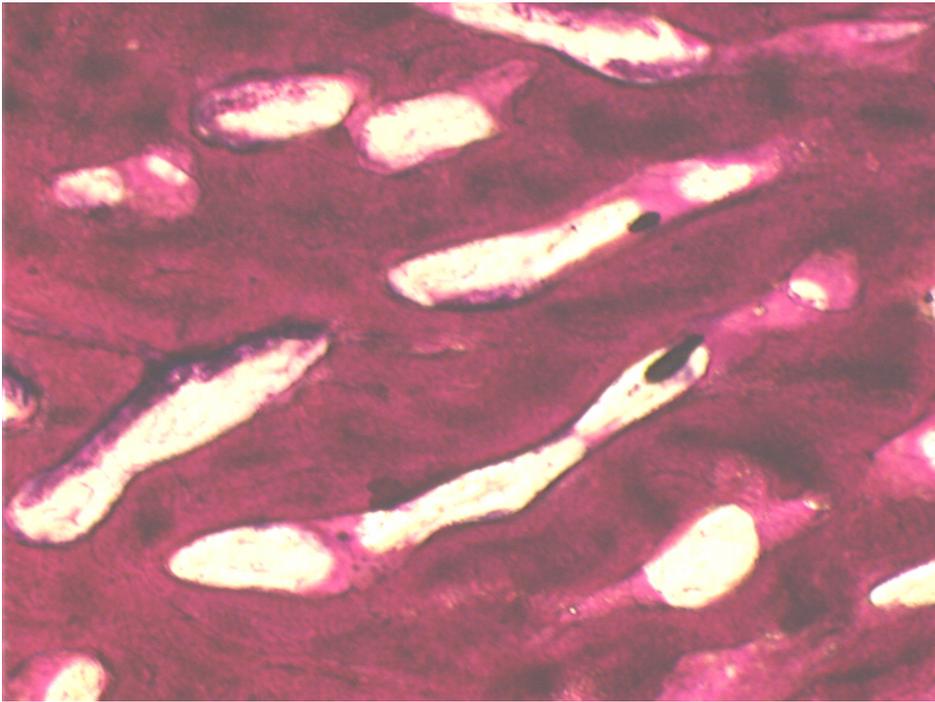


Abb. 3-22 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 3 (OP-1) aus Schnittebene 3 in der Färbung nach Laczko-Levai. Vergrößerung 25-fach. Ungerichteter Geflechtknochen.

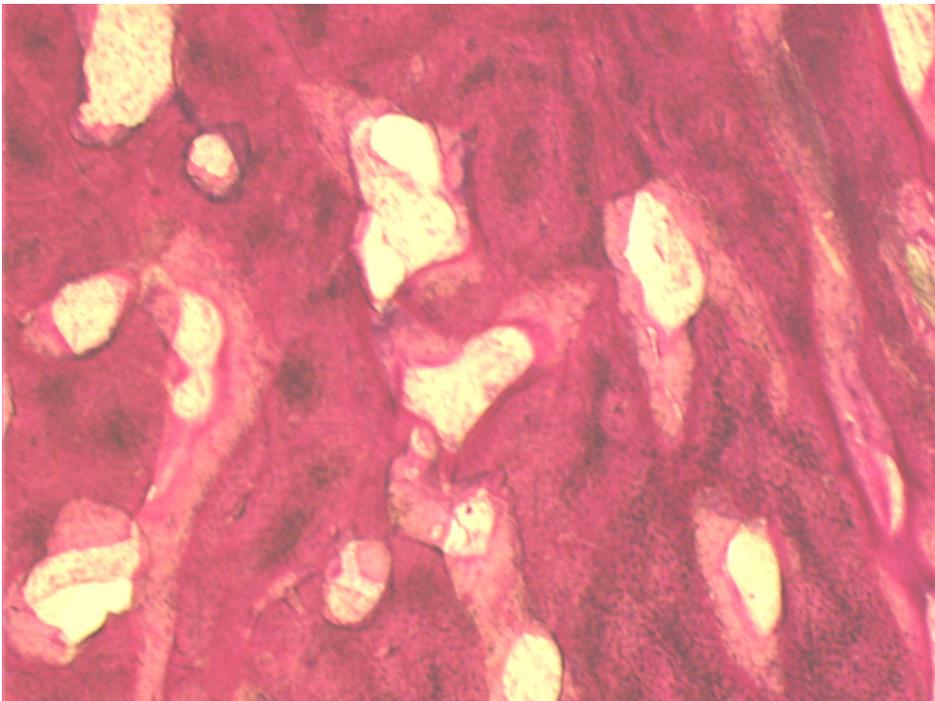


Abb. 3-23 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 7 (AS) aus Schnittebene 3 in der Färbung nach Laczko-Levai. Vergrößerung 25-fach. Ungerichteter Geflechtknochen.

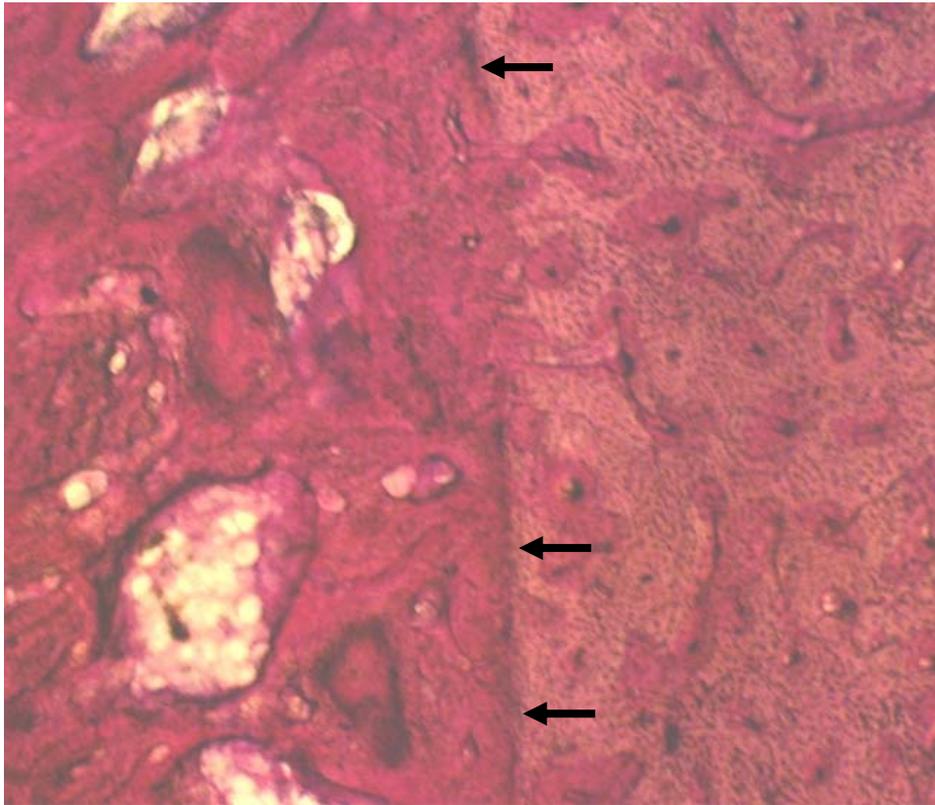


Abb. 3-24 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 1 (OP-1) aus Schnittebene 1 in der Färbung nach Laczko-Levai. Vergrößerung 25-fach. Die Pfeile markieren die Grenzzone zwischen gerichtetem Lamellenknochen der Kortikalis (rechts) und neu gebildetem ungerichtetem Geflechtknochen (links).

Dabei fand sich in den tiefen Knorpelschichten am Übergang zum subchondralen Knochen eine charakteristische Ausrichtung der Knorpelzellen und Kollagenfasern in Form von Säulenknorpel als Ausdruck einer bestehenden Druckbelastung (Abb. 3-28). In den knochenfernen oberflächlichen Knorpelschichten in Richtung Grenzzone zum Marknagel hin fand sich dagegen eine zunehmend tangentielle Ausrichtung des Knorpels als offensichtliche Reaktion auf Scherbelastungen am Interface (Abb. 3-28).

Bei vier von fünf mit Osteogenic Protein-1 behandelten Versuchstieren konnte eine derartige lokalisationsabhängige und gerichtete Knorpelbildung im Sinne einer Art Neo-Gelenkbildung zum mobilen Marknagel hin beobachtet werden (Tab. 7-9). Dieses Phänomen war in den anderen beiden Gruppen jeweils nur in einem Fall und auch nur in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar (Tab. 7-9).



Abb. 3-25 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 8 (AS) aus Schnittebene 3 in der Färbung nach Laczko-Levai. Makroaufnahme des gesamten Schnittes. Mehr als 75% der Zirkumferenz des zentralen Loches (1), in dem der Marknagel lag, sind von neu gebildetem Geflechtknochen (2) umgeben. Lediglich rechts oben findet sich eine Zone mit hellblauem Bindegewebe (3) an der Grenzzone zum Marknagel. Bei radiologischem Befund einer hypertrophen Pseudarthrose in dem Bereich, aus dem dieser Schnitt stammt, kommt in der unteren Hälfte des Schnittes eine ausgedehnte dunkelblau-violette Knorpelzone (4) zur Darstellung, welche den linken unteren knöchernen Bereich vom zentralen knöchernen Bereich abtrennt. Auch am Interface zwischen Knochen und Marknagel sind knorpelige Regionen erkennbar (Pfeile). Vgl. auch Abb. 3-17.

Eine tangentielle Ausrichtung in den oberflächlichen Knorpelschichten war bei zwei von fünf mit OP-1 behandelten Versuchstieren nachweisbar, in den beiden anderen Gruppen jeweils nur bei einem Versuchstier. Eine Neo-Gelenkfläche mit einer Ausdehnung von mehr als 25% der endostalen Zirkumferenz konnte bei drei von fünf Versuchstieren aus Gruppe 1 und bei einem von vier Versuchstieren aus Gruppe 2 beobachtet werden (Tab. 7-9).

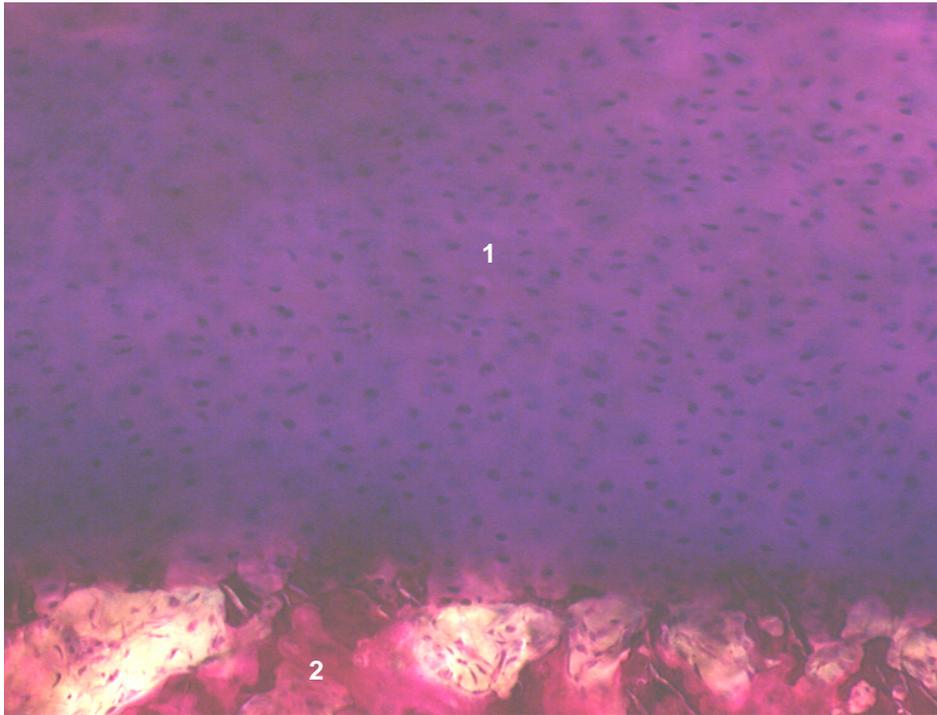


Abb. 3-26 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 3 (OP-1) aus Schnittbene 1 in der Färbung nach Laczko-Levai. Vergrößerung 100-fach. Oben ist dunkelblauviolett gefärbtes zellreiches Knorpelgewebe dargestellt (1), darunter neu gebildeter subchondraler Geflechtknochen (2).

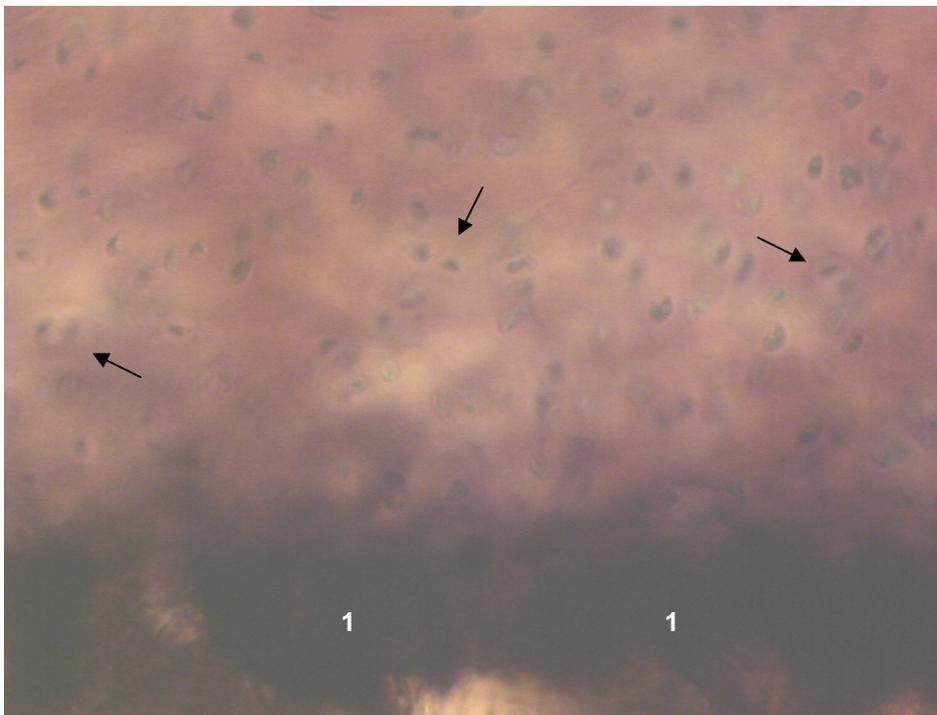


Abb. 3-27 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 3 (OP-1) aus der Grenzzone zwischen neu gebildetem Knochen (1) und Marknagel in Schnittbene 2 in der Färbung nach Laczko-Levai. Vergrößerung 200-fach. Deutlich zu erkennen sind die in typischen Zellgruppen (Chondronen) formierten rundlich-ovalen Knorpelzellen (Pfeile).

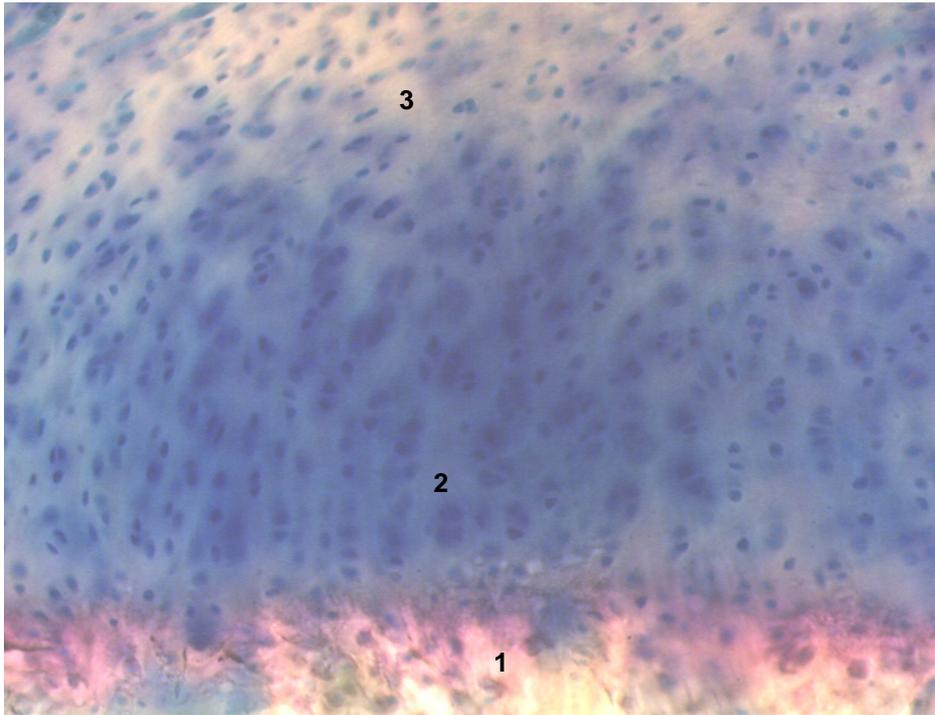


Abb. 3-28 Histologischer Schnitt von Tier-Nr. 5 (OP-1) aus der Grenzzone zwischen neu gebildetem Knochen (1) und Marknagel (oben) in Schnittebene 1 in der Alizarin-Toluidin-Färbung. Vergrößerung 100-fach. Lokalisationsabhängige Ausrichtung der Knorpelzellen als charakteristischer Säulenknorpel (2) in den knochennahen tiefen Schichten und zunehmend tangential (3) in Richtung Grenzzone zum Marknagel (oben).

Die maximale Dicke bzw. Höhe des neu gebildeten Knorpels betrug 1,17 mm in Gruppe 1 (OP-1), 0,95 mm in Gruppe 2 (AS) und 0,65 mm in Gruppe 3 (IDKM). Somit konnte eine qualitativ vergleichbare Knorpelbildung am Interface zwischen neugebildetem Knochen und Marknagel zwar in allen drei Versuchsgruppen beobachtet werden, aber die beschriebenen Effekte waren bei den mit OP-1 behandelten Versuchstieren in quantitativer Hinsicht insgesamt deutlich stärker ausgeprägt.

4. Diskussion

„Ob wir nun aber unsere Bemühung bloß für anatomisch erklären, so müßte sie doch, wenn sie fruchtbar, ja wenn sie in unserem Falle auch nur möglich sein sollte, stets in physiologischer Rücksicht unternommen werden. Man hat also nicht bloß auf das Nebeneinandersein der Teile zu sehen, sondern auf ihren lebendigen, wechselseitigen Einfluß, auf ihre Abhängigkeit und Wirkung.“¹²¹

J.W. von GOETHE (Entwürfe zu einem osteologischen Typus, 1796)

4.1. Versuchsmodell

4.1.1. Versuchsdesign

Anforderungsprofil

Anhand eines Extremmodells sollte versucht werden, die Möglichkeiten bzw. Grenzen des klinischen Einsatzes des bisher als sehr vielversprechend geltenden osteogenetischen Wachstumsfaktors Osteogenic Protein-1 (rhOP-1, BMP-7) als Bestandteil von Bioimplantaten zur Überbrückung langstreckiger segmentaler Knochendefekte aufzuzeigen.

Da sich die Fragestellung an der Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung bewegt und letztendlich die Frage nach der Übertragbarkeit der bisher gewonnenen Erkenntnisse auf den humanmedizinischen Einsatzbereich geklärt werden soll, muß ein derartiges Untersuchungsmodell eine möglichst realistische und klinisch-relevante Problemsituation widerspiegeln, wie sie beispielsweise bei massiven Knochensubstanzdefekten nach offenen Trümmerfrakturen, Infektionen oder ausgedehnten Tumorresektionen in der Klinik anzutreffen ist. Insbesondere an lasttragenden Extremitätenknochen resultieren

dabei häufig schwerwiegende Komplikationen wie etwa Pseudarthrosen oder Achsenfehlstellungen mit entsprechender Konsektivproblematik. So geht man aktuell davon aus, daß jede Pseudarthrose der Tibia zusätzliche direkte Kosten von etwa 7500 US-Dollar verursacht ¹²². Indirekte Folgekosten durch Arbeitsausfall während der Behandlungsphase werden mit bis zu 17000 US-Dollar angegeben ¹²³.

Unter dem Aspekt der klinischen Relevanz ergibt sich für ein entsprechendes Versuchsmodell daher folgendes Anforderungsprofil:

1. Segmentaler Kontinuitätsdefekt eines stark belasteten Extremitätenknochens
2. Defektgröße mindestens entsprechend der nach Heiple ¹⁰⁸ bzw. Johnson ¹⁰⁹ zu fordernden sogenannten kritischen Defektgröße von mehr als dem Zweifachen des entsprechenden Knochendurchmessers
3. Ungünstige Weichteilsituation im Implantatlager
4. Ungünstige Durchblutungsverhältnisse im Implantatlager
5. Ungünstige Osteosynthesebedingungen bzw. Fixationsmöglichkeiten
6. Größen- und Gewichtsverhältnisse möglichst nahe an der realistischen Situation in der Humanmedizin
7. Osteogenetisches Regenerationsvermögen der Versuchstierspezies möglichst entsprechend dem des Menschen

Tiermodell

Trotz begrüßenswerter und auch zunehmend erfolgreicher Bestrebungen hinsichtlich der Entwicklung von Alternativmethoden zu Tierversuchen erscheint ein Versuchsmodell mit einem derartigen Anforderungsprofil nur im Tierversuch realisierbar zu sein.

Die Knochenneubildung ist ein derart komplexer kaskadenartiger Ablauf, so daß eine Simulation der Vorgänge in vitro nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich ist ¹¹¹. Insbesondere setzt die Hauptfragestellung des Versuchsvorhabens nach der Fähigkeit des untersuchten Wachstumsfaktors zur Heilung großer Knochendefekte und damit dessen Verwendungsfähigkeit zum Knochenersatz in der Klinik die

Quantifizierung des neugebildeten Knochens und dessen biomechanischer Eigenschaften voraus. Dies ist nur in einer klinisch realistischen Situation in einem intakten Organismus möglich¹¹². So wird die Formbildung von Knochen auch durch Spannungs- und Druckkräfte bedingt, die bei Bewegung und Belastung des Knochens intravital auftreten. Ob durch Stimulation durch den verwendeten Wachstumsfaktor ein tragfähiger Röhrenknochen im Defektbereich entsteht, hängt somit auch von einer postoperativen Bewegung und Belastung der operierten Extremität ab.

In-vitro-Untersuchungen an Osteoblasten-ähnlichen Zellen oder an Knochenmarks-Zellkulturen geben lediglich Aufschluss über intra- und interzelluläre Stoffwechselforgänge in streng normiertem Milieu, das die intravitale Situation z.B. nach schwerem Trauma nicht adäquat imitieren kann^{111,112}.

Auch im Hinblick auf die Fragestellung nach einem gerechtfertigten Einsatz des zu testenden Wachstumsfaktors am Menschen ist es daher nicht nur aus grundsätzlichen versuchsimmanenten, sondern auch aus ethisch-moralischen Gründen zunächst notwendig, vorbereitende Versuche am Großtier durchzuführen.

Schafmodell

Als geeignetes Versuchstier stellt das ausgewachsene weibliche Merinoschaf einen den relevanten Faktoren bestmöglich entsprechenden Kompromiß dar. Dies läßt sich folgendermaßen begründen:

Aufgrund der Tatsache, daß sich nach Urist die Knochenregenerationskapazität eines Säugetieres annähernd indirekt proportional zu dessen Position auf dem phylogenetischen Stammbaum verhält, also z.B. bei Nagern wesentlich ausgeprägter ist als bei Primaten, soll das Versuchstier dem Menschen evolutionsbiologisch möglichst nahestehen¹²⁴. So ist z.B. bekannt, daß die Knochenneubildungsrate des Kaninchens⁶ diejenige des Menschen um mehr als eine Zehnerpotenz übertrifft, entsprechende Versuchsergebnisse sind daher als nicht auf den Menschen übertragbar anzusehen (siehe Anforderungsprofil Punkt 7).

Ein entsprechender Zusammenhang besteht laut Aspenberg auch hinsichtlich der Größe des Säugetieres ¹²⁵. Die Osteoinduktivität eines Transplantates nimmt mit zunehmender Größe des Versuchstieres ab, so daß die Knochenregenerationskapazität von Hunden, Schafen oder auch Primaten diejenige des Menschen nur noch um den Faktor 1,5 bis 2 übertrifft ¹²⁵.

