

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Jürgen Becker

**Experimentelle Untersuchung zur biologischen Aktivität von rhPDGF für
die lokale Kieferkammaugmentation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Laura Alessa Podolsky

2012

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

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

Referent: Prof. Dr. Frank Schwarz
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel

Meiner Familie.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: an immunohistochemical study in dogs.

Schwarz F, Ferrari D, Podolsky L, Mihatovic I, Becker J.

Clin. Oral Impl. Res. 21, 2010; 90–99.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Allgemein
- 1.2 Kieferkammdefekte
- 1.3 Heilung der Extraktionsalveole
- 1.4 Knochenaufbau
- 1.5 Augmentation
- 1.6 Gesteuerte Knochenregeneration
- 1.7 Verwendung von Wachstumsfaktoren

2. Ziele und Arbeitshypothesen

3. Material und Methode

- 3.1 Tiere
- 3.2 Studiendesign und Randomisierung
- 3.3 Chirurgische Phase 1 (Zahnextraktion und Defektbildung)
- 3.4 Adsorption von rhPDGF-BB
- 3.5 Operative Phase 2 (Knochenaugmentation)
- 3.6 Untersuchung der Alkalinen Phosphatase (ALP) und Laktatdehydrogenase (LDH)
- 3.7 Bereitstellung des Probensatzes
- 3.8 Histologische Präparation in zeitlicher Reihenfolge
- 3.9 Immunhistochemische Untersuchung in zeitlicher Abfolge
- 3.10 Histologische Analyse
- 3.11 Statistische Analyse

4. Ergebnisse

- 4.1 Phase der Wundheilung
- 4.2 ALP- und Laktatdehydrogenaseversuch
- 4.3 Histomorphometrische Analyse/ histologische Beobachtung
- 4.4 UK- Einfluss von rhPDGF
- 4.5 OK- Einfluss der gesteuerten Knochenregeneration

5. Diskussion

- 5.1 Diskussion der Wirkung von rhPDGF im Vergleich zu anderen Studien
- 5.2 Vergleich vorangegangener Studien bezüglich initialer Knochenbildung
- 5.3 Ergebnisse des Einflusses von rhPDGF auf die Knochenbildung
- 5.4 Vergleich einiger Studien zum Thema gesteuerte Knochenregeneration
- 5.5 Transglutaminase II
- 5.6 Standpunkt zur gesteuerten Knochenregeneration
- 5.7 rhPDGF-BB im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren

6. Zusammenfassung und klinische Relevanz der Ergebnisse

7. Literaturverzeichnis

8. Abkürzungsverzeichnis

9. Tabellenverzeichnis

10. Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Allgemein

Seit Alters her wird ein strahlendes Lächeln mit einem gesunden, attraktiven Körper assoziiert. „Mens sana in corpore sano“ (Zitat Juvenal) - ein gesunder Geist in einem gesundem Körper. Im Bezug auf die demografische Entwicklung in Deutschland steigen jedoch die Ansprüche in der Alterszahnmedizin ähnlich wie bei der durch die Medien verwöhnten jüngeren Generation an. Das makellos strahlende „Hollywoodlächeln“ wird als Standard vorausgesetzt. Umso wichtiger ist es insbesondere nach traumatisch oder bakteriell bedingtem Zahnverlust eine ansprechende und jugendliche Rot-Weiß-Ästhetik zu erreichen. Der Ersatz von Zähnen kann sowohl durch herausnehmbaren, bedingt-herausnehmbaren als auch durch festsitzenden Zahnersatz erfolgen. Es stellt sich somit die Frage nach Zahn bzw. Gingiva gestütztem oder Implantat getragenen Zahnersatz. Diese Entscheidung liegt nicht allein in der Hand des Patienten. Implantate erfordern eine strenge Indikationsstellung. Neben vielen anderen Aspekten stellen die Knochenhöhe und Breite des Kieferkammes einen entscheidenden Einflussfaktor dar. Mit dem Zuwachs an Implantatinserktionen pro Jahr gewinnen augmentative Verfahren zunehmend an Bedeutung. Laut der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) wurden im Jahr 2009 rund eine Millionen Implantate gesetzt. Um Implantate unter Berücksichtigung der späteren Prothetik, Ästhetik und Funktion zu setzen, sind Knochenrekonstruktionen häufig unumgänglich. Neben Rekonstruktionen des Hartgewebes vor, während oder nach Implantationen können auch in der Parodontalchirurgie Knochendefekte versorgt werden. Das Feld der Knochenersatzmaterialien impliziert ein breites Anwendungsspektrum.

