

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie  
und Aufnahme  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. J. Becker

**Regeneration von knöchernen Dehiszenzdefekten an  
sub- und transmukosal einheilenden chemisch  
modifizierten und konventionellen SLA-  
Titanimplantaten.  
Eine immunhistochemische Tierstudie an Beagle-Hunden.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

**Daniel Niko Ferrari**

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med Joachim Windolf

Dekan

Referent: Privatdozent Dr. med. dent. Frank Schwarz

Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler

Meinen Eltern gewidmet.

## Abkürzungsverzeichnis

BF	Fläche des neuen Knochens
BIC-D	Knochen Implantat Kontakt innerhalb des Defektes
BTB	Übergang des enossalen zum transmukosalen Anteil des Implantates
DL	Defektlänge
D-CBI	Unterschied des crestalsten Knochen bukkal und oral
GBR	guided bone regeneration
GTR	guided tissue regeneration
modSLA	sandgestrahlt, säuregeätzt und hydrophil
NBH	neue Knochenhöhe
OK	Oberkiefer
P	Signifikanzniveau
PLF	prozentuale Defektauffüllung
SLA	sandgestrahlt und säuregeätzt
TPS	Titan plasmabeschichtet
UK	Unterkiefer

Inhaltsverzeichnis	5
1 EINLEITUNG	
1.1 Allgemein	7
1.2 Ultrahydrophile modSLA-Implantatoberfläche	10
1.3 Hypothese	13
2 MATERIAL UND METHODE	
2.1 Implantate	13
2.2 Tiere	14
2.3 Studiendesign	14
2.4 Chirurgisches Vorgehen	16
2.5 Tötung der Tiere und Probenentnahme	19
2.6 Probenaufbereitung und -einbettung	19
2.7 Hartgewebshistologie	19
2.8 Toluidin-blau-Färbung	20
2.9 Masson-Goldner-Färbung	21
2.10 Histomorphometrie	22
2.11 Statistik	24
2.12 Immunhistochemie	25
3 ERGEBNISSE	
3.1 Histomorphometrische Ergebnisse	26
3.1.1 Ergebnisse Oberkiefer-transmukosale Einheilung	29
3.1.2 Ergebnisse Oberkiefer-submukosale Einheilung	34

3.1.3	Ergebnisse Unterkiefer-transmukosale Einheilung	39
3.1.4	Ergebnisse Unterkiefer-submukosale Einheilung	44
3.2	Masson-Goldner-Färbung	51
3.3	Immunhistochemische Ergebnisse	54
3.3.1	1 Woche	54
3.3.2	2 Wochen	57
4	DISKUSSION	60
5	SCHLUSSFOLGERUNG	74
6	LITERATURVERZEICHNIS	75
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
8	TABELLENVERZEICHNIS	91
9	ZUSAMMENFASSUNG	92
10	SUMMARY	93
11	DANKSAGUNG	94
12	LEBENS LAUF	95
13	ANHANG	96

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Allgemein**

Zähne stellen einen wichtigen Teil unserer persönlichen Ausstrahlung dar. Sie ermöglichen uns eine deutliche Phonation, ein angenehmes Essen und letztendlich eine ansprechende Ästhetik. Diese Eigenschaften nehmen wir erst wahr, wenn wir Zähne verloren haben oder diese mittels konventionellen Brücken und Prothesen ersetzt wurden. Seit nunmehr über 40 Jahren bieten uns Zahnimplantate die Möglichkeit, Zähne vollwertig und langfristig zu ersetzen. Es können einzelne oder aber auch mehrere Zähne durch Implantate ersetzt werden. Ausserdem bieten sie die Möglichkeit, Prothesen einen verbesserten und sicheren Halt auf dem un- oder teilbezahnten Kiefer zu verleihen. Das Implantat übernimmt dabei die Funktion der Zahnwurzel und bildet somit die intraossäre Verankerung bzw. den Pfeiler für den Zahnersatz.

In einer Untersuchung von 100 zahnlosen Patienten im Alter von 35-65 Jahren wurde herausgefunden, dass für Parameter wie z.B. funktionelle Einschränkung, körperliche und psychische sowie soziale Behinderung die Ergebnisse bei implantatgetragenen Deckprothesen besser waren als bei konventionellen Prothesen (Awad et al. 2000, Awad et al. 2003). Dies lässt Rückschlüsse auf die gestiegene Lebensqualität durch dentale Implantate zu.

Nicht zuletzt durch solche positiven Erfahrungen und die steigende Erfolgsrate von Implantaten über einen Zeitraum von 10 bis 20 Jahren auf zwischen 92,8 % bis zu 100 % in den vergangenen Jahren (Misch CE et al 2008, Astrand P et al. 2008, Tang CB et al. 2007) lassen die Akzeptanz in der Bevölkerung wachsen. Somit wurden im Jahre 2006 bereits 650000 Implantate alleine in Deutschland inseriert. Im Jahre 2009 soll erstmals die Millionengrenze überschritten werden.

Das Grundprinzip der Osseointegration und somit der dentalen Implantation wurde durch P.I. Brånemark bereits 1969 beschrieben (Brånemark et al.1969). Er definierte diesen Prozess als „direkte strukturelle und funktionelle Verbindung

zwischen geordnetem lebenden Knochen und der Oberfläche eines belasteten Implantates“. Heute wird als Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Osseointegration der direkte Knochen-Implantat-Kontakt ohne weichgewebliche Einschlüsse angesehen (Albrektsson et al. 1983, Davies et al. 1998).

Die Oberflächentopographie des Titanimplantates sollte daher so gestaltet werden, dass eine optimale Inkorporation in den Knochen erfolgen kann. Idealerweise sollte demnach die Oberfläche bioadhäsive Eigenschaften aufweisen (Kasemo et al. 1985)

In verschiedenen Studien konnte in vitro gezeigt werden, dass die Proliferation osteoblastenartiger Zellen auf rauhen Titanoberflächen signifikant höher war als an polierten (Ahmad et al. 1999, Bowers et al. 1992, Buser et al. 2004). Demnach spielt die Oberflächenmikrotopographie eine essentielle Rolle bei der Optimierung der Bioadhäsion. Analog zu den in vitro gewonnen Erkenntnissen zeigten Tierversuche deutlich höhere Abzugsmomente an rauhen als an glatten Titanimplantatoberflächen (Deporter et al. 1990).

Ausserdem konnte in mehreren präklinischen Untersuchungen gezeigt werden, dass sandgestrahlte und säuregeätzte (SLA) Implantate signifikant mehr Knochen-Implantat-Kontakt aufwiesen als maschinerte oder TPS-Implantate (Buser et al. 1991, Larsson et al. 1996, Larsson et al. 1994, Piattelli et al. 1996, Wong et al. 1995)

Die Insertion von zahnärztlichen Implantaten in ein ausreichend dimensioniertes knöchernes Implantatlager stellt den Behandler heute vor keine allzu grossen Probleme mehr. Jedoch muss ca. jedes fünfte Implantat in ein kompromittiertes Knochenlager inseriert werden und mit augmentativer Verfahren kombiniert werden (Knöfler et al. 2004).

Eine retrospektive Untersuchung des Patientengutes der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie der Westdeutschen Kieferklinik, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf ergab sogar eine Augmentationsnotwendigkeit bei 61,3 %

der inserierten Implantate. Von 212 inserierten Implantaten wurde bei 80 Implantaten in einem einzeitigen Verfahren das Implantat inseriert und simultan der dehizente Implantatanteil augmentiert. Bei 50 der 212 nachuntersuchten Implantate musste primär ein Knochenaufbau gemacht werden bevor in einem zweiten chirurgischen Eingriff dann das Implantat inseriert werden konnte (Daten noch nicht publiziert).

Wie bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, ist die Technik der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) auch in der Augmentation dehizenter Implantate von Nutzen (Becker et al. 1990, Mayfield et al. 1998, Oh et al. 2003).

Das Grundprinzip der GBR beruht auf dem Prinzip eine Barrieremembran zu platzieren. Diese soll das Blutkoagel, welches gegebenenfalls durch Knochenersatzmaterialien gestützt wird, schützen und einen gegen Weichgewebszellproliferation separierten Raum um den knöchernen Defekt abgrenzen (Dahlin et al. 1988).

An Augmentationsverfahren und -materialien werden diverse in der Literatur beschrieben. So gibt es xenogene, allogene und alloplastische Materialien. Den Goldstandard für die Hartgewebsaugmentation stellt heutzutage aber noch immer der autologe Knochen dar (Chiapasco et al. 2006).

Da die Entstehung knochenbildender Zellen direkt an kleinen Blutgefäßen im Bindegewebe beobachtet wurde, besteht die Annahme, dass die frühe Vaskularisation des Blutkoagels eine wichtige Rolle in der GBR spielt (Long et al. 1995, Rickard et al. 1996, Reilly et al. 1998).

In der Tat zeigten bereits die Ergebnisse einer früheren tierexperimentellen Untersuchung, dass Barrieremembrane, welche eine transmembranöse Angiogenese zulassen, eine bessere knöcherne Regeneration im lateralen Anteil von Dehiszenzdefekten an Implantaten aufwiesen (Schwarz et al. 2007e).

Trotz dieser vielversprechenden Erkenntnisse und der bereits gut untersuchten Charakteristika von Membranen, Knochenersatzmaterialien und des GBR-

Verfahrens an sich (Schwarz et al 2007e, Park et al 2008, Lundgren et al 1997) sind solche Therapieformen an dehizzenten Implantaten doch mit erheblich mehr Aufwand, Kosten und Belastung für den Patienten verbunden.

In dieser Studie sollte nun untersucht werden, inwiefern durch eine Optimierung der Eigenschaften der Titanoberfläche augmentative Verfahren an dehizzenten Implantaten umgangen werden können.

## **1.2 Ultrahydrophile modSLA-Implantatoberfläche**

Vor wenigen Jahren wurde erstmals eine chemisch modifizierte, ultra-hydrophile, sandgestrahlte und säuregeätzte Titanoberfläche (SLActive, Straumann AG, Basel, Schweiz) entwickelt. Die speziellen Herstellungsverfahren führen zu einer hydroxylierten, chemisch aktiven Oberfläche mit einem geringen Gehalt an Kohlenwasserstoff und Kohlenstoff, aber einem erhöhten Anteil an Sauerstoff.

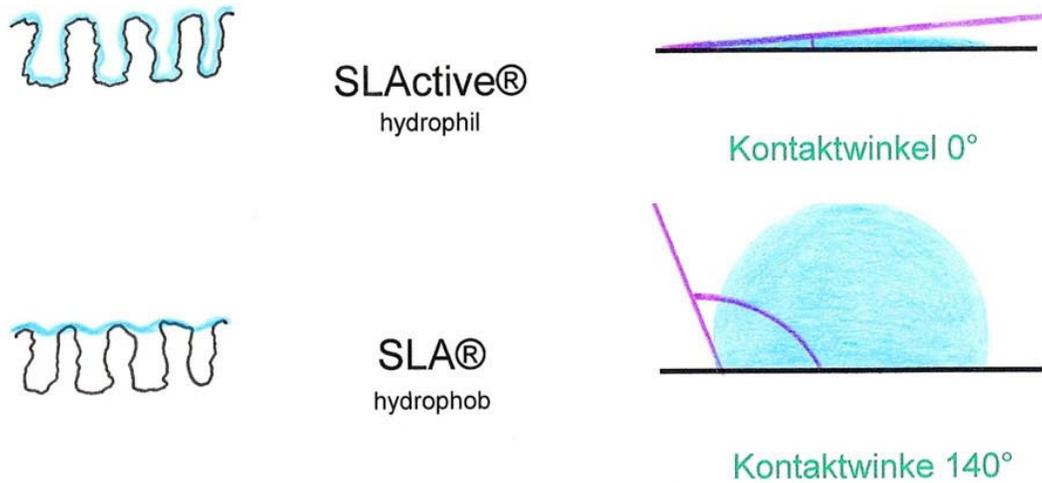
Man versprach sich durch die hydrophilen Oberflächeneigenschaften die Knochenanlagerung zu verbessern bzw. zu beschleunigen.

Die Mikro- und Makrotopographie der SLA- und modSLA-Implantatoberflächen sind identisch. Die Rauigkeit resultiert aus Sandstrahlung und Säureätzung.

Neben der Oberflächenmikrotopographie nimmt auch die initiale Benetzbarkeit der Titanimplantatoberfläche einen entscheidenden Einfluss auf die Bioadhäsion und Osteophilizität (Schwartz et al. 1994).

Bestimmen lässt sich die Benetzbarkeit bzw. der Grad der Hydrophilizität bei Verwendung von Wasser über den Kontaktwinkel. Als Kontaktwinkel bezeichnet man den Winkel, welcher zwischen Tropfenoberfläche und dessen Untergrund besteht (Abbildung 1). So lässt sich bereits mit bloßem Auge beim Eintunken der unterschiedlichen Implantate in Flüssigkeit die Hydrophilie bzw. Hydrophobie erkennen (Abbildung 2a, 2b). Während das in einer Lösung aus Natriumchlorid

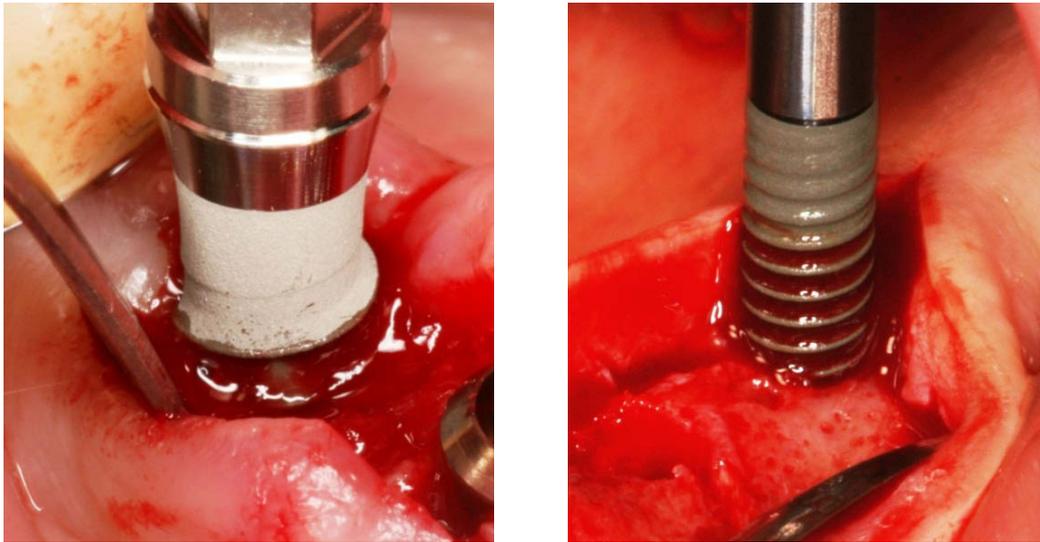
und Stickstoff gelagerte SLActive-Implantat scheinbar unmittelbar mit Flüssigkeit benetzt ist, erscheint das SLA-Implantat förmlich die Flüssigkeit abzustossen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Verhaltens von Wasser in Gegenwart der hydrophoben SLA- und hydrophilen modSLA- bzw. SLActive-Oberfläche



**Abbildung 2a:** Darstellung der Benetzbarkeit mit Wasser von hydrophoben SLA- (rechts) und hydrophilen modSLA- bzw. SLActive-Implantaten (links).



**Abbildung 2b:** Klinisches Bild der Benetzbarkeit während der Insertion eines SLA- (links) und eines mod-SLA Implantates (rechts)

In vitro Untersuchungen zeigten verbesserte osteophile Eigenschaften der modSLA- im Vergleich zu SLA-Oberflächen (Masaki et al. 2005). Positiv stimulierende Effekte der erhöhten Oberflächenenergie auf knochenbildende Zellen wurden ebenfalls nachgewiesen. Osteoblasten auf modSLA-Oberflächen wurden mit einem mehr differenzierten Phänotyp beobachtet (Zhao et al. 2005, 2007).

In vivo wurde in mehreren Tierstudien verschiedenster Studiendesigns eine gesteigerte Knochenapposition während früher Phasen der Wundheilung an sub- und transmukosal einheilenden modSLA-Implantaten gezeigt (Buser et al. 2004; Ferguson et al. 2006; Bornstein et al. 2008; Schwarz et al. 2007b, 2007d, Lai et al. 2009).

In einer vorherigen Pilotstudie zeigten die histologischen Beobachtungen einen die Regeneration akuter Dehiszenzdefekte fördernden Einfluss der modSLA-Oberfläche bei submukosaler Einheilung ohne zusätzlichen Einsatz von GBR-

Verfahren (Schwarz et al. 2007a). Eine mögliche Erklärung für diese positive Knochenregeneration könnte jedoch auch die unterstützende Funktion der Implantatschulter sein, welche einen Kollaps des angrenzenden Mukoperiostlappens in den Wundbereich verhindert haben könnte. Das hier untersuchte Implantatdesign unterstütz ein primär transmukosales chirurgisches Vorgehen.

Diese vorliegende Studie sollte nun immunhistochemisch während der ersten zwei Wochen und histomorphometrisch während der ersten acht Wochen den Einfluss von sub- bzw. transmukosaler Einheilung an dehiszenten SLA- und modSLA-Implantaten zeigen.

### 1.3 Hypothese

- modSLA-Titanimplantatoberflächen unterstützen eine Stabilisierung des Blutkoagulums und somit der extrazellulären Matrix im Bereich knöcherner Dehiszenzdefekte
- der Heilungsmodus (offen oder geschlossen) hat einen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Knochenneubildung

## 2 MATERIAL UND METHODE

### 2.1 Implantate

Die verwendeten Implantate (Standard Plus, regular neck, ø 3,3 mm, Länge 8 mm, Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) waren in ihrer Form und Größe identisch. Die als Kontrollgruppe dienenden SLA-Implantate sind in Mikro- wie Makrotopographie absolut vergleichbar mit den modSLA-Implantaten, abgesehen von den



**Abbildung 3:** Standard Plus Implantat, regular neck, Straumann AG

unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften. Wie bereits erläutert, weisen die modSLA-Oberflächen im Gegensatz zu den SLA-Implantaten ultrahydrophile Charakteristika auf. Allgemein bietet das zylindrische Implantat mit dem enossalen Durchmesser von 3,3 mm eine flexible Lösung für trans- und submukosale Einheilung. Standard Plus Implantate bieten mit ihrer geringen, nur 1,8 mm maschinieren Schulterhöhe eine ideale Voraussetzung für ästhetisch anspruchsvolle Ergebnisse und ein gutes Emergenzprofil (Abbildung 3).

## **2.2 Tiere**

Es wurden 12 Beagle-Hunde im Alter von 12 bis 15 Monaten mit einem durchschnittlichen Gewicht von  $10,6 \pm 1,2$  kg in dieser Studie verwendet. Initial wiesen alle Hunde eine vollständige, gesunde und permanente Dentition auf. Die Wahl der Tierart, die Haltung und das experimentelle Vorgehen wurden vor Studienbeginn von der örtlichen Tierversuchskommission (Bezirksregierung Düsseldorf) genehmigt. Der experimentelle Teil dieser Studie begann nach einer Eingewöhnungszeit von 4 Wochen.

## **2.3 Studiendesign**

Der Hund als Versuchstier ist gut geeignet zur Untersuchung neuer Modifikationen von zahnärztlichen Implantaten. Bevorzugt werden international Beagle- oder Foxhundrassen eingesetzt, was unter anderem auf die vergleichsweise einfache Haltung und Zucht dieser in Rudeln lebenden Rassen zurückzuführen ist. Der Beagle als grosses Versuchstier verfügt über einen ausreichend groß dimensionierten Alveolarfortsatz zur Aufnahme von ca. 4 - 6 Implantaten pro Seite im Unter- und 2 - 4 Implantaten pro Seite im Oberkiefer (Abbildung 4). Die Art der Einheilung im Knochen ist zwischen Mensch und

Beagle vergleichbar.

Diese Studie gliederte sich in zwei chirurgische Phasen. Während der ersten wurde in allen vier Quadranten der zweite, dritte und vierte Prämolare und erste und zweite Molare schonend bei allen zwölf Hunden extrahiert. Nach einer drei-monatigen Heilungsphase wurden im zweiten chirurgischen Eingriff nach Präparation der Implantatbetten die standardisierten bukkalen Dehiszenzdefekte im Ober- und Unterkiefer osteotomiert (n = 16 Defekte pro Tier)(Abbildung 5).

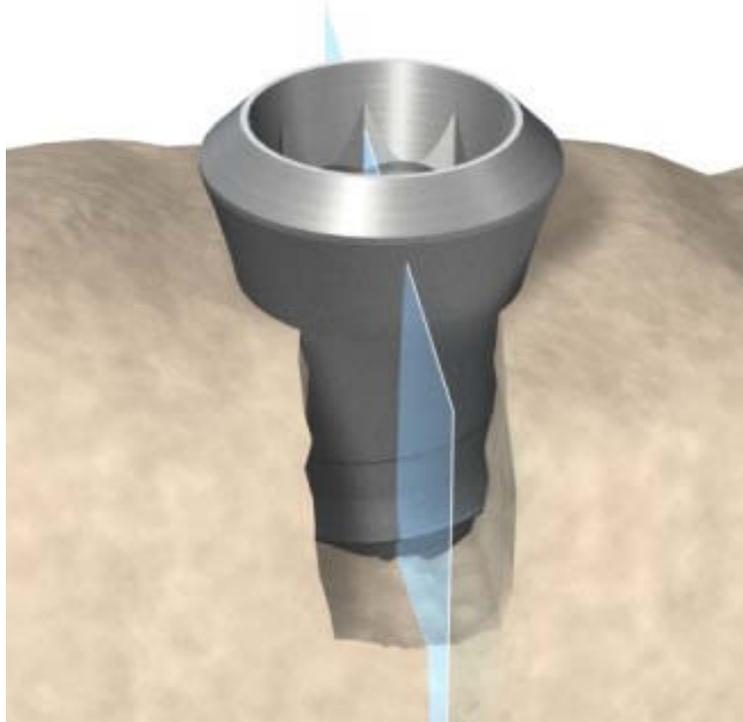


**Abbildung 4:** Röntgenologische Darstellung der Anatomie eines vollbezahnten Beagelunterkiefers

Somit wurden pro Tier und Quadrant jeweils 2 SLA- und 2 modSLA- Implantate randomisiert inseriert. Einem Split-mouth Design entsprechend wurden die Quadranten einer sub- bzw. transmukosalen Einheilung zugeteilt.

Die Zufallsordnung basierte auf einem Computerprogramm (RandList®, DatInf GmbH, Tübingen, Deutschland).

Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 und 8 Wochen (n = 3) Einheilzeit getötet, anschließend die Proben entnommen und histologisch aufbereitet bzw. histomorphometrisch ausgewertet.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Dehiszenzdefektes und der oro-vestibulären Schnittrichtung (Schwarz et al. 2007c)

## 2.4 Chirurgisches Vorgehen

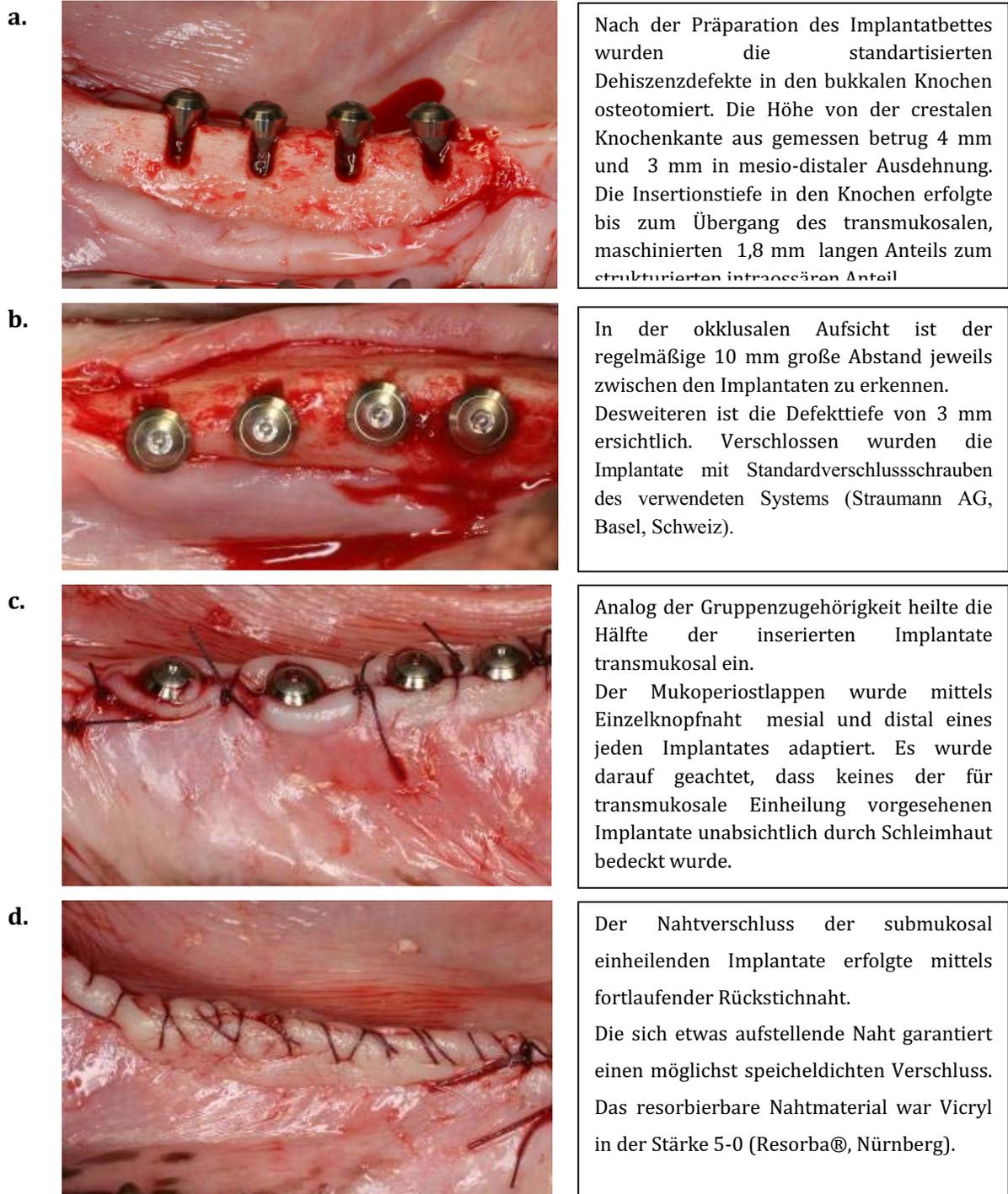
Nach intramuskulärer Sedierung mit 0,17 mg/kg Acepromazin (Vetranquil 1%, Ceva Tiergesundheit, Düsseldorf) wurde mittels 21,5 mg/kg Thiopental (Trapanal 2,5 %, Altana GmbH, Konstanz) die Allgemeinnarkose eingeleitet und durch eine Mischung von Sauerstoff, Lachgas und Isofluran ergänzt. Zusätzlich erhielten alle Tiere eine Ringer-Lactat Infusion und intravenöse Schmerzmedikation von 0,4 mg/kg Piritramid (Dipidolor<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und 4,5 mg/kg Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe). Die postoperative Analgetikamedikation erfolgte mit Piritramid, welches subkutan über einen Zeitraum von drei Tagen verabreicht wurde. Alle Tiere wurden intra- und postoperativ für zehn Tage antibiotisch mit Clindamycin (11,0 mg/kg, Clerobe<sup>®</sup>, Pharmacia Tiergesundheit, Erlangen) abgedeckt.