Da die Knochenregenerationskapazität bei juvenilen Säugern wiederum bedeutend höher ist als bei adulten, soll die Skelettentwicklung beim Versuchstier bereits abgeschlossen sein und das Tier soll sich in einem mittleren Alter befinden, was bei etwa 3-5 Jahre alten Merinoschafen der Fall ist.

Die verwendete Tierart muß ausreichend große Extremitätenknochen aufweisen, damit ein entsprechend großer Knochendefekt gesetzt werden kann, der einem klinisch relevanten Substanzdefekt und auch den Knochenverhältnissen am Menschen entspricht. An kleinen Versuchstieren wie z.B. Nagern kann absolut gesehen nur ein kleiner Defekt gesetzt werden, der eine hohe Spontanheilungsrate besitzt und somit die geforderte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation beim Menschen nicht zuläßt. Ausgewachsene weibliche Merinoschafe haben ein mittleres Gewicht von etwa 50-75 kg und skelettale Größenverhältnisse, die denen des Menschen eher entsprechen, als dies z.B. beim Hund ⁷, beim Kaninchen ⁶ oder bei der afrikanischen Affenart *Cercopithecus aethiops* ⁸ der Fall ist (siehe Anforderungsprofil Punkt 6).

Das Schaf gehört wie auch der Mensch zu den Plazenta-Tieren (Monodelphiae) der Säugetier-Klasse, und der Aufbau des Knochens weist sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine dem Menschen vergleichbare Anatomie auf. Der Ablauf der Frakturheilung zeigt beim Schaf die gleichen Stadien wie beim Menschen ¹¹³.

Experimentelle Untersuchungen hinsichtlich der Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies bei der Verwendung als Modell der humanen Knochenregeneration weisen dem Schaf in sämtlichen wissenschaftlich relevanten Belangen deutliche Vorteile gegenüber Hund und Kaninchen aus ^{110,147}.

Aus diesen Gründen verfügen unsere Arbeitsgruppe sowie das Tierlabor unserer Klinik bereits über langjährige Erfahrungen bei Versuchen mit Merinoschafen einschließlich der Narkoseführung sowie der prä-, intra- und postoperativen Versorgung^{114-116,126-128}. Im Vergleich etwa zu Primaten sind Merinoschafe zudem leicht verfügbar und kostengünstig.

Als relativer Schwachpunkt kann an diesem Schafmodell somit lediglich die Tatsache kritisiert werden, daß Primaten als Versuchsobjekte dem Menschen phylogenetisch noch näher stehen als Schafe. Allerdings existieren bereits entsprechende Studien an Primaten⁸, wobei bei den üblicherweise zu Versuchszwecken verwendeten Primaten *Cercopithecus aethiops*⁸ oder *Papio ursinus*¹²⁹ bei einem mittleren Körpergewicht von etwa 30-35 kg wiederum die Übertragbarkeit der Größenverhältnisse auf den Menschen problematischer ist als beim Merinoschaf, so daß auch dieser Kritikpunkt relativiert zu betrachten ist, zumal in diesem Versuchsmodell im Hinblick auf die Fragestellung ja auch der klinische Aspekt betont werden sollte.

Obwohl das Merinoschaf nachgewiesenermaßen für osteologische Fragestellungen sehr gut geeignet ist, lagen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns noch keine Studienergebnisse über den Einsatz von rhOP-1 bei tibialen Problemdefekten an Schafen vor. Gerhart und Kirker-Head veröffentlichten 1993 eine Studie über den Einsatz von rekombinantem humanem Bone Morphogenetic Protein bei segmentalen femoralen Defekten am Schaf¹³⁰. Entsprechende Arbeiten über den Einsatz von rhOP-1 bei tibialen Defekten folgten erst ab 2003^{131,132}.

Kritisch beurteilt werden muss sicherlich, daß weibliche Merinoschafe einem jahreszeitlichen Hormonzyklus unterliegen. Dadurch besteht die Möglichkeit, daß zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten im Jahresverlauf eine unterschiedlich starke Östrogenausschüttung einen erheblichen Einfluß auf die Knochenneubildung haben kann. So konnte bereits 2004 gezeigt werden, daß die laborchemischen Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat bei weiblichen Merinoschafen auffälligen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen^{133,134}. 2007 konnte Arens schließlich relevante saisonale Änderungen des Knochenstoffwechsels und auch der Knochendichte bei Merinoschafen nachweisen, wobei bei den Merinoschafen wie

auch beim Menschen im Winter die geringste Knochendichte zu verzeichnen ist¹³⁵. Um diese saisonalen Einflussfaktoren auszuschließen wären männliche Merinoschafe möglicherweise besser geeignet als weibliche. Aktuell führen einige Arbeitsgruppen osteologische Studien zunehmend an männlichen Merinoschafen durch^{136,137,147}.

Gemäß dem Anforderungsprofil des Versuchsmodells der vorliegenden Studie ergaben sich für die weiblichen Merinoschafe folgende Eingangs- und Ausschlußkriterien:

Eingangskriterien:

- Alter 3-5 Jahre
- Gewicht 55-75 kg
- Größenverhältnisse mit möglichst geringer Streubreite

Ausschlußkriterien:

- Knochenpathologien jeglicher Art
- Präoperative Krankheitsanzeichen
- Schlechter Allgemein- oder Ernährungszustand
- Gravidität
- Sonstige operative Kontraindikationen

Segmentdefektmodell der Schafstibia

Für die Einschätzung von Schweregrad und Prognose eines massiven Knochen- substanzdefektes spielt die physiologische Belastungsstruktur des betroffenen Skelettabschnitts und damit die Defektlokalisierung eine entscheidende Rolle.

Häufig verwendete Untersuchungsmodelle an der Schädelkalotte mögen zwar z.B. unter histomorphometrischen Gesichtspunkten aus diversen Gründen, wohl nicht zuletzt auch wegen der regelmäßig sehr guten Resultate an diesem unbelasteten Skelettabschnitt, recht praktikabel sein, entbehren aber im Hinblick auf kritische

Problemdefekte eigentlich jeder klinischen Relevanz^{129,138}. Wie bereits erwähnt sind es insbesondere die Defekte an stark belasteten Extremitätenknochen (siehe Anforderungsprofil Punkt 1), die häufig von schwerwiegenden Komplikationen begleitet sind.

Grundsätzlich am stärksten belastet sind aufgrund der Schwerkraft die distalen Skelettabschnitte, abgesehen von kurzzeitigen lokalen Belastungsspitzen, wie sie z.B. an Acetabulum oder Schenkelhals auftreten können. Schon alleine aus diesem Grunde wäre gemäß dem Anforderungsprofil die Tibia z.B. dem Femur als Defektlokalisierung vorzuziehen¹³⁰.

Gerade die Schafstibia bietet aber für das angestrebte Versuchsmodell noch weitere entscheidende Vorteile:

- So sind die stark asymmetrisch und v.a. anteromedial extrem spärlich angelegten Weichteilstrukturen an der Schafstibia als ein äußerst ungünstiges und daher auch klinisch-realistisches Implantatlager (siehe Anforderungsprofil Punkt 3) zu bezeichnen, wohingegen am Schaffemur ein allseitiger, stark ausgebildeter und zudem gut durchbluteter Muskelmantel vorhanden ist, wie er bei problematischen Knochensubstanzdefekten nach schwerem Trauma, Infektion oder Tumorresektion in der Klinik kaum anzutreffen ist¹³⁰.
- Neben der Weichteilgewebeanlage ist auch die Durchblutungssituation an der Schafstibia insofern als besonders kritisch anzusehen, als daß i.d.R. nur eine den Unterschenkel versorgende Hauptarterie vorhanden ist (siehe Anforderungsprofil Punkt 4).
- Zudem ist die Fibula beim Merinoschaf nur rudimentär als i.d.R. kaum erkennbarer Sporn am lateralen Tibiaplateau angelegt, so daß im Gegensatz zur Situation bei Primaten keine entsprechende Sekundärstabilisierung der Tibia über die Fibula existiert⁸.

Hinsichtlich der zu wählenden Defektgröße bietet die nach Heiple bzw. Johnson zu fordernde sogenannte kritische Defektgröße von mehr als dem Zweifachen des entsprechenden Knochendurchmessers (siehe Anforderungsprofil Punkt 2) eine bereits wissenschaftlich belegte Orientierungsgrundlage^{108,109}.

Aus auswertungstechnischen Gründen sollte dabei die Defektlänge bei allen Versuchstieren einheitlich sein und nicht etwa in einer festen Relation an die jeweiligen Tibia-Maße angepaßt werden. Ausgleichend wurde bei den Eingangskriterien für die Versuchstiere auf eine möglichst geringe Streubreite der Größenverhältnisse geachtet.

Da bei den nach den Eingangskriterien als Versuchstier geeigneten Merinoschafen die Tibialänge im Mittel mit 20-25 cm und der mittlere Tibiaschaftdurchmesser im mediodiaphysären Bereich mit rund 2,25 cm zu veranschlagen ist, resultierte als sicher kritische Defektgröße eine Defektstrecke von 5,0 cm (siehe Tabelle 6-1 im Anhang).

Bei einer Defektlänge von $L = 5,0$ cm, einem mittleren Defektdurchmesser von $D = 2,25$ cm und einem mittleren Marknageldurchmesser von $M = 1,0$ cm kann daher nach der Formel

$$V = L \times \pi \times \left(\left(\frac{D}{2} \right)^2 - \left(\frac{M}{2} \right)^2 \right)$$

von einem mittleren effektiven Defektvolumen V von etwa 15 ml ausgegangen werden. Bleibt dagegen das Marknagelvolumen unberücksichtigt, so resultiert eine klinisch relevante tatsächliche Defektgröße von etwa 20 ml, welche nun unabhängig vom jeweiligen Osteosyntheseverfahren auch mit anderen Studien verglichen werden kann.

In den bisher veröffentlichten Studien zur vorliegenden Thematik wurde überwiegend mit vergleichsweise geringen Defektlängen von 2,5 cm (Cook 1994), 2,0 cm (Cook 1995) bzw. 2,5 cm (Gerhart und Kirker-Head 1993) gearbeitet^{7,8,130}. Erst 2006 publizierte Pluhar ein mit unserem Modell vergleichbar großes Defektmodell an der

Schafstibia mit einer Defektstrecke von 5,0 cm¹³². Das durchschnittliche Defektvolumen wurde dabei allerdings mit nur 10,0 ml angegeben.

In der vorliegenden Studie ist damit das bislang größte Defektmodell zur Untersuchung eines osteogenen Wachstumsfaktors realisiert.

Extremvariante des Segmentdefektmodells

Da in einer klinischen Problemsituation gegebenenfalls auch ungünstige Osteosynthesebedingungen mit unzureichenden Fixationsmöglichkeiten vorliegen können, sollte auch dieser Aspekt im vorliegenden Versuchsmodell berücksichtigt werden. Eine kontrollierbare und einheitliche Instabilität der verwendeten Marknagel-Osteosynthese läßt sich hierbei dadurch erzielen, daß bei der Osteosynthese zur Verriegelung des Marknagels Kortikalisschrauben verwendet werden, die einen für den eingebrachten Marknagel zu geringen Durchmesser aufweisen. Je nach Durchmesser der Schrauben läßt sich somit der Freiheitsgrad der hierdurch entstehenden Rotationsinstabilität der Osteosynthese determinieren.

Um eine deutliche Rotationsfreiheit von insgesamt etwa 10° zu ermöglichen, müssen Schrauben verwendet werden, deren Durchmesser um 0,5 mm geringer ist als derjenige der entsprechenden Schraubenlöcher. Wir verwendeten 4,5 mm Kortikalisschrauben bei einem Schraubenlochdurchmesser im Marknagel von 5,0 mm. Gemäß der Gleichung

$$U / d = M \pi / d = 360^\circ / \alpha = 31,42 / 0,25 = 125,68$$

ergibt sich somit ein einfacher maximaler Rotationswinkel der Schraube von der Neutralstellung bis zum Anschlag von $\alpha = 360^\circ / 125,68 = 2,86^\circ$.

Da die Schraube in beide Richtungen um den Winkel α rotieren kann und sich die Bewegungen der proximalen und distalen Verriegelung addieren können, errechnet sich für die Marknagel-Osteosynthese nun eine maximale Rotationsinstabilität von 4α entsprechend 11°.

Bei der Verriegelung des Marknagels mußte dabei darauf geachtet werden, daß alle Schrauben exakt lotrecht zum Marknagel und genau in die Mitte der Schraubenlöcher eingebracht werden. Noch in situ erfolgten Rotationskontrolle und eventuelle Korrekturen der Verriegelung.

Da die Versuchstiere postoperativ in ihrer Bewegungsfreiheit in keiner Weise (z.B. durch Orthesen bzw. Gips oder Bauchgurt-Aufhängung) eingeschränkt wurden, herrschte somit im Defektraum eine erhebliche mechanische Unruhe bis zu dem Zeitpunkt, an dem eine erste Kallusbrücke ausgebildet wurde.

Durch die beschriebene kontrollierte Rotationsinstabilität wird das Segmentdefektmodell der Schafstibia zu einem klinisch-realistischen Extremmodell, das höchste Ansprüche an ein osteoinduktives Implantat stellt. Ein vergleichbares Untersuchungsmodell mit kontrollierter Instabilität wurde bislang noch nicht publiziert.

Ferner sollte durch die beschriebene kontrollierte Rotationsinstabilität zuverlässig vermieden werden, daß es bereits durch alleinige Spongiosatransplantation zu einer regelmäßigen Ausheilung des Defektes kommt. In der Literatur finden sich in diesem Zusammenhang mehrfach Ergebnisse mit überraschenden Spontanheilungen unbehandelter Segment-Defekte trotz Verwendung eines vermeintlich kritischen Defektmodells^{132,143}. So berichtete den Boer über ein Defektmodell an der Schafstibia mit einer Defektlänge von 3,0 cm entsprechend dem 1,8-fachen Durchmesser der Diaphyse. Dabei kam es in 33% der unbehandelten Defekte zu einer vollständigen Ausheilung¹⁴³.

Von entscheidender Bedeutung bei der Beurteilung derartiger Defektmodelle ist dabei auch immer, ob mit dem resezierten Knochen auch der Periostschlauch vollständig aus dem Defektbereich entfernt wurde. Dies ist in manchen Studien nicht der Fall bzw. nicht nachvollziehbar dargestellt^{131,143,144}.

Entlastungsmodell

Das in dieser Studie angewendete Entlastungsmodell mittels Tenotomie der Patellarsehne hat mehrere Vorteile gegenüber dem häufig auch verwendeten Modell mittels Tenotomie der Achillessehne^{139,140,145,146}. Zum einen kann nach Tenotomie der Patellarsehne in den ersten Wochen nach Operation kein aktives Belasten der Tibia erfolgen. Nach Tenotomie der Achillessehne können die Tiere zwar den Fuß nicht aktiv belasten, sehr wohl aber über den Kalkaneus aufstehen und auf diesem Stehen und somit die operierte Tibia unkontrolliert belasten¹⁴⁵. Zum anderen ermöglicht das Modell mittels Tenotomie der Patellarsehne durch die sukzessive Aktivierung des Reservestreckapparates eine stetig zunehmende Teilbelastung bis hin zur Vollbelastung nach etwa sechs bis acht Wochen, wie dies ja auch in der klinischen Praxis erwünscht und üblich ist.

In der vorliegenden Studie mußte nur ein frakturbedingter Versuchstierausfall (Tier-Nr. 12) verzeichnet werden, was einem Anteil von 6,6% entspricht. Im Vergleich dazu kam es bei Anwendung von Entlastungsmodellen mit kompletter Tenotomie der Achillessehne zur Protektion der operierten Tibia zu frakturbedingten Versuchstierausfällen in bis zu sieben von 68 Fällen (10,3%), wobei hierbei zudem lediglich vergleichsweise kleine Defekte von bis zu 2 cm Länge vorlagen¹³⁹.

Unter Verzicht auf jegliche Entlastung war bereits bei kleineren Defektmodellen an der Schafstibia vermehrt ein Implantatversagen beobachtet worden^{144,148}. So wurde z.B. in einer Studie von Blokhuis bei 31 Schafen ein 3,0 cm langer segmentaler Defekt der Tibia mit einem Marknagel stabilisiert. Die Tiere wurden hinsichtlich der postoperativen Belastung in keiner Weise limitiert. Dabei brach bei zwei Versuchstieren der Marknagel distal des Defektbereiches¹⁴⁴.

4.1.2. Versuchstieranzahl

Da im Rahmen dieser Untersuchung eine den Ansprüchen der vergleichenden Statistik genügende Versuchsgruppengröße von mindestens 18 Tieren einerseits ohnehin als unrealistisch und als nicht durchführbar zu betrachten ist und

andererseits zur Klärung der Fragestellung im Verhältnis zum Aufwand, zur Zeitverzögerung und zur ethischen Problematik hierdurch auch keine bedeutenden zusätzlichen Informationen gewonnen werden können, erschien eine Beschränkung auf eine Mindest- bzw. Minimalstprobenanzahl für die Formulierung einer wissenschaftlichen Aussage bezüglich der Fragestellung als gerechtfertigt und unter dem Aspekt der Aktualität sicher auch als sinnvoll.

Folglich erübrigen sich auch umfangreiche statistische Auswertungen, welche nur eine de facto nicht ableitbare Exaktheit und Sicherheit der Ergebnisse suggerieren würden. Alle gemachten wissenschaftlichen Aussagen hinsichtlich der Fragestellung können nur mehr oder weniger deutliche Trends bzw. Tendenzen reflektieren und sollten daher auch als solche aufgefasst werden.

4.1.3. Versuchsdauer

Der Auswertungszeitpunkt wurde mit 12 Wochen postoperativ in Relation zum Ausmaß des Defektes bewußt früh gewählt, da bekannt ist, daß die Wachstumsfaktoren der BMP-Superfamilie vorwiegend in der Frühphase der osteogenetischen Kaskade wirksam sind^{4,95,122,149-151}. Somit kann ein durch rhOP-1 ausgelöster Effekt auch am deutlichsten in der Frühphase der Knochenheilung beobachtet werden. Nach einem sehr langen Beobachtungszeitraum von z.B. zwei Jahren wären diese Effekte möglicherweise nicht mehr erkennbar, falls es sowohl durch Implantation von rhOP-1 als auch durch Transplantation von autogener Spongiosa regelmäßig zu einer Ausheilung kommen würde.

Daher wurden sowohl die Versuchsdauer als auch das Defektmodell so ausgerichtet, daß man – basierend auf den vorliegenden Ergebnissen früherer Versuche aus unserer Arbeitsgruppe – davon ausgehen konnte, daß es durch alleinige Transplantation von autogener Spongiosa sicher nicht regelmäßig zu einer Ausheilung kommen konnte¹¹⁴⁻¹¹⁶. Somit würde man einen möglichen Vorteil von rhOP-1 gegenüber autogener Spongiosa am deutlichsten aufdecken können im Sinne der qualitativen Fragestellung “geheilt” oder “nicht geheilt”.

4.2. Auswertungsverfahren

4.2.1. Röntgenverlaufskontrollen

Röntgenverlaufskontrollen sind das klinische Standardverfahren zur Beurteilung der Frakturheilung. In den bisherigen vergleichbaren Studien zur Untersuchung des rekombinanten humanen Wachstumsfaktors OP-1 bei segmentalen Knochendefekten wurden jeweils Röntgenverlaufskontrollen mit einer Score-Bewertung als Hauptkriterium für die Beurteilung der Effektivität von OP-1 angewendet^{6-8,132}. Um eine Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit denen bisheriger Studien zu ermöglichen, wurden auch in dieser Studie Röntgenverlaufskontrollen durchgeführt und nach einem vergleichbaren Score-System bewertet. Problematisch ist hierbei sicherlich, daß eine Punktevergabe nach einem Score-System immer, auch wenn verblindet und kontrolliert durchgeführt, gewissen subjektiven Einflüssen unterworfen ist. Ferner existieren Hinweise dafür, daß die Ergebnisse aus Röntgenuntersuchungen speziell unter dem Einfluß von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren nicht immer verlässlich mit dem klinischen Outcome korrelieren⁹⁷. Ein weiteres Problem bei der Beurteilung von Röntgenbildern ist speziell bei der Transplantation von autogener Spongiosa, daß es nicht ohne weiteres möglich ist, neugebildeten Knochen von in den Defekt eingebrachter mineralischer Substanz in Form von autogener Spongiosa zu unterscheiden. Der direkte Vergleich mit den Gruppen, in denen keine mineralische Substanz eingebracht wurde, ist daher schwierig. Anhand der Röntgenaufnahmen kann letztlich nur sehr bedingt eine vergleichende quantitative Aussage bezüglich der Knochenneubildung getroffen werden, speziell in der Frühphase der Knochenneubildung. Als weitgehend verlässlich kann somit nur die auch in der klinischen Praxis übliche Formulierung einer qualitativen Aussage im Sinne von „geheilt“ oder „nicht geheilt“ gelten. Durch die Beurteilung von Defektüberbrückungen sowie von der Erkennbarkeit der Defektkanten in verschiedenen Ebenen ist insbesondere in der späten Phase der Knochendefektheilung auch eine brauchbare vergleichende quantitative Aussage möglich.

4.2.2. 3D-CT-Volumetrie

Aufgrund der beschriebenen Problematik, aus den Röntgenverlaufskontrollen eine sichere quantitative Aussage bezüglich der Knochenneubildung ableiten zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches durch dreidimensionale Vermessung mittels Computertomographie quantitativ zu erfassen. Dichtewerte von mehr als 100 Hounsfield-Einheiten werden dabei allgemein anerkannt dem Knochengewebe zugeordnet. Hierdurch ist eine sichere quantitative Erfassung von Knochengewebe innerhalb des Defektbereiches möglich. Daher stellte die 3D-CT-Volumetrie das zentrale Auswertungsverfahren in der vorliegenden Studie dar, in vergleichbaren Untersuchungsmodellen wurde dieses Verfahren bisher noch nicht angewandt^{6-8,132}. Da aber auch hierbei nach Transplantation von autogener Spongiosa das Problem besteht, zu beurteilen, ob neugebildeter Knochen oder eingebrachte mineralische Substanz vermessen wird, erfolgte zusätzlich eine weitere Aufschlüsselung des vermessenen Knochens nach Fraktionen mit Dichtewerten von mehr als 300, mehr als 600, mehr als 900 und mehr als 1200 Hounsfield-Einheiten. Falls nun die bei der autogenen Spongiosatransplantation eingebrachte mineralische Substanz einen entscheidenden Einfluß auf das Messergebnis haben sollte, so würde man erwarten, daß das Spektrum der Knochendichte hierbei im Vergleich zu den anderen Gruppen auch in Richtung höherer Dichte verschoben wäre, da innerhalb von 12 Wochen neugebildeter Knochen im Vergleich zu transplantierte Spongiosa unreifer und weniger mineralisiert ist. Somit erschien es möglich, zumindest einen wesentlichen möglichen Einfluß eingebrachter mineralischer Substanz beurteilen zu können.

4.2.3. Biomechanik

Aus den bereits unter Punkt 4.1.3. beschriebenen Gründen sollte die Versuchsdauer 12 Wochen betragen. Zu diesem Zeitpunkt ist eine biomechanische Auswertung eines segmentalen Knochendefektes dieser Dimension sicherlich als kritisch zu betrachten, zumal Hinweise dafür existieren, daß die Umbauvorgänge nach Knochendefektheilung i.S. des Remodeling auch nach einer Dauer von zwei Jahren noch nicht abgeschlossen sind¹⁵². Daher wurde auch das Modell der 4-Punkt-

Biegebelastung gewählt, um eine direkte Kraffteinleitung im Defektbereich zu vermeiden und auch bei geringerer Stabilität eine Aussage ableiten zu können. Alternativ hätte man bei doppelter Versuchstieranzahl jeweils die Hälfte der Versuchstiere jeder Gruppe nach einem längeren Beobachtungszeitraum von etwa ein bis zwei Jahren und gegebenenfalls auch erst nach Dynamisierung des Marknagels separat biomechanisch auswerten können, was zur Beantwortung der Fragestellung aber aus ethischen Gründen nicht gerechtfertigt erschien. Die Biomechanik spielte daher in der vorliegenden Studie eine untergeordnete Rolle.