1.2 Kieferkammdefekte

Defekte des Alveolarfortsatzes können verschiedene Ursachen haben. Ausgehend von einer traumatischen Extraktion besteht die Möglichkeit, dass begrenzende Knochenlamellen - vor allem die bukkalen Knochenanteile - frakturieren oder zur Entfernung eines Zahnfragmentes osteotomiert werden müssen. Desweiteren kann durch den traumatischen Verlust eines Zahnes wie z.B. bei Frontzahntraumata die bukkale Knochenlamelle beeinträchtigt werden. Iatrogen können Kieferkammdefekte bei der Implantation verursacht werden. Entzündliche Reaktionen im Sinne einer Periimplantitis nach primär erfolgreicher Implantation können laterale Kieferkammdefekte bedingen. Auch Erkrankungen des Zahnhalteapparates gehen entzündungsbedingt mit einem vertikalen bzw. horizontalen Knochenverlust einher. Im Weiteren

wird auf die Inaktivitätsatrophie nach Zahnextraktion als Ursache für Knochenverlust näher eingegangen.

Die Atrophie (altgriechisch: ἀτροφία - Verkümmern) verläuft im Ober- und im Unterkiefer auf Grund der unterschiedlichen Knochenstruktur und der spezifischen Form nach einem jeweils charakteristischen Muster. Die Rückbildung des Knochens ist multikausalen Ursprungs; im Kiefer entsteht sie u. a. durch Druck, Überbelastung, Inaktivität oder im Sinne einer Altersinvolution.

„Die Resorption der Kieferkämme ist ein komplexer biophysikalischer Prozess. An dieser Stelle kann man sich eines Vergleiches zwischen Knochen und Eis bedienen. Wenn ein abgemessenes Gewicht auf ein abgemessenes Stück Eis für eine bestimmte Zeit bei einer bestimmten Temperatur unter einem bestimmten atmosphärischen Druck gegeben wird, wird ein vorher-sagbarer Grad an Schmelzung des Eises auftreten“ (Zitat Atwood D.A. et al. 1962).

Bereits im 19ten Jahrhundert formulierte Wolff das gleichnamige Gesetz, welches besagt, dass die Knochenanatomie und -dichte der jeweiligen Knochenbeanspruchung folgen. Weiterhin postulierte er, dass die trabekuläre Struktur des belasteten Knochens sich nach der Richtung der einwirkenden Kräfte orientiert (Wolff, J. 1892). H. Frost ergänzte, dass der Knochenumbau durch sein Elastizitätsmodul determiniert wird, sodass dieser zu einer mathematisch reproduzierbaren Größe wird.

In welchem Maße die Resorption des Knochens voranschreitet und mit welcher Geschwindigkeit dies abläuft, ist nicht nur zwischen zwei Menschen unterschiedlich sondern auch bei jedem Menschen selbst. Eine Erklärung für diese Abweichungen ist nicht monokausalen Ursprungs. Entsprechend der Klinik sollten vier Komplexe berücksichtigt werden (Atwood D.A. et al. 1962). Anatomische Gegebenheiten wie beispielsweise die Ausprägung, Höhe und Form des Kieferkammes sowie die Knochenqualität geben wichtige Hinweise für die Ausprägung der späteren Inaktivitätsatrophie nach Zahnverlust. Die Anatomie des Knochens wird durch die Physiologie und Beanspruchung des gesamten Kausystems beeinflusst, so spielt auch die Muskelaktivität und das Ernährungsverhalten des Menschen eine entscheidende Rolle für die Resorption. Die Physiologie ist dementsprechend der zweite Komplex. Sie ist eng mit dem dritten Komplex verbunden dem Stoffwechsel des Menschen. Der letzte iatrogen zugeführte Komplex ist die Versorgung der Zähne durch den Zahnarzt. Fehlbelastungen oder unphysiologische Gestaltungen des Zahnersatzes können eine Resorption des Kiefers implizieren. Die Komplexe sind keine Einheiten ohne Berührungspunkte, sie gehen vielmehr ineinander über. Der Kno-

chen im gesamten Organismus des Menschen ist keine stillstehende Matrix, sobald sie einmal gebildet wurde, sondern passt sich entsprechend den oben erläuterten Komplexen den jeweiligen Gegebenheiten durch Knochenapposition und –resorption stets an. (Atwood D.A. et al. 1962).