Nach Applikation von insgesamt 1 ml Lokalanästhetikum (UDS, Sanofi-Aventis Dt. GmbH, Frankfurt, Germany) pro Quadrant wurde nach vertikaler Separation mittels Lindemannfräse der zweite und dritte Prämolare sowie der erste und zweite Molar schonend extrahiert.

Nach einer Adaptation der Wundränder mit Einzelknopfnähten wurde anschließend eine zweimonatige Heilungsperiode abgewartet, bevor in einem erneuten, ebenfalls in Intubationsnarkose durchgeführten operativen Eingriff die Defekte geschaffen und Implantate inseriert wurden.

Nach crestaler Schnittführung und Präparation eines Mukoperiostlappens wurden die Implantatbohrung und die Gewindeschneidung entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Systems (Straumann AG, Basel, Schweiz) unter ständiger Kühlung mit 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Der Abstand zwischen den einzelnen Implantaten betrug 10 mm. Anschließend wurden die standardisierten bukkalen Dehiszenzdefekte mit einer Höhe von 4 mm (von der crestalen Knochengrenze aus gemessen), einer Tiefe von 3 mm (von der bukkalen Knochenoberfläche aus gemessen) und einer Ausdehnung von 3 mm in mesio-distaler Richtung unter Verwendung einer spitzen Hartmetallfräse mit Kühlung durch 0,9 % NaCl-Lösung kreiert. Die Defektgrößen wurden mittels Parodontalsonde (PCP12 Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA) auf ihre Größe kontrolliert und standardisiert. In diese modifizierten knöchernen Implantatbetten wurde unter besonderer Beachtung der Primärstabilität die modSLA- und SLA-Implantate inseriert. Die SLA-Implantate wurden vor Insertion mit sterilem Wasser benetzt.

Abschließend wurden die Wundränder mit einer resorbierbaren Rückstichnaht (Vicryl 5-0, Resorba®, Nürnberg) adaptiert und die Implantate für einen Zeitraum von 1, 2, 4, und 8 Wochen sub- bzw. transmukosal der Einheilung überlassen.



**Abbildung 6a-d:** Operatives Vorgehen

## **2.5 Tötung der Tiere und Probenentnahme**

Nach einer Heilungsperiode von 1, 2, 4, und 8 Wochen wurden die Tiere nach i.v. Gabe von 50 000 i.E. Heparin durch eine Überdosis an 3 % Pentobarbital (200 mg/kg i.v.) getötet. Nach beidseitiger Präparation und Katheterisierung der Carotiden wurden die Tiere decapitiert und der Kopf des Tieres mit 1000 ml 10 %igem Formaldehyd intra-arteriell fixiert. Anschließend wurden die entsprechenden Kieferabschnitte im Block mit Schleimhaut reseziert und für eine Woche in 4 %igem Formaldehyd gelagert.

## **2.6 Probenaufbereitung und –einbettung**

Die fixierten Proben dehydrierten in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bevor sie mit speziellem Methacrylat-Monomer (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Wehrheim) infiltriert und in Methacrylat (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Wehrheim) zur Erstellung nicht entkalkter Hartgewebsschnitte eingebettet wurden. Um jegliche Art negativer Einflüsse von Polymerisationshitze zu vermeiden erfolgte diese in kontrollierter Atmosphäre von -4°C. Zum Erreichen einer vollständigen Polymerisation nach 20 Stunden wurden die Proben absolut luftdicht verschlossen. Dies wurde in speziell zu diesem Zweck hergestellten Kunststoffzylinder gewährleistet.

## **2.7 Hartgewebshistologie**

Anschließend wurden die Proben mit einer diamantierten Bandsäge (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt) entsprechend der Implantatachse in bucco-oraler Richtung aufgesägt. Von jeder Probe wurden in hartgewebshistologischer Standardtechnik nach Donath (Donath 1985), vier aufeinander folgende Schnitte in bucco-oraler Richtung entsprechend der Achse des Implantates durch den

Dehiszenzdefekt angefertigt. Die primäre Schnittdicke betrug ca. 300 µm. Diese mit Acryl-Zement (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer) auf silanisierte Glasobjektträger (Super Frost, Menzel GmbH, Braunschweig) geklebten Proben wurden unter Verwendung eines Tellerschleifgerätes (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt) mit aufsteigender Körnungszahl bis zur finalen Dicke von ca. 40 µm geschliffen und poliert. Zeigten die Präparate einen Teil der inneren Schraubenwindung des Implantates, wurde der Schnitt zur Beurteilung des zentralen Defektbereichs genutzt und bei Nichtvorhandensein als ein lateraler angesehen.

## **2.8 Toluidin-blau-Färbung**

Die final polierten Schriffe wurden mittels Aqua dest. und Luftdruck von sämtlichen Schleifrückständen befreit und getrocknet.

Das Procedere der Toluidin-blau-Färbung lief nach folgendem Protokoll ab:

- 10 Minuten Bad in 10 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Abspülen mit H<sub>2</sub>O
- 30 Sekunden Bad in 4 %iger Ameisensäure
- Abspülen mit H<sub>2</sub>O
- 7 Minuten Bad in Toluidin-blau-Färbelösung I
- Abspülen mit H<sub>2</sub>O
- 7 Minuten Bad in Toluidin-blau-Färbelösung II
- Abspülen mit Aqua dest.
- Trocknen mittels Papiertuch
- Eindecken mittels Eukitt

Die in Toluidin-blau gefärbten Schnitte dienten der histomorphometrischen Auswertung. Durch den höheren Proteingehalt wird jüngerer Knochen stärker blau angefärbt als älterer Knochen (Schenk et al. 1984).

## **2.9 Masson-Goldner-Färbung**

Die final polierten Schliche wurden mittels Aqua dest. und Luftdruck von sämtlichen Schleifrückständen befreit und getrocknet.

Bevor die Präparate der eigentlichen Färbung unterzogen werden konnten, mussten die Schliche entplastet werden. Dies verlief nach folgendem Protokoll:

- 20 Minuten Bad in Xylol
- 20 Minuten Bad in Methoxyethylacetat
- 15 Minuten Bad in Aceton I
- 15 Minuten Bad in Aceton II

Die Masson-Goldner-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- 3 Minuten Bad in Aqua dest.
- 5 Minuten Bad in Haemalaun
- 5 Minuten Bad in H<sub>2</sub>O
- 17 Minuten Bad in Ponceau de Säurefuchsin
- Abspülen mit 1 %iger Essigsäure
- 7 Minuten Bad in Orange G
- Abspülen mit 1 %iger Essigsäure
- 8 Minuten Bad in Lichtgrün
- 1 Minute Bad in 1 %iger Essigsäure

- 1 Minute Bad in 1 %iger Essigsäure (wg. besserer Differenzierung)
- 1 Minute Bad in Aqua dest.
- 1 Minute Bad in 70 %igem Alkohol
- 1 Minute Bad in 99,5 %igem Alkohol
- 1 Minute Bad in Xylol I
- 2 Minuten Bad in Xylol II

Da es sich um eine spezielle Bindegewebsfärbung handelt, zeigt die Masson-Goldner-Färbung besonders gut kollagene Strukturen. Dies lässt Rückschlüsse auf die weichgewebliche Integration des Implantates besonders im transmukosalen Anteil zu.

## **2.10 Histomorphometrie**

Alle Auswertungen wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit und Heilungsdauer durchgeführt. Die histologische Bewertung erfolgte im Durchlichtmikroskop (BX50, Olympus, Hamburg). Für die histomorphometrische Auswertung wurden jeweils zentrale Schnitte bei einer Vergrößerung von 4x, 12,5x und 20x digital photographiert (SIS Color View3, Soft Imaging System GmbH, Münster).

Unter Verwendung einer speziellen Software (SIS analySIS Auto Software 3.2, Soft imaging System GmbH, Münster) wurden nachfolgende Punkte markiert und daraus resultierend folgende Strecken und Flächen vermessen.

**BTB** (borderline between the transmucosal and bony part of the implant) zeigt den 1,8 mm unterhalb der Implantatschulter liegenden Übergang des transmukosalen- zum intraossären Anteil des Implantates.

**BD** (bottom of bone defect) markiert den knöchernen Defektboden.

**CBI-b/-o** (most coronal level of bone in contact with the implant) ist der Punkt, an dem die coronalste knöcherne Ausdehnung des Knochen-Implantat-Kontaktes besteht, bukkal wie oral.

Die Defektlänge (**DL**, defect length) wurde gemessen von BTB zu BD (in mm).

Die neue Knochenhöhe (**NBH**, new bone height) entsprach der Strecke von BD zu CBI-b (in mm).

Die prozentuale Defektauffüllung (**PLF**, per cent linear fill) wurde definiert als NBH dividiert durch DL.

Der Knochen-Implantat-Kontakt im Dehiszenzdefekt (**BIC-D**, percentage of bone to implant contact within the defect) wurde analog der Defektlänge prozentual von BD zu BTB vermessen.

Der Unterschied der bukkalen und oralen (CBI-b – CBI-o) Ausdehnung des Knochens nach crestal wurde ebenfalls in mm als **D-CBI** (difference in buccal and oral dimension of CBI) bestimmt.

Außerdem wurde die Fläche des neuen Knochens (**BF**, area of new bone fill) in mm<sup>2</sup> von BD nach CBI-b histomorphometrisch in allen Präparaten vermessen.



**Abbildung 7:** Darstellung der zu bestimmenden Punkte (BTB, BD, CBI-b/-o) an einer repräsentativen Histologie (modSLA, 2 Wochen, Unterkiefer, submukosale Einheilung, TB-Färbung, 25-fache Vergrößerung).

## 2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung diente das Statistikprogramm SPSS (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Mittelwerte und Standardabweichungen zwischen den Tieren wurden für alle Parameter und Gruppen berechnet. Nach Überprüfung einer Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Abweichungstest fand für die induktive Analyse innerhalb der Gruppen (z.B. sub- bzw. transmukosale Einheilung) der gepaarte T-Test Verwendung. Für den Vergleich zwischen den Gruppen (z.B. zentraler oder lateraler Aspekt) wurde der

ungepaarte T-Test verwendet. Beobachtete Unterschiede wurden ab einem Signifikanzniveau von  $P < 0.05$  als statistisch signifikant definiert.

## **2.12 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Anfärbung mussten die final polierten Schliffe ebenfalls von sämtlichen Schleifrückständen befreit und getrocknet werden.

Bevor die Präparate der eigentlichen Färbung unterzogen werden konnten, mussten die Schliffe entplastet werden.

Folgendes Protokoll fand Anwendung:

- 20 Minuten Bad in Xylol
- 20 Minuten Bad in Metyoxylethylacetat
- 15 Minuten Bad in Aceton I
- 15 Minuten Bad in Aceton II

Die entplasteten Schliffe wurden anschließend für 4 Minuten in PBS hydriert, bevor das eigentliche Procedere der Immunhistochemie begann.

-Demaskierung des Antigens durch 15 Minuten Bad in 0,05 %igem Trypsin

- 4 Minuten Bad in PBS
- Markierung mittels Dako-Pen
- 10 Minuten Block der endogenen Peroxidase mittels 3 %igem  $H_2O_2$  (PBS)
- 3 x 5 Minuten Bad in PBS
- 15 Minuten Protein-Block bei Raumtemperatur
- Inkubation mit primären monoklonalen Maus Antikörpern gegen Transglutaminase II (1:40, Labvisio Fremont CA, USA) bzw. Osteocalcin

(1:40, Acris Antikörper GmbH, Hiddenhausen, Germany) über Nacht bei 8°Celsius (unspezifische Antikörper respektive).

- 3 x 5 Minuten Bad in PBS
- zweiter Antikörper: Anti-Goat, Mouse, Rabbit, biotinilliert DAKO E 0453
- 3 x 5 Minuten Bad in PBS
- Streptavidin-Peroxidase Lösung für 30 Minuten
- 3 x 5 Minuten Bad in PBS
- Inkubation mit 3-amino-9-ethylcarbazole als Chromogen unter mikroskopischer Kontrolle
- Abwaschen mittels Aqua dest.
- Eindeckeln in Crystall Mount Aqueous Mounting Medium

Osteocalcin wird während der Differenzierung der Mesenchymzelle hin zum Osteoblasten und im Zuge der Mineralisation extrazellulärer Matrix zu Knochen exprimiert. Deshalb dient ein positiver Osteocalcin-Nachweis als ein Zeichen für Mineralisation bzw. Knochenneubildung (Gallop et al. 1980; Hauschka et al. 1989; Hopyan et al. 1999; Raymond et al. 1999).

Transglutaminase II wird von Endothelzellen exprimiert (Haroon et al. 1999). Insofern kann ein positiver Transglutaminase-Nachweis stellvertretend für Angiogenese bzw. als Angiogenesemarker angesehen werden.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Histomorphometrische Ergebnisse**

Die postoperative Wundheilung verlief ohne besondere Zwischenfälle. Es wurden weder Infektionen noch Wunddehiszenzen oder Expositionen des Implantatkörpers der submukosal einheilenden SLA- und modSLA-Implantate beobachtet.

Die Defektlänge (DL) war analog zum Protokoll in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten 4 mm ( $\pm 0,3$  mm). Damit lagen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen und Zeitpunkte vor ( $P > 0,05$ ; unpaired t-test).

Soweit signifikante Unterschiede in den Ergebnissen zwischen modSLA- und SLA-Implantaten zu den jeweiligen Zeitpunkten bestanden, werden diese im Anschluss an die Tabellen beschrieben.

Nach **einer Woche** der Einheilung waren einige kleine Areale der Mineralisation am Defektboden in allen Gruppen zu sehen (Abbildung 8). Abgesehen von diesen ersten Anzeichen der knöchernen Regeneration des Dehiszenzdefektes waren noch keine Werte für NBH, PLF, BIC-D und BF feststellbar (Abbildung 12, 18). D-CBI, der Unterschied der oralen und vestibulären crestalen knöchernen Ausdehnung lag analog der Defekttiefe bei  $4,0 \pm 0,2$  mm.

Nach **zwei Wochen** waren am Defektboden neu gebildete Knochenbälkchen in Form von Geflechtknochen zu sehen. Diese ersten Mineralisationen entstanden aus offenen Knochenmarksräumen und dehnten sich in lateraler und coronaler Richtung in den Defektbereich hinein aus. In den modSLA-Gruppen lagerte sich der neu gebildete Knochen unmittelbar an der Oberfläche (D-BIC) an (Abbildung 9, 13, 14, 24, 25), während an den SLA-Implantaten in vielen Fällen der neu gebildete Knochen durch eine dünne Schicht nicht mineralisierten Gewebes separiert wurde (Abbildung 15, 16, 23). Das Ausmaß der Knochenbildung variierte innerhalb (Abbildung 9, 10) und zwischen den Gruppen erheblich. Insgesamt aber waren an den modSLA-Implantaten signifikant höhere Werte für NBH, PLF, BIC-D und BF festzustellen. Während diese Ergebnisse für den lateralen Aspekt vergleichbar für sub- und transmukosale Heilung waren, wichen die Resultate des zentralen Aspektes deutlich zwischen den sub- und transmukosal einheilenden Implantaten ab. Diesbezüglich erschien die geschlossene Heilung förderlich für die knöcherne Regeneration von Dehiszenzdefekten zu sein. Insbesondere galt dies für die in den Oberkieferknochen inserierten Implantate (Tabelle 1-4). Im Oberkiefer waren innerhalb der modSLA-Gruppe alle zentralen Parameter bei den submukosal

einheilenden Implantaten signifikant besser. NBH und BIC-D mit  $P < 0,05$  und PLF und BF mit  $P < 0,01$ . Die SLA-Gruppen im Oberkiefer zeigten untereinander nur im lateralen Anteil bei BF mit  $P < 0,05$  einen signifikanten Unterschied zu Gunsten der submukosalen Einheilung. Im Unterkiefer lagen innerhalb der modSLA-Gruppen Unterschiede mit  $P < 0,05$  im lateralen Bereich für NBH, PLF, BIC-D und D-CBI vor. Zentrale Signifikanzen ( $P < 0,01$ ) ergaben sich nur für BF. Bei den SLA-Implantaten war einzig D-CBI lateral mit  $P < 0,05$  bei der submukosalen Heilung signifikant besser.

Die Wundheilung nach **vier Wochen** war hauptsächlich durch ein Fortschreiten der Knochenneubildung charakterisiert. Allgemein überbrückte der neue Geflechtknochen den Defekt in coronaler und lateraler Richtung. Primär wurde aber ein Knochenwachstum entlang beider Implantatoberflächen beobachtet. Wiederum wiesen die höchsten Werte mit signifikanten Unterschieden die modSLA-Implantate im Ober- und Unterkiefer, bei offener und geschlossener Heilung und im lateralen wie zentralen Anteil für NBH, PLF, BIC-D und BF auf (Tabelle 1-4). Erneut zeigten im zentralen Bereich die submukosal einheilenden modSLA-Implantate im Oberkiefer signifikante Vorteile ( $P < 0,05$ ) bei NBH, PLF, BIC-D und dementsprechend niedrigeren Werten für D-CBI gegenüber den Transmukosalen auf. Lateral lag nur für BF mit  $P < 0,01$  eine Signifikanz vor. Diese Unterschiede könnten auf folgende histologische Beobachtung zurückzuführen sein. Es wurde an den transmukosal heilenden Implantaten ein partieller Kollaps des Mukoperiostlappens in den Defektbereich festgestellt. Somit war die von lateral beginnende Regeneration des Defektbereichs in Richtung zentral behindert und unterbunden (Abbildung 19, 26). An den SLA-Implantaten zeigte sich ein ähnliches Bild der Wundheilung. Sowohl bei den sub- als auch bei den transmukosal einheilenden Implantaten war ein in den Dehiszenzdefekt kollabierter Mukoperiostlappen zu erkennen. Dieser füllte den Defekt nahezu aus und behinderte somit die von den Defektwänden bzw. vom Defektboden ausgehende knöcherne Regeneration (Abbildung 20, 27).

Das histologische Bild nach **acht Wochen** der Wundheilung war gekennzeichnet

durch eine Verdichtung der Knochen trabekel in allen Gruppen. Es bildete sich ein organisierter, parallelfaseriger Geflechtknochen aus. Erste Anzeichen der Remodellation des neu gebildeten Knochens hin zu primären und sekundären Osteonen war zu beobachten. Wiederum variierte der Grad der knöchernen Regeneration und Remodellation innerhalb und zwischen den Gruppen und Kiefern beträchtlich. Erneut waren es aber die modSLA-Implantate in allen Gruppen, welche die signifikant höchsten Werte für NBH, PLF, BIC-D und BF im zentralen (Abbildung 17) und lateralen Anteil aufzeigten (Tabelle 1-4). Einige dieser Implantate wiesen eine Regeneration der bukkalen Knochenausdehnung nach crestal auf, die das ursprüngliche Niveau nahezu erreichten. Somit war nach acht Wochen Regeneration kaum ein Unterschied zwischen der oralen und vestibulären Knochenausdehnung nach crestal (D-CBI) in Gegenwart der modSLA-Implantate festzustellen. Innerhalb der modSLA-Gruppen waren es wieder die submukosal einheilenden Implantate, welche die höchsten Werte für BF hatten (Tabelle 1-4). Dies galt besonders für den zentralen Bereich der Defekte (OK:  $P < 0,01$ ; UK:  $P < 0,05$ ). Im lateralen Anteil waren die Unterschiede nicht so ausgeprägt (OK und UK:  $P < 0,05$ ), was die Vermutung aufkommen lässt, dass die submukosale Einheilung besonders ein Kollabieren des Mukoperiostlappens im zentralen Bereich der Dehiszenzdefekte vermindert (Abbildung 21, 28, 29). Im Gegensatz dazu zeigten die SLA-Implantate in keiner der Gruppen einen suffizienten Erhalt des Defektbereiches ohne Kollaps des Mukoperiostlappens. Dieses Einsinken des Weichgewebes verhinderte die knöcherne Regeneration der Dehiszenz (Abbildung 22, 30).

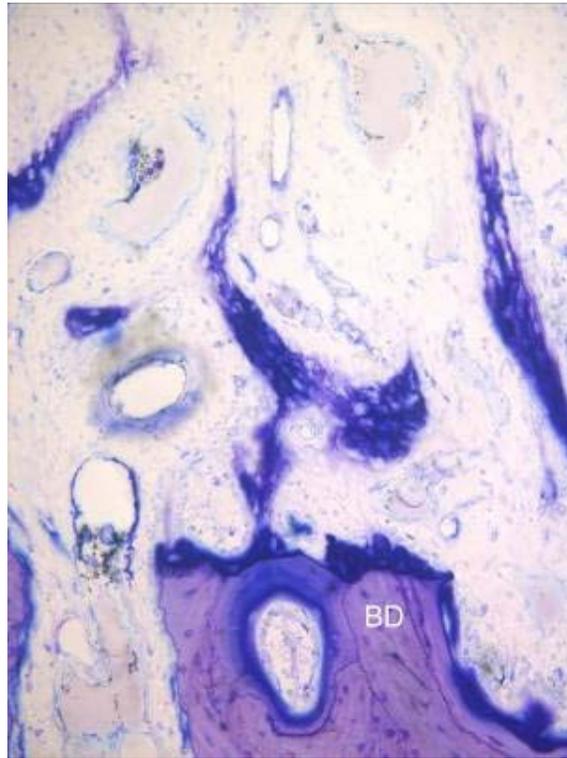
### **3.1.1 Oberkiefer-transmukosale Einheilung**

In Tabelle 1 sind die histomorphometrische Ergebnisse der transmukosal eingehielten Implantate im Oberkiefer für DL, NBH, PLF, BIC-D und BF zu allen Zeitpunkten (1, 2, 4, 8 Wochen) dargestellt.

**Tabelle 1:**

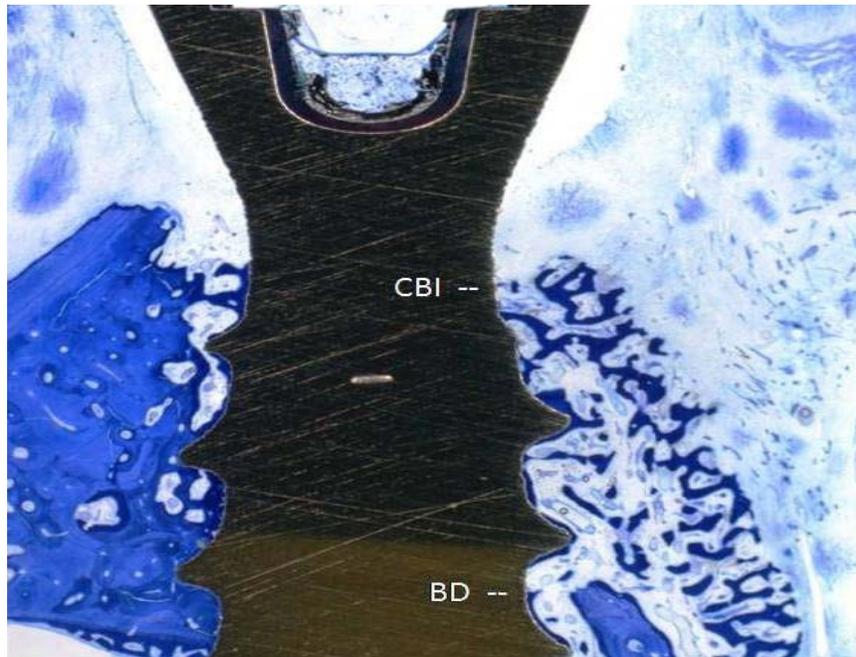
Transmukosale Einheilung im Oberkiefer

	modSLA		SLA		P value	
	zentral	lateral	zentral	lateral	zentral	lateral
<b>DL (mm)</b>						
1 Woche	4,0±0,2	4,1±0,3	4,2±0,1	4,1±0,1	n.s.	n.s.
2 Wochen	4,1±0,1	4,2±0,1	4,1±0,1	4,1±0,2	n.s.	n.s.
4 Wochen	4,0±0,1	4,1±0,2	4,2±0,1	4,2±0,1	n.s.	n.s.
8 Wochen	4,0±0,1	4,1±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	n.s.	n.s.
<b>NBH (mm)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,1±0,3	2,7±0,7	0,7±0,7	1,0±0,8	n.s.	P<0,05
4 Wochen	2,6±0,2	3,2±0,3	1,5±0,3	2,0±1,4	n.s.	P<0,05
8 Wochen	4,3±0,1	3,2±0,9	1,8±1,7	1,9±1,2	P<0,01	P<0,05
<b>PLF (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	27,8±8,0	64,3±15,7	18,3±18,3	23,6±18,8	n.s.	P<0,05
4 Wochen	66,2±7,0	77,0±3,3	35,9±7,2	46,3±32,9	P<0,05	P<0,05
8 Wochen	107,2±4,7	77,9±21,2	43,8±41,2	45,8±30,5	P<0,01	P<0,05
<b>BIC-D (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	27,6±7,3	68,0±18,3	12,5±12,5	24,2±19,4	n.s.	P<0,05
4 Wochen	60,8±2,0	77,4±3,2	28,4±2,9	40,6±28,4	P<0,05	P<0,05
8 Wochen	78,8±11,0	70,4±7,8	35,2±34,0	45,2±30,2	P<0,05	P<0,05
<b>BF (mm<sup>2</sup>)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,8±0,2	5,5±1,5	1,1±1,1	1,5±1,1	n.s.	P<0,01
4 Wochen	4,5±1,1	10,9±1,7	1,9±0,1	5,8±5,6	P<0,05	P<0,01
8 Wochen	2,9±1,0	3,3±1,7	2,2±1,8	1,3±0,9	n.s.	P<0,05
<b>D-CBI (mm)</b>						
1 Woche	4,2±0,2	3,9±0,5	4,1±0,1	4,2±0,4	n.s.	n.s.
2 Wochen	2,9±0,4	1,2±0,4	3,4±0,8	3,0±1,8	n.s.	P<0,05
4 Wochen	1,9±0,7	0,7±0,1	2,7±0,3	2,1±1,2	P<0,01	P<0,05
8 Wochen	0,2±0,1	0,6±0,3	2,5±1,2	1,9±1,3	P<0,05	n.s.



**Abbildung 8:** modSLA, 1 Woche, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 400fache Vergrößerung

**2 Wochen:** NBH war nach zwei Wochen an den modSLA-Implantaten im lateralen Anteil mit  $2,7 \pm 0,7$  mm signifikant ( $P < 0,05$ ) größer als an den SLA-Implantaten mit  $1,0 \pm 0,8$  mm. PLF war auch an den modSLA-Implantaten im lateralen Anteil mit  $64,3 \pm 15,7$  % signifikant ( $P < 0,05$ ) größer als an den SLA-Implantaten mit  $23,6 \pm 18,8$  %. Dementsprechend waren auch BF ( $P < 0,01$ ) und D-CBI ( $P < 0,05$ ) zu Gunsten der modSLA-Implantate jeweils im lateralen Anteil signifikant unterschiedlich.