4.2.4. Unentkalkte Knochenhistologie

Aufgrund der Fragestellungen hinsichtlich der Beurteilung von Knochenneubildung und Knochendefektheilung wurden die histomorphologischen Untersuchungen an unentkalkten Schnitten durchgeführt. Die Färbung nach Laczko-Levai ist eine hierfür geeignete Gegenfärbung für in Formaldehyd fixierte unentkalkte Knochenschnitte mit einer guten Farben-Strukturen-Zuordnung für die verschiedenen Bindegewebe¹²⁰. Kalzifizierter Knochen stellt sich bei dieser Färbung pinkfarben-rötlich dar, Knorpel violett, Kollagenfasern blau-violett, elastische Fasern rot und Muskelfasern grün-blau. Die zusätzlich in dieser Studie verwendete Färbung mit Alizarinrot S und Toluidinblau O dient insbesondere der Differenzierung von Knorpelgewebe und mineralisiertem oder verkalktem Hartgewebe. Alizarinrot S färbt dabei Kalziumsalze intensiv rötlich-orange, wohingegen die kalkfreie Knorpelmatrix metachromatisch rotviolett und die verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau erscheinen.

Bei vergleichbaren Untersuchungen sind in der Literatur neben der Färbung mit Toluidinblau auch die von Kossa Färbung und die Goldner Trichrom-Färbung beschrieben⁶⁻⁸. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurden auch Histologien an entkalkten Schnitten durchgeführt, z.B. zur Beurteilung von möglicherweise durch Wachstumsfaktoren ausgelösten Entzündungsprozessen¹³².

Die histomorphometrischen Vermessungen führten wir an Mikroradiographien durch, da bei dieser Methode eine optimale Unterscheidung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe möglich ist¹¹⁸. Mikroradiographien entsprechen

Röntgenbildern der histologischen Knochenschnitte in Originalgröße mit sehr guter Abbildungsschärfe, wodurch auch eine gute Unterscheidung von lamellärem, trabekulärem, spongiösem und kompaktem Knochen möglich ist. Neben der Bewertung der Knochenstruktur diente diese Untersuchungsmethode insbesondere zur quantitativen Beurteilung einer Abhängigkeit der Knochenneubildung von der Lokalisation und damit der unterschiedlichen Lagerqualität. Hierzu erfolgte neben der Einteilung des Defektbereiches in fünf Schnittebenen entlang der Longitudinalebene zusätzlich eine Unterteilung der Schnitte in der Transversalebene in vier Quadranten, so daß insgesamt eine vollständige dreidimensionale Beurteilung des Defektbereiches möglich war. Ein vergleichbares Vorgehen wurde in der einschlägigen Literatur bislang nicht beschrieben.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Röntgenverlaufskontrollen

Diese Studie bestätigt, daß durch den rekombinanten humanen osteogenen Wachstumsfaktor OP-1 auch ausgedehnte Problemdefekte der lasttragenden unteren Extremität knöchern überbrückt werden können. Allerdings zeigte sich in den radiologischen Ergebnissen dieser Studie, dass unter den strengen Bedingungen dieses Großtierversuchsmodells mit beabsichtigter kontrollierter Rotationsinstabilität und kritischer Defektgröße das osteoinduktive Potential von OP-1 insgesamt geringer erscheint als das der autogenen Spongiosa. Dies widerspricht den Ergebnissen vorausgehender Untersuchungen von Cook, welcher bei Studien mit kritischen Segmentdefekten an der Kaninchen-Ulna, an der Hunde-Ulna und an der Tibia und Ulna von Primaten dem OP-1 eine deutliche Überlegenheit gegenüber autogener Spongiosa zuschreibt⁶⁻⁸. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß in den Studien von Cook eine postoperative Immobilisierung mit gelenkübergreifenden Kunststoff-Gipsen erfolgte, ferner besteht bei den verwendeten Modellen an der Ulna und auch an der Primaten-Tibia eine Sekundärstabilisierung des defekten Knochens durch den Radius bzw. die Tibia. Auch Gerhart und Kirker-Head konnten bei ihrer Untersuchung des Wachstumsfaktors BMP-2 an einem Segmentdefekt des Schafsfemurs eine Überlegenheit des Wachstumsfaktors gegenüber der autogenen Spongiosa

beobachten ¹³⁰. Das größte Defektvolumen betrug bei diesen Studien allerdings lediglich 3,0 ml im Vergleich zu einem mittleren Defektvolumen von 20,0 ml in der vorliegenden Arbeit. Vor allem im Hinblick auf ein geeignetes Trägermaterial scheint somit nicht nur das relative, sondern auch das absolute Defektvolumen eine entscheidende Rolle zu spielen ⁹⁸. In unserem Versuchsmodell mit der bisher größten untersuchten Defektdimension von 20 ml war trotz gleicher Dosierung pro Volumeneinheit die Effektivität von OP-1 erheblich geringer als in vergleichbaren Studien mit deutlich kleinerem Defektvolumen ⁶⁻⁸.

In einer aktuellen Studie von Pluhar mit einem kritischen Segmentdefekt an der Schafstibia mit einem Defektvolumen von 10 ml wurde der relative Anteil des OP dagegen auf 3,5 mg OP-1 pro g Kollagen erhöht ¹³². Die Tibia wurde in dieser Studie mit einem aufgebohrten Marknagel rotationsstabil versorgt und die Versuchsdauer betrug vier Monate. Als Vergleichsgruppe diente lediglich eine Negativkontrolle mit unbehandelten Leerdefekten, daher sind Vergleiche mit der vorliegenden Arbeit kaum möglich.

In vorausgegangenen tierexperimentellen Untersuchungen zum Einsatz von OP-1 bei kritischen segmentalen Knochendefekten wurde unter Verwendung von OP-1 bereits mehrfach ein signifikant besseres radiologisches Ergebnis beschrieben als bei Verwendung von autogener Spongiosa ⁶⁻⁸. Bei genauerer Analyse finden sich z.B. in der Arbeit von Cook jedoch Fehler und nicht zulässige Schlussfolgerungen im Abstract des Artikels ⁸. In dieser Studie wurden kritische segmentale Kontinuitätsdefekte an Ulna und Tibia von Primaten mit OP-1 oder mit autogener Spongiosa behandelt. Die radiologische Auswertung erfolgte entsprechend der vorliegenden Untersuchung anhand eines Score-Systems. Im Abstract der Studie wird radiologisch eine komplette Heilung bei vier von fünf operierten Tibiae nach sechs bis acht Wochen beschrieben. Vergleicht man diese Angaben mit der Datentabelle, so fällt auf, daß diese vier von fünf operierten Tibiae einen Score-Wert von größer oder gleich 3 aufweisen, was in der Beschreibung der Score-Werte lediglich einer Überbrückung des Defektes an einer Lokalisation entspricht. In der Arbeit findet sich keine Angabe, ab welchem Score-Wert ein Defekt als geheilt gewertet wurde. Wendet man unsere Definition einer Heilung ab einem Score-Wert von mindestens 4 an, so zeigen sich nach 12 Wochen überraschenderweise exakt vergleichbare

Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit. Zu diesem Zeitpunkt erreichten in der Studie von Cook wie auch in unserer Arbeit zwei von fünf der mit OP-1 behandelten Tibiae einen Score-Wert von mindestens 4 (Tab.7-3). Bei Cook hatten drei von sechs (50%) und bei uns zwei von vier (50%) der mit autogener Spongiosa behandelten Tibiae einen Score-Wert von mindestens 4 (Tab. 7-3). Somit sind die Angaben im Abstract des Artikels sehr relativiert zu betrachten. Zu kritisieren ist ferner, daß in dieser Arbeit vier verschiedene Dosierungen von OP-1 bei fünf Versuchstieren getestet wurden.

Bei der Auswertung der Röntgenbilder der vorliegenden Untersuchung war bei mehreren Versuchstieren nach Implantation von OP-1 eine teilweise erhebliche Dislokation des osteoinduktiven Implantates aus dem Defektbereich heraus in die umgebenden Weichteile auffällig. Als Folge entstanden mitunter sehr ausgedehnte heterotop Ossifikationen (siehe Abb. 3-2, 3-3, 3-16). Ursächlich hierfür kann die Kompressionswirkung der Muskelpumpe bei zunehmender Mobilisation diskutiert werden. Die in unserer Studie beobachteten heterotopen Ossifikationen bestätigen die bereits von Ripamonti beschriebene Eigenschaft von OP-1, auch im Bereich der Muskulatur osteogene Eigenschaften zu besitzen ¹⁵⁵. Dabei wurde Primaten der Wachstumsfaktor OP-1 gebunden an eine kollagene Trägersubstanz in den M. rectus abdominis implantiert, und es konnten ausgeprägte heterotop Ossifikationen induziert werden. Sogar an einem unbelasteten Skelettabschnitt konnten nach Implantation von OP-1 in 25 mm durchmessende Defekte am Schädelknochen von Primaten Dislokationen des Implantates mit konsekutiven heterotopen Knochenneubildungen im M. temporalis beobachtet werden ¹⁵⁶.

Da dieser Effekt der Ausbildung von heterotopen Ossifikationen in den Kontrollgruppen der vorliegenden Untersuchung, insbesondere nach Transplantation von autogener Spongiosa, nicht beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß hierbei ein Zusammenhang mit der relativ flüchtigen Konsistenz des Gemisches aus Wachstumsfaktor und Kollagenträger ähnlich der von nassem Sand besteht ^{98,153,154}. Auch Shimmin, der im Rahmen humaner Pilotstudien bei verschiedenen therapierefraktären Pseudarthrosen mit kleinem Defektvolumen OP-1 mit gutem Erfolg verwendete, hat die Konsistenz des Trägers und das entsprechende Problem der Dislokation von OP-1 aus größeren Defekten heraus kritisiert ⁹⁸. Zur Vermeidung

dieses negativen Effektes wären eine alternative Form der Entlastung bzw. Immobilisierung oder eine geänderte Applikationsform des Wirkstoffes mit plastischer Konsistenz zu erwägen.

In aktuellen Untersuchungen wurde dementsprechend bereits an bovines Typ-I-Kollagen gebundene semi-synthetisch hergestellte Carboxymethylcellulose als Trägersubstanz erprobt (sog. OP-1 putty) ^{132, 157-161}. Dieses Polymer erhöht die Viskosität und Kohäsion der Gesamtsubstanz und kann als Diffusionsbarriere die Freisetzung verschiedener Faktoren modifizieren ^{162,163}. Durch die Funktion i.S. eines Binders verbesserte die Carboxymethylcellulose die physikalischen Eigenschaften hinsichtlich der Handhabung des OP-1-Implantates, ohne dadurch die osteogene Kapazität des Wachstumsfaktors nachteilig zu beeinflussen. Durch mehrere Studien konnten eine lokale oder systemische Toxizität der Carboxymethylcellulose ausgeschlossen werden ^{132,164}. Die kittartige Konsistenz des Composite-Implantates ermöglichte nun ein besseres Einbringen sowie auch ein sicheres Verbleiben des Materials in einem Segmentdefekt der Schafstibia. Dabei wurden keine Implantat-Dislokationen und nachfolgende heterotope Ossifikationen mehr beobachtet ¹³².

Dagegen konnte Geesink bei seinen Untersuchungen zum Einsatz von OP-1 zur Überbrückung von Segmentdefekten an der humanen Fibula ebenfalls durch Implantat-Dislokation entstandene heterotope Ossifikationen beobachten und sah diese sogar als mögliche Ursache für eine mechanische Beeinträchtigung der Muskelfunktion sowie für andauernde Schmerzen nach Belastungsaufbau an, was für eine klinische Anwendung von OP-1 natürlich von größter Bedeutung ist ¹⁰¹.

In diesem Zusammenhang finden sich in der aktuellen Literatur weitere Berichte über heterotope Ossifikationen und zum Teil lebensbedrohliche Komplikationen bei der Anwendung von BMP-2 im Bereich der Wirbelsäulen Chirurgie ¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. In einer CT-Analyse von Joseph wurde das Ausmaß der durch BMP-2 indizierten heterotopen Ossifikationen bei minimalinvasiven posterolateralen Wirbelkörperfusionen bestimmt. Dabei zeigte sich im Vergleich zur autogenen Knochentransplantation eine um mehr als 100% erhöhte Inzidenz von heterotopen Ossifikationen bei Anwendung des Wachstumsfaktors BMP-2 ¹⁶⁵. Shields beschrieb eine signifikante Rate an Komplikationen von 23,2% bei der Anwendung von BMP-2 bei ventralen

Wirbelkörperfusionen in Bereich der Halswirbelsäule¹⁶⁶. 2008 gab die amerikanische Gesundheitsbehörde (FDA) sogar eine öffentliche Warnung im Zusammenhang mit lebensbedrohlichen Komplikationen bei off-label Anwendungen von BMPs zur Wirbelkörperfusion im Bereich der Halswirbelsäule heraus¹⁶⁸. Der Behörde lagen mindestens 38 Berichte über Kompressionen der Atemwege oder der nervalen Strukturen im Bereich des Halses vor, welche teilweise eine erneute Intubation oder gar eine Tracheotomie erforderten. Diese Tatsachen bekräftigen die absolute Notwendigkeit einer sicheren Applikationsform für osteogene Wachstumsfaktoren.

4.3.2. 3D-CT-Volumetrie

Die 3D-CT-Volumetrie ermöglicht zusätzlich zur Auswertung der Röntgenbilder eine dreidimensionale quantitative Erfassung des neugebildeten Knochens innerhalb des Defektbereiches. Dieses quantitative Auswertungsverfahren wurde in vergleichbaren Untersuchungen bislang noch nicht angewandt.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die autogene Spongiosa in der 3D-CT-Volumetrie mit Abstand am meisten Knochenneubildung. Dabei ist zu berücksichtigen, daß dieses Ergebnis im Wesentlichen durch die überragende Knochenneubildung bei lediglich einem Versuchstier (Tier-Nr.8) zustande kommt, das auch innerhalb dieser Gruppe deutlich aus der Reihe fällt. Ursächlich hierfür ist die Ausbildung einer aktiven hypertrophen Pseudarthrose zu diskutieren.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind am deutlichsten in der Gesamtbetrachtung der Dichtewerte über 100 Hounsfield-Einheiten, da hierbei der noch wenig mineralisierte neugebildete Knochen am meisten zur Geltung kommt. Das mittlere Knochenneubildungspotential in Gruppe 2 (AS) betrug dabei $21,5 \pm 9,2$ ml, das von Gruppe 1 (OP-1) $9,4 \pm 2,5$ ml. Der Maximalwert in Gruppe 1 betrug 12,5 ml (Tier-Nr. 3) und entsprach damit annähernd dem effektiven Defektvolumen von 15 ml (Tab. 7-5). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die heterotopen Ossifikationen in Gruppe 1 (OP-1) zum großen Teil außerhalb des Defektbereiches lagen und nicht in die Messung eingegangen sind. Somit läßt sich vermuten, daß OP-1 bei Anwendung in Kombination mit einem geeigneten Träger, der eine Dislokation sicher verhindern

kann, grundsätzlich das Potential zur Ausheilung auch derartig großer knöcherner Substanzdefekte hat.

Bei Beurteilung der Knochenfraktionen mit zunehmender Knochendichte verlieren sich die beschriebenen Effekte, da hierbei schließlich fast nur noch die dichte Kortikalis der in allen Gruppen gleichermaßen miterfaßten Defektkanten in die Messung eingeht. Die Relationen der Fraktionen unterschiedlich dichten bzw. mineralisierten Knochens sind dabei in allen Gruppen vergleichbar.

Nicht restlos geklärt ist bisher allerdings, wie bereits erwähnt, die Frage, ob durch den in den Defektbereich eingebrachten Mineralsalzgehalt der transplantierten autogenen Spongiosa die Bewertung der Knochenneubildung in dieser Gruppe möglicherweise falsch positiv verzerrt werden könnte. Nach theoretischen Überlegungen müßte man dann aber in dieser Gruppe auch einen höheren relativen Anteil an sehr dichtem Gewebe erwarten, was nicht der Fall ist. Somit kann davon ausgegangen werden, daß durch die eingebrachte mineralische Substanz kein wesentlicher Einfluß auf die Aussagekraft der Messergebnisse besteht.

Das relativ gute Abschneiden der Kontrollgruppe mit Implantation des Kollagenträgers kann durch die von den Defektkanten ausgehende Spontanregeneration erklärt werden, welche in der Messung mit erfasst wurde. In diesem Zusammenhang haben bereits andere Autoren auf teilweise sehr überraschende Ergebnisse hinsichtlich der Spontanheilung bei als kritisch bezeichneten Segmentdefekten hingewiesen^{132,143}.

4.3.3. Biomechanik

Nach Implantation von OP-1 war lediglich eine von fünf operierten Tibiae klinisch stabil, dagegen konnten alle vier operierten Tibiae der Spongiosagruppe biomechanisch ausgewertet werden. In der Kontrollgruppe war erwartungsgemäß keine operierte Tibia klinisch stabil genug für eine biomechanische Auswertung. Die biomechanischen Ergebnisse zeigten bei allen getesteten Versuchstieren keine typischen Kennlinien für ein Bruchereignis, sondern lediglich Charakteristika einer plastischen Deformation bei einer vergleichbaren Größenordnung der Kraffteinleitung.

Daher sind diese Ergebnisse nicht sinnvoll auswertbar. Im Hinblick auf die Defektgröße, die beabsichtigte Rotationsinstabilität und die bewußt kurz gewählte Nachbeobachtungszeit ist dieses Ergebnis aber nicht überraschend und wurde für die Gruppen 2 (AS) und 3 (IDKM) auch so erwartet. Dadurch bestätigt sich die gewählte Strenge des Defektmodells, und eine eindeutige Überlegenheit des Wachstumsfaktors OP-1 gegenüber der autogenen Spongiosa hätte sich durch ein entsprechendes biomechanisches Ergebnis sicher nachweisen lassen.

In vorausgegangenen tierexperimentellen Untersuchungen zum Einsatz von OP-1 bei kritischen segmentalen Knochendefekten wurde dagegen unter Verwendung von OP-1 teilweise reichlich euphorisch eine signifikant höhere biomechanische Stabilität beschrieben als bei Verwendung von autogener Spongiosa^{8,169}. Bei genauerer Analyse finden sich z.B. in der Arbeit von Cook jedoch Fehler und nicht zulässige Schlussfolgerungen im Abstract des Artikels⁸. In dieser Studie wurden kritische segmentale Kontinuitätsdefekte an Ulna und Tibia von Primaten mit OP-1 oder mit autogener Spongiosa behandelt. Die biomechanische Auswertung erfolgte abweichend zu der vorliegenden Untersuchung als Torsionsversuch. Im Abstract wird hervorgehoben, daß die biomechanische Stabilität der mit OP-1 behandelten Tibiae durchschnittlich 69% der Stabilität der unversehrten kontralateralen Tibiae erreicht, bei den mit autogener Spongiosa behandelten Tibiae waren dies dagegen jedoch nur durchschnittlich 23%. Betrachtet man die genaueren Angaben in der entsprechenden Datentabelle, so fällt auf, daß lediglich drei der fünf mit OP-1 behandelten Tibiae biomechanisch getestet wurden, dagegen fünf von sechs der mit autogener Spongiosa behandelten Tibiae. Eine derart eindeutig überlegene biomechanische Stabilität nach Behandlung mit OP-1 läßt sich daher aus den Ergebnissen nicht ohne weiteres ableiten.

Auch in der Studie von Gerhart und Kirker-Head konnte nach Implantation von BMP-2 oder autogener Spongiosa in segmentale Kontinuitätsdefekte am Schafsfemur nach einer Versuchsdauer von 12 Wochen eine biomechanische Auswertung erfolgen¹³⁰. Dabei erreichten die mit dem osteogenen Wachstumsfaktor behandelten Knochen eine Bruchlast von 91% der unversehrten kontralateralen Knochen, die mit autogener Spongiosa behandelten dagegen nur eine Bruchlast von 77% der unversehrten kontralateralen Knochen. Allerdings sind bei den hierbei vorliegenden

Versuchsgruppengrößen von drei Tieren (BMP-2) bzw. zwei Tieren (autogene Spongiosa) wiederum keine sinnvollen statistischen Aussagen möglich.

Pluhar gibt in seiner Arbeit einschränkend zu bedenken, daß möglicherweise Periostanteile in den Defektbereichen verblieben sind, da es auch in den Leerdefekten zu überraschend guten Ergebnissen kam¹³². Somit könnten auch die sehr guten biomechanischen Ergebnisse nach Implantation von OP-1 durch im Defektbereich verbliebene Periostanteile mit verursacht worden sein. In der vorliegenden Arbeit wurde das Periost dagegen vollständig und jeweils mindestens 1 cm über die Defektkanten hinaus entfernt.

4.3.4. Unentkalkte Knochenhistologie

Hinsichtlich der qualitativen Beurteilung der Knochenneubildung wurde anhand der Mikroradiographie wie auch anhand der histologischen Färbungen in allen Gruppen unreifer Geflechtknochen registriert. Histomorphologisch ergaben sich dabei keine Unterschiede zwischen der Knochenneubildung nach Induktion durch OP-1 oder nach Transplantation autogener Spongiosa. In Gruppe 2 (AS) war die eingebrachte Spongiosa nach 12 Wochen vollständig resorbiert und nicht mehr nachweisbar. Innerhalb der Defektbereiche aller Gruppen fanden sich keine Anzeichen einer Ausbildung von kortikalem Knochen i.S. eines fortgeschrittenen Remodelings. Dagegen konnte Cook in seinen Untersuchungen an Kaninchen, Hunden und Primaten bereits nach 12 Wochen ein fortgeschrittenes Remodeling des neu gebildeten Knochens einschließlich der Entwicklung von kortikalem Knochen und gut ausgebildeter Knochenmarkskanäle beobachten⁶⁻⁸. Der lamelläre Knochen überwog dabei in dichter Struktur und es fanden sich nur geringe Anteile von Geflechtknochen. Im Vergleich zur autogenen Spongiosa wurde entsprechend den Beobachtungen von Cook durch OP-1 mehr und reiferer Knochen gebildet. Diese Unterschiede zu den histologischen Ergebnissen der vorliegenden Studie können erklärt werden durch die absolute Größe des gewählten Defektes, die Verwendung kleinerer Versuchstiere und die unterschiedlichen mechanischen Bedingungen.

Die quantitativen histomorphometrischen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der 3D-CT-Volumetrie. Entlang der Longitudinalebene zeigte sich in Gruppe 1 (OP-1) und in Gruppe 3 (IDKM) innerhalb des Defektbereiches eine von proximal nach distal abnehmende Knochenneubildungsrate. In Gruppe 2 (AS) zeigte sich dagegen wie bereits in der 3D-CT-Volumetrie die stärkste Knochenneubildung in der Defektmittle. Die geringste Knochenneubildungsrate konnte in dieser Gruppe wie auch in den anderen beiden Gruppen an der distalen Defektkante beobachtet werden. In Gruppe 2 war mit Tier-Nr. 8 ein Ausreißer auffällig, bei dem in den Schnittebenen 3 und 4 mehr als doppelt so viel Knochen gebildet wurde wie bei allen anderen Versuchstieren dieser Gruppe. Ursächlich hierfür scheint wie bereits erwähnt eine offensichtlich vorliegende hypertrophe Pseudarthrosenbildung zu sein.

In Gruppe 3 (IDKM) zeigte sich ähnlich wie in Gruppe 1 (OP-1) innerhalb des Defektes in den Schnittebenen 2 bis 4 eine von proximal nach distal abnehmende Knochenneubildungsrate bei jedoch insgesamt deutlich geringerer Knochenneubildung innerhalb des Defektes als bei Gruppe 1. Auffällig ist dabei, daß die Knochenneubildungsraten in den im Bereich der Defektkanten liegenden Schnittebenen 1, 2 und 5 mit denjenigen in der Gruppe 1 (OP-1) vergleichbar sind, während die Knochenneubildungsraten in den kritischen Schnittebenen 3 und 4 nur etwa halb so groß sind wie diejenigen in Gruppe 1. Somit scheint der osteoinduktive Einfluß von OP-1 auf die Knochenneubildung zentral im Defektbereich deutlicher zur Geltung zu kommen als an den Defektkanten, an denen ohnehin eine Spontanregeneration stattfindet. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Knochenneubildung entlang der Transversalebene wird insgesamt offensichtlich, daß in allen Gruppen die Knochenneubildung entsprechend der Lagerqualität verstärkt proximal und dorsolateral erfolgt und distal sowie anteromedial am geringsten ausgeprägt ist. Dabei scheint der Einfluß der Lagerqualität in Gruppe 1 (OP-1) tendenziell etwas geringer zu sein als in Gruppe 2 (AS) und Gruppe 3 (IDKM).