In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass sich bereits in den ersten 12 Monaten nach Extraktion der Alveolarknochen um ca. die Hälfte reduziert (Schropp L. et al 2003). M.G.Araújo führte 2005 präklinische Studien zum Alveolarkammverlust nach Zahnextraktionen durch. Er stellte fest, dass sich die Resorption des Kieferkammes nicht nur je nach Knochenwunde unterscheidet, sondern an einer Extraktionsalveole selbst entsprechend des histologischen Aufbaus der Knochenwände. Grundsätzlich inseriert das parodontale Ligament eines Zahnes in den umliegenden Bündelknochen. Wie bereits oben erwähnt, wird Knochen ohne Funktion umgebaut. Ist nun nach Zahnextraktion die Beanspruchung des Knochens durch den Zahn nicht mehr gegeben, so wird der Bündelknochen abgebaut. (Araújo et al 2005). In der hier genannten Studie wurde beobachtet, dass die krestalen Anteile der Alveolen bukkal ausschließlich aus Bündelknochen bestehen gegenüber der lingualen Alveolarwand, welche sich histologisch aus Bündel- und Lamellenknochen aufbaut. In der aufgeführten Studie konnte der Bündelknochen nach zwei Wochen der Wundheilung histologisch erfasst werden. Nach einer Wundheilungszeit von ein bis zwei Monaten war kein Bündelknochen mehr sichtbar (Araújo et al 2005). Auf Grund des histologischen Aufbaus der Knochenwände zeigt sich, warum im Oberkiefer die Resorption in zentripetaler Richtung verläuft, während sie im Unterkiefer in zentrifugaler Richtung voranschreitet (Neukam et al. 1989). Für den Prothetiker besteht die Herausforderung darin, aus einer durch den Knochenumbau entstandenen Pseudoprogenie eine orthognathe Verzahnung mit ästhetisch ansprechendem Gesichtsprofil zu erzielen.

Die Resorptionsklassen der Kiefer wurden von Cawood und Howell eingeteilt:

Klasse	Kieferform
1	Physiologisch voll ausgeformter, bezahnter Kiefer
2	Zustand direkt post extractionem
3	Massiver Kieferkamm mit ausreichender Höhe und Breite
4	Rasierklängenähnliche Kammform mit ausreichender Höhe aber unzureichender Breite
5	Flacher Kieferkamm mit geringer Höhe und Breite
6	Stark atrophierte Kieferkammform mit teilweise negativer Ausrichtung

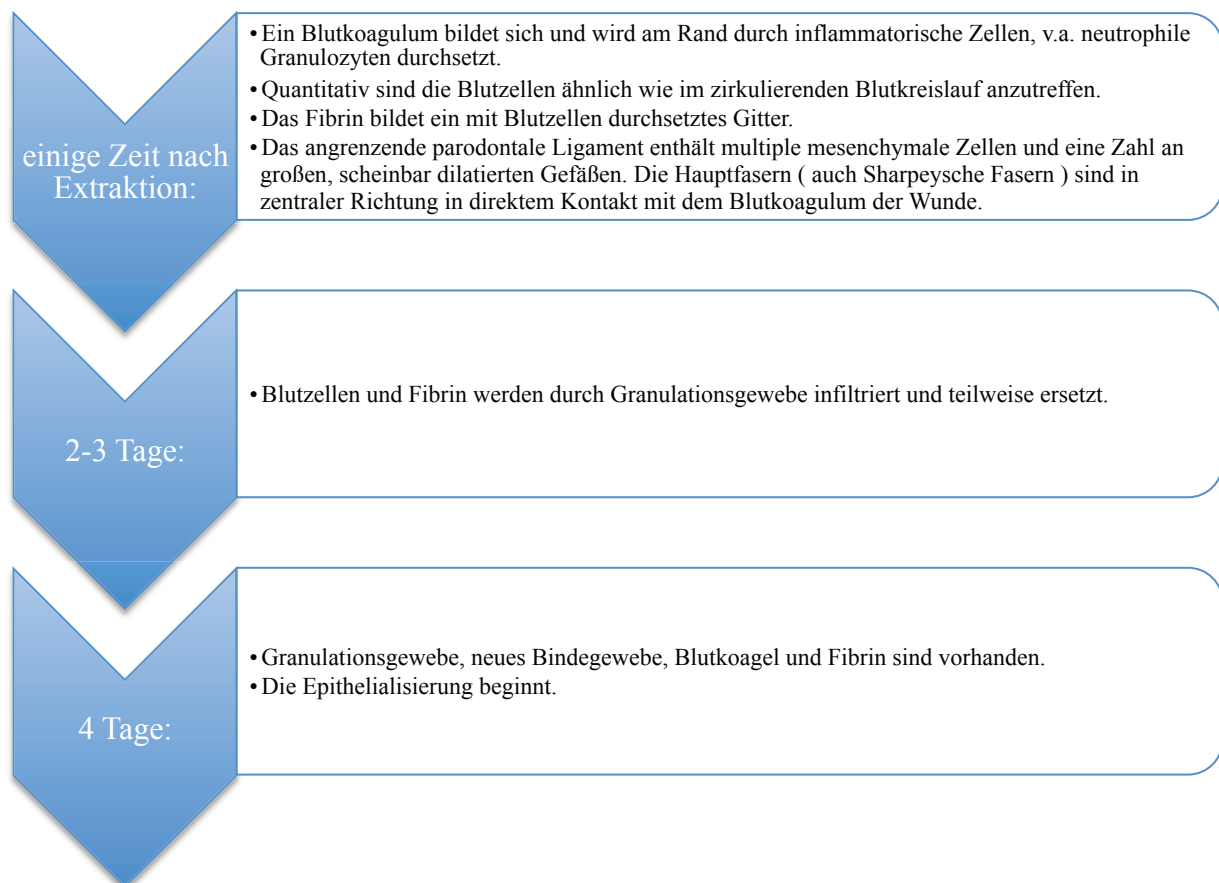
Tabelle 1 (modifiziert nach Cawood & Howell 1988)