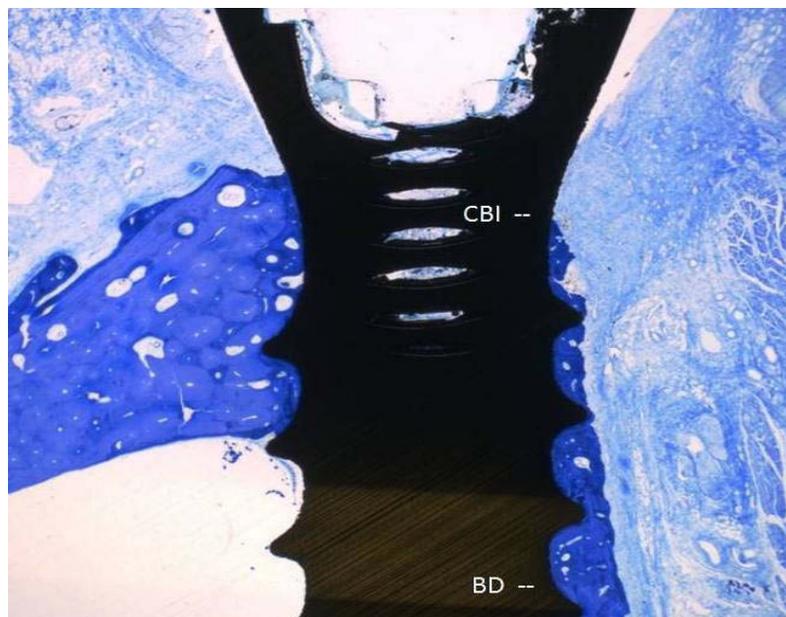
**Abbildung 9:** modSLA, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



**Abbildung 10:** SLA, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

**4 Wochen:** Nach vier Wochen lagen im lateralen Anteil bei allen zu bestimmenden Parameter signifikante Unterschiede zwischen den modSLA- und SLA-Implantaten vor. Und auch im zentralen Anteil waren abgesehen von der neuen Knochenhöhe (NBH) signifikant bessere Werte für die modSLA-Gruppen zu beobachten. Signifikanzen von  $p < 0,01$  zeigten sich im lateralen Anteil bei der Fläche des neu gebildeten Knochens.

**8 Wochen:** Die Ergebnisse nach acht Wochen bestätigten die Tendenz, welche zu früheren Zeitpunkten feststellbar waren. Außer für BF im zentralen- und D-CBI im lateralen Anteil waren alle Werte für die modSLA-Implantate besser. Insbesondere bei PLF und NBH mit  $107,2 \pm 4,7\%$  zu  $43,8 \pm 41,2\%$  und  $4,3 \pm 0,1$  mm zu  $1,8 \pm 1,7$  mm im zentralen Bereich der Defekte waren die Unterschiede besonders deutlich ( $P < 0,01$ ).



**Abbildung 11:** modSLA, 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

### 3.1.2 Oberkiefer-submukosale Einheilung

**Tabelle 2:** Submukosale Einheilung im Oberkiefer

	modSLA		SLA		P value	
	Zentral	lateral	zentral	lateral	zentral	lateral
<b>DL (mm)</b>						
1 Woche	4,0±0,2	4,1±0,2	4,1±0,1	4,2±0,2	n.s.	n.s.
2 Wochen	4,1±0,1	3,9±0,1	4,2±0,1	4,2±0,2	n.s.	n.s.
4 Wochen	4,2±0,1	4,1±0,2	4,1±0,2	4,3±0,2	n.s.	n.s.
8 Wochen	4,1±0,2	4,1±0,1	4,1±0,1	4,2±0,1	n.s.	n.s.
<b>NBH (mm)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	3,3±0,5	3,0±0,7	1,4±1,2	1,5±1,3	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	4,0±0,1	3,5±0,4	2,0±1,2	2,0±1,8	<i>P</i> <0,05	n.s.
8 Wochen	3,7±0,1	3,6±0,8	1,4±1,0	1,9±1,2	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
<b>PLF (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	79,4±13,0	76,1±15,6	29,1±24,9	36,5±31,7	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
4 Wochen	96,1±3,2	84,1±10,9	49,1±29,7	47,6±42,2	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	91,2±1,9	87,8±18,4	34,5±24,5	46,0±28,5	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
<b>BIC-D (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	67,6±12,0	61,3±14,2	30,9±30,2	36,8±33,5	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	98,0±11,1	82,2±10,1	40,5±21,6	45,0±38,2	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
8 Wochen	81,4±12,6	75,1±22,3	34,4±20,7	44,2±24,6	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
<b>BF (mm<sup>2</sup>)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	10,5±0,5	8,4±3,8	1,9±1,0	4,3±1,1	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	4,5±1,0	6,4±2,9	1,5±0,8	3,4±2,0	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,01
8 Wochen	6,6±0,9	6,7±1,1	2,6±0,6	2,3±0,7	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
<b>D-CBI (mm)</b>						
1 Woche	4,0±0,3	4,0±0,1	3,9±0,2	4,3±0,2	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,0±0,5	1,2±0,7	3,0±1,3	2,6±1,3	n.s.	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	0,2±0,1	0,4±0,2	2,0±1,2	2,5±1,5	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	0,4±0,1	0,3±0,2	2,5±0,7	2,1±1,1	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05

In Tabelle 2 sind die histomorphometrische Ergebnisse der submukosal eingehielten Implantate im Oberkiefer für DL, NBH, PLF, BIC-D und BF zu allen Zeitpunkten (1, 2, 4, 8 Wochen) dargestellt.



**Abbildung 12:** SLA, 1 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt, Toluidinblau, 25fache Vergrößerung

**2 Wochen:** NBH und BIC-D waren signifikant ( $P < 0,05$ ) unterschiedlich zu Gunsten der modSLA Implantate. PLF war mit einem Signifikanzniveau von  $P < 0,01$  abweichend. BF war im zentralen ( $p < 0,01$ ) und im lateralen ( $p < 0,05$ ) Bereich an den SLA-Oberflächen geringer. Der Unterschied der oralen und vestibulären crestalen Ausdehnung des Knochens (D-CBI) war im zentralen Anteil nicht signifikant. Im lateralen Aspekt lag eine Signifikanz von  $P < 0,05$  mit Werten von  $1,2 \pm 0,7$  mm an den modSLA und  $2,6 \pm 1,3$  mm an den SLA Implantaten vor.



**Abbildung 13:** modSLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



**Abbildung 14:** modSLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



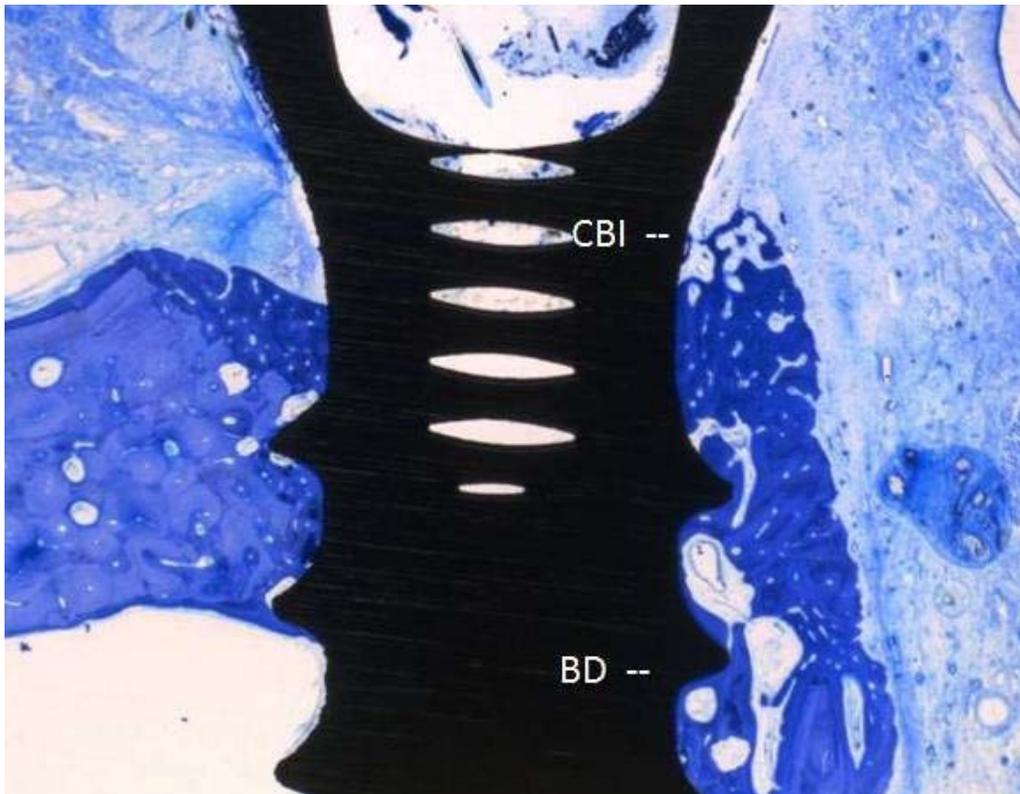
**Abbildung 15:** SLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



**Abbildung 16:** SLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

**4 Wochen:** Die neue Knochenhöhe (NBH) war zentral mit  $P < 0,05$  signifikant an den modSLA-Implantaten höher. Im lateralen Anteil des Defektes ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. PLF war zentral und lateral mit Signifikanzniveau  $P < 0,01$  und  $P < 0,05$  ebenfalls bei den modSLA-Gruppen größer. Der Knochen-Implantat-Kontakt im Defekt (BIC-D) war mit  $p < 0,01$  sehr deutlich geringer an den SLA-Oberflächen. BF und D-CBI waren auch in Gegenwart der modSLA-Gruppen signifikant günstiger verändert. Das Areal des neu gebildeten Knochens (BF) war zentral  $4,5 \text{ mm}^2 \pm 1$  zu  $1,5 \text{ mm}^2 \pm 0,8$  ( $P < 0,05$ ) und im lateralen Bereich  $6,4 \text{ mm}^2 \pm 2,9$  zu  $3,4 \text{ mm}^2 \pm 2$  ( $P < 0,01$ ).

**8 Wochen:** Nach acht Wochen der submukosalen Einheilung im Oberkiefer war die neu gebildete Knochenhöhe (NBH) im Defekt an den modSLA-Implantaten mit  $3,7 \pm 0,1$  mm zentral und  $3,6 \pm 0,8$  mm lateral, jeweils signifikant ( $P < 0,05$ ) höher als an den SLA-Implantaten mit  $1,4 \pm 1,0$  mm und  $1,9 \pm 1,2$  mm. Dementsprechend waren auch die Werte für D-CBI jeweils mit einer Signifikanz ( $P < 0,05$ ) unterschiedlich. BF war sowohl lateral wie zentral, sogar mit  $P < 0,01$  zu Gunsten der modSLA-Oberfläche abweichend. Für PLF und BIC-D lagen zentral signifikante Differenzen mit  $P < 0,01$  und lateral solche mit  $P < 0,05$  vor. Die prozentualen Abweichungen besonders zentral waren ziemlich groß. Bei PLF  $91,2 \pm 1,9$  % zu  $34,5 \pm 24,5$  % und bei BIC-D  $81,4 \pm 12,6$  % zu  $34,4 \pm 20,7$  %. Dies ergibt einen Unterschied des Mittelwertes von  $56,7$  % für PLF und  $47,0$  % für BIC-D zum Nachteil der konventionellen, hydrophoben SLA-Oberfläche.



**Abbildung 17:** modSLA, 8 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

### 3.1.3 Unterkiefer-transmukosale Einheilung

In Tabelle 3 sind die histomorphometrische Ergebnisse der transmukosal eingeeilten Implantate im Unterkiefer für DL, NBH, PLF, BIC-D und BF zu allen Zeitpunkten (1, 2, 4, 8 Wochen) dargestellt.

**Tabelle 3:** Transmukosale Einheilung im Unterkiefer

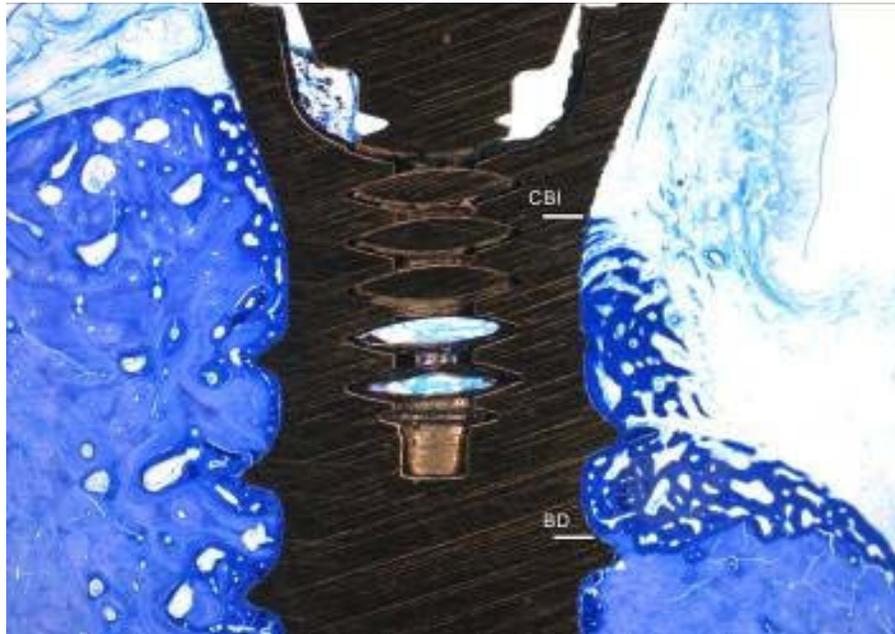
	<b>modSLA</b>		<b>SLA</b>		<i>P</i> value*	
	zentral	lateral	zentral	lateral	zentral	lateral
<b>DL (mm)</b>						
1 Woche	4,1±0,2	4,2±0,1	4,0±0,2	4,2±0,3	n.s.	n.s.
2 Wochen	4,0±0,2	4,2±0,1	4,2±0,1	4,1±0,2	n.s.	n.s.
4 Wochen	4,1±0,1	4,2±0,1	4,1±0,1	4,2±0,1	n.s.	n.s.
8 Wochen	4,1±0,1	4,1±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	n.s.	n.s.
<b>NBH (mm)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,5±0,5	2,0±0,7	0,3±0,2	0,4±0,3	n.s.	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	2,7±0,9	3,2±0,7	1,5±0,7	1,6±1,1	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	3,1±1,1	2,6±0,8	1,1±0,8	1,7±1,6	<i>P</i> <0,05	n.s.
<b>PLF (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	36,6±11,6	48,9±17,1	10,3±7,6	10,8±8,6	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,01
4 Wochen	65,2±20,6	77,7±17,1	37,9±18,2	37,8±27,0	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	75,8±28,3	64,2±19,4	27,7±20,3	42,1±39,7	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
<b>BIC-D (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	38,2±8,8	41,7±12,9	7,4±4,5	5,0±3,5	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
4 Wochen	70,0±15,0	77,0±14,8	27,7±11,9	37,3±25,6	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	71,2±20,3	67,5±18,8	29,1±17,1	39,0±38,4	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
<b>BF (mm<sup>2</sup>)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,8±0,8	3,7±0,8	0,7±0,7	0,8±0,5	n.s.	<i>P</i> <0,01
4 Wochen	4,7±1,1	8,4±4,2	2,9±1,4	4,8±2,6	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	4,3±1,5	3,9±1,6	1,9±1,1	3,4±2,8	<i>P</i> <0,01	n.s.
<b>D-CBI (mm)</b>						
1 Woche	3,8±0,4	4,0±0,3	4,2±0,2	4,0±0,2	n.s.	n.s.
2 Wochen	2,6±0,4	1,9±0,8	3,8±0,4	4,1±0,2	n.s.	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	1,2±1,2	0,9±0,7	2,5±0,7	2,5±1,0	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	0,6±0,4	1,3±0,7	2,3±0,9	2,7±1,2	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05



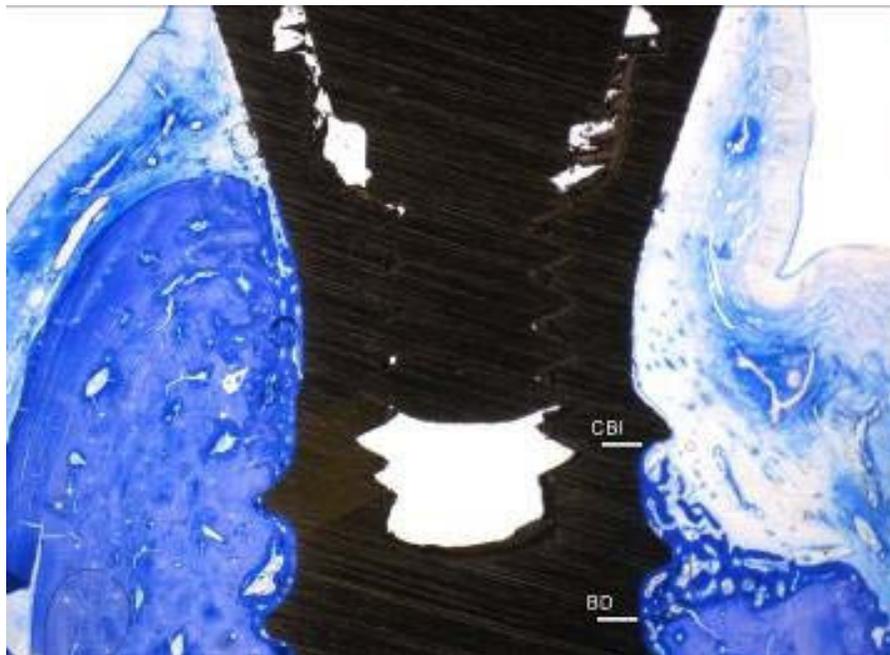
**Abbildung 18:** modSLA, 1 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

**2 Wochen:** Im zentralen Aspekt gab es außer bei PLF ( $p < 0,05$ ) und BIC-D ( $P < 0,01$ ) keine signifikanten Unterschiede. Im lateralen Anteil wiesen PLF, BIC-D und BF Unterschiede mit Signifikanzniveau von  $P < 0,01$  auf. NBH und D-CBI unterschieden sich mit  $P < 0,05$  zum Nachteil der SLA-Oberfläche.

**4 Wochen:** Nach vier Wochen der transmukosalen Heilung im Unterkiefer lag für alle Messwerte ein signifikanter ( $P < 0,05$ ) Unterschied zu Gunsten der modSLA-Implantate vor. Nur BIC-D war mit  $P < 0,01$  an den SLA-Oberflächen geringer.



**Abbildung 19:** modSLA, 4 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



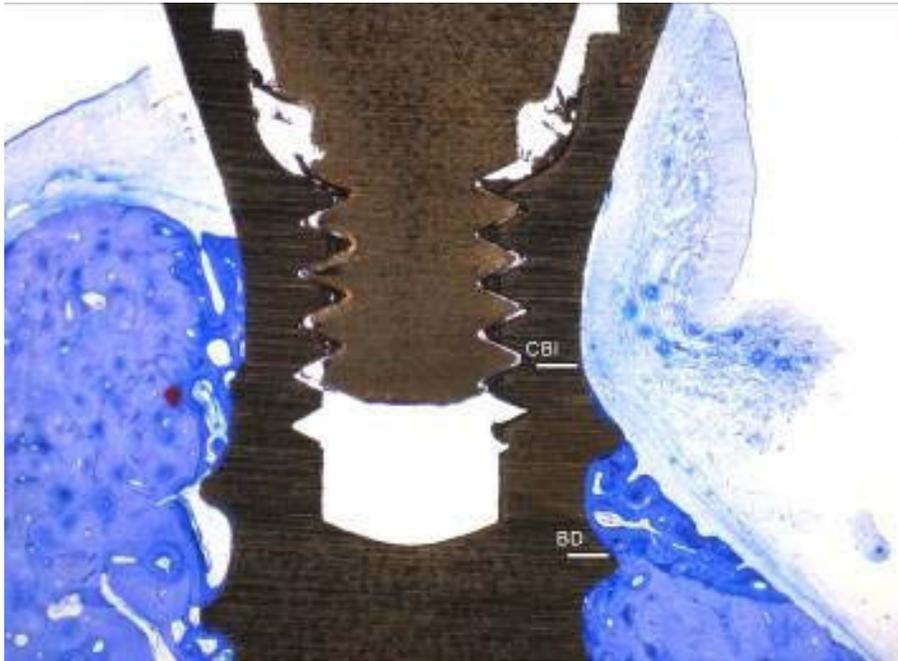
**Abbildung 20:** SLA, 4 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

**8 Wochen:** Im lateralen Bereich der Dehiszenz ergab sich bei NBH und BF keine Signifikanz. Jedoch war trotzdem die modSLA-Oberfläche mit  $2,6 \pm 0,8$  mm zu  $1,7 \pm 1,6$  mm für NBH und  $3,9 \pm 1,6$  mm<sup>2</sup> zu  $3,4 \pm 2,8$  mm<sup>2</sup> bevorteilt. Die anderen Parameter (PLF, BIC-D und D-CBI) waren im lateralen Anteil in den modSLA-Gruppen signifikant ( $P < 0,05$ ) besser. Der zentrale Aspekt war bei PLF, BIC-D und BF in der SLA-Gruppe signifikant ( $P < 0,01$ ) geringer. Die Unterschiede der neuen Knochenhöhe (NBH) und der Differenz der oralen und vestibulären crestalsten Knochenausdehnung (D-CBI) waren mit  $P < 0,05$  abweichend. Die Werte waren für modSLA  $3,1 \pm 1,1$  mm zu SLA  $1,1 \pm 0,8$  mm (NBH) und modSLA  $0,6 \pm 0,4$  mm zu SLA  $2,3 \pm 0,9$  mm (D-CBI).



**Abbildung 21:** modSLA, 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,

Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



**Abbildung 22:** SLA, 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

### 3.1.4 Unterkiefer-submukosale Einheilung

In Tabelle 4 sind die histomorphometrische Ergebnisse der submukosal eingeheilten Implantate im Unterkiefer für DL, NBH, PLF, BIC-D und BF zu allen Zeitpunkten (1, 2, 4, 8 Wochen) dargestellt.

**Tabelle 4:** Submukosale Einheilung im Unterkiefer

	<b>modSLA</b>		<b>SLA</b>		<i>P</i> value*	
	zentral	lateral	zentral	lateral	zentral	Lateral
<b>DL (mm)</b>						
1 Woche	4,2±0,2	4,1±0,2	4,1±0,3	4,2±0,1	n.s.	n.s.
2 Wochen	4,3±0,1	4,1±0,1	4,2±0,1	4,2±0,2	n.s.	n.s.
4 Wochen	4,1±0,1	4,2±0,1	4,2±0,1	4,1±0,1	n.s.	n.s.
8 Wochen	4,2±0,2	4,1±0,1	4,0±0,2	4,1±0,2	n.s.	n.s.
<b>NBH (mm)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	1,8±0,6	3,4±1,1	0,8±0,7	1,6±1,2	n.s.	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	2,8±1,2	3,8±0,5	1,3±0,4	1,9±1,0	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	3,7±0,1	3,6±0,3	1,2±0,6	1,7±0,5	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
<b>PLF (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	41,5±14,4	82,6±27,9	18,3±15,2	37,8±29,2	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,01
4 Wochen	69,5±29,8	91,9±12,7	32,0±10,7	46,6±24,3	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	92,4±2,4	88,3±6,7	28,9±15,1	40,8±12,0	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
<b>BIC-D (%)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	39,7±12,0	75,9±14,7	8,6±7,3	35,6±24,8	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	67,1±26,4	89,4±10,6	32,0±10,7	46,6±24,3	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,01
8 Wochen	82,1±14,8	71,0±20,3	26,8±10,4	46,2±16,2	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
<b>BF (mm<sup>2</sup>)</b>						
1 Woche	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	n.s.	n.s.
2 Wochen	5,2±2,9	7,6±2,5	1,7±0,9	3,5±1,9	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	5,2±0,8	6,9±2,3	2,3±2,0	3,3±2,4	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	6,4±0,7	5,4±1,2	1,9±0,3	2,6±0,7	<i>P</i> <0,01	<i>P</i> <0,01
<b>D-CBI (mm)</b>						
1 Woche	4,2±0,4	4,1±0,2	4,2±0,2	4,0±0,4	n.s.	n.s.
2 Wochen	2,5±0,6	0,6±0,4	3,6±0,9	2,6±1,3	n.s.	<i>P</i> <0,05
4 Wochen	1,3±1,1	0,3±0,2	2,9±0,6	2,2±1,1	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05
8 Wochen	0,3±0,2	0,5±0,3	2,6±0,8	1,9±0,3	<i>P</i> <0,05	<i>P</i> <0,05

**2 Wochen:** NBH und D-CBI waren lateral mit  $P < 0,05$  besser an der modSLA-Oberfläche regeneriert. Auch PLF und BIC-D zeigten größere prozentuale Fortschritte bezüglich der Regeneration. Zentral PLF mit  $P < 0,05$ , lateral mit  $P < 0,01$ . Umgekehrt verhielt es sich mit BIC-D, hier war zentral der Knochen mit  $P < 0,01$  und lateral mit  $P < 0,05$  prozentual mehr an der modSLA-Oberfläche vertreten. Für BF wurden folgende Flächen vermessen. Zentral  $5,2 \pm 2,9 \text{ mm}^2$  zu  $1,7 \pm 0,9 \text{ mm}^2$  und lateral  $7,6 \pm 2,5 \text{ mm}^2$  zu  $3,5 \pm 1,9 \text{ mm}^2$ . Damit lag jeweils  $P < 0,05$  zu Gunsten der modSLA-Implantate vor.



**Abbildung 23:** SLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidinblau, 25fache Vergrößerung

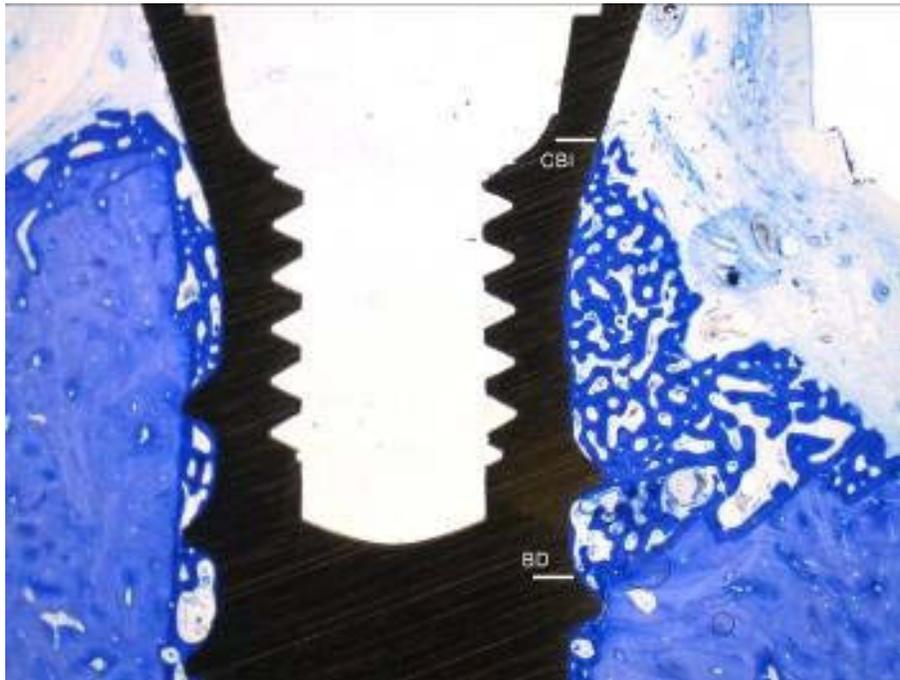


**Abbildung 24:** modSLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

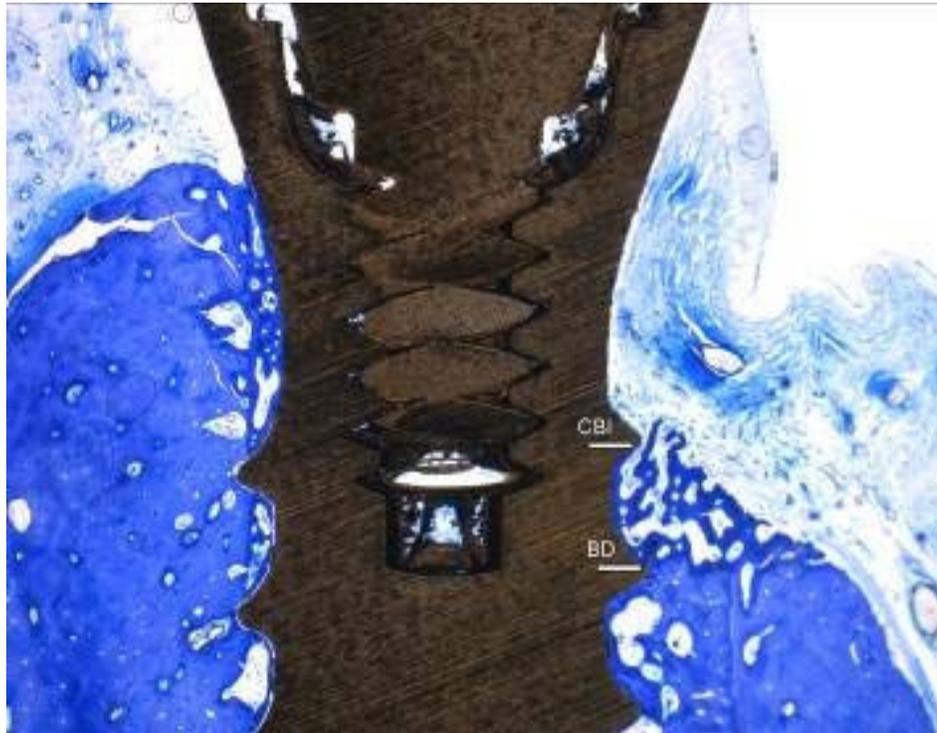


**Abbildung 25:** modSLA, 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

**4 Wochen:** NBH, PLF und D-CBI waren auch nach vier Wochen der geschlossenen Einheilung im Unterkiefer mit  $P < 0,05$  zentral und lateral an den SLA-Implantaten schlechter. Bei BIC-D und BF lagen ebenso Signifikanzen vor. Bei BIC-D lateral  $P < 0,01$  und zentral  $P < 0,05$ . Die Fläche des neuen Knochens im Defekt (BF) war an den modSLA-Implantaten zentral mit  $P < 0,01$  und lateral mit  $P < 0,05$  größer.