Bei der qualitativen histologischen Auswertung zeigte sich als unerwarteter interessanter Nebenbefund am Interface zwischen Implantat und rotationsinstabilem Marknagel eine durch OP-1 induzierte lokalisations- und damit wohl auch belastungsabhängige Knorpelbildung. Bemerkenswert ist dabei, daß durch die

Implantation von OP-1 offensichtlich simultan Knochen- und Knorpelgewebe induziert werden können. Einen entscheidenden Einfluss scheinen dabei die lokalen biomechanischen Rahmenbedingungen zu haben, da es in den peripheren Bereichen der Defektzone mit anzunehmender mechanischer Ruhe zu einer Knochenneubildung, in den zentralen Bereichen mit einer anzunehmenden repetitiven mechanischen Unruhe im Sinne von Druck- und Gleitbelastungen durch den instabilen Marknagel dagegen vermehrt zu Knorpelneubildung kam (Abb. 4-1 bis 4-3). Dabei zeigte das neu gebildete Knorpelgewebe gelenktypische morphologische Merkmale mit tangentialer Ausrichtung der Kollagenfasern in den oberflächlichen Schichten und Ausbildung einer regelrechten subchondralen Platte mit fließendem Übergang zum darunter gebildeten Knochengewebe. Dieses in der vorliegenden Studie beobachtete Phänomen einer simultanen belastungsabhängigen Knochen- und Knorpelbildung durch rekombinantes humanes OP-1 wurde nach Kenntnis des Autors in der einschlägigen Literatur bislang noch nicht im Rahmen eines extraartikulären Modells beschrieben. Damit eröffnet sich ein Feld für weitere vielversprechende Studien auf dem Gebiet der Knorpelregeneration durch induktive Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit von mechanischer Belastung.

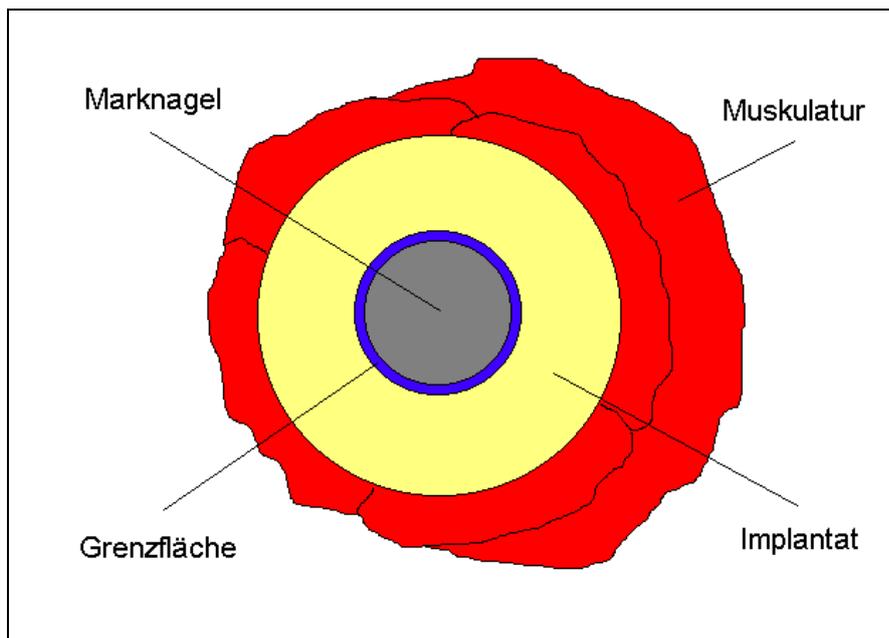


Abb. 4-1 Axiale schematische Darstellung der Grenzfläche zwischen rotationsinstabilem Marknagel und Implantat im Defektbereich.

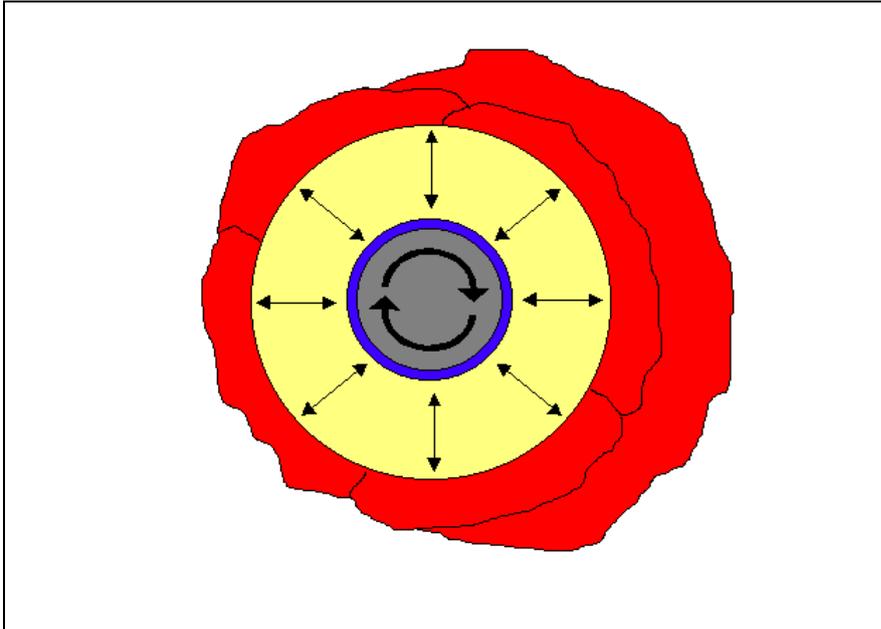


Abb. 4-2 An der Grenzfläche zwischen rotationsinstabilem Marknagel und Implantat kommt es zu repetitiven Gleitbewegungen, in der Peripherie des Defektes herrscht dagegen relative mechanische Ruhe.

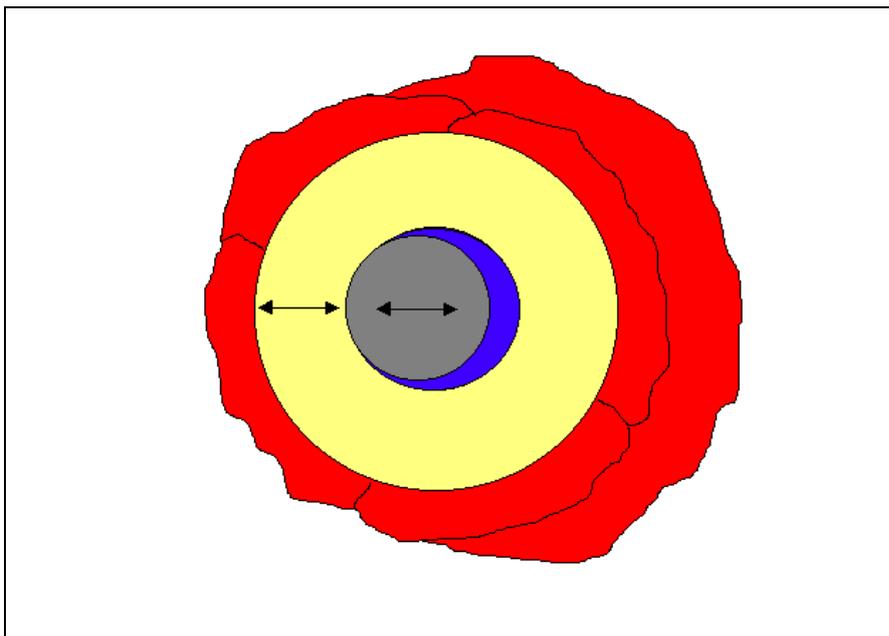


Abb. 4-3 Durch Kippbewegungen des Marknagels kann es in der Defektzone auch zu Kompressionsbelastungen kommen.

Hierdurch zeigt sich aber bereits auch die Bedeutung einer stabilen Osteosynthese als relevante Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung von osteogenen Wachstumsfaktoren zur knöchernen Ausheilung kritischer segmentaler Substanzdefekte.

Die Möglichkeit einer Knorpelregeneration durch OP-1 wurde zwar bereits durch mehrere verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben ¹⁷⁰⁻¹⁷⁸, nicht aber der offensichtliche bzw. naheliegende Einfluß einer bestimmten biomechanischen Belastungsstruktur auf die Determinierung des durch OP-1 induzierten Gewebes in Richtung Knochen oder Knorpel. Falls sich diese Beobachtungen in weiterführenden Untersuchungen verlässlich reproduzieren lassen, so sollte daher bei der Grundlagenforschung zur Therapie von Knorpeldefekten durch Wachstumsfaktoren vermehrt auch die offensichtliche Notwendigkeit einer gezielten adäquaten Nachbehandlung unter knorpelspezifischen biomechanischen Aspekten berücksichtigt werden.

Mittlerweile gilt es zwar als anerkannt, daß die Regeneration der Gewebe des Bewegungsapparates sowohl durch biochemische Signaltransduktion als auch durch mechanische Belastung kontrolliert wird, aber bis heute ist letztlich unklar, wie und in welchem Ausmaß die mechanischen Rahmenbedingungen und die biochemischen Vorgänge sich gegenseitig beeinflussen ¹⁷¹. Damit wird aber auch bei der Knorpelregeneration - ebenso wie beim Knochenersatz - unmittelbar das Problem einer geeigneten belastungsfähigen Applikationsform offensichtlich. In diesem Zusammenhang könnte die mittlerweile bereits bei Wirbelkörperfusionen durch OP-1 erprobte kittartige Trägersubstanz Carboxymethylcellulose (OP-1 putty) eine interessante Alternative darstellen ^{157-161,179}.

In Bezug auf die primäre Fragestellung können letztlich folgende Schlussfolgerungen getroffen werden:

1. Ein klinisch relevanter segmentaler diaphysärer Problemdefekt am lasttragenden Röhrenknochen der unteren Extremität kann prinzipiell – wenngleich noch nicht regelmäßig – durch den alleinigen Einsatz von rekombinantem humanem OP-1 knöchern überbrückt werden.

2. Rekombinantes humanes OP-1 zeigt auch im ausgedehnten Problemdefekt eine der autogenen Spongiosa vergleichbare qualitative osteogenetische Potenz, die quantitative osteogenetische Potenz der autogenen Spongiosa kann hierbei jedoch nicht erreicht werden.
3. Der zeitliche Ablauf der Knochenneubildung und Knochendefektheilung kann durch den alleinigen Einsatz von rekombinantem humanem OP-1 im Vergleich zur Anwendung autogener Spongiosa nicht beschleunigt.
4. Bei der Therapie ausgedehnter segmentaler diaphysärer Knochendefekte der lasttragenden unteren Extremität bestehen relevante Unterschiede zwischen rekombinantem humanem OP-1 und autogener Spongiosa hinsichtlich Anwendungssicherheit und Komplikationspotential. Hier ist speziell das Problem der flüchtigen Konsistenz des Implantates hinsichtlich der Applikation und das entsprechende Risiko der Dislokation des Implantates aus dem Defektbereich heraus in die umgebenden Weichteile zu nennen mit den Folgen einer signifikanten Reduktion der erwünschten Wirkung am Zielort sowie einer Ausbildung von mitunter ausgedehnten heterotopen Ossifikationen.

Eine humanmedizinische klinische Anwendung der gegenwärtig angebotenen Applikationsform von rekombinantem humanem OP-1 scheint daher derzeit aufgrund noch ungelöster Probleme hinsichtlich Applikation, Dislokation, Dosierung und Releasing aus der Trägersubstanz bei ausgedehnten segmentalen diaphysären Knochendefekten noch nicht gerechtfertigt und bleibt vorerst weiterhin speziellen Indikationen mit geringen knöchernen Defektvolumina wie der Wirbelkörperfusion oder der Behandlung von therapierefraktären Pseudarthrosen vorbehalten^{97,99,102-105,153-154,157-160,167,180}. Ferner liegen derzeit noch keine Daten bezüglich der Frage vor, ob durch die mittlerweile vorliegende verbesserte Applikationsform (OP-1 putty) die beschriebenen Probleme hinsichtlich Dislokation und heterotoper Ossifikation auch im großen segmentalen Problemdefekt vermieden werden können.

Ein weiteres vielversprechendes Einsatzgebiet für OP-1 könnte dagegen in Zukunft die Therapie von Knorpeldefekten darstellen¹⁷⁰⁻¹⁷⁸.

5. Zusammenfassung

“Alles sollte so einfach wie möglich gemacht werden, aber nicht einfacher.”

A. EINSTEIN

Die Behandlung ausgedehnter knöcherner Substanzdefekte stellt in der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie sowie auch in der Orthopädie nach wie vor ein nur unbefriedigend gelöstes Problem dar. Die Transplantation autogener Spongiosa wie auch die Kallusdistraction als derzeitige Standardverfahren sind mit erheblichen verfahrensimmanenten Nachteilen verbunden, so daß seit Jahrzehnten nach geeigneten Alternativen gesucht wird. Durch die Methoden der Gentechnologie eröffnete sich schließlich die Möglichkeit, osteoinduktive Wachstumsfaktoren kommerziell herzustellen und therapeutisch einzusetzen, wobei sich im Kleinterversuch das rekombinante humane Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) bereits als sehr vielversprechend erwiesen hat. Allerdings spiegeln die verwendeten Versuchsmodelle bisher keine der Humansituation vergleichbaren klinisch-realistischen Problemdefekte wieder.

Anhand eines überkritischen Extremmodells sollte daher in der vorliegenden Studie versucht werden, die Möglichkeiten bzw. Grenzen des klinischen Einsatzes von rekombinantem humanem Osteogenic Protein-1 als Bestandteil von Bioimplantaten zur Überbrückung langstreckiger segmentaler Knochendefekte aufzuzeigen.

Hinsichtlich der Übertragbarkeit von Knochenstoffwechsel und skelettalen Größenverhältnissen auf die Humansituation gilt hierbei das Schaf nachgewiesenermaßen als sehr gut geeignete Versuchstierspezies. Bisher wurde Osteogenic Protein-1 aber noch nicht in einem großen kritischen Segmentdefekt am Schaf getestet. In der vorliegenden Studie ist neben dem Einsatz von Osteogenic Protein-1 beim Schaf ferner auch das bisher größte segmentale Knochendefektmodell zur Untersuchung eines osteogenen Wachstumsfaktors realisiert.

Um die Konkurrenzfähigkeit des Wachstumsfaktors gegenüber den Standardverfahren zu beschreiben diente als relevanter Parameter die Knochenneubildung in qualitativer, quantitativer und zeitlicher Hinsicht. Dabei sollte der getestete Wachstumsfaktor zumindest vergleichbare oder bessere Ergebnisse erzielen als das Standardverfahren der autogenen Spongiosatransplantation. Um eventuelle Unterschiede der Verfahren möglichst deutlich erkennen zu können wurde gezielt eine überkritische Defektsituation gewählt, in der auch durch aufwändige autogene Spongiosatransplantation keine regelmäßige Ausheilung mehr erzielt werden kann.

Dazu wurde bei insgesamt 15 weiblichen Merinoschafen an der linken Tibia ein 5,0 cm langer segmentaler Knochendefekt mit einem Defektvolumen von 20 ml geschaffen und mit einem aufgebohrten Marknagel unter einer beabsichtigten Rotationsinstabilität von 10° osteosynthetisch versorgt. Der Defekt wurde mit folgenden Implantaten aufgefüllt: In Gruppe 1 mit 5 mg Osteogenic Protein-1 kombiniert mit inaktivierter demineralisierter Knochenmatrix als Kollagenträger, in Gruppe 2 mit autogener Spongiosa und in Gruppe 3 nur mit inaktivierter demineralisierter Knochenmatrix zum Ausschluß bzw. zur Beurteilung einer eventuellen Eigenaktivität des Kollagenträgers.

Die Auswertung erfolgte anhand von seriellen Röntgenverlaufskontrollen im Abstand von 2 Wochen bis zum Versuchsende nach 12 Wochen, anschließender quantitativer Bestimmung der Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches durch 3D-CT-Volumetrie, biomechanischer Testung im 4-Punkt-Biegeversuch sowie durch unentkalkte Knochenhistologie und Histomorphometrie mittels Mikroradiographie.

In den Röntgenverlaufskontrollen zeigten vier von fünf mit Osteogenic Protein-1 behandelten Versuchstieren deutliche Anzeichen einer Implantat-induzierten Knochenneubildung innerhalb des Defektbereiches, allerdings konnte 12 Wochen postoperativ lediglich in zwei von fünf Fällen der Defekt als ausreichend überbrückt und damit als geheilt bezeichnet werden. Nach Transplantation von autogener Spongiosa kam es in allen vier Fällen zu einer Defektüberbrückung bis hin zur knöchernen Defektkonsolidierung in ebenfalls zwei Fällen. Durch Implantation der Trägersubstanz alleine konnte keine Defektüberbrückung erzielt werden. Im zeitlichen Verlauf der Knochenneubildung zeigten sich keine relevanten

Unterschiede. Auffällig war dagegen eine mitunter erhebliche Dislokation des osteoinduktiven Implantates aus dem Defektbereich heraus mit Entwicklung ausgeprägter heterotoper Ossifikationen in vier von fünf Fällen nach Implantation von Osteogenic Protein-1. Dieser Effekt konnte in den anderen Gruppen nicht beobachtet werden.

Während in der Auswertung des Röntgenverlaufs somit durch Implantation von Osteogenic Protein-1 annähernd gleich gute Resultate hinsichtlich der qualitativen Defektüberbrückung im zeitlichen Verlauf erzielt werden konnten wie durch autogene Spongiosatransplantation, so zeigte sich in der quantitativen Knochenvolumenbestimmung innerhalb des Defektbereiches mittels 3D-CT-Scan eine eindeutige Überlegenheit der autogenen Spongiosatransplantation gegenüber der Implantation des Wachstumsfaktors. Durch autogene Spongiosatransplantation wurde mit durchschnittlich $21,45 \pm 9,20$ ml mehr als doppelt so viel neuer Knochen gebildet als durch Osteogenic Protein-1 (durchschnittlich $9,35 \pm 2,48$ ml). Durch den Einsatz von Osteogenic Protein-1 konnte aber immerhin um 50% mehr neuer Knochen gebildet werden als durch die Trägersubstanz alleine ($6,28 \pm 1,94$ ml). Das primäre Einbringen von mineralischer Substanz bei autogener Spongiosatransplantation scheint dabei keinen Einfluß auf eine falsch-positive Verzerrung der Ergebnisse zu haben, da die Relationen der Fraktionen unterschiedlich dichten Knochens dabei in allen Gruppen vergleichbar waren. Das vermeintlich relativ gute Ergebnis nach Implantation der Trägersubstanz alleine ist durch die Miterfassung der Defektkanten und der von diesen ausgehenden Spontanregeneration zu erklären.

Biomechanisch konnten alle vier Tibiae nach Spongiosatransplantation und eine mit Osteogenic Protein-1 behandelte Tibia untersucht werden. Dabei reflektierten alle getesteten Tibiae lediglich Charakteristika bindegewebig organisierter Pseudarthrosen mit einer relativen Bruchlast von 9,6-18,4 % gegenüber der jeweiligen unversehrten kontralateralen Tibia. In der Kontrollgruppe (nur Kollagenträger) war keine operierte Tibia ausreichend stabil für die biomechanische Auswertung.

Histologisch zeigten sich in der Färbung nach Laczko-Levai im Gruppenvergleich keine qualitativen Unterschiede des neu gebildeten Knochens. In allen Fällen

handelte es sich um noch ungerichteten Geflechtknochen mit allen typischen Bestandteilen.

In der Alizarin-Toluidin-Färbung sowie in der Färbung nach Laczko-Levai war bei vier von fünf mit Osteogenic Protein-1 behandelten Versuchstieren eine lokalisationsabhängige Ausbildung von gelenktypischem Knorpelgewebe am Interface zwischen Marknagel und neu gebildetem Knochen auffällig. Dieser neugebildete Knorpel fand sich nur an Lokalisationen, wo in unmittelbarer Nähe auch neuer Knochen gebildet wurde. Wie bei einer regelrechten synovialen Gelenkfläche befand sich der neugebildete Knorpel an der Oberfläche zum mobilen Marknagel hin und stand über eine subchondrale Platte in fester Verbindung mit dem darunter liegenden simultan gebildeten Knochen. Dieser Effekt konnte in den anderen beiden Gruppen jeweils nur in einem Fall und auch nur in deutlich geringerem Ausmaß beobachtet werden. Dieses in der vorliegenden Studie beobachtete Phänomen einer simultanen Knochen- und Knorpelbildung durch rekombinantes humanes OP-1 in Abhängigkeit einer unterschiedlich ausgeprägten mechanischen Belastungsstruktur wurde bislang noch nicht im Rahmen eines extraartikulären Modells beschrieben.

Mikroradiographisch wurden im Gruppenvergleich ebenfalls keine qualitativen Unterschiede des neu gebildeten Knochens festgestellt. Die quantitativen Messungen korrelieren gut mit denen der 3D-CT-Volumetrie. In allen Gruppen erfolgte die Knochenneubildung ferner erwartungsgemäß lokalisationsabhängig verstärkt im ersatzstarken Lager.

Zusammenfassend kann dem rekombinanten humanen Wachstumsfaktor Osteogenic Protein-1 auch im großen segmentalen Problemdefekt eine ausgeprägte lokale osteogenetische Potenz zugeschrieben werden, allerdings erscheint eine humanmedizinische Anwendung der gegenwärtig angebotenen Applikationsform im langstreckigen segmentalen Kontinuitätsdefekt der lasttragenden unteren Extremität aufgrund noch ungelöster Probleme hinsichtlich Applikation, Dislokation, Dosierung und Releasing aus der Trägersubstanz derzeit noch nicht gerechtfertigt.

Diese Studie zeigt aber ferner, daß Osteogenic Protein-1 bei entsprechenden biochemischen und insbesondere biomechanischen Milieubedingungen das Potential

zur Generierung von gelenktypischem Knorpel haben kann. Interessant erscheint dabei vor allem die wohl von der lokal unterschiedlichen Belastungsstruktur abhängige simultane Induktion sowohl von Knochen- als auch von Knorpelgewebe durch Osteogenic Protein-1.

Damit eröffnet sich ein weiteres Forschungsfeld im Zusammenhang mit diesem Wachstumsfaktor im Hinblick auf die Regeneration von osteochondralen Defekten. Diese Tatsache bekräftigt aber auch die unabdingbare Notwendigkeit einer stabilen Osteosynthese bei Anwendung von Osteogenic Protein-1 mit dem Ziel der reinen Osteoinduktion.