Aufschluss über dieses Resorptionsmuster gibt der histologische Auf- und Umbau des Knochens im Ober- bzw. im Unterkiefer vor und nach Zahnverlust.

1.3 Heilung der Extraktionsalveole

Grundsätzlich gilt die Wundheilung als komplexer, physiologischer Prozess einhergehend mit Inflammation, Proliferation und Migration basierend auf Angiogenese und Gewebesynthese (Clark et al. 1985).

Nach Zahnextraktion folgt die Wundheilung der Alveole einem konstanten Schema:



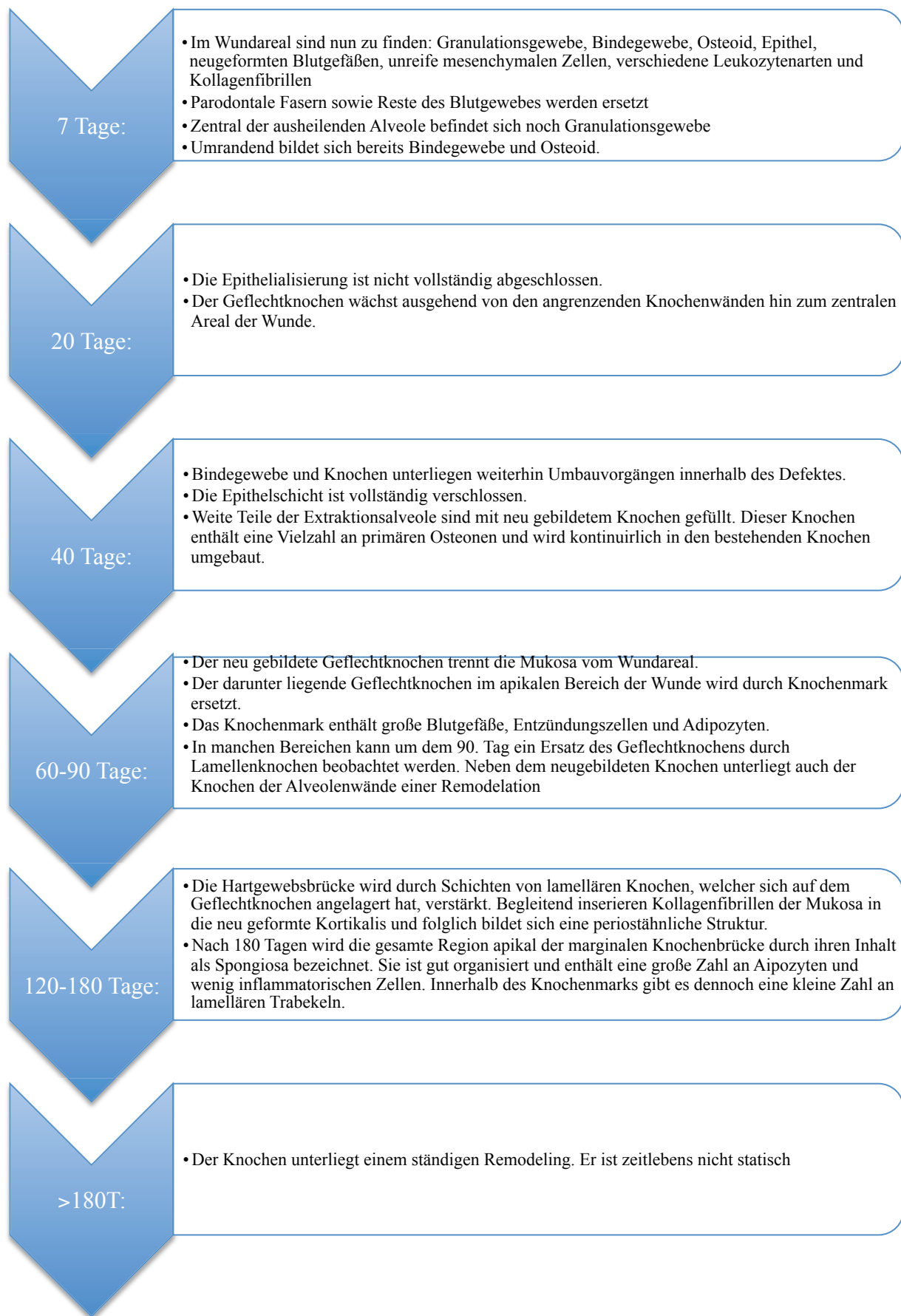


Abbildung 1

(modifiziert entspr. Abb. 1, Amler et al 1969, Cardaropoli G. & Araujo M. et al. 2003)

In manchen Bereichen unterliegt der Geflechtknochen ca. fünf bis zehn Wochen nach Extraktion osteoklastischer Resorption und indiziert somit den Prozess des Knochenaufbaus und Remodelings des neu