**Abbildung 26:** modSLA, 4 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

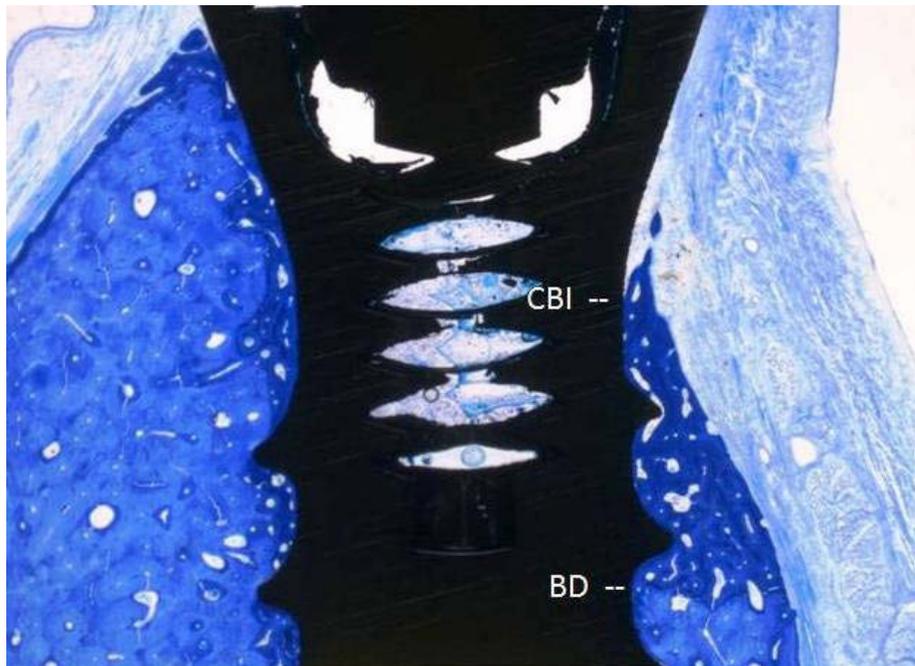


**Abbildung 27:** SLA, 4 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

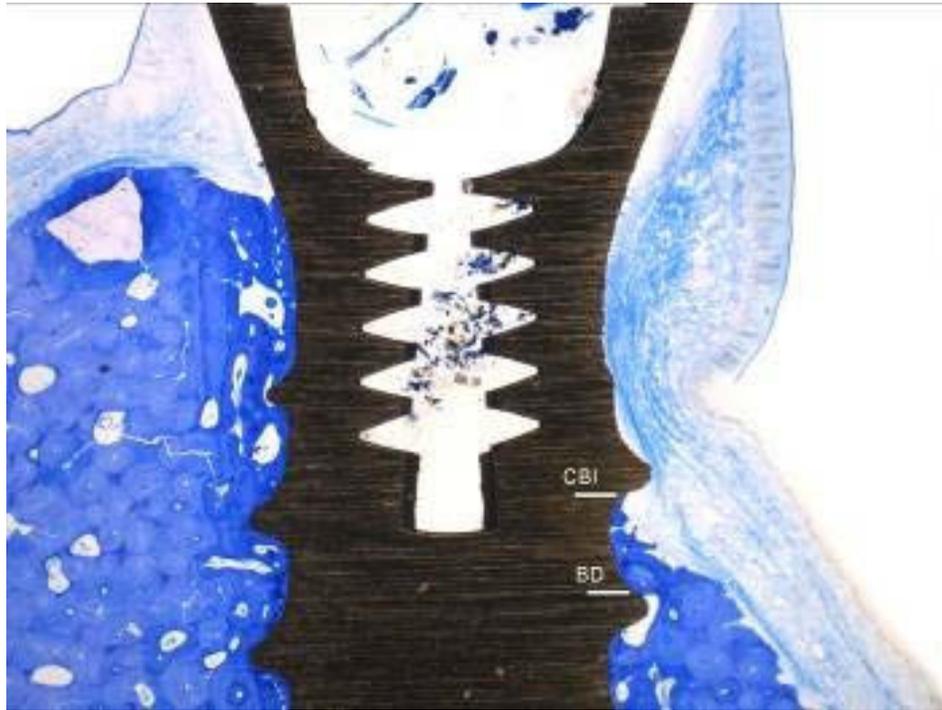
**8 Wochen:** NBH und D-CBI waren erneut nach acht Wochen mit  $P < 0,05$  in allen Bereichen in Gegenwart der hydrophilen modSLA-Oberfläche besser regeneriert. Die Abweichung der Ergebnisse bei PLF und BF waren sogar zentral wie lateral mit  $P < 0,01$  different. Und auch der prozentuale Knochen-Implantat-Kontakt war zentral mit  $P < 0,01$  und lateral mit  $P < 0,05$  an den SLA-Oberflächen geringer.



**Abbildung 28:** modSLA, 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, lateraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



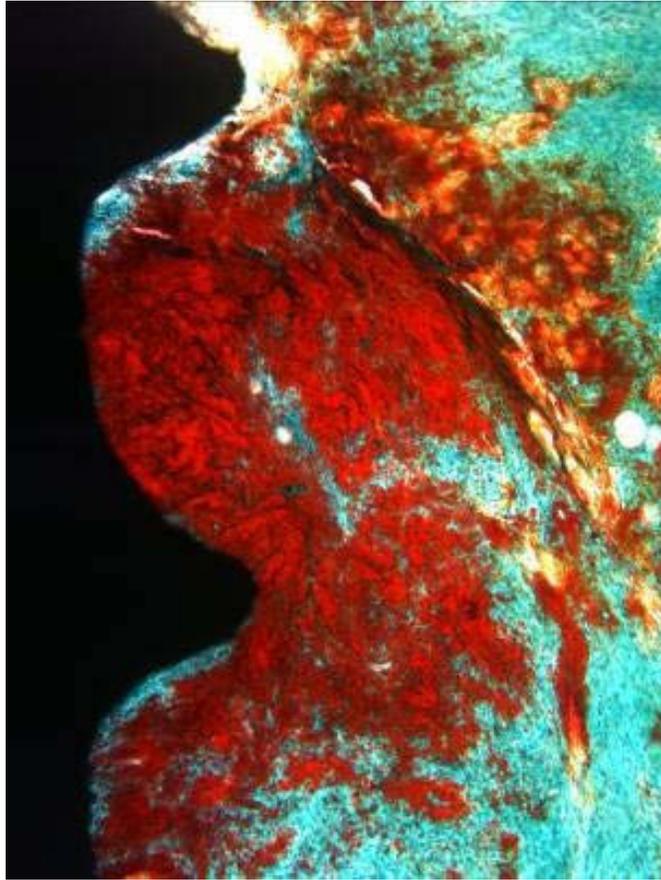
**Abbildung 29:** modSLA, 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung



**Abbildung 30:** SLA, 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung

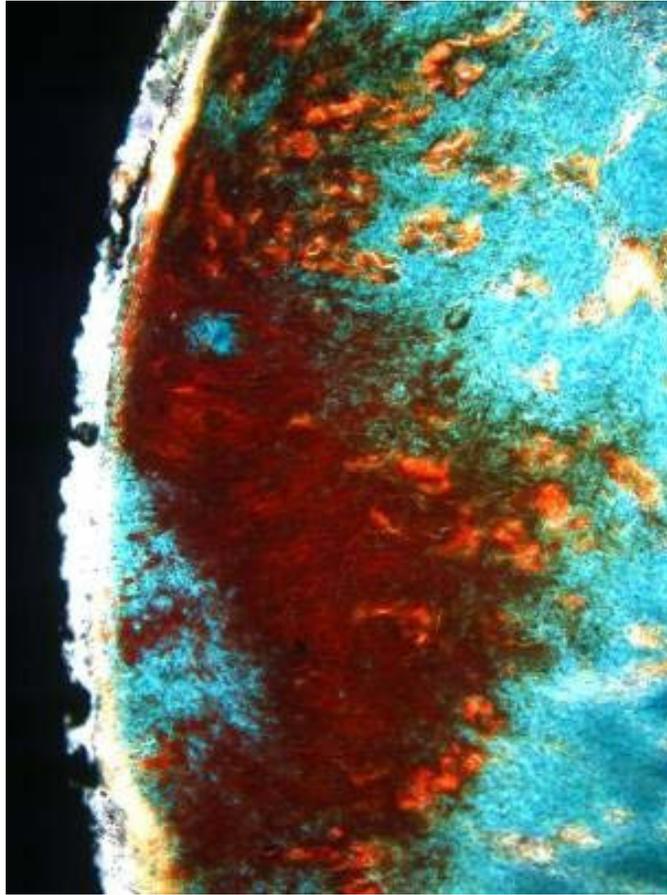
### 3.2 Masson-Goldner Färbung

Nach einer Woche war in Gegenwart der modSLA-Oberfläche ein homogen stabilisiertes Blutkoagel ersichtlich. Diese Beobachtung wurde in allen modSLA-Gruppen sowohl im lateralen wie im zentralen Aspekt gemacht (Abbildung 31).



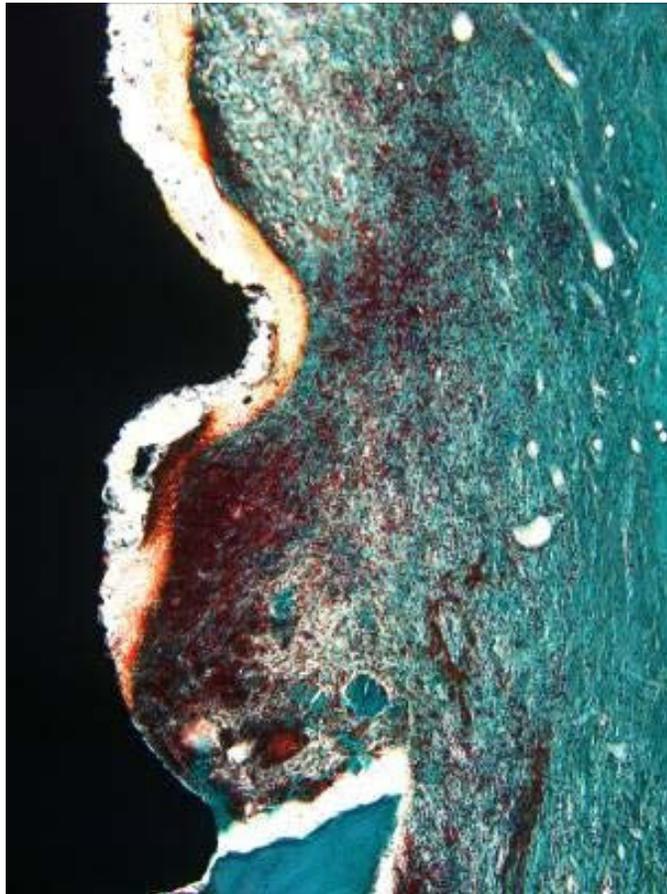
**Abbildung 31:** modSLA, 1 Woche, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung

Insbesondere die transmukosal einheilenden modSLA-Implantate wiesen eine besonders dünne fibrinbedeckte Zone im coronalen Anteil der Defekte auf (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** modSLA, 1 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,  
Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung

Nach einer Woche ließ sich an vielen der trans- und submukosal einheilenden SLA-Implantate sowohl im Ober- als auch im Unterkiefer ein vollständiger oder teilweiser Zerfall des Blutkoagels beobachten (Abbildung 33).



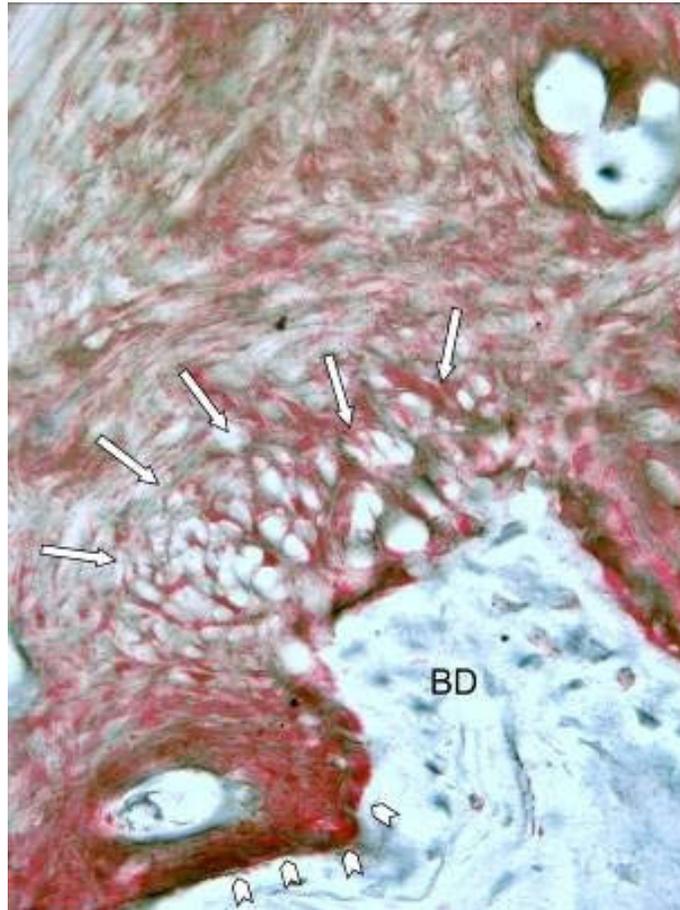
**Abbildung 33:** modSLA, 1 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung

### **3.3 Immunhistochemische Ergebnisse**

#### **3.3.1 1 Woche**

Nach einer Woche der Heilung konnte die ausgeprägteste Osteocalcin Antigenreaktivität im basalen Bereich der Dehiszenzdefekte beobachtet werden (Abbildung 34). Insbesondere vom Defektboden ausgehend, entlang kleiner geöffneter Knochenmarkkräume, schien die knöcherne Regeneration zu

beginnen. In allen Gruppen konnte in diesem Bereich ein primäres Geflecht von kleinen Blutgefäßen beobachtet werden. In Abbildung 34 ist dies durch Pfeile markiert.



**Abbildung 34:** SLA, 1 Woche, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt,  
Immunhistochemie - Osteocalcin, 400fache Vergrößerung

Im lateralen Anteil der Defekte wurde durch Vermessen der Fläche der angeschnittenen Blutgefäße gezeigt, dass es in Gegenwart der modSLA-Oberfläche zu einer signifikant beschleunigten Organisation des Defektbereichs

kommt. Unabhängig von der Art der Einheilung waren die Werte für die SLA-Implantate geringer. Im Oberkiefer unterschieden sich die Flächen 0,64-0,97 mm<sup>2</sup> für modSLA zu 0,19-0,24mm<sup>2</sup> für die SLA-Gruppen. Im Unterkiefer zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier konnte eine Signifikanz von  $P < 0,01$  zwischen den Oberflächen festgestellt werden. Die Werte waren für modSLA 0,61-0,80 mm<sup>2</sup> zu 0,22-0,26 mm<sup>2</sup> für SLA. Das Bindegewebe direkt um die Blutgefäße bzw. in der näheren Peripherie war ebenfalls gekennzeichnet durch eine deutliche Osteocalcin-Antigenreaktivität.



**Abbildung 35:** modSLA, 1 Woche, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Transglutaminase II, 400fache Vergrößerung

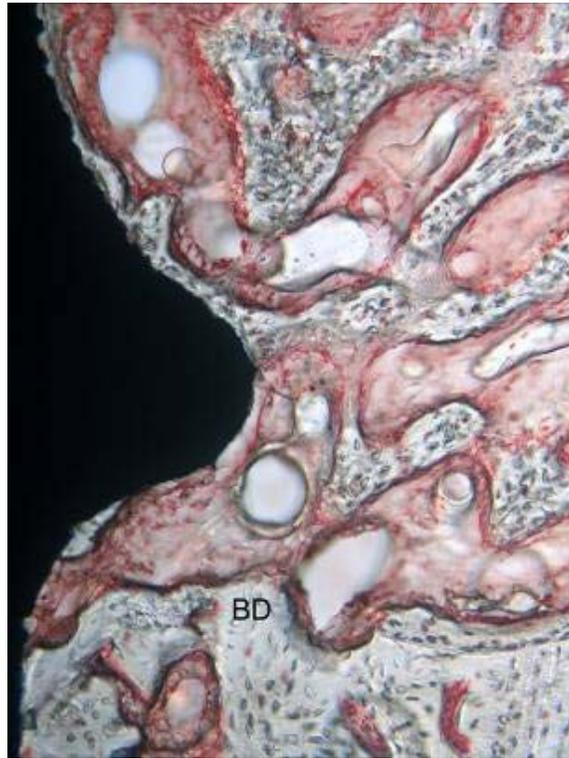
Analog zu diesen Beobachtungen wurden in der Toluidin-blau Färbung unter anderem in diesen Arealen erste Anzeichen einer primären Mineralisation nachgewiesen (Abbildung 7).

Auch im zentralen Anteil der Defekte, sowohl bei den sub- als auch transmukosal einheilenden modSLA-Implantaten, konnten signifikant ( $P < 0,01$ ) größere Flächen der angeschnittenen neuen Blutgefäße gemessen werden (Oberkiefer: 0,29-0,34 mm<sup>2</sup>, Unterkiefer: 0,19-0,37 mm<sup>2</sup>)(Abbildung 35 - Pfeile). Die Fläche in den entsprechenden SLA-Gruppen belief sich im Oberkiefer auf 0,07-0,12 mm<sup>2</sup> und im Unterkiefer auf 0,06-0,09 mm<sup>2</sup>.

### **3.3.2 2 Wochen**

Die immunhistochemische Analyse der Proben nach zwei Wochen zeigte wiederum eine deutlich stärkere Osteocalcin-Antigenreaktivität in Gegenwart der modSLA-Implantate. In den Abbildungen 36 und 37 lässt sich sehr schön der ausgeprägte Osteocalcinnachweis im organisierten Bindegewebe innerhalb der Defekte beobachten.

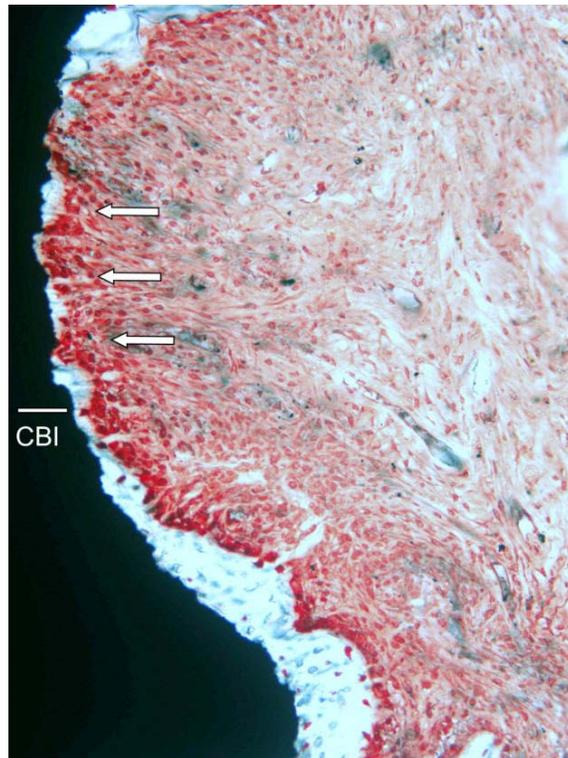
Abbildung 36 zeigt eine Mineralisation bzw. Geflechtknochenneubildung in direktem Kontakt zur modSLA-Oberfläche. Außerdem lassen sich auch kleine, neu gebildete Blutgefäße unmittelbar am Implantat feststellen.



**Abbildung 36:** modSLA, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Transglutaminase II, 200fache Vergrößerung

Vor allem in Abbildung 36 ist eindeutig das verstärkte immunhistochemische Signal hin zur modSLA-Oberfläche und vom Knochen ausgehend zu sehen. Die Demarkationslinie, der Defektboden (BD), ist vollständig durch ein deutliches Signal gekennzeichnet.

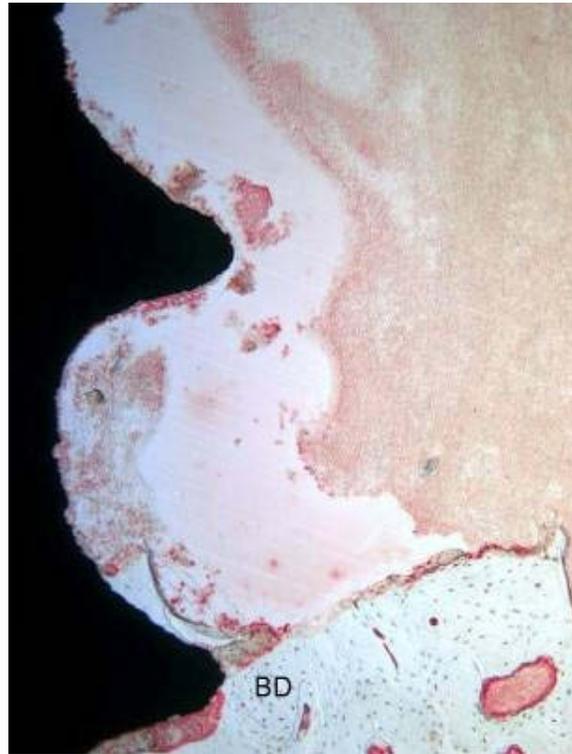
In Abbildung 37 zeigen die Pfeile Bindegewebe oberhalb des crestalsten Knochen-Implantat-Kontakts (CBI), welches an der hydrophilen Oberfläche sehr deutlich Osteocalcin-Antigenreaktivität aufweist. Insgesamt erscheint der Defekt sehr gut organisiert und im Begriff der Regeneration zu sein.



**Abbildung 37:** modSLA, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Osteocalcin, 200fache Vergrößerung

Ein teilweiser, aber zum Teil auch vollständiger Kollaps des Mukoperiostlappens in den Defektbereich wurde an einigen der sub- und transmukosal einheilenden SLA-Implantate festgestellt. Aber auch einige der transmukosal einheilenden modSLA-Implantate wiesen diese Kompromittierung auf.

In Abbildung 38 ist ein SLA-Implantat in der transmukosalen Gruppe im Unterkiefer in Osteocalcinfärbung dargestellt. Es ist der partielle Kollaps des Mukoperiostlappens und kein Anzeichen für Knochenregeneration bzw. Osteocalcinnachweis im Defekt zu erkennen.



**Abbildung 38:** SLA, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Osteocalcin, 100fache Vergrößerung

#### 4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, histomorphometrisch und immunhistochemisch die Regeneration von knöchernen Dehiszenzdefekten an sub- und transmukosal einheilenden chemisch modifizierten und konventionellen SLA-Titanimplantaten im Beagle-Hund zu untersuchen.

Dass die Implantatoberfläche einer der Hauptfaktoren für eine vorhersehbar suffizient verlaufende Osseointegration des Implantates darstellt, wurde bereits 1981 beschrieben (Albrektsson et al 1981).

Als wichtigste Oberflächencharakteristika werden die Mikro- bzw. Makrotopographie, die chemischen Eigenschaften, die Oberflächenladung und die Benetzbarkeit genannt (Ratner et al 1996).

So zeigten in den letzten 20 Jahren verschiedene in vivo Untersuchungen den Einfluss der Implantatoberfläche auf die knöcherne Wundheilung. Es wurde unter anderem der positive Einfluss einer rauhen gegenüber einer polierten bzw. maschinieren Oberflächen herausgearbeitet (Buser et al. 1991; Gotfredsen et al. 1992; Wennerberg et al. 1995; Vörös et al. 2001).

Die in dieser Untersuchung verwendete chemische Modifikation (mod-SLA) der konventionellen SLA-Implantatoberfläche ist patentrechtlich durch die Firma Straumann (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) geschützt. Allgemein werden SLA- und modSLA-Implantate durch Sandstrahlung und Säureätzung gleichermaßen mit einer identischen Mikro- und Makrostruktur der Oberfläche hergestellt. Wasserkontakt erzeugt auf beiden Oberflächen eine hydroxylierte Schicht mit hydrophilen Eigenschaften (Healy et al. 1992). Die anschließende Lufttrocknung erzeugt auf den konventionellen SLA-Oberflächen eine passive Kohlenwasserstoffschicht und somit hydrophobe Eigenschaften. Die modifizierte Aufbereitung in Stickstoffatmosphäre der modSLA-Implantate und die anschließende Lagerung in steriler Kochsalzlösung ermöglicht den Erhalt der chemischen Aktivität und Hydrophilie.

So konnte mittels Röntgen-Fotoemissions-Spektroskopie auch eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Titanoxidschicht nachgewiesen werden. Für SLA-Oberflächen wurde folgende Zusammensetzung festgestellt: O - 50,2 % ( $\pm 2,6$ ), Ti - 14,3 % ( $\pm 1,4$ ), N - 1,3 % ( $\pm 0,3$ ), C - 34,2 % ( $\pm 2,0$ ). Für die modSLA-Oberflächen: O - 60,1 % ( $\pm 0,7$ ), Ti - 23,0 % ( $\pm 1,1$ ), N - 0,7 % ( $\pm 0,2$ ), C - 14,9 % ( $\pm 0,9$ ) (Zhao et al. 2005).

Verschiedene experimentelle Zellkulturuntersuchungen bestätigten die verbesserten osteophilen Eigenschaften der modSLA- im Vergleich zu SLA-Oberflächen (Masaki et al. 2005; Zhao et al. 2005).