6. Literaturverzeichnis

*"Reading is sometimes an ingenious device for avoiding thought."*⁴⁹

SIR ARTHUR HELPS (1850)

1. Charnley J (1951) Compression arthrodesis of the ankle and shoulder. *J Bone Joint Surg* 33-B:180-191
2. Murray J (1999) Persönliche Mitteilung
3. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893
4. Groeneveld EH, Burger EH (2000) Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142(1):9-21
5. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-34
6. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger D et al. (1994) The effect of recombinant human Osteogenic Protein-1 on healing of large segmental bone defects. *Journal of Bone and Joint Surgery* 76-A:827-38
7. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC (1994) Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 Induces Healing in a Canine Long-Bone Segmental Defect Model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 301:302-12
8. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld, SL, and Rueger DC (1995) Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Segmental Defects in Non-Human Primates. *Journal of Bone and Joint Surgery* 77-A:734-50
9. Bernstein J, King T, Lawry GV (2007) Musculoskeletal medicine educational reform in the bone and joint decade. *J Bone Joint Surg* 89-A:2308-11
10. Linhart W, Briem D (2001) Knochenersatz 2000 bis 2010. Standortbestimmung und Innovation in der Therapie von Knochendefekten. *Orthopäde*, 30:189-192

11. Garrel T von, Gotzen L (1998) Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. Unfallchirurg 101:713-27
12. Heppenstall RB (1980) Bone Grafting in Fracture Treatment and Healing. W.B. Saunders, Philadelphia
13. Younger EM, Chapman MW (1989) Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 3:192-5
14. Knaeppler H (1994) Die allogene Knochentransplantation. Deutsches Ärzteblatt 91:798-804
15. Rueger JM (1989) Knochenersatzmittel. Habilitationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
16. Lexer E (1911) Ueber freie Transplantationen. Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie 95:827-851
17. Schweiberer L (1970) Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und mit denaturierter Knochengrundsubstanz. Hefte zur Unfallheilkunde 103:1-69
18. Schweiberer L (1971) Der heutige Stand der Knochentransplantation. Chirurg 42:252-59
19. Schweiberer L, Brauneisen R, Dambe LT, Eitel F, Zwank L (1981) Derzeitiger Stand der auto-, hetero- und homoioplastischen Knochentransplantation. In: Implantate und Transplantate in der Plastischen- und Wiederherstellungschirurgie (eds. H. Cotta, A.K. Martini). Springer, Berlin Heidelberg New York, 115-52
20. Urist MR (1989) Introduction to update on osteochondral allograft surgery. In Bone transplantation (eds. M. Aebi and P. Regazzoni). Springer, Berlin Heidelberg New York, 1-6
21. Ducheyne P (1985) Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials. Journal of Biomedical Materials Research 19:273-291
22. Uchida A, Nade S, McCartney ER, Ching W (1985) Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. Journal of Orthopaedic Research 3:65-77
23. Gross U, Struntz V (1985) The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed. Journal of Biomedical Materials Research 19:251-271
24. Bagnall RD (1980) Implant biocompatibility. Biomaterials 1:97-99

25. Urist MR, De Lange RJ, and Finerman GA (1983) Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, 220:680
26. Urist MR (1989) Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone-bone marrow consortium. In *Bone transplantation* (eds. M. Aebi and P. Regazzoni). Springer, Berlin Heidelberg New York, 185-197
27. Rueger JM (1996) Knochenersatzmittel. State of the art und: Wohin gehen wir? *Unfallchirurg* 99:228-36
28. Miller SD (1993) Clostridium Perfringens Infection of an Anterior Iliac Crest Bone Graft Donor Site. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 293:265-268
29. Broecke DG van den (1998) Neurotmesis of the Lateral Femoral Cutaneous Nerve When Coring for Iliac Crest Bone Grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 102:1163-1166
30. Ubhi CS (1984) Fracture and herniation of bowel at bone graft donor site in the iliac crest. *Injury* 16:202-203
31. Hu RW (1994) Fracture at the Iliac Bone Graft Harvest Site After Fusion of the Spine. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 309:208-213
32. Arrington ED (1996) Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 329:300-309
33. Cowley SP (1983) Hernias through Donor Sites for Iliac-Bone Grafts. *Journal of Bone and Joint Surgery* 65-A:1023-1025
34. Baksi DP (1983) Treatment of post-traumatic avascular necrosis of the femoral head by multiple drilling and muscle-pedicle bone grafting. *Journal of Bone and Joint Surgery* 65-B:268-273
35. Leung PC (1984) Reconstruction of proximal femoral defects with a vascular-pedicled graft. *Journal of Bone and Joint Surgery* 66-B:32-37
36. Pho RWH (1985) Free vascularized fibula graft in the treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia. *Journal of Bone and Joint Surgery* 67-B:64-70
37. Taylor GI (1978) One-stage repair of compound leg defects with free, vascularized flaps of groin skin and iliac bone. *Plastic and Reconstructive Surgery* 61:494-506
38. Wolff J (1892) *The law of bone remodelling*. Springer, Berlin 1986, see *Clinical Orthopaedics and Related Research* 228:2-11

39. Center of Infectious Diseases (1988) Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *MMWR* 37:597-599
40. Buck BE, Resnick L, Shah SM, and Malinin TI (1990) Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 251:249-253
41. Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, and Mankin HJ (1988) Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *Journal of Bone and Joint Surgery* 70-A:369
42. Tomford WW, Schachar NS, Fuller TC, Henry WB, and Mankin HJ (1981) Immunogenicity of frozen osteoarticular allografts. *Transplantation Proceedings* 13:888
43. Thompson RC, Pickvance EA, and Garry D (1993) Fractures in Large-Segment Allografts. *Journal of Bone and Joint Surgery* 75-A:1663-1673
44. Enneking WF and Mindell ER (1991) Observations on Massive Retrieved Human Allografts. *Journal of Bone and Joint Surgery* 73-A:1123-1142
45. Burchardt H (1983) The Biology of Bone Graft Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 174:28-42
46. Burchardt H, Glowczewskie FP, and Enneking WF (1977) Allogeneic Segmental Fibular Transplants in Azathioprine-Immunosuppressed Dogs. *Journal of Bone and Joint Surgery* 59-A:881-894
47. Burchardt H, Glowczewskie FP, and Enneking WF (1983) The Effect of Adriamycin and Methotrexate on the Repair of Segmental Cortical Autografts in Dogs. *Journal of Bone and Joint Surgery* 65-A:103-108
48. Kingma MJ (1960) Results of transplantation with preserved calf bone. *Archiv Chirurgica Neerlandica* 12:221-35
49. Ilizarov GA (1989a) The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues. Part I. The Influence of Stability of Fixation and Soft-Tissue Preservation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 238:249-281
50. Ilizarov GA (1989b) The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues. Part II. The Influence of the Rate and Frequency of Distraction. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 239:263-285
51. Marsh DR (1997) The Ilizarov method in nonunion, malunion and infection of fractures. *Journal of Bone and Joint Surgery* 79-B:273-279

52. Paley D (1990) Problems, Obstacles and Complications of Limb Lengthening by the Ilizarov Technique. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 250:81-104
53. Baumgart R, Betz A, Kessler S, Kettler M, and Schweiberer L (1994) Möglichkeiten der Rekonstruktion von Knochendefekten. *Orthopäde* 23:396-403
54. Longacre JJ and de Stefano GA (1957) Reconstruction of extensive defects of the skull with split rib grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 19:186
55. Roaf R (1960) *Spinal deformities*, 2nd edition, Pitman Medical, Tunbridge Wells, p 3
56. Boer HH de (1988) The History of Bone Grafts. *Clinical orthopaedics and Related Research* 226:292-298
57. Haeseker B (1988) Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and Surgery of the Hand. *Plastic and Reconstructive Surgery* 82:539-546
58. Walter P von (1821) Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. *Journal der Chirurgie und Augen-Heilkunde* 2:571-582
59. Ollier L (1867) *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Victor Masson et Fils, Paris
60. Macewen W (1881) Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proceedings of the Royal Society, London*, 32:232-247
61. Barth A (1893) Ueber histologische Befunde nach Knochentransplantationen. *Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie* 46:409-417
62. Barth A (1895) Histologische Untersuchungen ueber Knochenimplantationen. *Beiträge zur pathologischen Anatomie* 17:65-142
63. Curtis BF (1893) Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures. *American Journal of Medical Science* 106:30
64. Phemister DB (1914) The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 19:303
65. Lexer E (1925) 20 Jahre Transplantationsforschung in der Chirurgie. *Archiv für klinische Chirurgie* 138:251-302

66. Axhausen G (1907) Histologische Untersuchungen ueber Knochen transplantationen am Menschen. Deutsche Zeitschrift für Chirurgie 91:388-428
67. Lexer E (1908) Ueber Gelenktransplantation. Medizinische Klinik, 4:815-823, see also Clinical Orthopaedics and Related Research 197:4-10
68. Lexer E (1911) Ueber freie Transplantationen. Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie 95:827-851
69. Lexer E (1929) Knochenneubildung im Bindegewebe osteoblastischer Herkunft. Deutsche Zeitschrift für Chirurgie 217:1-32
70. Leriche R. und Policard A (1926) Physiologie normale et pathologique de l'os. Mason, Paris
71. Levander G (1934) On the formation of new bone in bone transplantation. Acta Chirurgica Scandinavia 74:425
72. Levander G (1938) A study of bone regeneration surgery. Surgery, Gynecology and Obstetrics 67:705-714
73. Annersten S (1940) Experimentelle Untersuchungen ueber die Osteogenese und die Biochemie des Fracturcallus. Acta Chirurgica Scandinavia Supplementum 60:1-181
74. Oberdalloff H (1947) Zur Frage der Knochenneubildung. Chirurgie 17/18:123-129
75. Axhausen G (1908) Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Thierversuchen. Archiv für klinische Chirurgie 88:23
76. Axhausen W (1952) Die Knochenregeneration – ein zweiphasiges Geschehen. Zentralblatt für Chirurgie 77:435-442
77. Axhausen W (1956) The osteogenic phases of regeneration of bone. A historical and experimental study. Journal of Bone and Joint Surgery 38-A:593
78. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, and Rosenberg JM (1967) The bone induction principle. Clinical Orthopaedics and Related Research 53:243
79. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, and Strates BS (1968) Inductive substrates for bone formation. Clinical Orthopaedics and Related Research 59:59
80. Urist MR, Hay PH, Dubuc FL, and Buring K (1969) Osteogenetic competence. Clinical Orthopaedics and Related Research 64:194
81. Urist MR, De Lange RJ, and Finerman GA (1983) Bone cell differentiation and growth factors. Science 220:680

82. Alper G, Bernick S, Yazdi M, and Nimni ME (1989) Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *American Journal of Medical Science* 298:371
83. Landesman R and Reddi AH (1985) Induction of endochondral bone by demineralized bone matrix from diabetic rats. *Calcified Tissue International* 37:630
84. Urist MR, Strates BS (1971) Bone morphogenetic protein. *Journal of Dental Research* 50:1392-1399
85. Urist MR, Mikulski A, Lietze A (1979) Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:1828-1836
86. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Leitze A, Tempst P, Hunkapeller M, DeLange RJ (1984) Purification of bovine bone morphogenetic protein (bBMP) by hydroxyapatite chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:371-379
87. Nishimoto SK, Chang CH, Gendler E, Stryker UF, Nimni ME (1985) The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. *Calcified Tissue International* 37:617-626
88. Reddi AH (1998) Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 16:247-252
89. Wozney JM (1989) Bone morphogenetic proteins. *Progress in Growth Factor Research* 1:267-280
90. Williams DF (1987) *Definitions in Biomaterials*. Progress in Biomedical Engineering. Elsevier, Amsterdam
91. Urist MR, O'Connor BT and Burwell RG (1994) Bone grafts, derivatives and substitutes (ed. by M.R. Urist, B.T. O'Connor and R.G. Burwell), Butterworth-Heinemann, Oxford
92. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK and Opperman H (1990) OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO Journal* 9:2085-2093
93. Reddi AH (1994) Bone and cartilage differentiation. *Current Opinion in Genetics Development* 4:937-944

94. Wozney JM (1993) Bone morphogenetic proteins and their gene expression. In Cellular and molecular biology of bone (ed. M. Noda), Academic, San Diego, 131-167
95. Sampath TK and Rueger DC (1994) Structure, Function, and Orthopedic Applications of Osteogenic Protein-1 (OP-1). *Complications in Orthopedics Winter 1994*:101-107
96. Asahina I, Sampath T, Hauschka P (1996) Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Experimental Cell Research* 222:38-47
97. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, and Yin S (2001) Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 83-A, Supplement 1, Part 2:151-158
98. Bonn D (1999) The application of cell biology to broken bones. *Lancet* 353 (9153):650
99. Shimmin A, Ruff S (1999) Clinical use of recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1). *Bone* 24:424
100. Pecina M, Giltaij LR, Vukicevic S (2001) Orthopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). *International Orthopaedics* 25:203-208
101. Geesink RGT, Hoefnagels NHM, Bulstra SK (1999) Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *Journal of Bone and Joint Surgery* 81-B:710-718
102. Muschler GF, Perry CR, Cole JD, et al (1998) Treatment of established tibial nonunions using human recombinant osteogenic protein-1. *Proceedings of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 65:218
103. Cook SD, Dalton JE, Tan EH et al (1994) In vivo evaluation of recombinant human Osteogenic Protein-1 (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine* 19:1655-1663
104. Magin MN, Delling G (2001) Improved lumbar vertebral interbody fusion using rhOP-1: a comparison of autogenous bone graft, bovine hydroxylapatite (Bio-Oss), and BMP-7 (rhOP-1) in sheep. *Spine* 26:469-478
105. Grauer JN, Patel TC, Erulkar JS, Troiano NW, Panjabi MM, and Friedlaender GE (2001) Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. *Spine* 26:127-133

106. Cook SD et al (2000) Strut allograft healing to the femur with recombinant human Osteogenic Protein-1. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 381:47-57
107. Boyne PJ (2001) Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *Journal of Bone and Joint Surgery* 83-A, Supplement 1, Part 2:146-150
108. Heiple KG, Chase SW, and Hernon CH (1963) A comparative study of healing process following different types of bone transplantation. *Journal of Bone and Joint Surgery* 45-A:1593
109. Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP, Chotivichit A, Huang HK, and Finerman GA (1989) Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. Effects of xenogeneic bovine bone morphogenetic protein without and with interposition of soft tissues and interruption of blood supply. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 254:254-265
110. Wissing H, Stürmer KM, und Breidenstein G (1990) Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 212:479-88
111. Urist MR (1994) The search for and the discovery of bone morphogenetic protein (BMP). In *Bone grafts, derivatives and substitutes* (ed. by MR Urist, BT O'Connor and RG Burwell), Butterworth-Heinemann, Oxford, p 316
112. Urist MR (1966) Origins of current ideas about calcification. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 44:13-39
113. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. (1992) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I*, Paul Parey, Berlin und Hamburg
114. Stützele H, Kessler S, Hallfeldt KK, Schweiberer L (1991) Knochenneubildung im langstreckigen Tibiaschaftdefekt nach Implantation demineralisierter Knochenmatrix. *Hefte zur Unfallheilkunde* 220:548
115. Hallfeldt KK, Stützele H, Puhlmann M, Bulut N, Kessler S, Schweiberer L (1994) Die Überbrückung langstreckiger Tibiaschaftdefekte durch teildemineralisierte Knochenmatrix. *Unfallchirurg* 97:518
116. Hallfeldt KK, Stützele H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L (1994) The osteoinductive properties of partially demineralised bone matrix. *Theoretical Surgery* 9:212

117. Sato K, Urist MR (1984) Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 183:180-187
118. Katthagen BD, Bechtel U (1985) Technik der unentkalkten Knochenhistologie und -histomorphometrie. *MTA-Journal* 7-4:164-172
119. Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. neubearbeitete Auflage, herausgegeben von P. Böck. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore
120. Fritsch H (1989) Staining of different tissues in thick epoxy resin-impregnated sections of human fetuses. *Staining Technology* 64:75-79
121. Trepl M (1995) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore
122. Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA (2007) New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* 38 Suppl 1:49-62
123. Busse JW, Bhandari M, Sprague S, Johnson-Masotti AP, Gafni A (2005) An economic analysis of management strategies for closed and open grade I tibial shaft fractures. *Acta Orthopaedica* 76(5):705-12
124. Urist MR (1989) Bone morphogenetic protein, bone regeneration, heterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. In *Bone and Mineral Research Annual*, ed. by W.A. Peck, No. 6, pp. 57-112, Elsevier, Amsterdam
125. Aspenberg P, Wang E, and Thorngren KG (1992) Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 63:619
126. Mandelkow HK, Hallfeldt KK, Kessler SB, Gayk M, Siebeck M, Schweiberer L (1990) Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken. *Unfallchirurg* 93:376
127. Hallfeldt KK, Kessler S, Puhlmann M, Mandelkow H, Schweiberer L (1992) Der Einfluß verschiedener Sterilisationsverfahren auf die osteoinduktiven Eigenschaften demineralisierter Knochenmatrix. *Unfallchirurg* 95:313
128. Deiler S, Puhlmann M, Stützele H, Kanz KG, Kessler S, Stock W, Schweiberer L (1995) Freie, mikrovaskulär angeschlossene Periostlappen-Transplantation zur ossären Überbrückung großer Knochendefekte. Eine experimentelle Untersuchung am Schaf. *Osteologie* 4:153

129. Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, Tucker MM, Rueger DC, Reddi AH (1996) Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13:273-89
130. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E (1993) Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 293:317-26
131. den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ. (2003) Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *Journal of Orthopaedic Research* 21(3):521-8
132. Pluhar GE, Turner AS, Pierce AR, Toth CA, Wheeler DL (2006) A comparison of two biomaterial carriers for osteogenic protein-1 (BMP-7) in an ovine critical defect model. *Journal of Bone and Joint Surgery* 88-B:960-6
133. Yokus B, Cakir DU, Kurt D (2004) Effects of seasonal and physiological variations on the serum major and trace element levels in sheep. *Biol Trace Elem Res* 101(3):241-55
134. Yokus B, Cakir DU, Kanay Z, Gulden T, Uysal E (2006) Effects of seasonal and physiological variations on the serum chemistry, vitamins and thyroid hormone concentrations in sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53(6):271-6
135. Arens D, Sigrist I, Alini M, Schawalder P, Schneider E, Egermann M (2007) Seasonal changes in bone metabolism in sheep. *Vet J* 174(3):585-91
136. Maus U, Andereya S, Ohnsorge JA, Gravius S, Siebert CH, Niedhart C (2008) A bFGF/TCP-composite inhibits bone formation in a sheep model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 85(1):87-92
137. Maus U, Andereya S, Gravius S, Ohnsorge JA, Niedhart C, Siebert CH (2008) BMP-2 incorporated in a tricalcium phosphate bone substitute enhances bone remodeling in sheep. *J Biomater Appl* 22(6):559-76
138. Ripamonti U, Crooks J, Rueger DC (2001) Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plastic and Reconstructive Surgery* 107(4):977-88

139. Wippermann BW (1997) Hydroxylapatitkeramik als Knochenersatzstoff: experimentelle Untersuchungen am Segmentdefekt der Schafttibia. Hefte zur Zeitschrift Der Unfallchirurg 260:33
140. Augat P, Merk J, Wolf S, Claes L (2001) Mechanical stimulation by external application of cyclic tensile strains does not effectively enhance bone healing. J Orthop Trauma 15(1):54-60
141. Chhabra A, Zijerdi D, Zhang J, Kline A, Balian G, Hurwitz S (2005) BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment. J Orthop Trauma 19(9):629-34
142. Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JI, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, Folch J, Calvo JH (2008) A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. Anim Genet 39(3):294-7
143. den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ (1999) New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. J Orthop Res 17(5):654-60
144. Blokhuis TJ, Wippermann BW, den Boer FC, van Lingen A, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ (2000) Resorbable calcium phosphate particles as a carrier material for bone marrow in an ovine segmental defect. J Biomed Mater Res 51(3):369-75
145. Augat P, Merk J, Ignatius A, Margevicius K, Bauer G, Rosenbaum D, Claes L (1996) Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing. Clin Orthop Relat Res 328:194-202
146. Augat P, Merk J, Genant HK, Claes L (1997) Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. Calcif Tissue Int 60(2):194-9
147. Claes L, Augat P (2000) Models in fracture healing: report from the Reisingburg workshop September 1999. J Orthop Trauma 14(6):440-1
148. Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ (2003) Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 66(2):526-31

149. Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, Montag AG, Haydon RC, He TC (2007) Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25:665-77
150. Saku T (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22-6:591-603
151. Wozney JM and Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 346:26-37
152. Betz O, Augat P, Ignatius A, Claes L (2000) Biomechanische und histologische Untersuchung autologer Spongiosa-Transplantate in einem teilbelasteten Transplantationsmodell. *Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“*, 275:237-238
153. Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A (2006) Klinische Erfahrungen mit Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP 7) bei Pseudarthrosen langer Röhrenknochen. *Unfallchirurg* 109(7):528-37
154. Zimmermann G, Müller U, Löffler C, Wentzensen A, Moghaddam A (2007) Therapieerfolg bei atrophen Tibiaschaftpseudarthrosen – Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP 7) versus autogene Spongiosaplastik. *Unfallchirurg* 110(11):931-8
155. Ripamonti U, Ramoshebi LN, Matsaba T, Tasker J, Crooks J, Teare J. (2001) Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates. *J Bone Joint Surg* 83-A Suppl 1(Pt 2):S116-27
156. Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, Tucker MM, Rueger DC, Reddi AH (1996) Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13(3-4):273-89
157. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, Hilibrand AS, Brower RS, Kurd MF, Appannagari A, Patel M, Fischgrund JS (2008) The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. *Spine J* 8(3):457-65
158. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN, Phillips F, Hilibrand A, Albert TJ, Wetzel T, McCulloch JA (2004) A pilot

- study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine* 29(17):1885-92
159. Vaccaro AR, Anderson DG, Patel T, Fischgrund J, Truumees E, Herkowitz HN, Phillips F, Hilibrand A, Albert TJ, Wetzel T, McCulloch JA (2005) Comparison of OP-1 Putty (rhBMP-7) to iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: a minimum 2-year follow-up pilot study. *Spine* 30(24):2709-16
160. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz H, Phillips F, Hilibrand A, Albert TJ (2005) A 2-year follow-up pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J* 14(7):623-9
161. Cook SD, Salkeld SL, Patron LP (2005) Bone defect healing with an osteogenic protein-1 device combined with carboxymethylcellulose. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75(1):137-45
162. Scalia S, Giunchedi P, Pazzi P, Conte U (2000) Enhancement of ursodeoxycholic acid bioavailability by cross-linked sodium carboxymethyl cellulose. *J Pharm Pharmacol* 52(4):383-8
163. Ikechukwu Ugwoke M, Kaufmann G, Verbeke N, Kinget R (2000) Intranasal bioavailability of apomorphine from carboxymethylcellulose-based drug delivery systems. *Int J Pharm* 202(1-2):125-31
164. Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, DeLuca M, Vasconez HC, DeLuca PP (2001) Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 18(12):1747-53
165. Joseph V and Rampersaud YR (2007) Heterotopic bone formation with the use of rhBMP2 in posterior minimal access interbody fusion: a CT analysis. *Spine* 32(25):2885-90
166. Shields LB, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, Shields CB. (2006) Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 31(5):542-7

167. Rihn JA, Gates C, Glassman SD, Phillips FM, Schwender JD, Albert TJ (2008) The use of bone morphogenetic protein in lumbar spine surgery. *J Bone Joint Surg* 90-A:2014-25
168. <http://www.fda.gov/medwatch>
169. Cook S, Rueger D (1996) Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 324:29-38
170. Cook SD, Patron LP, Salkeld SL, Rueger DC (2003) Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein-1 (BMP-7) in dogs. *J Bone Joint Surg* 85-A Suppl 3:116-23
171. Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P (2008) Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin? *Clin Orthop Relat Res* 466(7):1592-7
172. Badlani N, Inoue A, Healey R, Coutts R, Amiel D (2008) The protective effect of OP-1 on articular cartilage in the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16(5):600-6
173. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC (2007) OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop* 31(6):773-81
174. Masuda K, Pfister BE, Sah RL, Thonar EJ (2006) Osteogenic protein-1 promotes the formation of tissue-engineered cartilage using the alginate-recovered-chondrocyte method. *Osteoarthritis Cartilage* 14(4):384-91
175. Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J, Taylor K, Maticic D, McCartney J, Yin S, Rueger D, Vukicevic S (2001) Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. *Growth Factors* 19(2):101-13
176. Louwse RT, Heyligers IC, Klein-Nulend J, Sugihara S, van Kampen GP, Semeins CM, Goei SW, de Koning MH, Wuisman PI, Burger EH (2000) Use of recombinant human osteogenic protein-1 for the repair of subchondral defects in articular cartilage in goats. *J Biomed Mater Res* 49(4):506-16
177. Grgić M, Jelić M, Basić V, Basić N, Pećina M, Vukicević S (1997) Regeneration of articular cartilage defects in rabbits by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7). *Acta Med Croatica* 51(1):23-7
178. Flechtenmacher J, Huch K, Thonar EJ, Mollenhauer JA, Davies SR, Schmid TM, Puhl W, Sampath TK, Aydelotte MB, Kuettner KE (1996) Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage

- proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 39(11):1896-904
179. Fukuroku J, Inoue N, Rafiee B, Sim FH, Frassica FJ, Chao EY (2007) Extracortical bone-bridging fixation with use of cortical allograft and recombinant human osteogenic protein-1. *J Bone Joint Surg* 89-A:1486-96
 180. Phillips FM, Turner AS, Seim HB 3rd, MacLeay J, Toth CA, Pierce AR, Wheeler DL (2006) In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. *Spine J* 6(5):500-6
 181. Burchardt H (1983) The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 174:28-36
 182. Glowacki J, Wilcon S (1988) An hypothesis on the origin of osteoblast induced by demineralized bone matrix in rats. *Calcified Tissue International (Suppl.)*, 42, Abstract 14
 183. Urist MR (1976) Practical applications of basic research on bone graft physiology. In *Instructional Course Lectures* (ed. B. Evans), American Academy of Orthopaedic Surgeons, 25, 1, The C.V. Mosby Co., St Louis

7. Anhang

7.1. Definitionen und Terminologie

Die nachfolgenden Definitionen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten relevanten Termini orientieren sich an den Vorschlägen einer Konsensus-Konferenz der *European Society for Biomaterials*⁹⁰ sowie an den von M.R. URIST und R.G. BURWELL angegebenen Begriffsbestimmungen⁹¹. Die kursiv und fett gedruckten Begriffe werden separat definiert.