geformten Knochens. Osteoklasten können hier vor allem auf der Oberfläche des randständigen Lamellenknochens beobachtet werden (Cardaropoli G. & Araujo M. et al. 2003). Long (1995) postulierte, dass osteogene Vorläuferzellen als Speicher für knochenbildende Zellen im Knochenmark dienen und darüber hinaus Zugang zu peripheren Gefäßen haben, so dass sie im Falle der vergrößerten Nachfrage - wie z.B. bei Verletzungen des Hart- und Weichgewebes - genutzt werden können.

1.4 Knochenaufbau

Der Knochen besteht zu 30% aus organischen Bestandteilen, den nicht-kollagenen Proteinen und dem Kollagen Typ I; und zu 70 % aus anorganischen Bestandteilen, dem Hydroxylapatit und den Fluoriden und Chloriden (Felsenberg 2001).

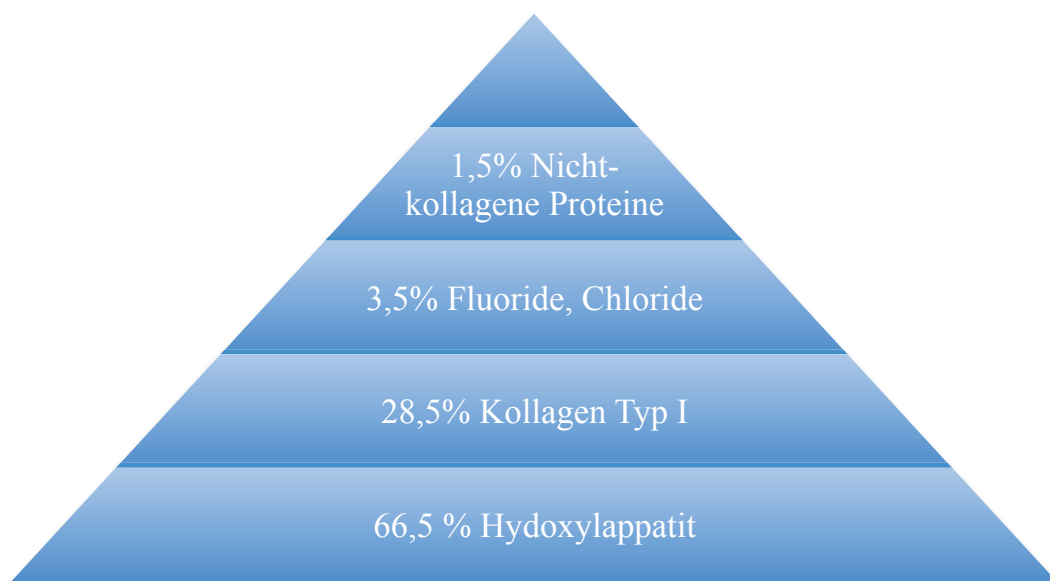


Abbildung 2 (modifiziert nach Felsenberg 2001)