Das chirurgische Prozedere in wissenschaftlichen Untersuchungen, welche die

Osseointegration von zahnärztlichen Implantaten und oder Knochenneubildung bzw. –regeneration zum Gegenstand haben, ist oft sehr ähnlich. So wird fast immer nach Präparation eines Mukoperiostlappens unter sterilen Kautelen das Implantatlager entsprechend den Herstellerangaben osteotomiert. Anschließend wird nach Implantatinsertion und/oder Augmentation ein speicheldichter Wundverschluss angebracht (Behneke A. et al. 1997; Buser et al. 2004; Grassi et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Knochenneubildung maßgeblich durch die Hydrophilizität der Implantatoberfläche und zusätzlich durch den Einheilmodus beeinflusst wurde. Im Einzelnen bedeutet das, dass nach 2, 4 und 8 Wochen der Heilungsdauer die modSLA-Gruppen signifikant höhere Werte für NBH, PLF, BIC-D, BF und dementsprechend niedrigere Werte für D-CBI als die konventionellen SLA-Implantate zu verzeichnen hatten. Im Detail zeigte sich folgende Entwicklung der einzelnen zu bestimmenden Parameter.

Die Defektlänge (**DL**) war analog zum Protokoll in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten 4 mm ( $\pm 0,3$  mm). Damit lagen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen und Zeitpunkte vor.

Die neue Knochenhöhe (**NBH**) stieg in allen Gruppen innerhalb der ersten vier Wochen sowohl lateral als auch zentral an. Die Werte variierten zwar zwischen den Gruppen und Einheilverfahren, jedoch war initial eine verstärkte Knochenneubildung im lateralen Defektbereich zu beobachten. Da die Knochenregeneration grundsätzlich vom angrenzenden Knochen ausgeht, haben die zentralen Werte der neuen Knochenhöhe mehr Aussagekraft als die lateralen Werte. Der laterale Anteil unterliegt eher einer Spontanregeneration und die Implantatoberfläche hat weniger Einfluss. In Gegenwart der hydrophoben SLA-Oberfläche stagnierte nach vier Wochen die Knochenneubildung und war zum Teil sogar leicht rückläufig. Im Gegensatz dazu war auch nach vier Wochen noch Regenerationspotential an den modSLA-Implantaten erkennbar. Die submukosale Einheilung hatte signifikante Vorteile

hinsichtlich der neuen Knochenhöhe an den modSLA-Implantaten nach 2 und 4 Wochen im Ober- bzw. nach 2 Wochen im Unterkiefer.

Der prozentuale Knochen-Flächen-Besatz (**PLF**) stellte die neue Knochenhöhe in Abhängigkeit zur Defektlänge dar. Wie bereits beschrieben, wies die Defektlänge keine signifikanten Unterschiede auf. Dementsprechend verhielt sich der prozentuale Knochen-Flächen-Besatz analog zur neuen Knochenhöhe im Defekt. Die Werte rangierten zentral an den modSLA-Implantaten nach acht Wochen zwischen 75,8 % ( $\pm 28,3$ ) bei transmukosaler Einheilung im Unterkiefer und 107,2 % ( $\pm 4,7$ ) bei ebenfalls transmukosaler Einheilung im Oberkiefer. Die SLA-Implantate wiesen nach gleicher Einheilzeit zentrale Werte zwischen 27,7 % ( $\pm 20,3$ ) im Unterkiefer und 43,8 % ( $\pm 41,2$ ) bei jeweils transmukosaler Einheilung im Oberkiefer auf.

Der Knochen-Implantat-Kontakt innerhalb des Defektes (**BIC-D**) verhielt sich ähnlich wie NBH und PLF. Da der Knochen-Implantat-Kontakt in der gesamten Defektlänge vermessen wurde, beeinflusste NBH die Werte maßgeblich. Man hätte in dieser Untersuchung auch separat die BIC-Rate innerhalb der jeweiligen NBH bestimmen können. Dies hätte ggf. noch detaillierte Informationen auf den Knochen-Implantat-Kontakt der jeweiligen Implantat-Oberfläche zugelassen. Diesbezügliche Vorteile der modSLA-Oberfläche wurden bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt (Buser et al. 2004; Schwarz et al. 2007d).

Die Fläche des neugebildeten Knochens (**BF**) wurde von BD bis CBI im Dehiszenzdefekt vermessen. Insgesamt waren die modSLA-Implantate wiederum den SLA-Implantaten deutlich überlegen, insbesondere bei submukosaler Einheilung. Auffallend erschien jedoch, dass bei transmukosaler Heilung in allen Gruppen die größte Fläche nach 4 Wochen vermessen wurde. Wahrscheinlich wurde im Rahmen der knöchernen Remodellation in den zweiten vier Wochen der funktionell unbelastete Knochen wieder abgebaut. Bei der submukosalen Einheilung waren die größten Flächen nach zwei Wochen zu verzeichnen. Der Grund hierfür dürfte in der divergierenden Implantatschulter

liegen. Der 1,8 mm suprakrestale Anteil bewirkt bei submukosaler Einheilung die Schaffung eines sich mit Blut füllenden Raums. Dieser mineralisiert initial, und wird dann ebenfalls im Rahmen der Remo-dellation unter funktioneller Nichtbelastung teilweise atrophiert (Abbildung 11).

Der Unterschied der bukkalen und oralen (CBI-b – CBI-o) Ausdehnung des Knochens nach crestal wurde ebenfalls in mm als **D-CBI** bestimmt. Die Werte für D-CBI sind ungefähr antiproportional zu NBH. Die minimalen Abweichungen resultieren möglicherweise aus geringfügigen Resorptionen des Alveolarcrests oral nach Präparation eines Mukoperiostlappens (Pihlström et al. 1983) und leichten Abweichungen des Knochenniveaus, oral zu bukkal, am Implantat bei Insertion.

Das hier verwendete Studiendesign der akuten standardisierten bukkalen Dehiszenzdefekte im Hund ist ein etabliertes und verbreitetes Modell zur Evaluation der Knochenregeneration an dentalen Titanimplantaten (Becker et al. 1990; Zablotsky et al. 1991; Casati et al. 2002; Oh et al. 2003; Schwarz et al. 2007a, 2007c, 2007e).

In einer Tierstudie unserer Arbeitsgruppe wurde an 6 Beagle-Hunden untersucht, inwiefern die Regeneration bukkaler Dehiszenzdefekte an modSLA-Implantaten durch zwei verschiedene Knochenersatzmaterialien beeinflusst werden konnte. Zum einen wurde der Dehiszenzdefekt mittels BoneCeramic®, einer Mischung aus Hydroxylapatit (60 %) und  $\beta$ -Tricalciumphosphat (40 %) und zum anderen mittels eines natürlichen Knochenminerals + 10 % porkines Kollagen (BioOssCollagen®) augmentiert. Abgedeckt wurden beide Augmentate analog zum GBR-Verfahren mit einer Kollagen-Membran (BioGide®). Beide Gruppen zeigten nach 4 und 9 Wochen einen signifikanten Rückgang der verbleibenden Defektlänge. Die verbleibenden Knochenersatzmaterial-Granula waren vollständig knöchern integriert, wobei an keinem eine osteoklastäre Aktivität an der Oberfläche der Granula nachgewiesen werden konnte. Die Autoren schlussfolgerten für beide Gruppen in Gegenwart der modSLA-Implantate ein

positives Potential für die knöcherne Regeneration von bukkalen Dehiszenzdefekten (Schwarz et al. 2007c).

Akute Dehiszenzdefekte haben ein gewisses Potenzial zur spontanen Regeneration. Es sollte dementsprechend bei der Interpretation der beschriebenen Ergebnisse nicht vergessen werden, dass ein gewisser Anteil der Regeneration, insbesondere in Defektwand- bzw. Defektbodennähe, spontan abläuft. In der Tat zeigten die immunhistochemischen Beobachtungen ein vergleichbares Muster der knöchernen Wundheilung im lateralen Anteil der Defekte, sowohl in den SLA- als auch den modSLA-Gruppen. Im Detail konnte nachgewiesen werden, dass Angiogenese, Osteocalcinsynthese und somit in der Toluidin-blau-Färbung auch erste Areale der Mineralisation aus angeschnittenen bzw. geöffneten Knochenmarksräumen hervorgeht. Solche Beobachtungen wurden an allen knöchernen Grenzen der Defekte gemacht, sowohl am Defektboden als auch an den Defektwänden. Dies erklärt die initiale bessere Wundheilung im lateralen Aspekt in allen Gruppen.

Im Gegensatz zu den konventionellen hydrophoben SLA-Implantaten wurde in Gegenwart der hydrophilen modSLA-Oberfläche auch im angrenzenden Bindegewebe eine intensive Osteocalcin-Antigenreaktivität nachgewiesen.

Seitdem bekannt ist, dass Osteocalcin eines der am häufigst vorkommenden nicht kollagenen Proteine der Knochenmatrix ist und ausschließlich von Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten syntetisiert wird (Gallop et al. 1980; Hauschka et al. 1989; Hopyan et al. 1999; Raymond et al. 1999), ist anzunehmen, dass die osteoblastäre Differenzierung innerhalb der ersten Woche und hauptsächlich an den knöchernen Defektgrenzen bzw. entlang der modSLA-Oberfläche lokalisiert ist.

Zudem zeigte nach einer Woche der Wundheilung die immunhistochemischen Analyse eine deutlich ausgeprägtere Proliferation von Blutgefäßen in direkter Beziehung zu den modSLA-Implantaten. Zum Teil reichte die beginnende Neovaskularisation bereits bis zur Defektmittle. Im Gegensatz dazu war an den

SLA-Implantaten das erste Geflecht vaskulärer Strukturen hauptsächlich am Defektboden und im lateralen Anteil lokalisiert.

In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass knochenbildende Zellen aus Perizyten entlang kleiner Blutgefäße im Bindegewebe entstehen (Long et al. 1995; Rickard et al. 1996; Reilly et al. 1998). Dieses Erkenntnis erklärt letztlich die gesteigerte Knochenregeneration an den modSLA-Implantaten.

Die gesteigerte bzw. verbesserte Angiogenese ist wahrscheinlich auf die hydrophilen Oberflächeneigenschaften und die daraus resultierende bessere Benetzbarkeit der modSLA-Oberfläche zurückzuführen (Rupp et al. 2006).

Bei der klinischen Insertion in das präparierte Knochenlager ist bereits mit bloßem Auge die verbesserte Benetzbarkeit der hydrophilen Oberfläche zu erkennen (Abbildung 2b). Das Blut zieht sich förmlich am Implantat entlang nach oben und bietet somit bessere Möglichkeiten der Blutkoagelstabilisierung.

Die Masson-Goldner-Färbung zeigte nach einer Woche ein suffizient stabilisiertes Blutkoagel in direktem Kontakt zu der hydrophilen modSLA-Implantatoberfläche. Dies begünstigte das Einsproßen neuer Blutgefäße aus dem angrenzenden Alveolarknochen. Im Gegensatz dazu schien das Blutkoagel an den SLA-Implantaten teilweise, aber auch öfter komplett kollabiert zu sein. Diese Beobachtung, dass das Blutkoagel deutlich besser an den hydrophilen modSLA-Oberflächen stabilisiert werden kann, insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Osseointegration, wurde bereits in mehreren vorangegangenen Studien gemacht (Schwarz et al. 2007b, 2007d). Die untersuchten Zeitpunkte in diesen Studien wurden absichtlich besonders kurz gewählt (1, 4, 7, 14, (28) Tage), um die initiale Integration der SLA- und modSLA-Oberflächen ins Weich- und Hartgewebe zu untersuchen. Wiederum stellten die Autoren schlussfolgernd fest, dass die Integration der untersuchten SLA- und modSLA-Implantate primär durch die Hydrophilizität und nicht durch die Oberflächenmikrotopographie beeinflusst wird (Schwarz et al. 2007b). Außerdem bewährte sich die kombinierte Untersuchung mittels konventioneller und immunhistochemischer

Histologie zur Evaluierung der weich- und hartgeweblichen Integration dentaler Implantate (Schwarz et al. 2007d).

Grundsätzlich fungiert ein Blutkoagel als Platzhalter und provisorische Matrix. Es induziert und fördert die Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen und somit die Angiogenese (Liu et al. 1990).

Auf Grund dieser Erkenntnisse ist die kompromittierte Knochenregeneration sowohl an den sub- wie auch an den transmukosalen SLA-Implantaten zu erklären. Das Unvermögen der hydrophoben SLA-Oberfläche, das Blutkoagel suffizient zu stabilisieren und dessen Zerfall zu verhindern, ist verantwortlich für den partiellen, aber auch zum Teil vollständigen Kollaps des Mukoperiostlappens in den Defektbereich. Diese Annahme wird gestützt durch die Erkenntnis, dass submukosal einheilende SLA-Implantate eine etwas bessere Knochenregeneration aufweisen als transmukosale. Der Grund für dieses Ergebnis liegt in der Implantatschulter. Sie unterstützt den Halt der originären Position des Mukoperiostlappens. Analog dazu wurde die gleiche Tendenz bei den submukosal einheilenden modSLA-Implantaten festgestellt. Auch hier wiesen sie im Vergleich zu den transmukosal eingeheilten Implantaten signifikant höhere Werte für BF auf. So zeigten auch die transmukosalen modSLA-Gruppen dünnere bzw. schmalere Blutkoagel als die submukosalen. Dies galt besonders für den coronalen Anteil.

Eine andere mögliche Erklärung für die verbesserte knöchernen Regeneration in Gegenwart der modSLA-Implantate könnte auf positiv stimulierende Effekte der hohen Oberflächenenergie auf knochenbildende Zellen zurückzuführen sein. Wie bereits beschrieben, zeigten die Ergebnisse verschiedener Zellkultur-Studien, dass Osteoblasten, welche auf modSLA-Oberflächen wuchsen, einen mehr differenzierten Phänotyp aufwiesen als solche, die auf SLA-Oberflächen kultiviert wurden. Gekennzeichnet war dies durch eine gesteigerte bzw. verminderte ALP-Aktivität, höhere Osteocalcin-Synthese und durch eine verstärkte Produktion von PGE2 und TGF – beta1 (Zhao et al. 2005, 2007).

Tatsächlich haben mehrere Tierstudien in der jüngsten Vergangenheit bereits mit deutlicher Evidenz gezeigt, dass modSLA-Oberflächen eine gesteigerte Knochenapposition während früher Phasen der Wundheilung an sub- und transmukosal einheilenden Implantaten unterstützen bzw. fördern (Buser et al. 2004; Ferguson et al. 2006; Bornstein et al. 2008; Schwarz et al. 2007b, 2007d, Lai et al. 2009).

Im Einzelnen bedeutet dies:

Das Studiendesign der Untersuchung von Buser et al. beinhaltete 6 ausgewachsene Miniaturschweine, bei denen zunächst die anterioren Zähne im Oberkiefer extrahiert wurden. Nach einer Heilungsphase von 6 Monaten erhielten die Schweine dann jeweils 6-8 Implantate entsprechend des Platzangebotes. Es wurde wie in dieser Studie SLA- und modSLA-Implantate verwendet. Die Einheilzeiträume waren 2, 4 und 8 Wochen. Neben einer exakten Charakterisierung der Oberflächen wurde der Knochen-Implantat Kontakt (BIC) bestimmt. Nach 2 und 4 Wochen waren die modSLA-Oberflächen mit signifikant mehr Knochen besetzt als die SLA-Oberflächen. Nach 8 Wochen näherten sich die Werte an, und es bestand keine Signifikanz mehr (2 Wochen: modSLA -  $49,3\% \pm 7,4$ ; SLA -  $29,4\% \pm 7,5$ ; 4 Wochen: modSLA -  $81,9\% \pm 3,5$ ; SLA -  $66,5\% \pm 8,1$ ; (8 Wochen: modSLA -  $78,4\% \pm 11,1$ ; SLA -  $75,4\% \pm 7,6$ ) (Buser et al. 2004).

Ferguson et al. bediente sich desselben Studiendesigns, ebenfalls SLA- und modSLA-Implantaten und den identischen Einheilzeiträumen. Sie integrierten 27 Miniaturschweine mit jeweils 6 Implantaten in ihre Untersuchung. Als Auswertungsparameter bestimmten sie den Ausdrehmoment. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen von Buser et al.. Wiederum verzeichneten die modSLA-Implantate die höheren Ausdrehmomente. Die Werte für modSLA waren 1,485 NM nach 2 Wochen, 1,709 NM nach 4 Wochen und 1,345 NM nach 8 Wochen während die SLA-Gruppe nur 1,231 NM, 1,585 NM und 1,143 NM als Ausdrehmoment aufwies. Somit hatten die modSLA-Oberflächen zwischen 8

– 21% höhere Werte. Dies lässt Rückschlüsse auf einen besseren Knochen-Implantat-Verbund zu (Ferguson et al. 2006).

Eine Tierstudie mit 5 Foxhunden wurde von Bornstein et al. durchgeführt, um die Knochenapposition um SLA- und modSLA-Implantate zu beurteilen. Neben histologischen Beobachtungen wurde histomorphometrisch der BIC nach 2 und 4 Wochen bestimmt. Wiederum wurde in Gegenwart der modSLA-Oberflächen nach 2 Wochen signifikant mehr Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat festgestellt. Der Unterschied relativierte sich erneut nach 4 Wochen. Außerdem wurde wie in dieser Untersuchung beobachtet, dass die neue Mineralisation sich primär vom ortsständigen Knochen ausgehend und in direkter Nachbarschaft zu kleinen Blutgefäßen zeigte. Sekundär etablierte sich der Knochen entlang der Implantatoberfläche (Bornstein et al. 2008).

Lai et al. untersuchten in einem radiären Defektmodell am Beagle-Hund ebenfalls SLA- und modSLA-Implantate. Der zu überbrückende Spaltraum variierte zwischen 0,5 und 1 mm. Nach 2 und 4 Wochen waren die modSLA-Implantate signifikant besser eingeeilt. Nach 8 Wochen lag wie bereits mehrfach beschrieben keine Signifikanz mehr vor (Lai et al. 2009).

Im Allgemeinen ist der Umfang der knöchernen Regeneration an den SLA-Implantaten aber vergleichbar mit beschriebenen Ergebnissen von unbehandelten Kontrolldefekten in der Literatur. Auch dort waren im Falle der knöchernen Exposition von Implantatwindungen diese meist nur von locker anliegendem Bindegewebe bedeckt. BIC und NBH waren in diesen Fällen nur marginal verändert (Dahlin et al. 1989; Becker et al. 1990; Oh et al. 2003).

Die Beobachtung, dass submukosal eingeeilte modSLA-Implantate eine knöcherne Regeneration bukkaler Dehiszenzdefekte ohne Anwendung von GBR-Verfahren fördern, stimmt mit einigen Ergebnissen einer präklinischen tierexperimentellen Pilotstudie im Beagle überein (Schwarz et al. 2007a). Im Einzelnen war die Wundheilung an den SLA-Implantaten überwiegend durch die Ausbildung eines dichten Bindegewebes nach 2 und 12 Wochen

charakterisiert. Es wurden keine signifikanten Veränderungen der Werte für NBH, PLF, BIC-D oder BF festgestellt. Im Gegensatz dazu waren nach 12 Wochen die Defekte an den modSLA Implantaten nahezu vollständig regeneriert. Nach 2 und 12 Wochen zeigten die Ergebnisse für die SLA-Oberflächen signifikant schlechtere Werte für NBH (0 mm; 0.3 – 0.4 mm), PLF (0%; 7 – 10%), BIC-D (0%; 4 – 5%), BF (0 mm<sup>2</sup>; 0.07 – 0.08 mm<sup>2</sup>), and D-CBI (3.1 – 3.4 mm; 3.8 – 4.3 mm) als im Vergleich die modSLA-Implantate [NBH (1.1 – 2.6 mm; 3.3 – 3.2 mm), PLF (34 – 80%; 97 – 98%), BIC-D (27 – 61%; 80 – 85%), BF (0.4 – 1.8 mm<sup>2</sup>; 2.3 – 2.4 mm<sup>2</sup>), und D-CBI (0.6 – 2.1 mm; 0.1 – 0.2 mm)]. Allerdings sind die beschriebenen Ergebnisse für BF in beiden Gruppen niedriger als in den submukosal einheilenden Gruppen der hier vorgestellten Untersuchung. Jedoch muss in dem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass möglicherweise die Unterschiede auf eine geringere Anzahl (n=4) differierende Einheilzeiträume und ein höheres Alter (20-24 Monate) der Tiere zurückzuführen sind. Außerdem lag eine geringere Defekthöhe von nur 3 mm vor (Schwarz et al. 2007a).

Ein ähnliches Heilungsmuster und Potential der Knochenregeneration wurde für modSLA-Implantate unter Verwendung von unterschiedlichen Membranen und/oder in Kombination mit unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien beobachtet (Schwarz et al. 2007c, 2007e). Erneut wiesen diese Studien die bereits beschriebene Abfolge der Regeneration auf: Blutgefäße, erste Mineralisation, Geflechtknochen. Diese verlief vom knöchernen Defektboden in coronaler Richtung entlang der modSLA-Oberfläche. Nach 12 Wochen der Wundheilung variierte der Zuwachs an Knochenfläche im akuten Dehiszenzdefekt zwischen  $1.2 \pm 0.3 \text{ mm}^2$  (Kontrollgruppe: natürliches Knochenmineral – BDX) und  $3.7 \pm 0.9 \text{ mm}^2$  (BDX + quervernetzte Kollagenmembran) (Schwarz et al. 2007e).

Unter Berücksichtigung dieser Daten und in Kombination mit denen in der vorliegenden Studie gewonnenen Erkenntnissen scheint es, als ob die modSLA-Oberfläche die knöcherne Regeneration von akuten bukkalen Dehiszenzdefekten fördert. Das Regenerationspotential scheint vergleichbar,

wenn nicht sogar größer zu sein, als unter Verwendung von GBR-Verfahren mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien und Membranen.

Bereits publizierte Untersuchungen haben gezeigt, dass das Auffüllen von Defekträumen mittels nicht oder nur langsam resorbierbaren Knochenerstzmaterialien die Knochenneubildung behindern oder verlangsamen kann (Trombelli et al. 1999; Stavropoulos et al. 2001).

So wurde auch festgestellt, dass die klassischen Anforderungen an GBR/GTR Verfahren kritisch zu bewerten sind. Die einst geforderte Zellokklusivität von Barrieremembranen konnten anhand von makroporösen experimentellen Membranen widerlegt werden, da durch deren Einsatz eine vergleichbare knöcherne Regeneration im Defektbereich erzielt wurde (Wikesjö et al. 2003).

Letztendlich sollte beim Versuch der Interpretation und ggf. der Übertragung der gewonnen Erkenntnisse auf den klinischen Alltag aber immer berücksichtigt werden, dass es sich hier um eine präklinische Tierstudie im Beagle-Hund handelt. Bekanntermaßen liegt die Turnover-Rate bezüglich der knöchernen Regeneration beim Hund ungefähr viermal höher als die beim Menschen (Draper 1994).

Außerdem spielt es eine maßgebliche Rolle, ob die zu regenerierenden Defekte chronisch oder akut sind.

Desweiteren spiegelt die in dieser Untersuchung gewählte Defektmorphologie nicht wirklich die klinische Situation wieder. Hier handelte es sich um relativ großflächige, 3-wandig begrenzte Defekte mit weit eröffneten Markräumen. Die typischen knöchernen Dehiszenzen am Patienten resultieren meist aus einer physiologischen Atrophie der vestibulären Knochenlamelle nach Zahnextraktion, (Araujo et al. 2005) und einer daraus entstehenden nach bukkal abfallenden Fläche des Alveolarfortsatzes. Somit ist der Defekt oft kaum wandig begrenzt und eigentlich immer mit kortikaler Knochenstruktur, ohne eröffnete Markräume, gekennzeichnet. Deshalb therapiert man klinisch meist solche Dehiszenzen mittels lateraler Augmentation unter Verwendung von GBR-Verfahren.

Insofern bedarf es weiterer Untersuchungen mit mehr an die klinische Situation angepassten bzw. chronischen Defekten, um bei Implantatinsertion knöchern exponierte Implantatwindungen nicht zu augmentieren und sich selbst der Regeneration zu überlassen.

Trotzdem spiegeln sich einige Erkenntnisse der beschriebenen Tierversuche in klinischen Untersuchungen wieder.

So wurde die beschleunigte Osseointegration der hydrophilen Oberfläche in einer klinisch kontrollierten Studie an 31 Patienten mittels Resonanz-Frequenz-Analyse bestätigt. Jeder Patient erhielt jeweils ein Implantat mit SLA- und modSLA-Oberflächeneigenschaften. Anschließend wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen die Stabilität bestimmt. Alle Implantate heilten komplikationslos ein. In der modSLA-Gruppe war ein Wechsel von sinkender zu ansteigender Stabilität bereits nach 2 Wochen zu verzeichnen, während an den SLA-Implantaten dies erst nach 4 Wochen zu beobachten war. Dieser Unterschied lag mit einem Signifikanzniveau von  $P > 0,01$  vor (Oates et al. 2007).

In einer aktuellen klinischen Multi-Center-Studie wurde untersucht, inwieweit modSLA-Implantate geeignet sind, sofort bzw. früh, d. h. nach einer Einheitszeit von 28 bis 34 Tagen, prothetisch versorgt zu werden: primär durch ein ausser Okklusion geschliffenes Provisorium und definitiv nach 20 bis 23 Wochen durch festsitzenden Zahnersatz. Es nahmen 19 Kliniken aus insgesamt 10 verschiedenen Ländern an dieser Untersuchung teil. Die Patienteneinschlusskriterien waren: älter als 18 Jahre, mindestens einen fehlenden Seitenzahn (länger als 4 Monate), ausreichendes Knochenangebot und -qualität und einen natürlichen Zahn bzw. festsitzenden Zahnersatz als Antagonisten. Ausschlusskriterien waren: Einnahme von Antibiotika bzw. Steroiden, HIV-Infektion, Alkohol- bzw. Drogenabusus, Niereninsuffizienz, Hormonfunktionsstörung, Zigarettenkonsum (>10 pro Tag), Kautabakkonsum, intraorale Infektionen, Gingivitiden oder Knochenstoffwechselfunktionsstörungen. Die Behandler wiesen alle 10 bis 25 Jahre klinische

Erfahrung auf. Die Auswertungskriterien waren neben dem klinischen Erfolg der durch standardisierte radiologische Zahnfilmaufnahmen evaluierte Verlauf des Knochenniveaus. Insgesamt wurden 266 Patienten mit 383 Implantaten in die Studie inkludiert. Davon wurden 197 sofort und 186 Implantate früh prothetisch versorgt. Am Tag der definitiven prothetischen Versorgung, ca. 5 Monate nach Implantatinsertion bzw. provisorischer prothetischer Versorgung, waren 10 Implantate verloren gegangen: 4 Implantate aus der sofort versorgten und 6 Implantate aus der früh versorgten Gruppe. Diese Ergebnisse stellen eine Erfolgsquote von 98 % bzw. 97 % dar. Die Veränderung des Knochenniveaus betrug in der Sofort-Gruppe  $0,82 \text{ mm} \pm 0,89$  und  $0,56 \text{ mm} \pm 0,73$  in der Früh-Gruppe. Der Durchschnitt lag bei  $0,70 \text{ mm} \pm 0,83$ . Diese Ergebnisse sind absolut vergleichbar mit denen bei konventionellen und längeren Einheilzeiten.

Deshalb sprachen die Autoren den modSLA-Implantaten eine Eignung für die sofortige bzw. frühe prothetische Versorgung zu (Zöllner et al. 2008).

In einer weiteren Publikation der Ergebnisse dieser Untersuchung über einen Zeitraum von 12 Monaten wurden die positiven 5-Monatsergebnisse bestätigt. Es ging kein weiteres Implantat verloren und die Veränderung des Knochenniveaus war unerheblich. In der sofort versorgten Gruppe  $0,90 \text{ mm} \pm 0,90$  und  $0,63 \text{ mm} \pm 0,95$  in der frühen Gruppe. Auf Grund der vergleichbaren Ergebnisse mit konventionellen Therapieverfahren (Einheilzeiten von bis zu 6 Monaten) sahen die Autoren wiederum die modSLA-Implantate als absolut geeignet für diese Art der verkürzten Behandlungsdauer an (Ganeles et al. 2008).

Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die knöcherne Regeneration von akuten bukkalen Dehiszenzdefekten im Beagle-Hund primär von der Hydrophilizität und desweiteren von der Art der Einheilung beeinflusst wird. Dabei zeigte sich, dass ein submukosales Einheilverfahren förderlich für die Regeneration ist. So wurden die Defekte an den modSLA-Implantaten und besonders bei submukosaler Einheilung nahezu vollständig überbrückt (Schwarz et al. 2008).

Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. (1999)

An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 20: 211–220

Albrektsson T. (1983)

Direct bone anchorage of dental implants. *J Prosthet Dent* 50: 255–261

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. (1981)

Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 52: 155-70

Araujo MG, Lindhe J. (2005)

Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 32:212-8

Astrand P, Ahlqvist J, Gunne J, Nilson H. (2008)

Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res.* 10: 207-17. Epub 2008 Apr 1

Awad MA, Locker D, Korner-Bitensky N, Feine JS. (2000)

Measuring the effect of intra-oral implant rehabilitation on health-related quality of life in a randomized controlled clinical trial. *Journal Dent Res.* 79: 1659-63.

Awad MA, Lund JP, Dufresne E, Feine JS. (2003)

Comparing the efficacy of mandibular implant-retained overdentures and conventional dentures among middle-aged edentulous patients: satisfaction and functional assessment. *Int J Prosthodont.* 16: 117-22

Becker W, Becker BE, Handlesman M, Celletti R, Ochsenbein C, Hardwick R, Langer B. (1990)

Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 10: 92-101.

Behneke A, Behneke N, d'Hoedt B, Wagner W.(1997)

Hard and soft tissue reactions to ITI screw implants: 3-year longitudinal results of a prospective study, *Int Journal Oral Maxillofac Implants* 12: 749-57

Bornstein M, Valderrama P, Jones A, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. (2008)

Bone apposition around two different sand-blasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res.* 19: 233-41

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. (1992)

Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 302–310

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. (1969)

Intra-osseous anchorage of dental prostheses. Experimental studies.

Scand Journal Plast Reconstr Surg 3: 81-100

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. (2004)

Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res 83: 529–533

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. (1991)

Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res 25: 889–902

Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum AW. (2002)

Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. Journal of Periodontology 73: 789-796.

Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. (2006)

Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. Clinical Oral Implants Research 17: 136-159

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. (1988)

Healing of bone defects by guided tissue regeneration. Plastic and Reconstructive Surgery 81: 672-676.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. (1989)

Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 4: 19-25.

Davies JE. (1998)

Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11: 391–401

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Chipman ML, Valiquette N. (1990)

A histological comparison in the dog of porous-coated vs. threaded dental implants. *J Dent Res* 69: 1138–1145

Donath K. (1985)

The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Säge-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pathology Research and Practice* 179: 631-633.

Draper HH (1994)

Bone loss in animals. *Advances in Nutritional Research*, Vol. 9, pp 53-71  
New York: Plenum Press

Ferguson SJ, Brogini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Buser D. (2006)

Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *Journal of Biomedical Materials Research A* 78: 291-297.

Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. (1980)

Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *New England Journal of Medicine* 302: 1460-1466.

Ganeles J, Zöllner A, Jackowski J, ten Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F. (2008)

Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clin Oral Implants Res.* 19: 1119-28.

Gotfredsen K, Nimb L, Hjørting-Hansen E, Jensen JS, Holmén A. (1992)

Histomorphometric and removal torque analysis for TiO<sub>2</sub>-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Implants Res.* 3: 77-84.

Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, Alba RC Jr, Shibli JA. (2006)

Histological evaluation of early human bone response to different implant surfaces, *J Periodontol*, 77: 1736-43

Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. (1999)

Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *Faseb J* 13: 1787–1795

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. (1989)

Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 69: 990-1047.

Hopyan S, Gokgoz N, Bell RS, Andrulis IL, Alman BA, Wunder JS. (1999)

Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. *Journal of Orthopaedic Research* 17: 633-638.

Kasemo B, Lausmaa J. (1985)

Aspects of surface physics on titanium implants. *Swed Dent J Suppl* 28:  
19–36

Knöfler W, Knöfler A, Graf HL. (2004)

Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Implantaten in einer zahnärztlichen  
Praxis im Zeitraum von zehn Jahren. *Journal of Dental Implantology*. 4:  
230-246

Lai CH, Zhuang LF, Zhang ZY, Wieland M, Liu X. (2009)

Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-  
etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an  
experimental study in dogs. *Clin. Oral Impl. Res.* 20 : 247-253

Larsson C, Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B,  
Ericson LE. (1996)

Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early  
tissue response to machined and electropolished implants with different  
oxide thicknesses. *Biomaterials* 17: 605–616

Larsson C, Thomsen P, Lausmaa J, Rodahl M, Kasemo B, Ericson LE. (1994)

Bone response to surface modified titanium implants: studies on  
electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology.  
*Biomaterials* 15: 1062–1074

Liu HM, Wang DL, Liu CY. (1990)

Interactions between fibrin, collagen and endothelial cells in angiogenesis.  
*Advances in Experimental Medicine and Biology* 281: 319-331.

Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. (1995)

Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *Journal of Clinical Investigation* 95: 881-887.

Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. (1996)

Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res.* 8: 82-9.

Mayfield L, Skoglund A, Nobreus N, Attstrom R. (1998)

Clinical and radiographic evaluation, following delivery of fixed reconstructions, at GBR treated titanium fixtures. *Clinical Oral Implants Research* 9: 292-302.

Misch CE, Misch-Dietsh F, Silc J, Barboza E, Cianciola LJ, Kazor C. (2008)

Posterior implant single-tooth replacement and status of adjacent teeth during a 10-year period: a retrospective report. *J Periodontol.* 79: 2378-82.

Oates TW, Valderrama P, Bischof M, Nedir R, Jones A, Simpson J, Toutenburg H, Cochran DL. (2007)

Enhanced implant stability with a chemically modified SLA surface: a randomized pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 22: 755-60.

Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. (2003)

Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clinical Oral Implants Research* 14: 80-90.

Park SH, Lee KW, Oh TJ, Misch CE, Shotwell J, Wang HL. (2008)

Effect of absorbable membranes on sandwich bone augmentation. Clin Oral Implants Res. 19: 32-41.

Pihlström BL, McHugh RB, Oliphant TH, Ortiz-Campos C. (1983)

Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. Journal of Clinical Periodontology 10: 524-541

Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Calabrese L. (1996)

Direct bone formation on sand-blasted titanium implants: an experimental study. Biomaterials 17: 1015–1018

Ratner BD, Porter SC. (1996)

Surfaces in biology and biomaterials; description and characterization. Interfacial phenomena and bioproducts. Brash JLW, editor. New York: Marcel Dekker, 57-83

Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC. (1999)

Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. Genomics 60: 210-217.

Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighton CT. (1998)

Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. Clinical Orthopaedics and Related Research 346: 95-103.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. (1996)

Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 312-324.

Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. (2006)

Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research A* 76: 323-334.

Schenk RK, Olah AJ, Herrmann W. (1984)

Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson, G. R. (ed.) *Methods of Calcified Tissue Preparation*, pp.1–56. Amsterdam: Elsevier.

Schwartz Z, Boyan BD. (1994)

Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 56: 340–347

Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. (2007a)

Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 34: 78-86.

Schwarz F, Ferrari D, Herten M, Mihatovic I, Wieland M, Sager M, Becker J. (2007b)

Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at nonsubmerged titanium implants. An immunohistochemical study in dogs. *Journal of Periodontology* 78: 2171-

84.

Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Schmitz L, Becker J. (2007c)

Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using a biphasic hydroxyapatite/ beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen coated natural bone mineral (BioOss® Collagen). An immunohistochemical study in dogs. International Journal of Oral and Maxillofac Surg. 36: 1198-206.

Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. (2007d)

Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA((R)) titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. Clinical Oral Implants Research 18: 481-488.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Ferrari D, Becker J. (2007e)

Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at dehiscence-type defect using different barrier membranes. An experimental study in dogs. Clinical Oral Implants Research 19: 402-15.

Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Herten M, Wieland M, Becker J. (2008)

Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. Journal of Clinical Periodontology 35: 64 – 75.

Stavropoulos A, Kostopoulos L, Mardas N, Nyengaard JR, Karring T. (2001)

Deproteinized bovine bone used as an adjunct to guided bone

augmentation: an experimental study in the rat. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 3: 156-165.

Tang CB, Ma JM, Tong X, Ding C, Li L. (2007)

A clinical evaluation of implant dentures over 10 years. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 16: 470-4.

Trombelli L, Lee MB, Promsudthi A, Guglielmoni PG, Wikesjö UM. (1999)

Periodontal repair in dogs: histologic observations of guided tissue regeneration with a prostaglandin E1 analog/methacrylate composite. *Journal of Clinical Periodontology* 26: 381-387.

Vörös J, Wieland M, Ruiz-Taylor L, Textor M, Brunette DM. (2001)

Characterization of titanium surfaces. In: *Titanium in medicine*. Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. Berlin: Springer 87-144

Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. (1995)

A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*. 6: 24-30

Wikesjö UME, Lim WH, Thomson RC, Hardwick WR. (2003)

Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for guided tissue regeneration? *J Clin Periodontol* 2003; 30: 655-664

Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. (1995)

Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 29: 1567–1575

Zablotsky M, Meffert R, Caudill R, Evans G. (1991)

Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehiscenced hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 6: 294-303.

Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. (2005)

High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research A* 74: 49-58.

Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD. (2007)

Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials* 28: 2821-2829.

Zöllner A, Ganeles J, Korostoff J, Guerra F, Krafft T, Brägger U. (2008)

Immediate and early non-occlusal loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: interim results from a prospective multicenter randomized-controlled study. *Clin Oral Implants Res.* 19: 442-50

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Verhaltens von Wasser in Gegenwart der hydrophoben SLA- und hydrophilen modSLA- bzw. SLActive-Oberflächen	11
Abbildung 2a:	Darstellung der Benetzbarkeit mit Wasser von hydrophoben SLA- (rechts) und hydrophilen modSLA- bzw. SLActive-Implantaten (links).	11
Abbildung 2b:	Klinisches Bild der Benetzbarkeit während der Insertion eines SLA- (links) und eines modSLA-Implantates (rechts)	12
Abbildung 3:	Standard Plus Implantat, regular neck, Straumann AG	13
Abbildung 4:	Röntgenologische Darstellung der Anatomie eines vollbezahnten Beagelunterkiefer	15
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des Dehiszenzdefektes und der oro- vestibulären Schnittrichtung	16
Abbildung 6a-d:	Operatives Vorgehen	18
Abbildung 7:	Darstellung der zu bestimmenden Punkte (BTB, BD, CBI-b/-o) an einer repräsentativen Histologie (modSLA, 2 Wochen, Unterkiefer, submukosale Einheilung, TB-Färbung, 25 fache Vergrößerung	24
Abbildung 8:	<b>modSLA</b> , 1 Woche, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 400fache Vergrößerung	31
Abbildung 9:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	32
Abbildung 10:	<b>SLA</b> , 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	32
Abbildung 11:	<b>modSLA</b> , 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	33
Abbildung 12:	<b>SLA</b> , 1 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt,	

	Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	35
Abbildung 13:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	36
Abbildung 14:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	36
Abbildung 15:	<b>SLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	37
Abbildung 16:	<b>SLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	37
Abbildung 17:	<b>modSLA</b> , 8 Wochen, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	39
Abbildung 18:	<b>modSLA</b> , 1 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	41
Abbildung 19:	<b>modSLA</b> , 4 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	42
Abbildung 20:	<b>SLA</b> , 4 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	42
Abbildung 21:	<b>modSLA</b> , 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	43
Abbildung 22:	<b>SLA</b> , 8 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	44
Abbildung 23:	<b>SLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	46
Abbildung 24:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	47

Abbildung 25:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	47
Abbildung 26:	<b>modSLA</b> , 4 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	48
Abbildung 27:	<b>SLA</b> , 4 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	49
Abbildung 28:	<b>modSLA</b> , 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, lateraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	50
Abbildung 29:	<b>modSLA</b> , 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	50
Abbildung 30:	<b>SLA</b> , 8 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Toluidin-blau, 25fache Vergrößerung	51
Abbildung 31:	<b>modSLA</b> , 1 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung	52
Abbildung 32:	<b>modSLA</b> , 1 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung	53
Abbildung 33:	<b>modSLA</b> , 1 Wochen, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Masson-Goldner, 100fache Vergrößerung	54
Abbildung 34:	<b>SLA</b> , 1 Woche, submukosale Einheilung, Oberkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie - Osteocalcin, 400fache Vergrößerung	55
Abbildung 35:	<b>modSLA</b> , 1 Woche, submukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Transglutaminase II, 400fache Vergrößerung	56
Abbildung 36:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt, Immunhistochemie – Transglutaminase II, 200fache Vergrößerung	58
Abbildung 37:	<b>modSLA</b> , 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,	

Immunhistochemie – Osteocalcin, 200fache Vergrößerung 59

Abbildung 38: **SLA**, 2 Wochen, transmukosale Einheilung, Unterkiefer, zentraler Aspekt,

Immunhistochemie – Osteocalcin, 100fache Vergrößerung 60

## **8 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Transmukosale Einheilung im Oberkiefer	30
Tabelle 2: Submukosale Einheilung im Oberkiefer	34
Tabelle 3: Transmukosale Einheilung im Unterkiefer	40
Tabelle 4: Submukosale Einheilung im Unterkiefer	45

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die knöchernen Regeneration von Dehiszenzdefekten an sub- und transmukosal einheilenden chemisch modifizierten (mod) und konventionellen SLA-Titanimplantaten (SLA) zu untersuchen.

Hierzu wurden akute standardisierte vestibuläre Dehiszenzdefekte nach der Implantatbettpräparation sowohl im Ober- als auch im Unterkiefer bei 12 Beagle-Hunden osteotomiert. Beide Implantattypen wurden randomisiert entweder zur sub- oder transmukosalen Einheilung inseriert. Nach einer Einheilungszeit von 1, 2, 4, und 8 Wochen wurden die Tiere getötet, die entsprechenden Kieferblöcke entnommen und hartgewebshistologisch aufbereitet. Histomorphometrisch wurde die neue Knochenhöhe (NBH), die prozentuale Defektauffüllung (PLF), der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC-D) und die Fläche des neu gebildeten Knochens (BF) innerhalb der Defekte bestimmt. Zudem wurde immunhistochemisch die Knochenregeneration untersucht.

Wie sich nach 8 Wochen zeigte, waren sowohl bei den sub- als auch bei den transmukosal eingeheilten SLA-Implantaten signifikant geringere Werte für NBH ( $1,1 \pm 0,8 - 1,9 \pm 1,2\text{mm}$ ), PLF ( $27,7 \pm 20,3 - 46,0 \pm 28,5\%$ ), BIC-D ( $26,8 \pm 10,4 - 46,2 \pm 16,2\%$ ) und BF ( $1,3 \pm 0,9 - 3,4 \pm 2,8\text{mm}^2$ ) als im Vergleich bei den modSLA-Implantaten NBH ( $2,6 \pm 0,8 - 4,3 \pm 0,1\text{mm}$ ), PLF ( $64,2 \pm 19,4 - 107,2 \pm 4,7\%$ ), BIC-D ( $67,5 \pm 18,8 - 82,1 \pm 14,8\%$ ) und BF ( $2,9 \pm 1,0 - 6,7 \pm 1,1\text{mm}^2$ ) zu finden. Die signifikant höchsten Werte für BF wurden an den modSLA-Implantaten mit submukosaler Einheilung gemessen.

Schlussfolgernd wurde festgestellt, dass modSLA-strukturierte Titanimplantate die knöchernen Regeneration in akuten Dehiszenzdefekten fördern und dass eine submukosale Einheilung die Regeneration positiv beeinflusst.

## 10 Summary

The aim of the present study was to evaluate bone regeneration in acute dehiscence-type defects at nonsubmerged and submerged titanium implants with chemically modified (mod) and conventional sandblasted and acid-etched (SLA) surfaces.

Therefore standardized buccal dehiscence defects were surgically created following implant site preparation in both upper and lower jaws of twelve beagle dogs. Both types of implants were randomly assigned to either a nonsubmerged or submerged healing procedure. After 1, 2, 4, and 8 weeks, dissected blocks were processed for histomorphometrical and immunohistochemical analysis. Histomorphometrical the new bone height (NBH), the percent linear fill (PLF), the percent of bone to implant contact (BIC-D) and the area of new bone fill (BF) were evaluated.

Concerning the results at 8 weeks, nonsubmerged and submerged SLA implants revealed significantly lower mean NBH ( $1.1\pm 0.8\text{mm}$  to  $1.9\pm 1.2\text{mm}$ ), PLF ( $27.7\pm 20.3\%$  to  $46.0\pm 28.5\%$ ), BIC-D ( $26.8\pm 10.4\%$  to  $46.2\pm 16.2\%$ ), and BF ( $1.3\pm 0.9\text{mm}^2$  to  $3.4\pm 2.8\text{mm}^2$ ) values than respective modSLA implants (NBH ( $2.6\pm 0.8\text{mm}$  to  $4.3\pm 0.1\text{mm}$ ), PLF ( $64.2\pm 19.4\%$  to  $107.2\pm 4.7\%$ ), BIC-D ( $67.5\pm 18.8\%$  to  $82.1\pm 14.8\%$ ), BF ( $2.9\pm 1.0\text{mm}^2$  to  $6.7\pm 1.1\text{mm}^2$ )). Within modSLA groups, significantly highest BF values were observed at submerged implants.

It was concluded that modSLA titanium surfaces promoted bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects, and a submerged healing procedure improved the outcome of healing additionally.

## 11 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Oberarzt PD Dr. Frank Schwarz, der in vielerlei Hinsicht auch für mich ein Vorbild darstellt. Ihm habe ich meine praktische und wissenschaftliche Ausbildung einschließlich des Referierens vor Publikum zu verdanken. Nicht zuletzt dank seiner Unterstützung und Geduld wurde diese Arbeit letztendlich fertiggestellt.

Desweiteren bedanke ich mich natürlich bei meinem Chef Prof. Dr. Jürgen Becker für die Überlassung des Themas und die praktische Ausbildung.

Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Freund, Dr. Dr. Daniel Rothamel, für jegliche Hilfestellung in unserer gemeinsamen Zeit an der HHU bedanken.

Und natürlich danke ich den anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Frau Hartig, Frau Dr. Herten und Herrn Golubovic für die jahrelange Unterstützung bei den Tierexperimenten, und der histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung der Proben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Dr. Sager und Frau Schrey, Mitarbeiter der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf für die Unterstützung bei den wissenschaftlichen Arbeiten.

Daniel Ferrari

Geburtstag	19. Februar 1980, Koblenz
Nationalität	deutsch
Eltern	Dr. med. dent. Barbara Ferrari, Kieferorthopädin; Wolfgang Ferrari, Oberstudienrat
Geschwister	Oliver Ferrari, Lehrer
1986 - 1990	Konrad-Adenauer-Grundschule, Vallendar
1990 - 1999	Wilhelm-Remy-Gymnasium, Bendorf
2000 - 2001	Zivildienst, Ökumenische Sozialstation Bendorf-Vallendar
2001 - 2006	Zahnmedizinstudium, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
Mai 2006	Staatsexamen im Fach Zahnmedizin
Juni 2006	Approbation als Zahnarzt
seit Aug. 06	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme, Dir.: Prof. Dr. J. Becker, Heinrich- Heine-Universität, Düsseldorf
seit Okt. 08	MSc-Studiengang der Kieferorthopädie an der Donau Universität Krems

Der Vollständigkeit halber ist im Folgenden die Publikation dieser Arbeit beigefügt. Sie hat massgeblichen Anteil an dieser Dissertation.

Journal of Clinical Periodontology (2008; 35: 64 – 75)

Schwarz F., Sager M., Ferrari D., Herten M., Wieland M., Becker J.

Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs.

# Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive<sup>®</sup>) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs

Frank Schwarz<sup>1</sup>, Martin Sager<sup>2</sup>, Daniel Ferrari<sup>1</sup>, Monika Hertel<sup>1</sup>, Marco Wieland<sup>3</sup> and Jürgen Becker<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Surgery; <sup>2</sup>Animal Research Institute, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany; <sup>3</sup>Institut Straumann AG, Basel, Switzerland

Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Hertel M, Wieland M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive<sup>®</sup>) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. J Clin Periodontol 2008; 35: 64–75. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01159.x.

## Abstract

**Objectives:** The aim of the present study was to evaluate bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged titanium implants with chemically modified (mod) and conventional sandblasted/acid-etched (SLA) surfaces.

**Material and Methods:** Standardized buccal dehiscence defects were surgically created following implant site preparation in both the upper and lower jaws of 12 beagle dogs. Both types of implants were randomly assigned to either a non-submerged or a submerged healing procedure. After 1, 2, 4, and 8 weeks, dissected blocks were processed for histomorphometrical [e.g. new bone height (NBH), per cent linear fill (PLF), percentage of bone to implant contact (BIC-D), area of new bone fill (BF)] and immunohistochemical analysis.

**Results:** At 8 weeks, non-submerged and submerged SLA implants revealed significantly lower mean NBH ( $1.1 \pm 0.8$ – $1.9 \pm 1.2$  mm), PLF ( $27.7 \pm 20.3$ – $46.0 \pm 28.5\%$ ), BIC-D ( $26.8 \pm 10.4$ – $46.2 \pm 16.2\%$ ), and BF ( $1.3 \pm 0.9$ – $3.4 \pm 2.8$  mm<sup>2</sup>) values than respective modSLA implants [NBH ( $2.6 \pm 0.8$ – $4.3 \pm 0.1$  mm), PLF ( $64.2 \pm 19.4$ – $107.2 \pm 4.7\%$ ), BIC-D ( $67.5 \pm 18.8$ – $82.1 \pm 14.8\%$ ), BF ( $2.9 \pm 1.0$ – $6.7 \pm 1.1$  mm<sup>2</sup>)]. Within modSLA groups, significantly highest BF values were observed at submerged implants.

**Conclusion:** It was concluded that (i) modSLA titanium surfaces promoted bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects and (ii) a submerged healing procedure improved the outcome of healing additionally.

Key words: animal study; bone regeneration; dehiscence-type defect; hydrophilic titanium surface; immunohistochemistry

Accepted for publication 5 October 2007

**Conflict of interest and source of funding statement**

Frank Schwarz, Martin Sager, Daniel Ferrari, Monika Hertel and Jürgen Becker declare that they have no conflict of interests. Dr. Wieland is an employee of Institute Straumann AG, the manufacturer of the tested implant systems.

This study was funded by a grant (454-2006) of the ITI Foundation, an independent non-profit organization financially supported by Institute Straumann AG, Basel, Switzerland. The study materials were kindly provided by Institut Straumann AG.

Nowadays, there is considerable evidence supporting the view that the technique of guided bone regeneration (GBR) may also predictably support bone augmentation at dehiscenced dental implants (Becker et al. 1990, Mayfield et al. 1998, Oh et al. 2003). The basic concept originally described for GBR involves the placement of a barrier membrane to protect the blood clot and create a secluded space around the bone defect, thus enabling access for bone-forming cells without competition from other tissues (Dahlin et al. 1988). Because osteogenic cells have also been observed to arise from pericytes adjacent to small blood vessels in connective tissue, it was hypothesized that early vascularization of the wound area may also play a crucial role in GBR (Long et al. 1995, Rickard et al. 1996, Reilly et al. 1998). Indeed, the results from a recent animal study have indicated that barrier membranes supporting an early transmembrane angiogenesis exhibited an enhanced bone regeneration in a peripheral compartment of dehiscence-type defects (Schwarz et al. 2007e). Recently, the specific surface properties noted for a chemically modified sandblasted, large grit, and acid-etched (modSLA) titanium surface have also been shown to enhance angiogenesis during very early stages of osseointegration (Schwarz et al. 2007a, d). In particular, it was observed that within 24 h the stabilized blood clot adjacent to hydroxylated/hydrated modSLA surfaces was organized by proliferating blood vessels, and homogeneously substituted by a well-organized collagen-rich connective tissue at day 4. In contrast, conventional SLA surfaces revealed a partial collapse of the blood clot at day 1, resulting in a delayed vascularization and mainly formation

of an undifferentiated granulation tissue (Schwarz et al. 2007a, d). Accordingly, modSLA surfaces exhibited a significantly higher mean percentage of bone to implant contact (BIC) as compared with conventional SLA surfaces at 7, 14, and 28 days of both non-submerged and submerged healing (Buser et al. 2004, Bornstein et al. 2007, Schwarz et al. 2007a, d). These observations might be explained by the higher surface free energy and increased wettability (initial advancing water contact angle of 0°) of hydrophilic modSLA surfaces (Rupp et al. 2006). The specific production process used for modSLA surfaces (i.e. rinsing the titanium surface after the etching process under N<sub>2</sub> protection and continuous storage in an isotonic NaCl solution) has been reported to retain the high surface energy of the uncontaminated TiO<sub>2</sub> surface by preventing the adsorption of potential contaminants from the atmosphere (e.g. hydrocarbons and carbonates) (Zhao et al. 2005). Recent studies have shown that osteoblasts grown on modSLA surfaces exhibited a more differentiated phenotype characterized by increased alkaline phosphatase activity and osteocalcin (OC) and generated an osteogenic microenvironment through higher production of PGE<sub>2</sub> and TGF-β<sub>1</sub> (Zhao et al. 2005, 2007). Based on these findings, it was hypothesized that the hydrophilic surface properties noted for modSLA implants might also support bone formation at deficient jaw bone sites. Indeed, most recent histological data have demonstrated that modSLA titanium surfaces promoted bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects at submerged implants without the additional use of GBR. In contrast, wound healing at SLA implants was predominantly characterized by the formation of a dense connective tissue, without any signs of bone regeneration (Schwarz et al. 2007c). So far, however, it remains unknown to what extent a submerged healing procedure might have prevented a collapse of the mucoperiosteal flap into the defect area and subsequently influenced bone regeneration.

Therefore, the aim of the present study was to immunohistochemically evaluate bone regeneration in dehiscence-type defects at either non-submerged or submerged modSLA and SLA titanium implants in a dog model.

**Material and Methods****Animals**

Twelve beagle dogs (age 12–15 months, mean weight 10.6 ± 1.2 kg) were used in the study. All animals exhibited a fully erupted permanent dentition. During the experiment, the dogs were fed once per day with soft-food diet and water. Animal selection, management, and surgery protocol were approved by the Animal Care and Use Committee of the Heinrich Heine University and the Bezirksregierung Düsseldorf. The experimental segment of the study started after an adaption period of 4 weeks.

**Study design**

The study was performed in two surgical phases. In the first phase, extraction of the mandibular and maxillary second, third, fourth pre-molar as well as the first and second molar (P2–M2) was performed bilaterally in all dogs. After 3 months of healing, standardized buccal dehiscence defects were surgically created following implant site preparation in both the upper ( $n = 8$  defects per animal) and the lower jaws ( $n = 8$  defects per animal). Subsequently, a total of two modSLA and two SLA implants were randomly placed in each quadrant of both the upper and lower jaws. According to a split-mouth design, the quadrants were randomly allocated to either a submerged or a non-submerged healing procedure (total  $n = 16$  implants per animal).