Allogen: homolog, die gleiche Spezies betreffend.

Autogen: autolog, das gleiche Individuum betreffend.

Bioaktivität: das Auslösen einer spezifischen, erwünschten, biologischen Reaktion nach dem Einbringen in den Organismus.

Biokompatibilität: das Ausbleiben von unerwünschten Gewebereaktionen jeglicher Art auf ein ***Biomaterial***.

Biomaterial: eine synthetische oder biologische Substanz bzw. Substanzkombination zum Einbringen in den Organismus, um dort dessen Gewebe, Organe oder Funktionen zu behandeln, zu ersetzen oder zu augmentieren.

Bioresorption: Abbau einer Substanz nach dem Einbringen in den Organismus.

Biotoleranz: das eingebrachte Material hat keine vollständige Resistenz gegen Angriffe des vitalen Körpergewebes. Es werden Abbauprodukte frei, die im Kontaktgewebe Reaktionen hervorrufen können.

Composite: ein aus mindestens zwei Komponenten mit diversen Charakteristika zusammengesetztes **Biomaterial** bzw. **Knochenersatzmaterial**. Bereits die Einzelsubstanz soll einen die **Osteoreparation** fördernden Effekt haben. Durch die Kombination soll eine über einen lediglich additiven Effekt hinausgehende Wirkung erzielt werden.

Fenestrationsen: Öffnungen zwischen einzelnen **Makroporen** einer **Keramik**.

Heterotop: außerhalb des Knochengewebes liegend. Dazu wird auch das **ersatzschwache Lager** nach langstreckiger segmentaler Knochen- und Periostresektion gezählt bzw. auch das **ersatzunfähige Lager** bei im Knochen entstehendem Narbengewebe nach Infekten.

Implantat: jede aus einem oder mehreren Biomaterialien bestehende, avitale medizinische Vorrichtung, die absichtlich in den Organismus eingebracht wird.

Induktion: zelluläre Differenzierung aufgrund physikochemischer Vorgänge, die durch den Kontakt eines bestimmten Gewebes mit einem anderen Gewebe oder einer die Differenzierung auslösenden Substanz hervorgerufen wird.

Interkonnektion: Verbindung von **Makroporen** über **Fenestrationsen**.

Isogen: isolog, ein genetisch identisches Individuum betreffend.

Kalzifizierung: unphysiologische Ablagerung von Kalzium- oder Kalziumphosphatsalzen im Gewebe.

Keramik: polykristalliner Festkörper aus pulverförmigen Metalloxiden bzw. Kalziumphosphaten, entstanden durch eine thermische Umwandlung (Sinterung) ohne chemische Reaktion.

Knochenersatzmaterial: Einzelsubstanz oder **Composite** zur Implantation in den Organismus. Identischer Indikationsbereich wie **autogenes** oder **allogenes** Knochengewebe. Knochenersatzmaterialien sollen die **Osteoreparation** durch

Osteokonduktion bzw. **Osteoinduktion** fördern. Angestrebt wird eine **osteostimulative** Wirkung. Bei der Verwendung als Oberflächenbeschichtung anderer **Implantate** soll die Entstehung eines Verbundes zwischen dem oberflächenaktiven Material und dem Knochengewebe ermöglicht werden.

Knochenmatrix (demineralisiert): organische Bestandteile des Knochens nach der Entfernung der Mineralphase. Aufgrund der angewandten Technik der Demineralisierung werden bei der Herstellung nur geringe Mengen der organischen Phase des Knochens entfernt bzw. denaturiert.

Lager: Implantationsort. **Orthotoper** Implantationsort als ersatzstarkes Lager, **heterotoper** Implantationsort als ersatzschwaches bzw. ersatzunfähiges Lager.

Leitschieneneneffekt: **Osteokonduktion**.

Makroporosität: Ausmaß der Öffnungen in einer **Keramik** bzw. in einem korallinen **Knochenersatzmaterial**, die größer als 5 μm sind und deren Ausdehnung bzw. Dichte bei der Sinterung direkt gesteuert werden kann. Relevanter Parameter für die **Osteointegration**.

Mikroporosität: bei der Sinterung einer **Keramik** in Abhängigkeit von der Pulverpartikelgröße des Ausgangsmaterials, der Sintertemperatur und der angewandten Drucke entstehende, im Größenbereich weniger μm liegende Öffnungen zwischen einzelnen Keramikpartikeln. Relevanter Parameter für die **Bioresorption**.

Mineralisation: Physiologische Ablagerung des Knochenminerals im Gewebe.

Orthotop: innerhalb des Knochengewebes liegend.

Osteogenese: Prozeß der Knochengewebebildung am **orthotopen** Ort durch vitale **autogene** Zellen (Osteoprogenitor-Zellen, Osteoblasten).

Osteoinduktion: Neuentstehung von Knochengewebe nach der **Implantation** eines **Knochenersatzmaterials** an einer **heterotopen** Lokalisation. Das Einbringen des Materials in den Organismus löst einen sequentiellen Mechanismus aus, der nachfolgend im Empfängerbett zur Zellmigration, Zelldifferenzierung, Morphogenese und potentiell auch zur Organogenese führt. Beteiligt sind pluripotente, kompetente, indeterminierte, ortständige sowie fraglich pluripotente zirkulierende Zellen.

Osteointegration: Einbau eines **Biomaterials** bzw. eines **Knochenersatzmaterials** in den Knochen, ohne daß dabei die Substanz vollständig resorbiert wird bzw. ohne daß die entsprechenden Abbauprodukte für die **Osteoreparation** verwendet werden können. Es entsteht ein osteoimplantärer Verbund.

Osteokonduktion: Leitschieneneffekt durch die Fähigkeit eines **Knochenersatzmaterials**, aufgrund seiner Struktur das Einwachsverhalten von Knochen bzw. **osteogenetischem** Gewebe zu fördern. Unterform der Osteostimulation. Wird in der vorliegenden Arbeit nicht nach BURCHARDT definiert, der als Osteokonduktion eine primäre Stimulation und Induktion von osteogenen Stammzellen im ersatzschwachen Lager bezeichnete ¹⁸¹. Auch die Definition von GLOWACKI als Leitschieneneffekt der anorganischen Matrix zur Apposition neugebildeten Knochens bei gleichzeitiger Resorption des eingebrachten Materials wird wegen der dadurch verursachten begrifflichen Einengung nicht benutzt ¹⁸².

Osteoreparation: Knochenheilung nach Fraktur, nach einer experimentellen Kontinuitätsunterbrechung, nach Bohrlochdefekten, unter physiologischen Bedingungen.

Osteostimulation: allgemein Förderung der **Osteoreparation** nach der Implantation eines **Knochenersatzmaterials** am **orthotopen** Ort. Beteiligt sind pluripotente, kompetente, indeterminierte, ortständige und fraglich auch zirkulierende Zellen sowie auch determinierte, ortständige Osteoprogenitor-Zellen und Osteoblasten. Die Knochenbildung soll beschleunigt und die Quantität und Qualität des neugebildeten Knochens gesteigert werden. Die **Osteokonduktion** ist eine Unterform der Osteostimulation. **Osteoinduktive** Effekte können im Rahmen der Osteostimulation auftreten.

Transplantat: Nach URIST vitales Gewebe bzw. Organ zum Einbringen in den Organismus¹⁸³.

Xenogen: heterolog, eine differente Spezies betreffend.

7.2. Operationsprotokoll

**Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. L. Schweiberer**

Aktenzeichen: 211-2531- 42 / 96

Ludwig **LMU**
Maximilians -
Universität -
München

OPERATIONSprotokoll - VERSUCHSTIER: SCHAF

Versuchsvorhaben: boma-grofa Datum: _____
Schaf-Nr.: _____ Gewicht: _____
Herkunft: _____
Besonderheiten präoperativ: _____

Operateur: _____ Assistent: _____
Anästhesist: _____ MTA: _____

Prämedikation: Zeit: _____
Atropin: _____ Diazepam: _____

Narkoseeinleitung: Zeit: _____
Pentobarbital: _____

Narkose: Zeit: _____ (Details siehe Anästhesieprotokoll)
O₂ _____ N₂O _____ Isofluran: _____ Antibiotikum: _____
OP-Beginn: _____ OP-Ende: _____
Besonderheiten während Narkose: _____

Operationsbericht: *Implantat/Gruppe*: _____ *Nagelgröße*: _____

Operateur _____ Anästhesist _____ Versuchsleiter _____

7.3. Anästhesieprotokoll

| Chirurgische Klinik und Poliklinik Klinikum Innenstadt | | LMU | | | | | | | | | |
|---|---|--------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------------|----|----------------------|----|----|----|
| Name: | | Klinik: | | Station: | | Anästhesieprotokoll vom: | | | | | |
| Geb.-Datum: | | Arztwahl | | ja <input type="checkbox"/> | | nein <input type="checkbox"/> | | Anästhesie-Buch-Nr.: | | | |
| Diagnose: | | | | | | | | | | | |
| Operation: | | | | | | | | | | | |
| Anästhesist: | | I-Nr.: | | Operateure: | | | | | | | |
| Größe (cm) | Datum | Medikament | Dos. (mg) | Appl.-Ort | verabrt. (Uhr) | | | | | | |
| Gew. (kg) | Prämedikation | | | | | | | | | | |
| Blutgruppe | | | | | | | | | | | |
| Blutdruck | | | | | | | | | | | |
| Herzfrequenz | | Einl.-Med. | | | | | | | | | |
| Temperatur | DHB | | | | | | | | | | |
| | Fentanyl | | | | | | | | | | |
| | Succinyl | | | | | | | | | | |
| Hb | Panc./Allof. | | | | | | | | | | |
| | N ₂ O L/min | | | | | | | | | | |
| | O ₂ L/min | | | | | | | | | | |
| Hkt | Haloth./Efl. | | | | | | | | | | |
| | Infusionen | | | | | | | | | | |
| K | ZVD | | | | | | | | | | |
| | Urin | | | | | | | | | | |
| Kreatinin | 200 | | | | | | | | | | |
| | 180 | | | | | | | | | | |
| Ges. Eiweiß | 160 | | | | | | | | | | |
| | 140 | | | | | | | | | | |
| Transaminasen | 120 | | | | | | | | | | |
| | 100 | | | | | | | | | | |
| Blutzucker | 80 | | | | | | | | | | |
| | 60 | | | | | | | | | | |
| Quick | 40 | | | | | | | | | | |
| | 20 | | | | | | | | | | |
| Thrombozyten | Zeit | 45 | 15 | 30 | 45 | 15 | 30 | 45 | 15 | 30 | 45 |
| | Zelchen: X Narkose + Begleit-/Einde + Intubation + Extubation O ₂ -Beginn -Einde Y systemisch A distalisch Puls | | | | | | | | | | |
| Venenzugang/Ort | | | | | | | | | | | |
| Plastikn. Stahln. ZVK | | | | | | | | | | | |
| Anäst. Technik | ohne Besonderh. | EKG | Blutverlust | Postop. Zustand | Laborbefunde | | | | | | |
| Überwachung | Hypotens. >30% | Blutige Dr.-Mess. | gemessen | ansprechbar | Zeit | | | | | | |
| Lokalanästhesie | Hypertension | Kontr. Hypotension | geschätzt | bewußtlos | Hb | | | | | | |
| Mononarkose | Tachycardie | Hypothermie | gesamt | Schutzrefl. ja/nein | HKt | | | | | | |
| Komb.-Narkose | Bradycardie | Heizmatte | Transf.-Menge ml | Kreislauf stabil/instabil | BZ | | | | | | |
| Maske | Arrhythmie | Magensonde | Vollblut | Atmg. ausreichend/unzureichend | Na ⁺ | | | | | | |
| Intubation <small>brach./trauch.</small> | Asystolie | Urinkatheter | Erykonz. | Tubus belassen | K ⁺ | | | | | | |
| Magill | Reanimation mit/ohne Erfolg | Lagerung | | Überwachungs-Zeit | pO ₂ | | | | | | |
| Woodbridge | Broncho-Laryngo- Spasmus | Rücken | Infusionsmenge ml | | SO ₂ | | | | | | |
| Größe | Zahnbeschädigung | Bauch | Krist. Lsg. | | pH | | | | | | |
| Spontanatmung | erschw. Intubation | Seite re/li | Kolloid. Lsg. | Anästhesie-Zeit | pCO ₂ | | | | | | |
| Ass. Beatmung | Erbrechen | halbsitzend | Plasma | | St. Bik. | | | | | | |
| Kontr. Beatmung | Aspiration | Steinschnitt | sonstige | | BE | | | | | | |
| Halboff. System | Tech. Störung | Kopftief | Gesamt | Operations-Zeit | | | | | | | |
| Halbgeschl. System | | Umlagerung | Urin | | | | | | | | |
| Unterschrift des verantwortlichen Anästhesisten | | | | | | | | | | | |

7.5. Tabellen

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Alter | Gewicht | Tibia-länge | Markna-gellänge | Defektdurchmesser | | | Defekt-volumen |
|----------|--------|-------------|-------|---------|-------------|-----------------|-------------------|--------|--------|----------------|
| | | | | | | | proximal | distal | medial | |
| | | | (a) | (kg) | (mm) | (mm) | (mm) | (mm) | (mm) | (ml) |
| 1 | 1 | 403 | 5 | 55 | 243 | 220 | 24 | 21 | 22,5 | 19,9 |
| 2 | 1 | 474 | 4 | 61 | 232 | 200 | 23 | 20 | 21,5 | 18,2 |
| 3 | 1 | 472 | 4 | 70 | 242 | 220 | 25 | 19 | 22,0 | 19,0 |
| 4 | 1 | 470 | 4 | 71 | 236 | 220 | 23 | 19 | 21,0 | 17,3 |
| 5 | 1 | 431 | 4 | 68 | 239 | 220 | 24 | 19 | 21,5 | 18,2 |
| | | | | | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 5 | 58 | 236 | 220 | 20 | 19 | 19,5 | 15,0 |
| 8 | 2 | 462 | 5 | 53 | 242 | 220 | 22 | 20 | 21,0 | 17,3 |
| 9 | 2 | 421 | 5 | 70 | 241 | 220 | 25 | 21 | 23,0 | 20,8 |
| 10 | 2 | 420 | 4 | 68 | 241 | 220 | 24 | 19 | 21,5 | 18,2 |
| | | | | | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | 5 | 65 | 235 | 220 | 23 | 20 | 21,5 | 18,2 |
| 13 | 3 | 410 | 5 | 63 | 234 | 220 | 22 | 20 | 21,0 | 17,3 |
| 14 | 3 | 475 | 5 | 60 | 236 | 220 | 24 | 20 | 22,0 | 19,0 |
| | | | | | | | | | | |
| MW | | | 4,6 | 63,5 | 238,1 | 218 | 23,3 | 19,8 | 21,50 | 18,20 |
| StA | | | 0,5 | 6,1 | 3,7 | 5,8 | 1,4 | 0,8 | 0,88 | 1,46 |

Tabelle 7-1 Versuchstierdaten

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Mobilisation | Besonderheiten |
|----------|--------|-------------|--|---|
| 1 | 1 | 403 | Normal. | |
| 2 | 1 | 474 | Normal. | |
| 3 | 1 | 472 | Aufstehen verzögert, Hilfe erforderlich. | Bronchitis in der 3. postop. Woche. |
| 4 | 1 | 470 | Lebhaft, sehr aktiv. | |
| 5 | 1 | 431 | Sehr lebhaft. | |
| 6 | 1 | 405 | Aufstehen verzögert, Hilfe erforderlich. | Tod am 3. postop. Tag durch Tympanie. |
| | | | | |
| 7 | 2 | 466 | Scheu, passiv. | Defektkantenausriß distal dorsal in 2. postop. Woche. |
| 8 | 2 | 462 | Scheu, passiv. | Im Verlauf rezidiv. Husten. |
| 9 | 2 | 421 | Sehr temperamentvoll. Laufen normal ab 3. Woche. | Defektkantenausriß proximal lateral in 2. postop. Woche. |
| 10 | 2 | 420 | Aufstehen anfangs verzögert. Laufen normal ab 4. Woche. | |
| | | | | |
| 11 | 3 | 422 | Sehr aktiv. Laufen normal ab 4. Woche. | Defektkantenausriß proximal lateral in 2. postop. Woche. |
| 12 | 3 | 476 | Belastet operiertes Bein nicht, Dreibeinstand kaum möglich. | Euthanasie am 6. postop. Tag nach dislozierter Fraktur der operierten Tibia. |
| 13 | 3 | 410 | Sehr aktiv. | |
| 14 | 3 | 475 | Normal. | Defektkantenausriß proximal dorsal in 2. postop. Woche. |
| 15 | 3 | 425 | Aufstehen erheblich verzögert, längeres Stehen ohne Hilfe nicht möglich. | Defektkantenausriß proximal dorsal in 4. postop. Woche. Euthanasie in der 5. postop. Woche bei therapieresistenten infizierten Dekubitalulcera der beiden Vorderläufe. |

Tabelle 7-2 Klinischer Verlauf

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Woche | | | | | | |
|----------|--------|-------------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
| 1 | 1 | 403 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 |
| 2 | 1 | 474 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 1 | 472 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 5 |
| 4 | 1 | 470 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | 1 | 431 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | | | | | | |
| MW | 1 | | 0 | 0,6 | 1,8 | 2 | 2,2 | 2,6 | 2,8 |
| STA | 1 | | 0 | 0,55 | 0,45 | 0,71 | 1,10 | 1,52 | 1,64 |
| | | | | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 0 | 0 | 2 | 3 | 5 | 5 | 5 |
| 8 | 2 | 462 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 |
| 9 | 2 | 421 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| 10 | 2 | 420 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| | | | | | | | | | |
| MW | 2 | | 0 | 0,5 | 2 | 2,25 | 2,75 | 3 | 3,75 |
| STA | 2 | | 0 | 0,58 | 0 | 0,5 | 1,5 | 1,41 | 0,96 |
| | | | | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 13 | 3 | 410 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 14 | 3 | 475 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| | | | | | | | | | |
| MW | 3 | | 0 | 0 | 1 | 1,33 | 1,67 | 2 | 2 |
| STA | 3 | | 0 | 0 | 0 | 0,58 | 0,58 | 0 | 0 |

Tabelle 7-3 Röntgenverlaufskontrollen. Daten im Score-System modifiziert nach COOK. Die einer Heilung entsprechenden Score-Werte sind fett gedruckt.

| Gruppe | 1 | 2 | 3 |
|---------|---|---|---|
| Anzahl | 5 | 4 | 3 |
| Heilung | 2 | 2 | 0 |

Tabelle 7-4 Röntgenverlaufskontrollen. Heilung bei Score >3

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | > 100 HU | > 300 HU | > 600 HU | > 900 HU | > 1200 HU |
|----------|--------|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 1 | 403 | 11,26 | 6,62 | 4,27 | 2,33 | 0,75 |
| 2 | 1 | 474 | 7,70 | 5,17 | 3,89 | 2,80 | 1,77 |
| 3 | 1 | 472 | 12,53 | 10,93 | 9,20 | 6,99 | 3,21 |
| 4 | 1 | 470 | 8,69 | 6,19 | 4,85 | 3,67 | 2,37 |
| 5 | 1 | 431 | 6,59 | 2,52 | 1,74 | 1,08 | 0,56 |
| | | | | | | | |
| MW | 1 | | 9,35 | 6,29 | 4,79 | 3,37 | 1,73 |
| STA | 1 | | 2,48 | 3,05 | 2,73 | 2,23 | 1,11 |
| | | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 18,27 | 16,71 | 14,95 | 12,63 | 5,90 |
| 8 | 2 | 462 | 35,15 | 27,18 | 15,59 | 6,81 | 2,18 |
| 9 | 2 | 421 | 15,65 | 12,39 | 9,07 | 5,89 | 2,91 |
| 10 | 2 | 420 | 16,72 | 13,17 | 9,54 | 5,72 | 2,05 |
| | | | | | | | |
| MW | 2 | | 21,45 | 17,36 | 12,29 | 7,76 | 3,26 |
| STA | 2 | | 9,20 | 6,81 | 3,46 | 3,28 | 1,80 |
| | | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | 4,94 | 3,76 | 2,63 | 1,35 | 0,34 |
| 13 | 3 | 410 | 8,51 | 7,14 | 5,25 | 3,11 | 1,26 |
| 14 | 3 | 475 | 5,39 | 4,91 | 4,15 | 3,30 | 2,30 |
| | | | | | | | |
| MW | 3 | | 6,28 | 5,27 | 4,01 | 2,59 | 1,30 |
| STA | 3 | | 1,94 | 1,72 | 1,32 | 1,08 | 0,98 |

Tabelle 7-5 3D-CT-Volumetrie. Knochenvolumen innerhalb des Defektbereiches in ml.

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Tibia links (N) | Tibia rechts (N) | Relation (%) |
|----------|--------|-------------|-----------------|------------------|--------------|
| 3 | 1 | 472 | 367 | 3818 | 9,6 |
| | | | | | |
| MW | 1 | | 367 | 3818 | 9,6 |
| STA | 1 | | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 575 | 3122 | 18,4 |
| 8 | 2 | 462 | 460 | 3137 | 14,7 |
| 9 | 2 | 421 | 393 | 5100 | 7,7 |
| 10 | 2 | 420 | 521 | 4583 | 11,4 |
| | | | | | |
| MW | 2 | | 487 | 3986 | 13,1 |
| STA | 2 | | 78 | 1011 | 4,6 |

Tabelle 7-6 Biomechanik. 4-Punkt-Biegeversuch. Maximale Bruchlast in Newton (N) bzw. %.

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Ebene 1 | Ebene 2 | Ebene 3 | Ebene 4 | Ebene 5 |
|----------|--------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 1 | 403 | 101,52 | 101,19 | 52,21 | 40,87 | 45,68 |
| 2 | 1 | 474 | 170,16 | 10,37 | 13,13 | 20,27 | 99,55 |
| 3 | 1 | 472 | 261,71 | 246,34 | 189,89 | 137,06 | 255,77 |
| 4 | 1 | 470 | 55,15 | 174,27 | 85,53 | 0 | 47,30 |
| 5 | 1 | 431 | 164,88 | 0 | 0 | 30,65 | 35,87 |
| | | | | | | | |
| MW | 1 | | 150,68 | 106,43 | 68,15 | 45,77 | 96,83 |
| STA | 1 | | 78,18 | 105,78 | 75,91 | 53,23 | 92,27 |
| | | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 391,88 | 315,41 | 225,38 | 256,25 | 273,35 |
| 8 | 2 | 462 | 278,36 | 346,34 | 593,98 | 583,97 | 275,02 |
| 9 | 2 | 421 | 315,94 | 218,92 | 208,31 | 174,52 | 54,98 |
| 10 | 2 | 420 | 200,30 | 286,79 | 231,13 | 96,03 | 133,11 |
| | | | | | | | |
| MW | 2 | | 296,62 | 291,87 | 314,70 | 277,69 | 184,12 |
| STA | 2 | | 79,71 | 54,37 | 186,44 | 214,41 | 108,79 |
| | | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | 81,77 | 158,87 | 35,56 | 20,49 | 0 |
| 13 | 3 | 410 | 137,54 | 58,20 | 39,31 | 38,72 | 163,46 |
| 14 | 3 | 475 | 162,85 | 77,31 | 28,03 | 0 | 131,78 |
| | | | | | | | |
| MW | 3 | | 127,39 | 98,13 | 34,30 | 19,74 | 98,41 |
| STA | 3 | | 41,48 | 53,47 | 5,74 | 19,37 | 86,69 |

Tabelle 7-7 Mikroradiographie. Gesamtfläche in mm² aus allen 4 Quadranten in der Transversalebene.