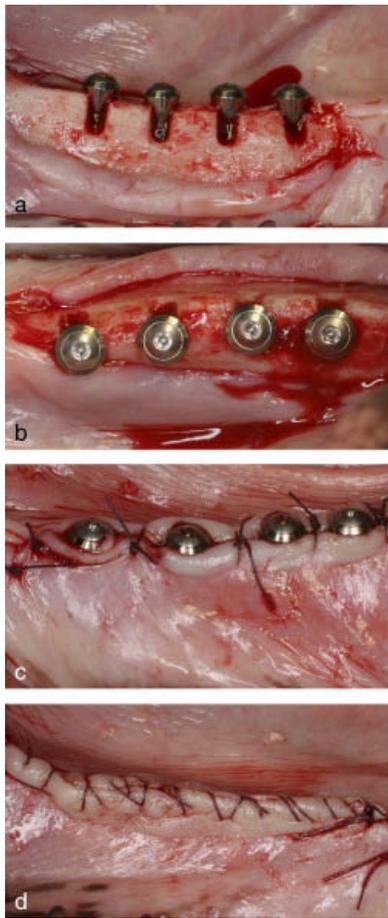
Randomization was based on a computer-generated list (RandList<sup>®</sup>, DatInf GmbH, Tübingen, Germany). The animals were sacrificed after 1, 2, 4, and 8 weeks of healing, including three animals each.

**Surgical procedure**

Following intra-muscular sedation with 0.17 mg/kg acepromazine (Vetranquil 1%, Ceva Tiergesundheits, Düsseldorf, Germany), anaesthesia was initiated using 21.5 mg/kg thiopental-sodium (Trapanal 2.5%, Altana GmbH, Konstanz, Germany). During all the surgical procedures, inhalation anaesthesia was performed using oxygen and nitrous oxide and isoflurane. To maintain hydration, all animals received a constant-rate infusion of lactated Ringer's solution while anaesthetized. Intra-operative analgesia was performed

by an intravenous injection of 0.4 mg/kg piritramid (Dipidor<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany) and 4.5 mg/kg carprofene (Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany). For post-operative treatment, piritramid and carprofene were applied subcutaneously for 3 days at the same dose as described above.

In the first surgery, P2–M2 were carefully removed bilaterally in both jaws after reflection of mucoperiosteal



**Fig. 1.** (a) Following implant site preparation, four standardized dehiscence-type defects, approximately 4 mm in height from the crestal bone, and 3 mm in width mesiodistally, were created in each quadrant of both upper and lower jaws. Both modSLA and SLA implants were inserted in a way so that the borderline between the transmucosal (1.8 mm) and bony part of the implant (BTB) coincided with the bone crest. (b) All defects revealed a depth of 3 mm, as measured from the surface of the buccal bone. The mucoperiosteal flaps were either repositioned, or advanced to allow for a non-submerged (c) or submerged (d) healing procedure, respectively. SLA, sandblasted/acid-etched; modSLA, modified SLA.

flaps and tooth separation. After wound closure by means of mattress sutures, the sites were allowed to heal for 3 months. Prophylactic administration of clindamycine (11.0 mg/kg body weight, Cleorobe<sup>®</sup>, Pharmacia Tiergesundheit, Erlangen, Germany) was performed intra- and post-operatively for 10 days.

In the second surgery, midcrestal incisions were made and full-thickness mucoperiosteal flaps were reflected to expose the respective sites for implant insertion in both the upper and lower jaws. Surgical implant sites were prepared bilaterally, at a distance 10 mm apart, using a low-trauma surgical technique under copious irrigation with sterile 0.9% physiological saline (surgery protocol by Institut Straumann AG, Basel, Switzerland).

Following implant site preparation, standardized dehiscence-type defects, approximately 4 mm in height from the crestal bone, 3 mm in depth from the surface of the buccal bone, and 3 mm in width mesiodistally, were created with a straight fissure carbide bur. The osteotomy procedures were performed under copious irrigation with sterile 0.9% physiological saline. The defect sizes were standardized using a periodontal probe (PCP12, Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA). Thereafter, both modSLA and SLA implants (Standard Plus, regular neck,  $\varnothing$  3.3 mm, length 8 mm, Institut

Straumann AG, Basel, Switzerland, commercial name of modSLA is SLActive<sup>®</sup>) were inserted with good primary stability (i.e. lack of clinical implant mobility) in such a way that the borderline between the transmucosal (1.8 mm) and the bony part of the implant (BTB) coincided with the bone crest (Fig. 1a and b). In case of SLA, the implants were thoroughly rinsed with sterile saline before insertion. Following irrigation, the mucoperiosteal flaps were either repositioned, or advanced to allow for either a non-submerged or a submerged healing procedure, respectively. In both groups, wound closure was achieved with resorbable 5.0 polyglycolic acid mattress sutures (Resorba<sup>®</sup>, Nürnberg, Germany) (Fig. 1c and d). All surgical procedures were performed by the same experienced operator.

#### Animal sacrifice and retrieval of specimens

The animals were killed (overdose of sodium pentobarbital 3%) after a healing period of 1, 2, 4, and 8 weeks including three animals each, respectively, and the oral tissues were fixed by perfusion with 10% buffered formalin administered through the carotid arteries. The jaws were dissected and blocks containing the experimental specimens were obtained. All specimens



**Fig. 2.** Landmarks for histomorphometrical analysis: borderline between the transmucosal and bony part of the implant (BTB), the bottom of the bone defect (BD), the most coronal level of bone in contact with the implant at both buccal and oral sites (CBI-b/o). (modSLA, 2 weeks, submerged, lower jaw, central aspect, TB stain, original magnification  $\times$  25).

Table 1. Histomorphometrical results ( $\pm$  SD) of non-submerged implants in the upper jaw at 1, 2, 4, and 8 weeks ( $n = 12$  dogs)

	modSLA		SLA		<i>p</i> value*	
	central	lateral	central	lateral	central	lateral
DL (mm)						
1 weeks	4.0 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	NS	NS
2 week	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	NS	NS
4 weeks	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	NS	NS
8 weeks	4.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	NS	NS
NBH (mm)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	1.1 $\pm$ 0.3 <sup>†</sup>	2.7 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.8	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	2.6 $\pm$ 0.2 <sup>†</sup>	3.2 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 1.4	NS	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	4.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 1.7	1.9 $\pm$ 1.2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
PLF (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	27.8 $\pm$ 8.0 <sup>‡</sup>	64.3 $\pm$ 15.7	18.3 $\pm$ 18.3	23.6 $\pm$ 18.8	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	66.2 $\pm$ 7.0 <sup>‡</sup>	77.0 $\pm$ 3.3	35.9 $\pm$ 7.2	46.3 $\pm$ 32.9	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	107.2 $\pm$ 4.7	77.9 $\pm$ 21.2	43.8 $\pm$ 41.2	45.8 $\pm$ 30.5	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
BIC-D (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	27.6 $\pm$ 7.3 <sup>†</sup>	68.0 $\pm$ 18.3	12.5 $\pm$ 12.5	24.2 $\pm$ 19.4	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	60.8 $\pm$ 2.0 <sup>†</sup>	77.4 $\pm$ 3.2	28.4 $\pm$ 2.9	40.6 $\pm$ 28.4	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	78.8 $\pm$ 11.0	70.4 $\pm$ 7.8	35.2 $\pm$ 34.0	45.2 $\pm$ 30.2	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
BF (mm <sup>2</sup> )						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>‡</sup>	5.5 $\pm$ 1.5	1.1 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 1.1 <sup>†</sup>	NS	<i>p</i> < 0.01
4 weeks	4.5 $\pm$ 1.1	10.9 $\pm$ 1.7 <sup>‡</sup>	1.9 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 5.6	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01
8 weeks	2.9 $\pm$ 1.0 <sup>‡</sup>	3.3 $\pm$ 1.7 <sup>†</sup>	2.2 $\pm$ 1.8	1.3 $\pm$ 0.9	NS	<i>p</i> < 0.05
D-CBI (mm)						
1 week	4.2 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.4	NS	NS
2 weeks	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>‡</sup>	1.2 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 1.8	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	1.9 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>	0.7 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 1.2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.2	1.9 $\pm$ 1.3	<i>p</i> < 0.05	NS

\*Comparisons between groups (unpaired *t*-test).

Comparisons within (non-submerged to submerged) groups (paired *t*-test):

<sup>†</sup>*p* < 0.05, <sup>‡</sup>*p* < 0.01.

SLA, sandblasted/acid-etched; modSLA, modified SLA; DL, defect length; NBH, new bone height; PLF, per cent linear fill; BIC-D, percentage of bone to implant contact; BF, area of new bone fill; D-CBI, difference in buccal and oral dimension of CBI.

were fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for 4–7 days.

### Histological preparation

The specimens were dehydrated using ascending grades of alcohol and xylene, infiltrated, and embedded in methylmethacrylate (Technovit 9100 NEU, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) for non-decalcified sectioning. During this procedure, any negative influence of polymerization heat was avoided due to a controlled polymerization in a cold atmosphere ( $-4^{\circ}\text{C}$ ). After 20 h, the specimens were completely polymerized. Each implant site was cut in the bucco-oral direction along with the long axis of the implant using a diamond wire saw (Exakt<sup>®</sup>, Apparatebau, Norderstedt, Germany). Serial sections were prepared from the respective defect areas, resulting in four sections approxi-

mately 300  $\mu\text{m}$  in thickness each (Donath 1985). In particular, implant sections showing an inner thread were chosen for the evaluation of central defect areas, while respective sections showing no inner thread of the implant were chosen for the evaluation of lateral defect areas. Subsequently, all specimens were glued with acrylic cement (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer) to silanized glass slides (Super Frost, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) and ground to a final thickness of approximately 40  $\mu\text{m}$ . One part of the sections was scheduled for histomorphometrical analysis and stained with toluidine blue (TB) to evaluate new bone formation. With this technique, old bone stains light blue, whereas newly formed bone stains dark blue because of its higher protein content (Schenk et al. 1984). The other part of the sections was prepared for immuno-

histochemical labelling. Additionally, sections obtained at 1 week were stained with Masson–Goldner trichrome (MG).

### Immunohistochemical labelling

For immunohistochemistry, all tissue section were deplasted in xylol ( $2 \times 30$  min.) followed by a treatment in 2-methoxyethylacetate ( $2 \times 20$  min.) and acetone ( $2 \times 5$  min.). After rehydration in phosphate-buffered saline (PBS), antigen unmasking was performed by incubating the slides for 15 min. in trypsin (0.05% in PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing with PBS, the activity of endogenous peroxidase was quenched with 0.9% hydrogen peroxide in PBS for 10 min. at room temperature, the specimens were washed, and non-specific binding sites were blocked with a blocking solution for 30 min. (DakoCytomation, Hamburg, Germany). The primary mouse monoclonal antibody to transglutaminase II (angiogenesis) (1:40 dilution, Labvision, Fremont, CA, USA) as well as OC (1:40 dilution, Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany) and corresponding unspecific antibodies (mouse IgG<sub>1</sub>) (DakoCytomation), respectively, as negative control were applied to tissue sections in a humidified chamber and incubated overnight at  $8^{\circ}\text{C}$ . The slides were washed in PBS, and incubated with secondary biotinylated anti-mouse antibody (1:50 dilution, DakoCytomation) for 90 min. at room temperature. After washing in PBS, the presence of antibody–antigen complexes was visualized using a streptavidin-peroxidase solution (1:250 dilution, DakoCytomation) and AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) as the chromogen (DakoCytomation).

### Histomorphometrical analysis

Histomorphometrical analyses as well as microscopic observations were performed by one experienced investigator masked to the specific experimental conditions. For image acquisition, a colour CCD camera (Color View III, Olympus, Hamburg, Germany) was mounted on a binocular light microscope (Olympus BX50, Olympus). Digital images (original magnification  $\times 200$ ) were evaluated using a software program (analySIS FIVE docu<sup>®</sup>, Soft Imaging System, Münster, Germany).

The following landmarks were identified in the stained sections: BTB by

drawing a perpendicular line of 1.8 mm from the implant shoulder in the apical direction parallel to the long axis of the implant, the bottom of the bone defect (BD), the most coronal level of bone in contact with the implant at both buccal and oral sites (CBI-b/o). Defect length (DL) was measured from BTB to BD (mm), new bone height (NBH) was measured from BD to CBI-b (mm), per cent linear fill (PLF) was defined as NBH divided by DL, the amount of new BIC in the defect area was measured as the percentage of the distance from BD to BTB (BIC-D), and the difference in buccal and oral dimension of CBI (D-CBI) was defined as CBI-o - CBI-b (mm). Additionally, the area (mm<sup>2</sup>) of new bone fill (BF) was measured from BD to CBI-b (Fig. 2).

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed using a commercially available software program (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The mean values and standard deviations among animals were calculated for each variable and group. The data rows were examined with the Kolmogorov-Smirnow test for normal distribution. For the statistical evaluation of the changes within groups (i.e. non-submerged to submerged), the paired *t*-test was used. For comparisons between groups (i.e. either central or lateral aspects), the unpaired *t*-test was used. The  $\alpha$  error was set at 0.05.

### Results

The post-operative healing was uneventful in all dogs. There were no signs of any wound dehiscence or exposure of the transmucosal part of the implant body in respective submerged modSLA and SLA groups.

### Histological observations/ histomorphometrical analysis

The mean values and percentages of DL, NBH, PLF, BIC-D, BF, and D-CBI for each group at 1, 2, 4, and 8 weeks are presented in Tables 1-4. In general, there were no significant differences in the mean DL values between non-submerged and submerged implants in different groups over time ( $p > 0.05$ ; unpaired *t*-test, respectively).

At 1 week, histomorphometrical analysis failed to reveal any increases in

mean NBH, PLF, BIC-D, or BF values in all groups. MG stain demonstrated a homogeneous stabilization of the blood clot at the both central and lateral aspects of modSLA implants (Fig. 3a). The area of stained fibrin, however, was thinner at the coronal aspect of the defect area. This was particularly true for non-submerged modSLA implants (Fig. 3b). In contrast, a partial or even full collapse of the blood clot was commonly observed at both non-submerged and submerged SLA implants (Fig. 3c). Immunohistochemical observation exhibited a pronounced OC antigen reactivity mainly along BD. In the basal compartment of the defect area, all groups demonstrated a primary sponge-work of newly formed blood vessels obviously originating from open marrow spaces at BD. However, the mean cross- and longitudinal sectional area of blood vessels at the lateral aspect of the

defect area was significantly highest at non-submerged and submerged modSLA implants (upper jaw: 0.64-0.97 mm<sup>2</sup>; lower jaw: 0.61-0.80 mm<sup>2</sup>), compared with the respective SLA groups (upper jaw: 0.19-0.24 mm<sup>2</sup>; lower jaw: 0.22-0.26 mm<sup>2</sup>) ( $p < 0.01$ ; unpaired *t*-test, respectively). The connective tissue surrounding the vascular structures was also demarcated by an intense OC staining (Fig. 3d). In these areas, TB stain revealed some tiny spots of mineralization (Fig. 3e). In both non-submerged and submerged modSLA groups, the formation of vascular structures was also observed within the central compartment of the wound area (upper jaw: 0.29-0.34 mm<sup>2</sup>; lower jaw: 0.19-0.37 mm<sup>2</sup>), mainly along the implant surface (Fig. 3f). In contrast, SLA implants revealed a significantly lower mean cross- and longitudinal sectional area of blood vessels at the central

Table 2. Histomorphometrical results ( $\pm$  SD) of non-submerged implants in the lower jaw at 1, 2, 4, and 8 weeks ( $n = 12$  dogs)

	modSLA		SLA		<i>p</i> value*	
	central	lateral	central	lateral	central	lateral
DL (mm)						
1 week	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3	NS	NS
2 weeks	4.0 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	NS	NS
4 weeks	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	NS	NS
8 weeks	4.1 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	NS	NS
NBH (mm)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	1.5 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	NS	$p < 0.05$
4 weeks	2.7 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 1.1	$p < 0.05$	$p < 0.05$
8 weeks	3.1 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 1.6	$p < 0.05$	NS
PLF (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	36.6 $\pm$ 11.6	48.9 $\pm$ 17.1 <sup>†</sup>	10.3 $\pm$ 7.6	10.8 $\pm$ 8.6	$p < 0.05$	$p < 0.01$
4 weeks	65.2 $\pm$ 20.6	77.7 $\pm$ 17.1	37.9 $\pm$ 18.2	37.8 $\pm$ 27.0	$p < 0.05$	$p < 0.05$
8 weeks	75.8 $\pm$ 28.3	64.2 $\pm$ 19.4	27.7 $\pm$ 20.3	42.1 $\pm$ 39.7	$p < 0.01$	$p < 0.05$
BIC-D (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	38.2 $\pm$ 8.8	41.7 $\pm$ 12.9 <sup>†</sup>	7.4 $\pm$ 4.5	5.0 $\pm$ 3.5	$p < 0.01$	$p < 0.01$
4 weeks	70.0 $\pm$ 15.0	77.0 $\pm$ 14.8	27.7 $\pm$ 11.9	37.3 $\pm$ 25.6	$p < 0.01$	$p < 0.05$
8 weeks	71.2 $\pm$ 20.3	67.5 $\pm$ 18.8	29.1 $\pm$ 17.1	39.0 $\pm$ 38.4	$p < 0.01$	$p < 0.05$
BF (mm <sup>2</sup> )						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	1.8 $\pm$ 0.8 <sup>‡</sup>	3.7 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.5	NS	$p < 0.01$
4 weeks	4.7 $\pm$ 1.1	8.4 $\pm$ 4.2	2.9 $\pm$ 1.4	4.8 $\pm$ 2.6	$p < 0.05$	$p < 0.05$
8 weeks	4.3 $\pm$ 1.5 <sup>†</sup>	3.9 $\pm$ 1.6 <sup>†</sup>	1.9 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 2.8	$p < 0.01$	NS
D-CBI (mm)						
1 week	3.8 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.2	NS	NS
2 weeks	2.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.8 <sup>†</sup>	3.8 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.2 <sup>†</sup>	NS	$p < 0.05$
4 weeks	1.2 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 1.0	$p < 0.05$	$p < 0.05$
8 weeks	0.6 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 1.2	$p < 0.05$	$p < 0.05$

\*Comparisons between groups (unpaired *t*-test).

Comparisons within (non-submerged to submerged) groups (paired *t*-test):

<sup>†</sup> $p < 0.05$ , <sup>‡</sup> $p < 0.01$ .

SLA, sandblasted/acid-etched; modSLA, modified SLA; DL, defect length; NBH, new bone height; PLF, per cent linear fill; BIC-D, percentage of bone to implant contact; BF, area of new bone fill; D-CBI, difference in buccal and oral dimension of CBI.

Table 3. Histomorphometrical results ( $\pm$  SD) of submerged implants in the upper jaw at 1, 2, 4, and 8 weeks ( $n = 12$  dogs)

	modSLA		SLA		<i>p</i> value*	
	central	lateral	central	lateral	central	lateral
DL (mm)						
1 week	4.0 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	NS	NS
2 weeks	4.1 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	NS	NS
4 weeks	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.2	NS	NS
8 weeks	4.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	NS	NS
NBH (mm)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	3.3 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	3.0 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 1.2	1.5 $\pm$ 1.3	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	4.0 $\pm$ 0.1 <sup>†</sup>	3.5 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 1.8	<i>p</i> < 0.05	NS
8 weeks	3.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 1.2	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
PLF (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	79.4 $\pm$ 13.0 <sup>‡</sup>	76.1 $\pm$ 15.6	29.1 $\pm$ 24.9	36.5 $\pm$ 31.7	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
4 weeks	96.1 $\pm$ 3.2 <sup>†</sup>	84.1 $\pm$ 10.9	49.1 $\pm$ 29.7	47.6 $\pm$ 42.2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	91.2 $\pm$ 1.9	87.8 $\pm$ 18.4	34.5 $\pm$ 24.5	46.0 $\pm$ 28.5	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
BIC-D (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	67.6 $\pm$ 12.0 <sup>†</sup>	61.3 $\pm$ 14.2	30.9 $\pm$ 30.2	36.8 $\pm$ 33.5	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	98.0 $\pm$ 11.1 <sup>†</sup>	82.2 $\pm$ 10.1	40.5 $\pm$ 21.6	45.0 $\pm$ 38.2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
8 weeks	81.4 $\pm$ 12.6	75.8 $\pm$ 22.3	34.4 $\pm$ 20.7	44.2 $\pm$ 24.6	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
BF (mm <sup>2</sup> )						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	10.5 $\pm$ 0.5 <sup>‡</sup>	8.4 $\pm$ 3.8	1.9 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 1.1 <sup>†</sup>	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	4.5 $\pm$ 1.0	6.4 $\pm$ 2.9 <sup>‡</sup>	1.5 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 2.0	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01
8 weeks	6.6 $\pm$ 0.9 <sup>‡</sup>	6.7 $\pm$ 1.1 <sup>†</sup>	2.6 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.7	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
D-CBI (mm)						
1 week	4.0 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 0.2	NS	NS
2 weeks	1.0 $\pm$ 0.5 <sup>‡</sup>	1.2 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 1.3	2.6 $\pm$ 1.3	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>†</sup>	0.4 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 1.5	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 1.1	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05

\*Comparisons between groups (unpaired *t*-test).

Comparisons within (non-submerged to submerged) groups (paired *t*-test):

<sup>†</sup>*p* < 0.05, <sup>‡</sup>*p* < 0.01.

SLA, sandblasted/acid-etched; modSLA, modified SLA; DL, defect length; NBH, new bone height; PLF, per cent linear fill; BIC-D, percentage of bone to implant contact; BF, area of new bone fill; D-CBI, difference in buccal and oral dimension of CBI.

aspect of the defect area (upper jaw: 0.07–0.12 mm<sup>2</sup>; lower jaw: 0.06–0.09 mm<sup>2</sup>) (*p* < 0.01; unpaired *t*-test, respectively).

At 2 weeks, newly formed trabeculae of woven bone, arising from open marrow spaces at BD, invaded the defect area in coronal and lateral directions. While this trabecular bone established a close BIC in the modSLA groups (Fig. 4a and b), the respective SLA groups frequently revealed a layer of non-mineralized tissue separating the implant surface in the regenerated area (Fig. 4c and d). Immunohistochemical analysis revealed a pronounced OC antigen reactivity mainly within the connective tissue adjacent to modSLA implants (Fig. 5a and b). A partial collapse of the mucoperiosteal flap within the defect area was commonly observed for non-submerged SLA and

modSLA as well as submerged SLA implants (Fig. 5c). The extent of bone formation varied considerably within and between groups. In particular, significantly the highest mean NBH, PLF, BIC-D, and BF values were observed at the central and lateral aspects of modSLA implants in both the upper and lower jaws. While at the lateral aspect, these values appeared to be comparable for non-submerged and submerged implants, the central aspect exhibited significantly higher mean NBH, PLF, BIC-D, BF, and subsequently lower D-CBI values for submerged implants. This was particularly true for modSLA implants placed in the upper jaws (Tables 1–4).

At 4 weeks, wound healing was mainly characterized by an ongoing bone formation in all groups. In general, the subsequently formed primary spon-

gework of woven bone covered the defect area in coronal and lateral directions, primarily along and in close contact to both implant surfaces. Significantly highest mean NBH, PLF, BIC-D, and BF values were observed at the central and lateral aspects of modSLA implants in both the upper and lower jaws (Tables 1–4). However, in the upper jaw, submerged healing of modSLA implants resulted in significantly higher NBH, PLF, BIC-D, and subsequently lower D-CBI values than the respective non-submerged healing procedure. In particular, histological observation revealed a partial collapse of the mucoperiosteal flap at the central aspect of the defect area at non-submerged modSLA implants, thus compromising the space for bone regeneration in the lateral direction (Fig. 6a and b). A similar pattern of wound healing was also observed for non-submerged as well as submerged SLA implants, because in both groups, the mucoperiosteal flap had completely occupied the central compartment of the defect areas (Fig. 6c and d).

At 8 weeks, histological observation revealed a continuous filling of the intertrabecular spaces in all groups and subsequently a transformation into a firmly attached mature, parallel-fibred woven bone. Early signs of remodelling, replacing the primary bone by secondary osteons, were apparent. Again, the amount of bone regeneration varied considerably within and between groups. In particular, modSLA implants revealed significantly highest NBH, PLF, BIC-D, and BF values at both the central and lateral aspects of non-submerged and submerged implants (Tables 1–4). Commonly, the newly formed buccal aspects of the alveolar bone even reached the level of the respective oral aspects. However, submerged healing of modSLA implants resulted in significantly higher BF values at both central and lateral aspects than the respective non-submerged healing approach (Tables 1–4). This difference was more pronounced at the central aspect of the defect area, indicating that a submerged healing procedure supported space maintenance in this area (Fig. 7a and b). In contrast, non-submerged and submerged SLA implants commonly exhibited a collapse of the mucoperiosteal flap at the central aspect of the defect area, thus compromising the space for bone regeneration (Fig. 7c and d).

Table 4. Histomorphometrical results ( $\pm$  SD) of submerged implants in the lower jaw at 1, 2, 4, and 8 weeks ( $n = 12$  dogs)

	ModSLA		SLA		<i>p</i> value*	
	central	lateral	central	lateral	central	lateral
DL (mm)						
1 week	4.2 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.1	NS	NS
2 weeks	4.3 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	NS	NS
4 weeks	4.1 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1	NS	NS
8 weeks	4.2 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.2	NS	NS
NBH (mm)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	1.8 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 1.1 <sup>†</sup>	0.8 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 1.2	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	2.8 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 1.0	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	3.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.5	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
PLF (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	41.5 $\pm$ 14.4	82.6 $\pm$ 27.9 <sup>†</sup>	18.3 $\pm$ 15.2	37.8 $\pm$ 29.2	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01
4 weeks	69.5 $\pm$ 29.8	91.9 $\pm$ 12.7	32.0 $\pm$ 10.7	46.6 $\pm$ 24.3	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	92.4 $\pm$ 2.4	88.3 $\pm$ 6.7	28.9 $\pm$ 15.1	40.8 $\pm$ 12.0	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
BIC-D (%)						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	39.7 $\pm$ 12.0	75.9 $\pm$ 14.7 <sup>†</sup>	8.6 $\pm$ 7.3	35.6 $\pm$ 24.8	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	67.1 $\pm$ 26.4	89.4 $\pm$ 10.6	32.0 $\pm$ 10.7	46.6 $\pm$ 24.3	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01
8 weeks	82.1 $\pm$ 14.8	71.0 $\pm$ 20.3	26.8 $\pm$ 10.4	46.2 $\pm$ 16.2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
BF (mm <sup>2</sup> )						
1 week	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	NS	NS
2 weeks	5.2 $\pm$ 2.9 <sup>‡</sup>	7.6 $\pm$ 2.5	1.7 $\pm$ 0.9	3.5 $\pm$ 1.9	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	5.2 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 2.3	2.3 $\pm$ 2.0	3.3 $\pm$ 2.4	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	6.4 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>	5.4 $\pm$ 1.2 <sup>†</sup>	1.9 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.7	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01
D-CBI (mm)						
1 week	4.2 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.4	NS	NS
2 weeks	2.5 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.4 <sup>†</sup>	3.6 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 1.3 <sup>†</sup>	NS	<i>p</i> < 0.05
4 weeks	1.3 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 1.1	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
8 weeks	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.3	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05

\*Comparisons between groups (unpaired *t*-test).

Comparisons within (non-submerged to submerged) groups (paired *t*-test):

<sup>†</sup>*p* < 0.05, <sup>‡</sup>*p* < 0.01.

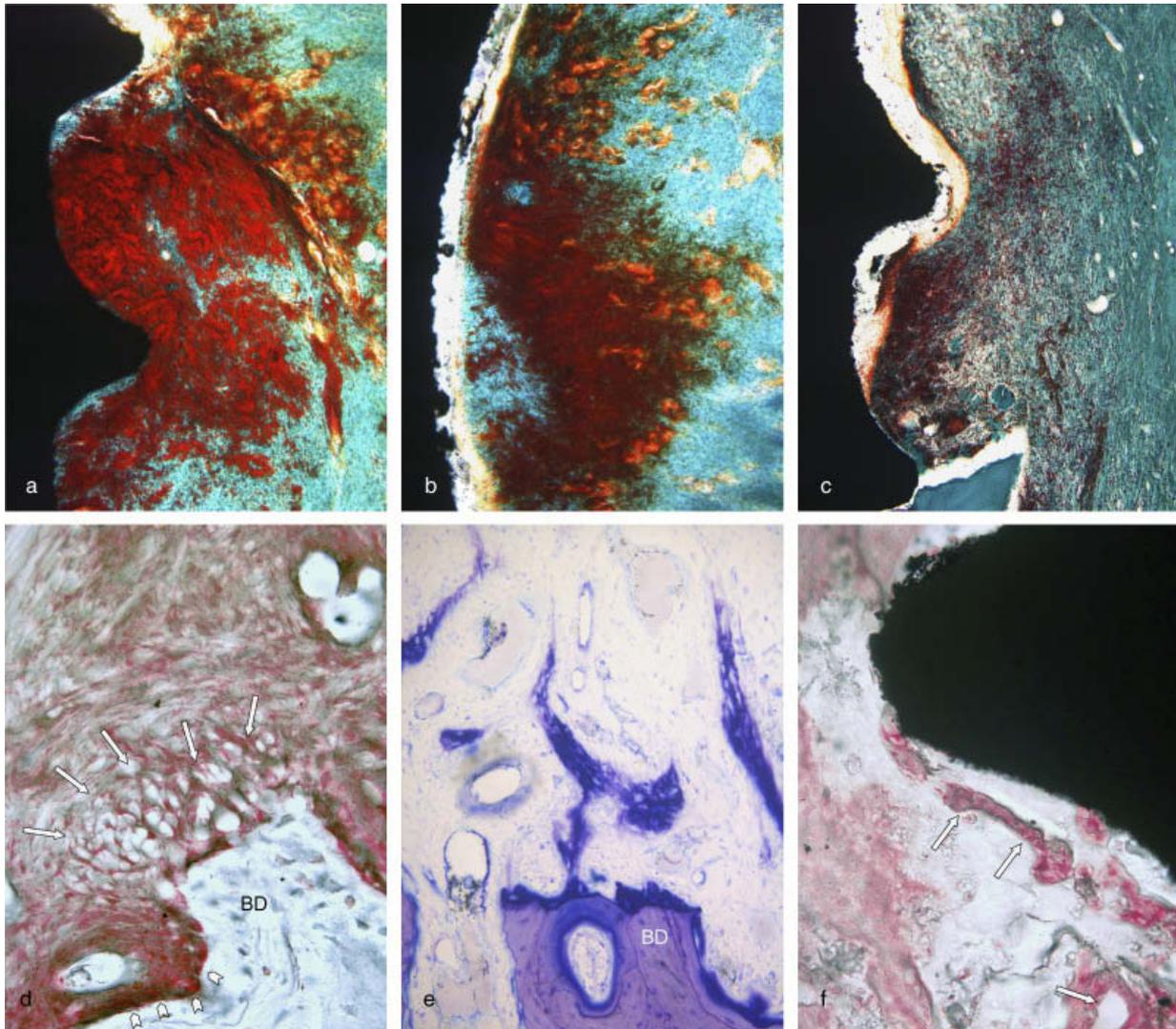
SLA, sandblasted/acid-etched; modSLA, modified SLA; DL, defect length; NBH, new bone height; PLF, per cent linear fill; BIC-D, percentage of bone to implant contact; BF, area of new bone fill; D-CBI, difference in buccal and oral dimension of CBI.

## Discussion

The present study was designed to histomorphometrically evaluate bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects at either non-submerged or submerged modSLA and SLA titanium implants in a dog model. Within its limits, it was observed that new bone formation was mainly influenced by surface hydrophilicity in addition to microtopography. In particular, at 2, 4, and 8 weeks of healing, modSLA implants exhibited significantly higher mean NBH, PLF, BIC-D, BF, and subsequently lower D-CBI values than conventional SLA implants. In this context, it must be emphasized that the surgical creation of standardized buccal dehiscence-type defects in dogs is a commonly used model to evaluate bone regeneration at titanium implants (Becker et al. 1990, Zablotzky et al.

1991, Casati et al. 2002, Oh et al. 2003, Schwarz et al. 2007b, c, e). When interpreting the present results, however, one must keep in mind that acute-type defects have a certain tendency towards spontaneous healing, thus supporting bone regeneration in all groups investigated. Indeed, immunohistochemical analysis revealed a similar pattern of wound healing at the lateral aspects of the defect area in both modSLA and SLA groups. In particular, it was observed that angiogenesis, OC synthesis, and subsequently the formation of localized spots of mineralization mainly arose from open marrow spaces at the defect borders, thus explaining the improved bone regeneration at the lateral aspect of the wound area in all groups. However, in contrast to conventional SLA implants, an intense OC antigen reactivity was also commonly observed within the newly formed con-

nective tissue along modSLA surfaces. Because OC is one of the most abundant non-collagenous proteins of the bone matrix that is exclusively synthesized by osteoblasts, odontoblasts, and hypertrophic chondrocytes (Gallop et al. 1980, Hauschka et al. 1989, Hopyan et al. 1999, Raymond et al. 1999), it might be supposed that osteoblastic differentiation was initiated within 1 week and mainly localized to the defect borders and along modSLA surfaces. Furthermore, after 1 week of healing, immunohistochemical analysis revealed a pronounced proliferation of blood vessels adjacent to modSLA surfaces, even reaching the central compartment of the defect area. In contrast, at SLA implants, the primary spongework of newly formed vascular structures was mainly localized to BD and the lateral aspects of the defect area. In this context, it must be emphasized that osteogenic cells have also been observed to arise from pericytes adjacent to small blood vessels in connective tissue (Long et al. 1995, Rickard et al. 1996, Reilly et al. 1998), thus explaining, at least in part, the pronounced bone regeneration at modSLA implants. The improved pattern of angiogenesis might be explained by the hydrophilic surface properties noted for hydroxylated/hydrated modSLA surfaces, resulting in a higher wettability when compared with conventional SLA surfaces (Rupp et al. 2006). Indeed, MG stain revealed a close adhesion of the blood clot to the hydrophilic modSLA implant surfaces at 1 week, thus promoting the ingrowth of new blood vessels from the adjacent alveolar bone. In contrast, the blood clot appeared to be partially or even fully collapsed at SLA implants. This observation is in agreement with previous studies, indicating an improved stabilization of the blood clot at hydrophilic modSLA surfaces during the initial stages of osseointegration (Schwarz et al. 2007a, d). Basically, the blood clot acts as a physical matrix that induces and amplifies the migration, proliferation, and differentiation of endothelial cells, subsequently leading to improved angiogenesis (Liu et al. 1990). Accordingly, the compromised bone regeneration at both non-submerged and submerged SLA implants might be explained by a partial or even full destabilization of the blood clot, thus allowing a collapse of the mucoperiosteal flap within the wound area. This might also be



**Fig. 3.** (a) modSLA implants revealed a homogeneous stabilization of the blood clot at both central and lateral aspects of the defect area (1 week, submerged, lower jaw, central aspect, MG stain, original magnification  $\times 100$ ). (b) The area of stained fibrin was thinner at the coronal aspect of the defect (1 week, non-submerged, lower jaw, central aspect, MG stain, original magnification  $\times 100$ ). (c) Both non-submerged and submerged SLA implants commonly revealed a partial or even full collapse of the blood clot (1 week, submerged, lower jaw, central aspect, MG stain, original magnification  $\times 100$ ). (d) Pronounced OC antigen reactivity along to open marrow spaces at BD (arrowheads) and within the connective tissue surrounding a spongework of newly formed blood vessels (arrows) (SLA, 1 week, submerged, upper jaw, central aspect, original magnification  $\times 400$ ). (e) Some tiny spots of mineralization were mainly localized at the basal compartment of the defect area (modSLA, 1 week, non-submerged, upper jaw, central aspect, TB stain, original magnification  $\times 400$ ). (f) Non-submerged and submerged modSLA implants also revealed the formation of vascular structures (arrows) within the central compartment of the defect area (1 week, submerged, lower jaw, central aspect, TG antigen reactivity, original magnification  $\times 400$ ).

supported by the observation that submerged SLA implants revealed a slightly improved bone regeneration, suggesting that the implant shoulder supported the mucoperiosteal flap preserving its original position. Similar results were also observed in the modSLA group, because submerged implants exhibited significantly higher BF values than the non-submerged group. Indeed, histological analysis revealed a slight collapse of the muco-

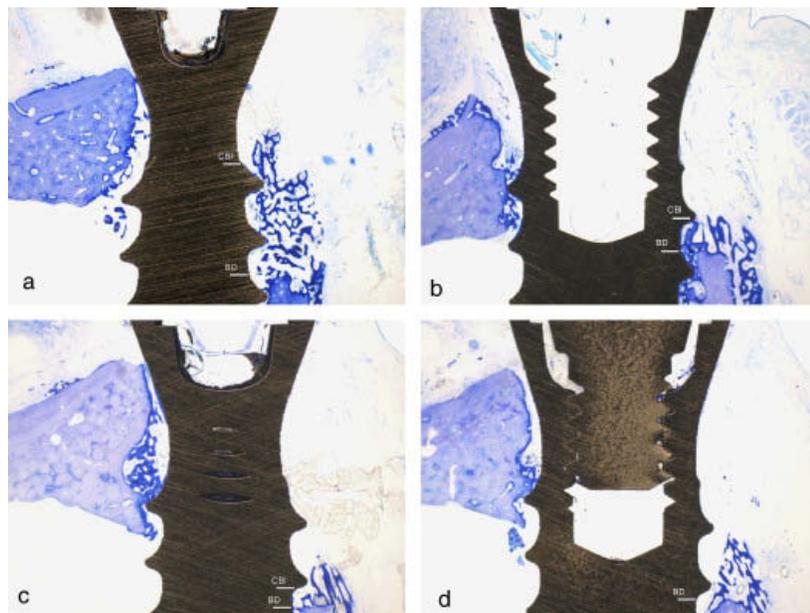
periosteal flap and subsequently a thinner blood clot particularly at the coronal aspect of non-submerged modSLA implants. Another possible explanation for the improved bone regeneration at modSLA implants might be in part due to the stimulatory effects of high surface energy on osteogenic cells. As described above, recent results from an *in vitro* study have shown that osteoblasts grown on modSLA surfaces exhibited a more differentiated phenotype charac-

terized by increased ALP activity and OC synthesis and generated an osteogenic microenvironment through higher production of PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 (Zhao et al. 2005, 2007). Indeed, recent animal studies provide clear evidence that modSLA surfaces enhanced bone apposition during early stages of wound healing at both non-submerged and submerged implant sites (Buser et al. 2004, Ferguson et al. 2006, Bornstein et al. 2007, Schwarz et al. 2007a, d). In general, the

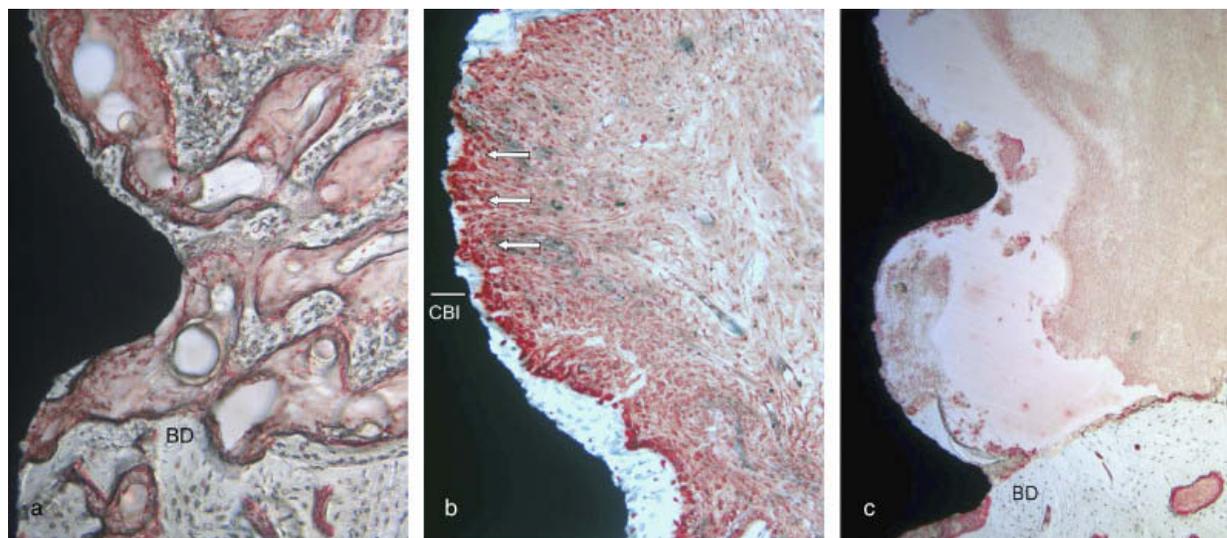
amount of bone regeneration at SLA implants, as observed in the present study, is in agreement with most of the results obtained at untreated control defects, because exposed implant threads were mainly covered by a loosely adherent connective tissue and only minute amounts of NBH and BIC (Dahlin et al.

1989, Becker et al. 1990, Oh et al. 2003). The observation that submerged modSLA implants promoted bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects without the additional use of GBR or bone augmentation procedures is in agreement with recent results from a pilot study in dogs (Schwarz

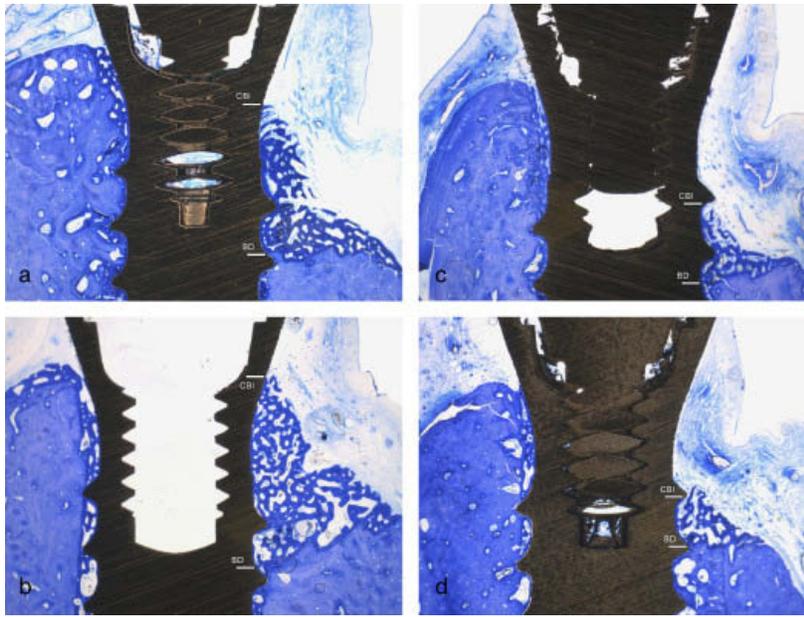
et al. 2007c). In particular, wound healing at SLA implants was predominantly characterized by the formation of a dense connective tissue at 2 and 12 weeks, without significant increases in mean NBH, PLF, BIC-D, or BF values. In contrast, modSLA implants exhibited a complete defect fill at 12 weeks following implant placement. At 2 and 12 weeks, SLA implants revealed significantly lower mean NBH (0 mm; 0.3–0.4 mm), PLF (0%; 7–10%), BIC-D (0%; 4–5%), BF (0 mm<sup>2</sup>; 0.07–0.08 mm<sup>2</sup>), and D-CBI (3.1–3.4 mm; 3.8–4.3 mm) values than modSLA implants [NBH (1.1–2.6 mm; 3.3–3.2 mm), PLF (34–80%; 97–98%), BIC-D (27–61%; 80–85%), BF (0.4–1.8 mm<sup>2</sup>; 2.3–2.4 mm<sup>2</sup>), and D-CBI (0.6–2.1 mm; 0.1–0.2 mm)]. However, the amount of BF reported in both groups appeared to be lower than the respective values obtained in the submerged healing groups of the present study. In this context, however, it must be emphasized that potential differences might be related to a smaller number ( $n = 4$ ) and the higher age (20–24 months) of the animals as well as the reduced defect height of 3 mm (Schwarz et al. 2007c). A similar pattern and amount of bone regeneration was also observed when modSLA implants were combined with different types of barrier membranes or bone substitutes (Schwarz et al. 2007b, e). In particular, blood vessels and the subsequently



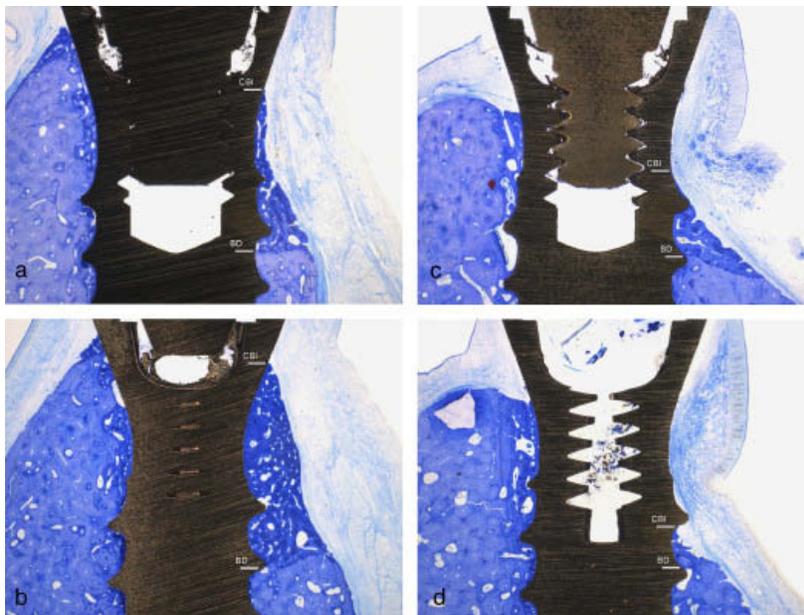
**Fig. 4.** Representative histological views of wound healing in different groups at 2 weeks. Bone regeneration in close contact to the implant surface was most pronounced at the lateral aspect of modSLA implants (upper jaws, TB stain, original magnification  $\times 25$ ). (a) modSLA, submerged, lateral aspect. (b) modSLA, submerged, central aspect. (c) SLA, submerged, lateral aspect. (d) SLA, submerged, central aspect.



**Fig. 5.** (a) Bone regeneration in close contact to a modSLA surface. Newly formed blood vessels and trabecular bone appeared to be tightly interconnected (2 weeks, non-submerged, lower jaw, central aspect, TG antigen reactivity, original magnification  $\times 200$ ). (b) The OC antigen reactivity (arrows) was most pronounced within the connective tissue adjacent to modSLA implants (2 weeks, non-submerged, lower jaw, central aspect, original magnification  $\times 200$ ). (c) Partial collapse of the mucoperiosteal flap at the central aspect of the defect area. There were no signs of any bone regeneration (SLA, 2 weeks, non-submerged, lower jaw, central aspect, original magnification  $\times 100$ ).



**Fig. 6.** Representative histological views of wound healing in different groups at 4 weeks. A primary spongework of woven bone covered the defect area in coronal and lateral directions. However, the extent of bone formation varied considerably within and between groups (lower jaws, TB stain, original magnification  $\times 25$ ). (a) modSLA, non-submerged, central aspect. (b) modSLA, submerged, central aspect. (c) SLA, non-submerged, central aspect. (d) SLA, submerged, central aspect.



**Fig. 7.** Representative histological views of wound healing in different groups at 8 weeks. A partial collapse of the mucoperiosteal flap compromised bone regeneration at the central aspects of non-submerged modSLA as well as non-submerged and submerged SLA implants (lower jaws, TB stain, original magnification  $\times 25$ ). (a) modSLA, non-submerged, central aspect. (b) modSLA, submerged, lateral aspect. (c) SLA, non-submerged, central aspect. (d) SLA, submerged, central aspect.

formed primary spongework of woven bone invaded the defect area in the coronal direction, primarily along the surface of modSLA implants. After 12 weeks of healing, the amount of bone regeneration at acute-type buccal dehiscence defects varied between  $1.2 \pm 0.3 \text{ mm}^2$  (control group: natural bone mineral – BDx) and  $3.7 \pm 0.9 \text{ mm}^2$  (BDx+cross-linked collagen membrane) (Schwarz et al. 2007e). All these data, taken together with the results from the present study, seem to indicate that modSLA titanium implants might promote bone regeneration in dehiscence-type defects to a similar or even a higher level than GBR procedures using various types of bone grafts or barrier membranes. Indeed, previous studies revealed that the obturation of the space underneath a barrier device by slow or non-resorbable bone graft substitutes may delay bone formation (Trombelli et al. 1999, Stavropoulos et al. 2001). Moreover, from a clinical point of view, the present results corroborate recent data indicating that space provision seems to be a critical factor influencing the outcome of bone regeneration (Polimeni et al. 2004, Schwarz et al. 2007e). When interpreting the present study, however, it must be queried whether data obtained from a pre-clinical study performed in dogs can be applied to the clinical situation, because the turnover rate of bone remodelling in dogs has been reported to be approximately four times faster than the human turnover rate (Draper 1994).

Within the limits of the present study, it was concluded that (i) modSLA titanium surfaces promoted bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects and (ii) a submerged healing procedure improved the outcome of healing additionally.

#### Acknowledgements

We appreciate the skills and commitment of Ms. Brigitte Hartig, Mr. Phillip Kühn, and Mr. Vladimir Golubovic in the preparation of the histological specimens.

#### References

- Becker, W., Becker, B. E., Handlesman, M., Celletti, R., Ochsenein, C., Hardwick, R. & Langer, B. (1990) Bone formation at dehisced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study

- in dogs. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **10**, 92–101.
- Bornstein, M. M., Valderrama, P., Jones, A., Wilson, T. G., Seibl, R. & Cochran, D. L. (2007) Bone apposition around two different sand-blasted and acid-etched titanium implant surfaces. A histomorphometric study in canine mandibles. *Clinical Oral Implants Research* (in press).
- Buser, D., Broggin, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S. G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research* **83**, 529–533.
- Casati, M. Z., Sallum, E. A., Nociti, F. H. Jr., Caffesse, R. G. & Sallum, A. W. (2002) Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology* **73**, 789–796.
- Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. & Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* **81**, 672–676.
- Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A. & Nyman, S. (1989) Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **4**, 19–25.
- Donath, K. (1985) The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Säge-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pathology Research and Practice* **179**, 631–633.
- Draper, H. H. (1994) Bone loss in animals. In: Draper, H. H. (ed). *Advances in Nutritional Research*, Vol. **9**, pp. 53–71. New York: Plenum Press.
- Ferguson, S. J., Broggin, N., Wieland, M., de Wild, M., Rupp, F., Geis-Gerstorf, J., Cochran, D. L. & Buser, D. (2006) Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *Journal of Biomedical Materials Research A* **78**, 291–297.
- Gallop, P. M., Lian, J. B. & Hauschka, P. V. (1980) Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *New England Journal of Medicine* **302**, 1460–1466.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. & Gundberg, C. M. (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* **69**, 990–1047.
- Hopyan, S., Gokgoz, N., Bell, R. S., Andrulis, I. L., Alman, B. A. & Wunder, J. S. (1999) Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. *Journal of Orthopaedic Research* **17**, 633–638.
- Liu, H. M., Wang, D. L. & Liu, C. Y. (1990) Interactions between fibrin, collagen and endothelial cells in angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **281**, 319–331.
- Long, M. W., Robinson, J. A., Ashcraft, E. A. & Mann, K. G. (1995) Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 881–887.
- Mayfield, L., Skoglund, A., Nobreus, N. & Attstrom, R. (1998) Clinical and radiographic evaluation, following delivery of fixed reconstructions, at GBR treated titanium fixtures. *Clinical Oral Implants Research* **9**, 292–302.
- Oh, T. J., Meraw, S. J., Lee, E. J., Giannobile, W. V. & Wang, H. L. (2003) Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clinical Oral Implants Research* **14**, 80–90.
- Polimeni, G., Koo, K. T., Qahash, M., Xiropaidis, A. V., Albandar, J. M. & Wikesjö, U. M. (2004) Prognostic factors for alveolar regeneration: bone formation at teeth and titanium implants. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 927–932.
- Raymond, M. H., Schutte, B. C., Torner, J. C., Burns, T. L. & Willing, M. C. (1999) Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* **60**, 210–217.
- Reilly, T. M., Seldes, R., Luchetti, W. & Brighton, C. T. (1998) Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **346**, 95–103.
- Rickard, D. J., Kassem, M., Hefferan, T. E., Sarkar, G., Spelsberg, T. C. & Riggs, B. L. (1996) Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research* **11**, 312–324.
- Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, N., de Wild, M., Wieland, M. & Geis-Gerstorf, J. (2006) Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research A* **76**, 323–334.
- Schenk, R. K., Olah, A. J. & Herrmann, W. (1984) Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson, G. R. (ed). *Methods of Calcified Tissue Preparation*, pp. 1–56. Amsterdam: Elsevier.
- Schwarz, F., Ferrari, D., Herten, M., Mihatovic, I., Wieland, M., Sager, M. & Becker, J. (2007a) Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at nonsubmerged titanium implants. An immunohistochemical study in dogs. *Journal of Periodontology* **78**, 2171–2184.
- Schwarz, F., Herten, M., Ferrari, D., Wieland, M., Schmitz, L. & Becker, J. (2007b) Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using a biphasic hydroxyapatite/beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic<sup>®</sup>) or a collagen coated natural bone mineral (BioOss<sup>®</sup> Collagen). An immunohistochemical study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, doi: 10.1016/j.ijom.2007.07.014.
- Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M. & Becker, J. (2007c) Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 78–86.
- Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M. & Becker, J. (2007d) Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA<sup>®</sup> titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **18**, 481–488.
- Schwarz, F., Rothamel, D., Herten, M., Sager, M., Ferrari, D. & Becker, J. (2007e) Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at dehiscence-type defect using different barrier membranes. An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* (in press).
- Stavropoulos, A., Kostopoulos, L., Mardas, N., Nyengaard, J. R. & Karring, T. (2001) Deproteinized bovine bone used as an adjunct to guided bone augmentation: an experimental study in the rat. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **3**, 156–165.
- Trombelli, L., Lee, M. B., Promsudthi, A., Guglielmoni, P. G. & Wikesjö, U. M. (1999) Periodontal repair in dogs: histologic observations of guided tissue regeneration with a prostaglandin E1 analog/methacrylate composite. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 381–387.
- Zablotsky, M., Meffert, R., Caudill, R. & Evans, G. (1991) Histological and clinical comparisons of guided tissue regeneration on dehisced hydroxylapatite-coated and titanium endosseous implant surfaces: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **6**, 294–303.
- Zhao, G., Raines, A. L., Wieland, M., Schwartz, Z. & Boyan, B. D. (2007) Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials* **28**, 2821–2829.
- Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorf, J., Cochran, D. L. & Boyan, B. D. (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research A* **74**, 49–58.

Address:

Priv. Doz. Dr. Frank Schwarz

Department of Oral Surgery

Westdeutsche Kieferklinik

Heinrich Heine University

D-40225 Düsseldorf

Germany

E-mail: Frank.Schwarz@med.uni-duesseldorf.de

**Clinical Relevance**

*Scientific rationale for the study:* Recent histological data have demonstrated that submerged modSLA titanium implants promote bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects without the additional use of GBR or bone augmentation procedures. However, the impact of the healing procedure (i.e.

non-submerged or submerged) on bone regeneration at modSLA implants is unknown.

*Principal findings:* At 2, 4, and 8 weeks of healing, both non-submerged and submerged modSLA implants revealed significantly higher mean values of NBH, PLF, BIC-D, and BF than corresponding conventional SLA surfaces. In both

groups, the submerged healing procedure promoted bone regeneration additionally, even reaching statistical significance in the modSLA group.

*Practical implications:* The most predictable outcome of bone regeneration in acute-type buccal dehiscence defects might be expected for submerged modSLA titanium implants.