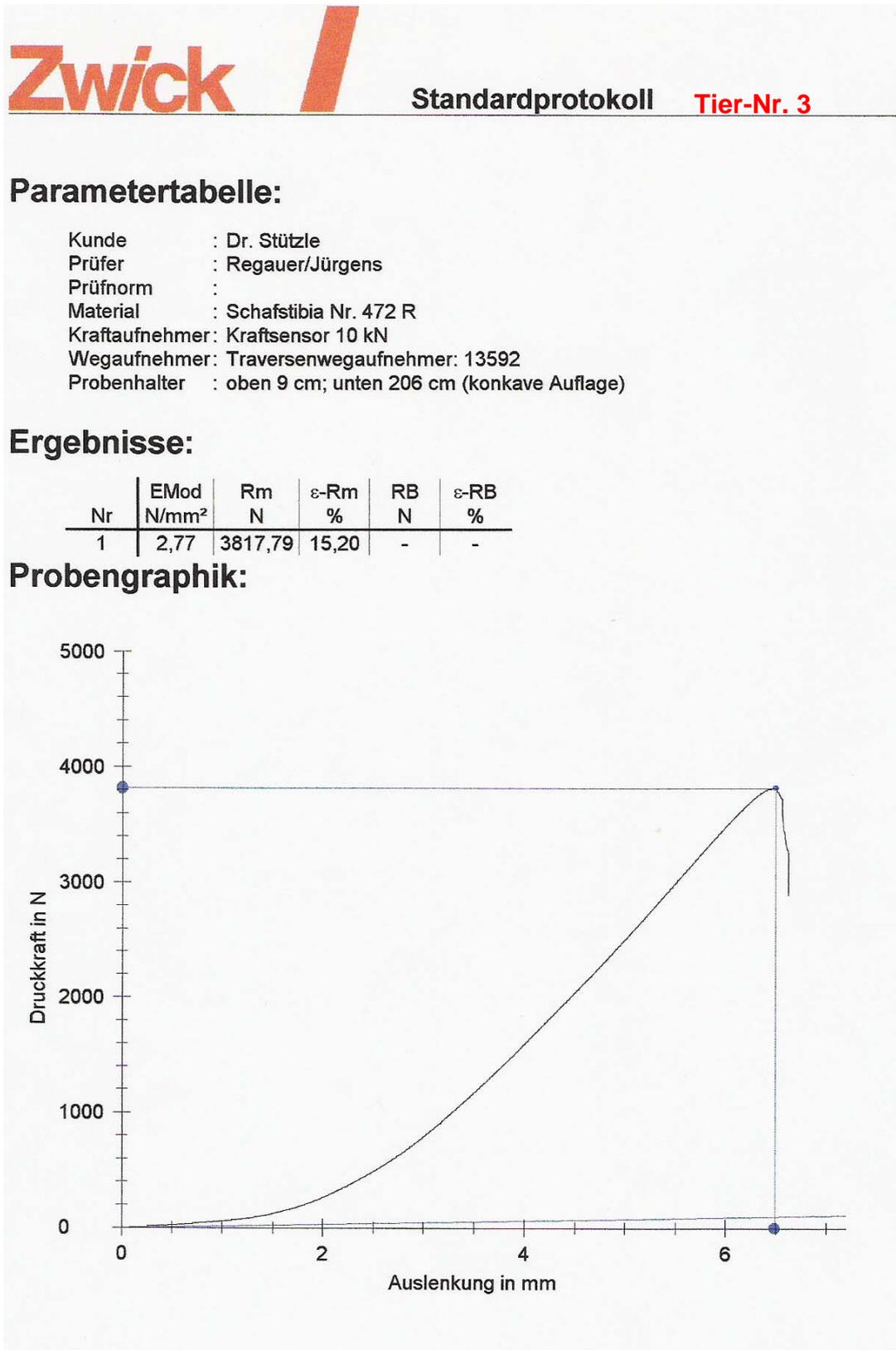
| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Quadrant 1 | Quadrant 2 | Quadrant 3 | Quadrant 4 |
|----------|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 1 | 403 | 147,63 | 36,62 | 60,41 | 95,81 |
| 2 | 1 | 474 | 84,96 | 114,57 | 79,19 | 35,03 |
| 3 | 1 | 472 | 262,28 | 356,51 | 326,46 | 145,52 |
| 4 | 1 | 470 | 134,96 | 176,77 | 25,11 | 25,52 |
| 5 | 1 | 431 | 77,28 | 55,79 | 50,14 | 48,19 |
| | | | | | | |
| MW | 1 | | 141,42 | 148,05 | 108,26 | 70,01 |
| STA | 1 | | 74,14 | 128,77 | 123,53 | 50,12 |
| | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | 232,27 | 650,99 | 455,32 | 123,69 |
| 8 | 2 | 462 | 703,65 | 357,03 | 415,05 | 601,94 |
| 9 | 2 | 421 | 191,86 | 388,22 | 267,25 | 125,34 |
| 10 | 2 | 420 | 383,64 | 285,64 | 141,06 | 137,02 |
| | | | | | | |
| MW | 2 | | 377,86 | 420,47 | 319,67 | 247,00 |
| STA | 2 | | 232,35 | 159,57 | 143,93 | 236,70 |
| | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | 45,17 | 184,89 | 48,09 | 18,54 |
| 13 | 3 | 410 | 160,73 | 195,67 | 17,12 | 63,71 |
| 14 | 3 | 475 | 114,58 | 184,94 | 81,91 | 27,54 |
| | | | | | | |
| MW | 3 | | 106,83 | 188,50 | 49,04 | 36,60 |
| STA | 3 | | 58,17 | 6,21 | 32,41 | 23,91 |

Tabelle 7-8 Mikroradiographie. Quadrantenflächensumme entlang der Longitudinalebene in mm².

| Tier-Nr. | Gruppe | Tier-Ident. | Knorpel | Säulen- formation | Ausrichtung tangential | Gelenkfläche > 25% endostal | H max. (mm) |
|----------|--------|-------------|---------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|----------------|
| 1 | 1 | 403 | + | + | + | + | 1,17 |
| 2 | 1 | 474 | + | + | - | + | 0,96 |
| 3 | 1 | 472 | + | + | + | + | 1,14 |
| 4 | 1 | 470 | + | - | - | - | - |
| 5 | 1 | 431 | + | + | - | - | - |
| | | | | | | | |
| % | 1 | | 100 | 80 | 40 | 60 | |
| | | | | | | | |
| 7 | 2 | 466 | - | - | - | - | - |
| 8 | 2 | 462 | + | - | - | - | 0,27 |
| 9 | 2 | 421 | + | + | + | + | 0,95 |
| 10 | 2 | 420 | + | - | - | - | - |
| | | | | | | | |
| % | 2 | | 75 | 25 | 25 | 25 | |
| | | | | | | | |
| 11 | 3 | 422 | + | - | - | - | - |
| 13 | 3 | 410 | + | + | + | - | 0,65 |
| 14 | 3 | 475 | + | - | - | - | - |
| | | | | | | | |
| % | 3 | | 100 | 33 | 33 | 0 | |

Tabelle 7-9 Knorpelhistologie. Morphologische und morphometrische Auswertung.

7.6. Protokolle der biomechanischen Auswertung





Standardprotokoll

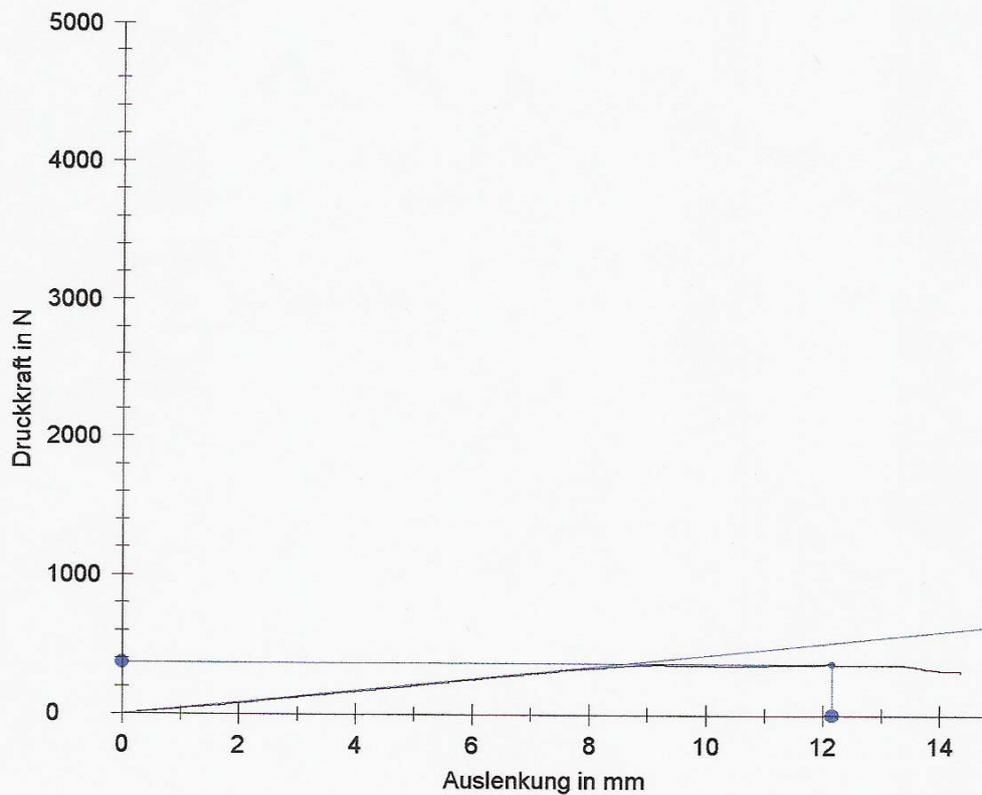
Tier-Nr. 3

Parametertabelle:

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 472 L
Kraftaufnehmer: Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer: Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ϵ -Rm % | RB N | ϵ -RB % |
|----|---------------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|
| 1 | 5,58 | 366,50 | 30,71 | - | - |

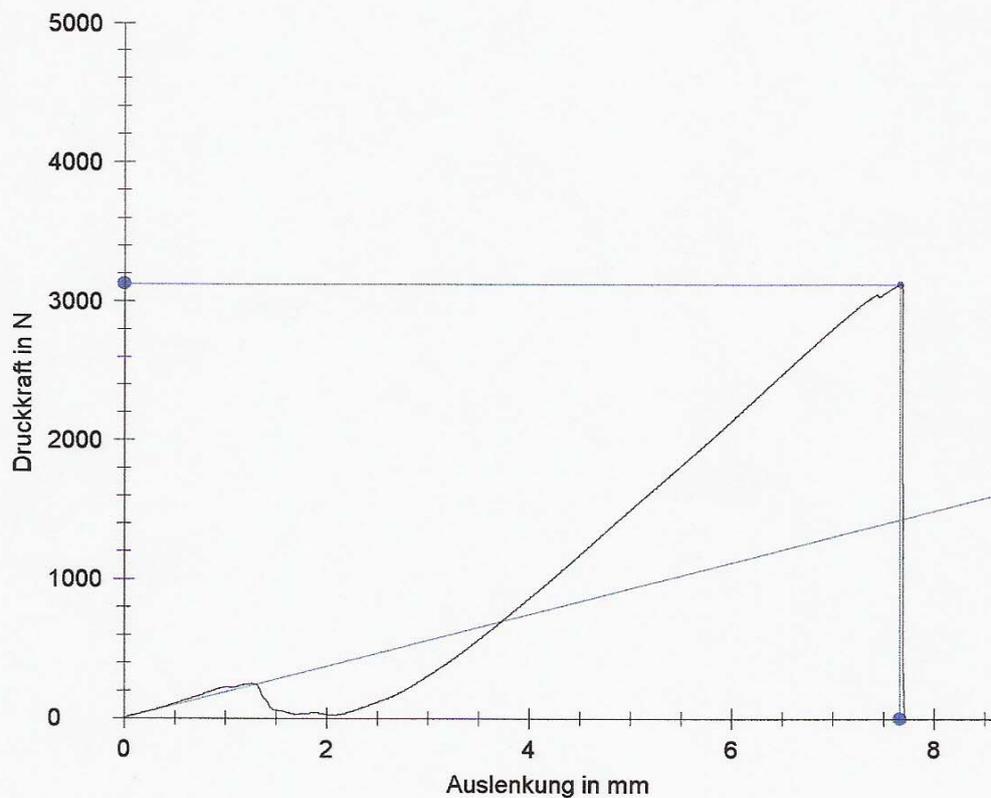
Probengraphik:

Standardprotokoll **Tier-Nr. 7****Parametertabelle:**

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 466 R
Kraftaufnehmer: Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer: Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 58,80 | 3122,12 | 15,50 | - | - |

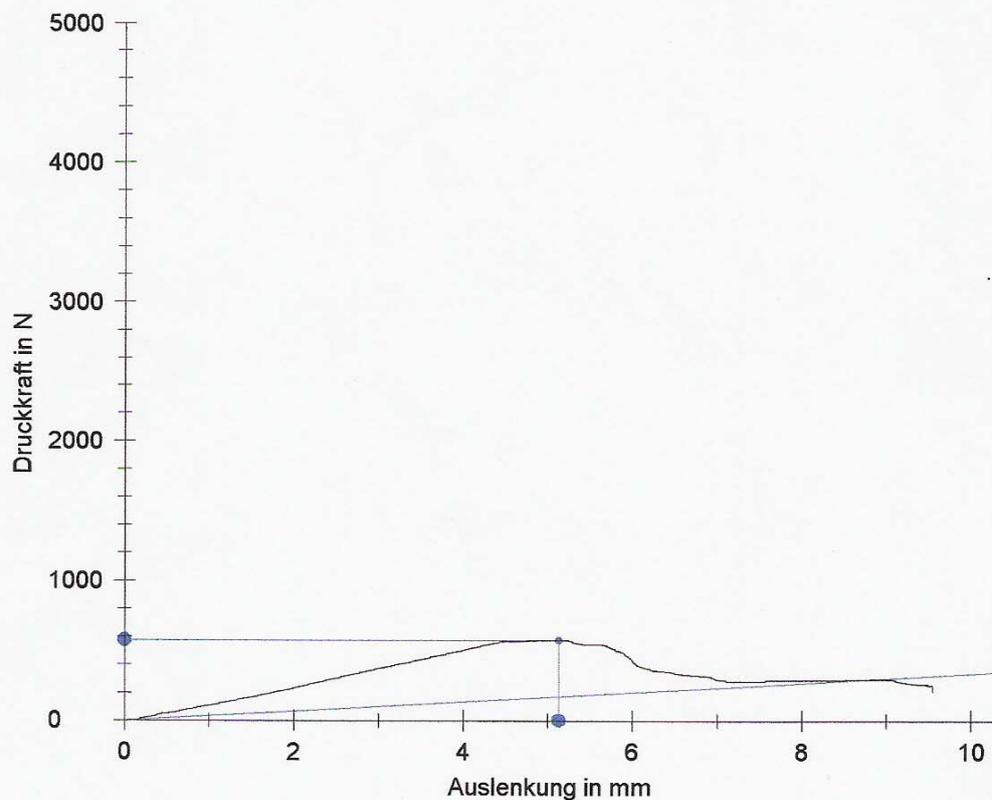
Probengraphik:

Standardprotokoll **Tier-Nr. 7****Parametertabelle:**

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 466 L
Kraftaufnehmer: Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer: Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 5,08 | 575,45 | 12,48 | - | - |

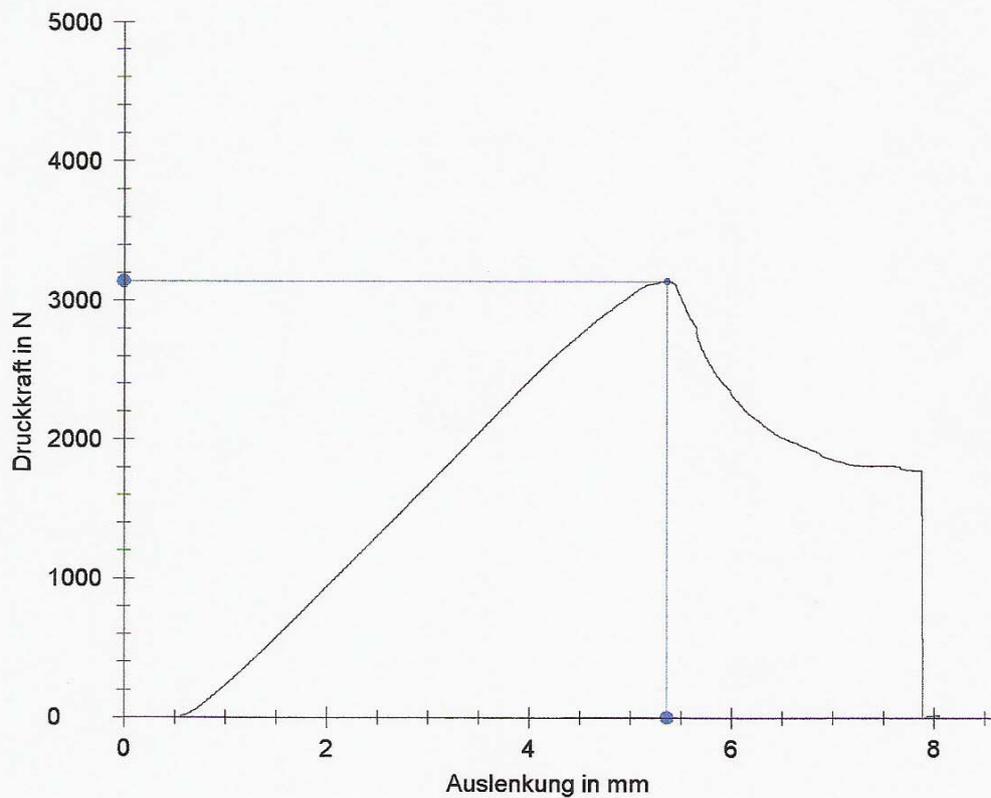
Probengraphik:

Standardprotokoll **Tier-Nr. 8****Parametertabelle:**

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 462 R
Kraftaufnehmer : Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer : Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 0,22 | 3137,12 | 16,13 | - | - |

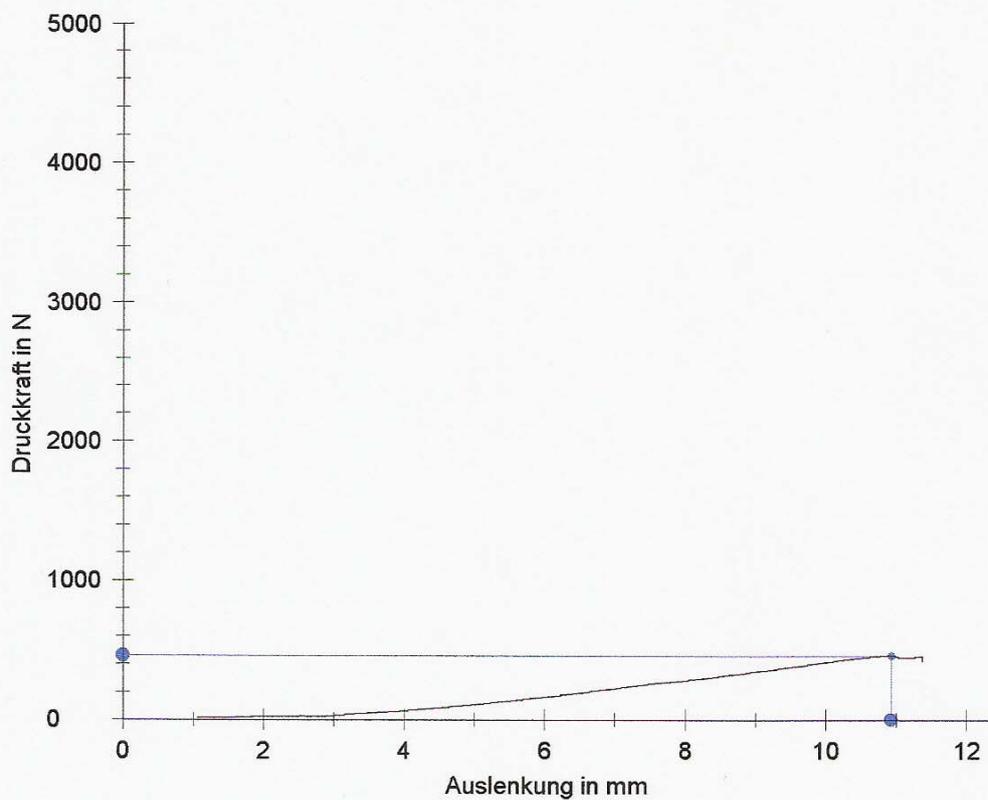
Probengraphik:

Standardprotokoll **Tier-Nr. 8****Parametertabelle:**

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 462 L
Kraftaufnehmer : Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer : Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 1,31 | 459,59 | 27,42 | - | - |

Probengraphik:



Standardprotokoll Tier-Nr. 9

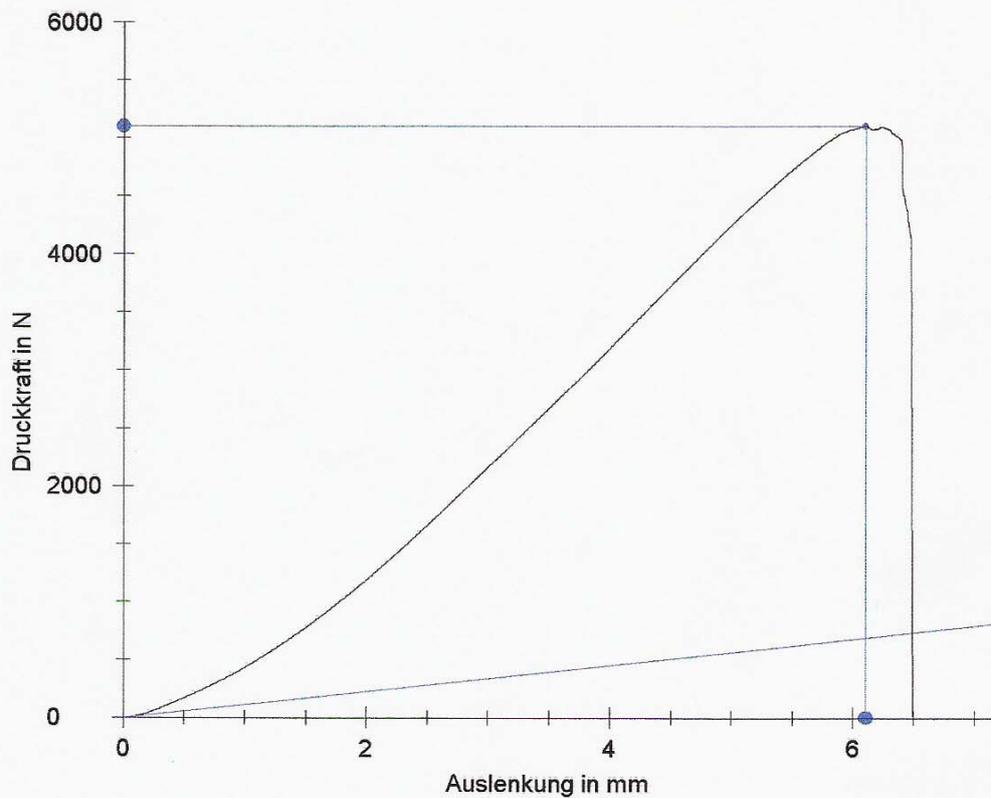
Parametertabelle:

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 421 R
Kraftaufnehmer : Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer : Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20.6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 20,43 | 5099,54 | 14,17 | - | - |

Probengraphik:





Standardprotokoll

Tier-Nr. 9

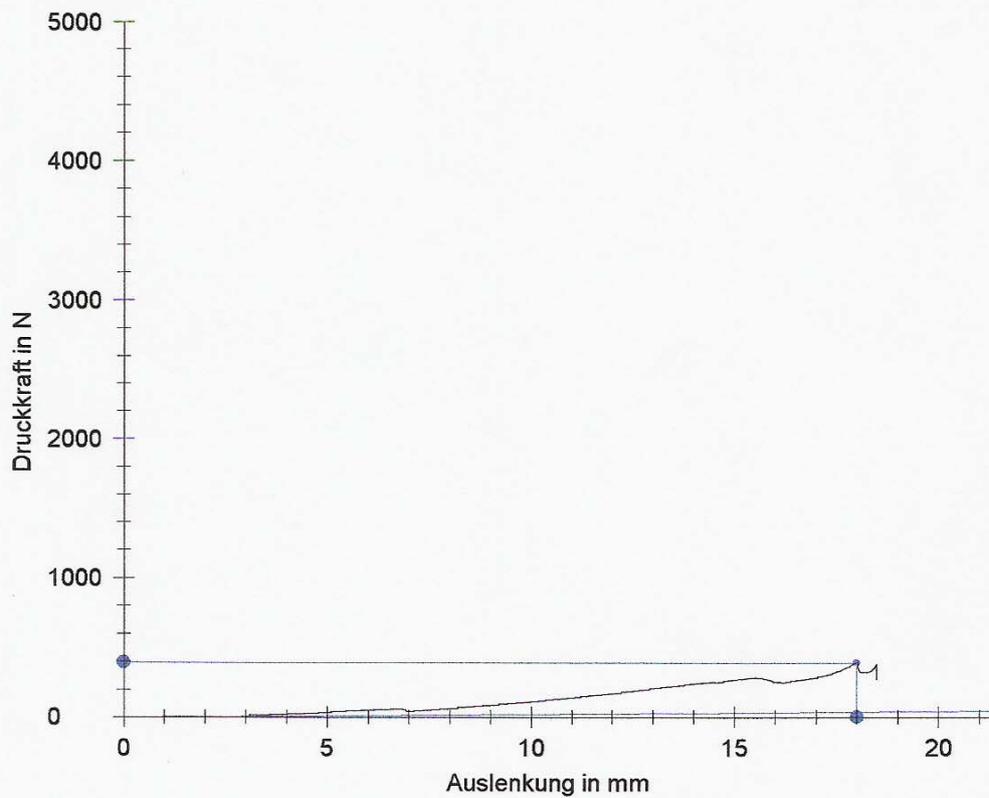
Parametertabelle:

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 421 L
Kraftaufnehmer: Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer: Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 0,26 | 393,37 | 45,52 | - | - |

Probengraphik:





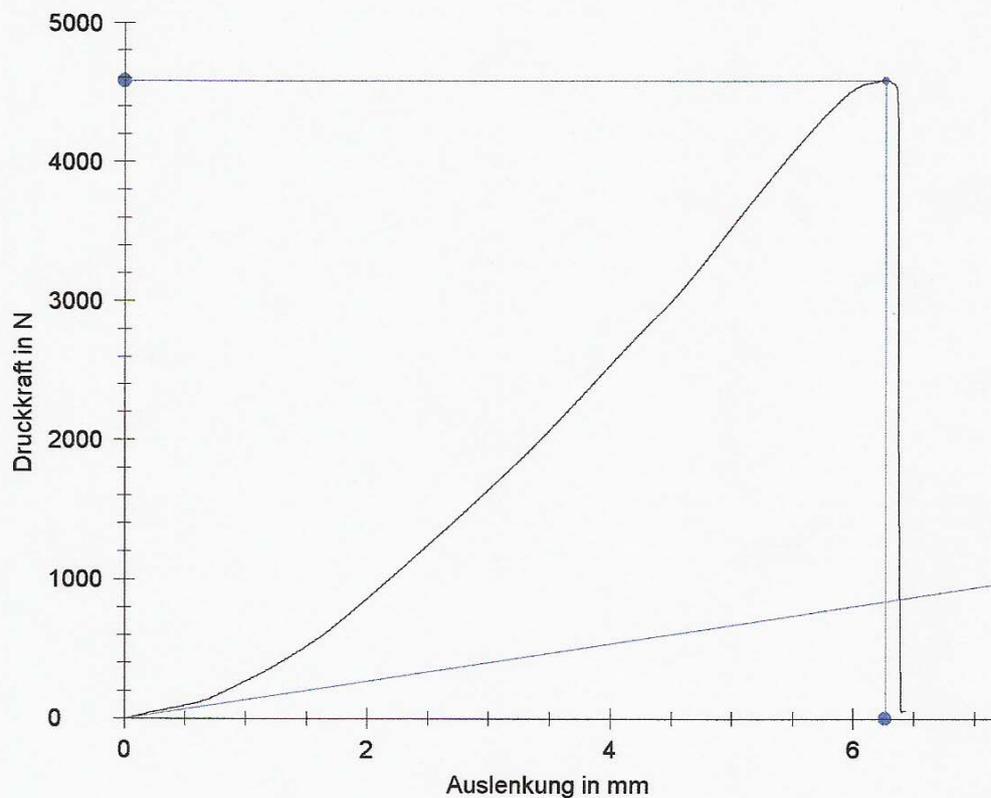
Parametertabelle:

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 420 R
Kraftaufnehmer : Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer : Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ε-Rm % | RB N | ε-RB % |
|----|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 24,18 | 4582,77 | 14,58 | - | - |

Probengraphik:





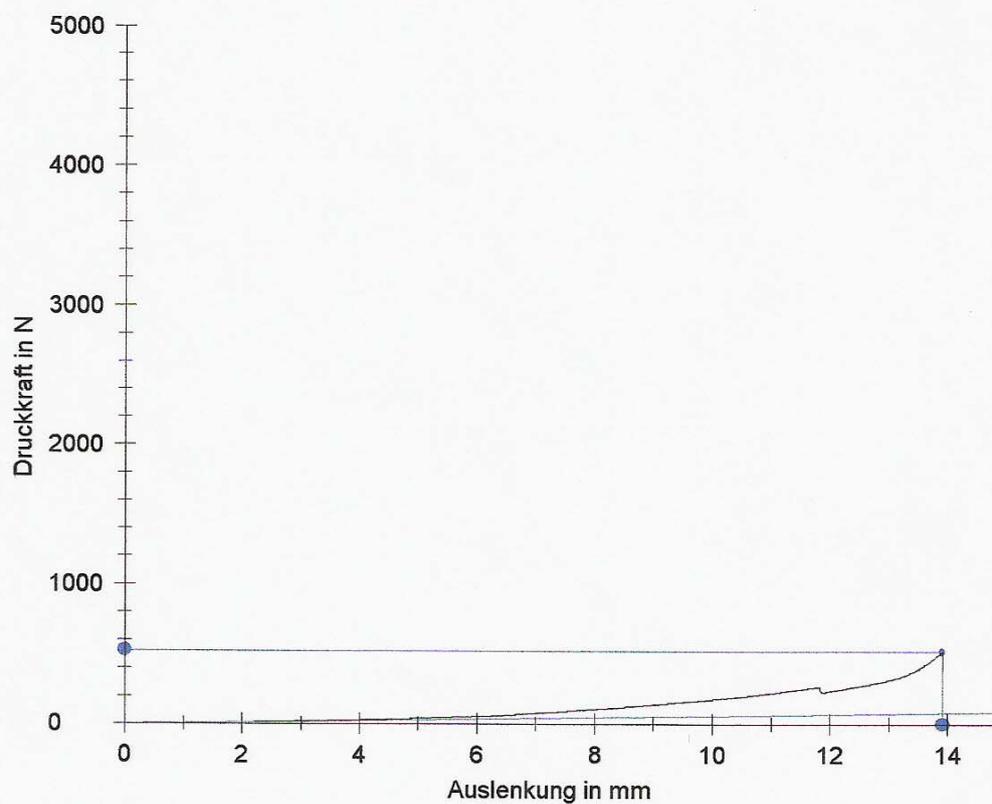
Parametertabelle:

Kunde : Dr. Stütze
Prüfer : Regauer/Jürgens
Prüfnorm :
Material : Schafstibia Nr. 420 L
Kraftaufnehmer : Kraftsensor 10 kN
Wegaufnehmer : Traversenwegaufnehmer: 13592
Probenhalter : oben 9 cm; unten 20,6 cm (konkave Auflage)

Ergebnisse:

| Nr | EMod N/mm ² | Rm N | ϵ -Rm % | RB N | ϵ -RB % |
|----|---------------------------|---------|---------------------|---------|---------------------|
| 1 | 0,89 | 521,27 | 33,81 | - | - |

Probengraphik:



Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an:

- Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler, meinen Doktorvater, für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die großzügige Förderung meiner klinischen Ausbildung.
- Herrn PD Dr. med. Matthias Schieker, Leiter des Forschungslabors für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, für die hervorragende und intensive Betreuung meiner Arbeit sowie für die freundschaftliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Angelegenheiten.
- Herrn Dr. med. Hubert Stütze, meinen initialen Betreuer, der das Konzept der Arbeit erstellt und geplant hatte, mit Herrn Ingo Jürgens und mir die Versuchsoperationen durchführte, mir die ersten Schritte des chirurgischen Handwerks beibrachte und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.
- Herrn cand. med. Ingo Jürgens, meinen Mit-Doktoranden, für die äußerst angenehme, produktive und stets freundschaftliche Zusammenarbeit sowohl im klinischen Alltag als auch im Rahmen der Tierversuche und Auswertungen.
- Frau Dr. med. Dorothea Kotsianos, Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Universität München, für ihre umfangreiche Hilfe bei der Durchführung der 3D-CT-Volumetrie.
- Herrn Dr. med. Michael Stengele, für seine stets verfügbare und hochqualifizierte Hilfe in allen EDV-Angelegenheiten.
- Herrn Dr. med. Thomas Tischer für die kompetente Anleitung zur Durchführung der Mikroradiographie und Fluoreszenzoptik.

- Herrn Dr. Dr. med. Christoph Pautke für seine kompetente Hilfe bei der Fotooptik.
- Frau Dr. med. Stefanie Strobl für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Auswertung der Mikroradiographien.
- Herrn Dr. med. vet. Heinz-Peter Scheuber, Leiter des TIZ-BIFO und der Tierversuchsanlage der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München, für die stets unkomplizierte und sehr kompetente tiermedizinische Betreuung.
- Herrn Prof. Dr. Ing. Wolfgang Plitz, Technischer Leiter des Labors für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie am Klinikum Großhadern, für die großzügige Unterstützung bei den biomechanischen Versuchen.
- Herrn PD Dr. med. Stefan Milz vom Lehrstuhl Anatomie I der Anatomischen Anstalt der Universität München für den stetigen Zugang zur Laborinfrastruktur der Anatomischen Anstalt und für die wissenschaftliche Begleitung der feingeweblichen Untersuchungen.
- Frau Maier, Frau Dinter und Frau Loew, Anatomische Anstalt München, für die Hilfe bei der Herstellung der histologischen Präparate.
- Familie Martin Schmid, Deutenhausen, für die Transporte und die fachmännische Betreuung der Versuchstiere sowie die stets freundschaftliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. med. Lex Giltaj und der Firma Stryker Biotech, Natick, USA, für das zu den Versuchszwecken zur Verfügung gestellte rhOP-1 (OP-1 device).

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner gesamten Familie: Meinen Eltern **Peter Regauer** und **Maria Regauer** für Ihre immerwährende und äußerst großzügige sowie auch tatkräftige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung bis zum heutigen Tage, welche mir letztlich erst ermöglichte, meinen bisherigen Weg zu gehen. Meinem Bruder **Christian Regauer** für seine fachmännische und geduldige Unterstützung bei Computerproblemen aller Art. Und schließlich meiner Ehefrau **Sabine Regauer** und unserer Tochter **Daniela Regauer** für ihre ausdauernde Geduld, ihr stets großes Verständnis auch in schwierigen Zeiten und ihre liebevolle mentale Unterstützung, wodurch ich immer wieder die notwendige Kraft tanken konnte.

Lebenslauf

Name: Markus Peter Regauer

Anschrift: Blumenweg 5 b, 83080 Oberaudorf

E-Mail: Markus.Regauer@med.uni-muenchen.de

Persönliche Daten

Geboren am 25. März 1972 in Rosenheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Sabine Regauer
Kind: Daniela Regauer, geboren am 30. Dezember 1994

Berufsziel

Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie,
Zusatzbezeichnung Sportmedizin, Habilitation

Ausbildung

Schule

07/92

Allgemeine Hochschulreife am Finsterwalder-Gymnasium
in Rosenheim (Abiturnote 1,6)

Zivildienst

01/93-03/94

Onkologische Klinik Bad Trissl: Krankenpflegehelfer

Studium

seit 05/94

Humanmedizin an der LMU-München

03/96

Ärztliche Vorprüfung

03/97

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/99

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/00

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,6)

Praktisches Jahr

| | |
|---------------|--|
| 10/99 – 01/00 | Chirurgische Klinik und Chirurgische Poliklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München: Chirurgie |
| 02/00 – 05/00 | Klinikum Rosenheim: Orthopädie und Sportorthopädie |
| 06/00 – 09/00 | Medizinische Poliklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München: Innere Medizin |

Doktorarbeit in der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
im Chirurgischen Forschungslabor der Chirurgischen Klinik
und Poliklinik Innenstadt am Klinikum der Universität
München (Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler)

Thema: Knochenneubildung und Knochendefektheilung
durch den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor
Osteogenic Protein-1 (BMP-7) – Tierexperimentelle
Untersuchungen am Problemdefektmodell der Schafstibia

Berufliche Tätigkeit

| | |
|---------------|--|
| 10/00 | Teilapprobation als Arzt |
| 12/00 | Einstellung als Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt am Klinikum der Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler) |
| 12/00 – 02/02 | Chirurgische Intensivstationen |
| 02/02 – 04/02 | Chirurgische Notaufnahme und Schockraum |
| 05/02 – 10/02 | Kinderchirurgie (Dr. von Hauner Kinderspital) |
| 06/02 | Approbation als Arzt |
| seit 10/02 | Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum der Universität München |
| seit 10/05 | Notarzt-Tätigkeit (Standort Kiefersfelden) |

Auszeichnungen

| | |
|---------------|---|
| 10/96 – 10/00 | Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung |
| 08/97 – 08/98 | Stipendiatensprecher der Hochschulgruppe München II |
| 10/01 | Posterpreis der Vereinigung für Grundlagenforschung in der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädischen Chirurgie (DGOOC) |
| seit 03/05 | Review-Tätigkeit für ISSO – International Seminars in Surgical Oncology |
| seit 07/05 | Review-Tätigkeit für Der Unfallchirurg |
| seit 04/07 | Review-Tätigkeit für Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery |
| seit 04/05 | Member of Editorial Board ISSO – International Seminars in Surgical Oncology |

KenntnisseFremdsprachen

Englisch: flüssig in Wort und Schrift
Spanisch: Grundkenntnisse

EDV

Anwendersoftware: Windows Office Paket

Methoden

Zwei Jahre Großtierversuchserfahrung (Schaf)
Versuchstierkunde (TIZ-BIFO Kurs 2 Wochen)
Biomechanik und Knochenhistologie

Qualifikationen

Fachkunde im Strahlenschutz nach §18a RÖV
Fachkunde Notfall- und Rettungsmedizin
Zusatzbezeichnung Sportmedizin

Publikationen

Originalarbeiten

1. Regauer M, Jürgens P, Budenhofer U, Hartstock M, Böcker W, Bürklein D, Mutschler W, Sader R, Schieker M. Quantitative scanning acoustic microscopy compared to microradiography for assessment of new bone formation. Bone. 2006 Apr;38(4):564-70
2. Regauer M, Tischer T, Kanz KG, Schieker M, Kettler M, Mutschler W. Anterior dislocation of the shoulder - a reduction technique that is easy on the patient. MMW Fortschr Med. 2005 Aug 18;147(33-34):38-41
3. Regauer M, Tischer T, Kanz KG, Schieker M, Kettler M, Mutschler W. Modifizierte Skapulamanipulationstechnik – schonende Reposition bei ventraler Schulterluxation. Orthopädie und Rheuma 2005;6:34-39
4. Regauer M, Jürgens I, Kotsianos D, Stützle H, Mutschler W, Schieker M. New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep. Zentralbl Chir. 2005 Aug;130(4):338-45
5. Hittinger M, Regauer M, Rucker A, Kessler S. Die Behandlung neuropathischer Vorfußulzera durch Achillessehnenverlängerung. Fuß und Sprunggelenk 2005;3:210-213
6. Schieker M, Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W. Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model. Orthopäde. 2004 Dec;33(12):1354-60

7. Muensterer OJ, Regauer MP. Closed reduction of forearm refractures with flexible intramedullary nails in situ.

J Bone Joint Surg Am. 2003 Nov;85-A(11):2152-5

Fallberichte

1. Regauer M, Kettler M, Schieker M, Kanz KG, Mutschler W. Complete rupture of the proximal semimembranosus tendon. Minimally invasive surgical repair by use of a suture anchor in a rare but often underestimated injury.

Unfallchirurg. 2005 Dec;108(12):1072, 1074-7

2. Safak O, Volkering C, Regauer M, Kessler S. The case of a patient with multiple superinfected necroses of both legs caused by vasculitis disease.

Zentralbl Chir. 2004 May;129 Suppl 1:S89-91

Buchbeiträge

1. Regauer M, Mutschler W. Schulterluxation. In: Jauch, Mutschler, Wichmann (eds). Chirurgie Basisweiterbildung. Springer, Berlin, 2007

Bibliographisch zitierfähige Abstracts von Vorträgen und Postern

1. Regauer M, Hinterwimmer S, Bürklein D, Kanz KG, Mutschler W. Scapular manipulation technique for reducing anterior shoulder dislocations – improvement by modification. Vortrag beim 8. EFORT-Kongress, Florenz, 14. Mai 2007

2. Regauer M, Hinterwimmer S, Kettler M, Mutschler W. Komplette Rupturen der proximalen Hamstring-Sehnen im Sport – Diagnostik, Therapie und Verlauf. Vortrag beim 21. Jahreskongress der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS), München, 12.-14. Mai 2006

3. Juergens P, Regauer M, Budenhofer U, Hartstock M, Milz S, Mutschler W, Zeilhofer HF, Schieker M, Sader R. Scanning Acoustic Microscopy Compared to Microradiography for Characterisation of Newly Formed Bone. Vortrag 18th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo facial Surgery (EACMFS), Barcelona, 12.-15. September 2006
4. Juergens P, Regauer M, Budenhofer U, Hartstock M, Milz S, Mutschler W, Schieker M, Zeilhofer HF, Sader R. Quantitative Scanning Acoustic Microscopy (SAM) zur Analyse der Knochenneubildung – vergleichende Untersuchungen zur Mikroradiographie. Poster beim 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Dresden, 07.-10. Juni 2006
5. Regauer M, Juergens P, Budenhofer U, Hartstock M, Mutschler W, Sader R, Schieker M. Charakterisierung der Knochenneubildung durch Quantitative Scanning Acoustic Microscopy. Vortrag beim 1. Gemeinsamen Kongress Orthopädie - Unfallchirurgie, Berlin, 19.-22. Oktober 2005
6. Regauer M, Kettler M, Schieker M, Mutschler W. Komplette Rupturen der proximalen Hamstring-Sehnen – Diagnostik, Therapie und Verlauf. Vortrag beim 1. Gemeinsamen Kongress Orthopädie - Unfallchirurgie, Berlin, 19.-22. Oktober 2005
7. Regauer M, Hinterwimmer S, Dobler T, Mutschler W. Evidenzbasierter Algorithmus zur Akutversorgung der Patellaluxation. Poster beim 1. Gemeinsamen Kongress Orthopädie - Unfallchirurgie, Berlin, 19.-22. Oktober 2005
8. Regauer M, Hinterwimmer S, Kessler S, Mutschler W. Vorteil der Vorfuß-Lauftechnik – Fakt oder Philosophie? Poster beim 1. Gemeinsamen Kongress Orthopädie - Unfallchirurgie, Berlin, 19.-22. Oktober 2005
9. Regauer M, Kettler M, Kanz KG, Mutschler. Evidenzbasierte und anatomische Überlegungen zu einer neuen Repositionstechnik bei ventraler

- Schulterluxation. Vortrag bei der 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin, Oktober 2004
10. Budenhofer U, Hartstock M, Juergens P, Regauer M, Milz S, Mutschler W, Sader R, Schieker M. Quantitative Scanning Acoustic Microscopy compared to Microradiography for Characterisation of newly formed Bone. *Langenbecks Arch Surg* 2004, Vol 389(5): 457 [113]. 8. Chirurgische Forschungstage, Mannheim, 28.-30. Oktober 2004
11. Nentwich M, Seitz S, Regauer M, Horvath G, Gülkan H, Milz S, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells on scaffolds in a mouse model. *Langenbecks Arch Surg* 2004, Vol 389(5): 463 [128]. 8. Chirurgische Forschungstage, Mannheim, 28.-30. Oktober 2004
12. Schieker M, Horvath G, Guelkan H, Seitz S, Regauer M, Neth P, Mutschler W. Composite substitutes in vivo molecular detection of disseminated human mesenchymal stem cells. 6th European Trauma Congress, Prag, Mai 2004
13. Regauer M, Jürgens I, Mutschler W. Osteoinduktion durch Osteogenic Protein-1 und zelluläre Elemente des Knochenmarks im Problemdefektmodell der Schafstibia. Posterpreis der Vereinigung für Grundlagenforschung in der DGOOC, Deutscher Orthopädenkongress, Berlin, Oktober 2001
14. Regauer M, Jürgens I, Kantelhardt T, Kotsianos D, Stützle H, Mutschler W. Einfluß von rekombinantem humanem Osteogenic Protein-1 (rhOP-1) auf die Knochenneubildung im langstreckigen Problemdefektmodell der Schafstibia. Vortrag bei der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (Trauma 2000), Hannover, 10.-13. September 2000

Sonstige Vorträge

1. Regauer M. Verletzungen des Kniegelenkes. Fortbildungs-Veranstaltung der Ambulanz Rosenheim, Flintsbach, 23. September 2008
2. Regauer M. Thoraxdrainage am Unfallort. Fortbildungs-Veranstaltung der Ambulanz Rosenheim, Flintsbach, 15. Juli 2008
3. Regauer M. Patellaluxation. Emergency Update – Verletzungen des Kniegelenks. München, 06. März 2008
4. Regauer M. Evidenzbasierter Algorithmus zur Akutversorgung der Patellaluxation. Montagsfortbildung der Chirurgischen Klinik der Universität, München, 07. Januar 2008
5. Regauer M. Präklinische Reposition von Luxationen und Frakturen im Rettungsdienst. Fortbildungs-Veranstaltung der Ambulanz Rosenheim, Flintsbach, 04. Dezember 2007
6. Regauer M. Reposition mittels modifizierter Skapula-Manipulations-Technik. Emergency Update Schulterluxation, München, 02. August 2007
7. Regauer M. Vorteil der Vorfuß-Lauftechnik – Fakt oder Philosophie? Vortrag beim 10. Workshop Sportmedizin der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS), Bernau – Felden am Chiemsee, 12.-16. Juli 2006
8. Regauer M. Therapie von Muskelverletzungen im Hüft- und Beckenbereich. Vortrag beim 10. Workshop Sportmedizin der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin (GOTS), Bernau – Felden am Chiemsee, 12.-16. Juli 2006

9. Regauer M. Präklinische Reposition von Luxationen und Frakturen im Bergwachtdienst. Fortbildungs-Veranstaltung der Bergwacht Oberaudorf, Oberaudorf, April 2006
10. Regauer M. Repositionstechniken bei der Schulterluxation. Vortrag beim 1. Gemeinsamen Kongress Orthopädie - Unfallchirurgie, Kurs Schulterluxation, Berlin, 19.-22. Oktober 2005
11. Regauer M. Repositionstechniken bei Schulterluxationen. Vortrag beim 25. Süddeutschen AO-Seminar, Titisee, Juli 2004
12. Horvath G, Gülkan H, Seitz S, Regauer M, Neth P, Mutschler W, Schieker M. Molekularbiologischer Nachweis zur Detektion migrierter Zellen nach Implantation von mesenchymalen Stammzellen im Mausmodell. XXXVI. Münchner Symposion für experimentelle Orthopädie, München, 6. - 7. Februar 2004
13. Seitz S, Pautke C, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W, Schieker M. Tissue Engineering von Knochen: Nachweis von Knochenzellwachstum in besiedelten Konstrukten im Mausmodell. XXXVI. Münchner Symposion für experimentelle Orthopädie, München, 6. - 7. Februar 2004
14. Regauer M, Jürgens I. Knochenneubildung durch Osteogenic Protein-1 und Knochenmarkszellen – Tierexperimentelle Untersuchungen am Problemdefektmodell der Schafstibia. Fortbildungsveranstaltung der Chirurgischen Klinik der Universität, München, 06. Oktober 2002