Der zu 28,5 % im Knochen vorkommende Kollagen Typ I setzt sich aus einem Heterotrimer von zwei Pro- α 1- und einer Pro- α 2-Polypeptidkette mit repetitiven Sequenzen vom charakteristischen Triplet GLY- X-Y zusammen. Durch die kleinste Aminosäure Glycin können sehr feine Spiralen Kollagen gebildet werden (Felsenberg 2001).

Die nicht-kollagenen Proteine machen einen kleineren Anteil des Knochens aus. Sie betragen lediglich 1,5 %, sind aber dennoch von immenser Wichtigkeit für das Hartgewebe. Zu den uns

bekannten nicht-kollagenen Proteinen zählen Osteokalzin, Osteonektin, Knochen-Proteoglykan, Sialoprotein, morphogenetisches Protein und Proteolipid (Felsenberg 2001).

Ohne Berücksichtigung der Entstehung und Struktur des ausgebildeten Lamellenknochens sind die Zusammensetzungen und Eigenschaften der anorganischen Matrix im gesamten Skelett vergleichbar. (Felsenberg 2001).

1.5 Augmentation

Gemäß der Prinzipien von Wiederherstellung und Ersatz (Sipe J.D. 2002) sind augmentative Verfahren durch folgendes Muster geprägt. Das Augmentat selbst bildet eine Raum einnehmende Leitstruktur für einwachsende Zellen. Die Induktion der Knochenneubildung basiert hauptsächlich auf den bereits lokal vorkommenden Zellen. Diese Zellen werden, ausgelöst durch externe Signale der Wachstumsfaktoren und Morphogene (z.B. Knochenmodulierendes Protein – engl.: Bone morphogenetic protein), zur Zelldifferenzierung und Proliferation angeregt. Die Einsprossung neuer Gefäße in das Augmentat und somit die Versorgung des Gewebeareals stellt die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Einheilung des Augmentates (Taba M. et al. 2005).

Ziel einer wiederherstellenden Behandlung im Bereich der Knochenaugmentation ist eine *Restitutio ad integrum*.

Grundsätzlich unterscheidet man verschiedene Prinzipien in der Knochenregeneration; die Osteokonduktion, Osteoinduktion und gesteuerte Knochenregeneration.

Osteokonduktion: Die Oberfläche des Knochenersatzmaterials (KEM) dient als Leitstruktur für einsprossende Gefäße und sich bildenden Knochen.

Osteoinduktion: Laut DGZMK ist „die Osteoinduktion die de novo Bildung von Knochen aus pluripotenten Reservezellen (Stammzellen), die ubiquitär im perivaskulären Bindegewebe und im Knochen vorkommen und unter bestimmten Bedingungen durch morphogene Faktoren aktiviert werden. (...) Definitionsgemäß muss eine osteoinduktive Substanz eine ektope Knochenneubildung, also eine Induktion von Knochengewebe an einem extraskelettalen Ort, bewirken“ (Zitat H. Terheyden, J. Becker 2006).

Osteogenese: Im Knochentransplantat enthaltene vitale Osteoblasten bilden unter ausreichender Blutversorgung zusätzliche Ossifikationszentren (Carranza 2006).

Gesteuerte Knochenregeneration:

Die befestigte Gingiva durchläuft einen höheren Turnover als der Kieferknochen. Eine Membran sorgt als unüberwindbare Barriere für Fibroblasten etc. dafür, dass schnell proliferierende Zellen nicht ungesteuert in den Knochendefekt einwandern können. Ziel des Prozederes soll sein, dass Zellen mit osteogenem Potential den Defekt auffüllen können, welche sonst durch schnell arbeitende Bindegewebszellen daran gehindert werden (Dahlin C. 1988).

Knochenersatzmaterialien lassen sich entsprechend ihres Ursprungs in verschiedene Gruppen einteilen.

Transplantatform	Transplantatursprung
Autograft	Der Knochen entstammt dem gleichen Individuum. Entnahmestellen: →aus dem Operationsgebiet mittels Safescraper oder Knochenfalle →Retromolar →Kinnregion →Beckenkamm →Rippe
Isograft	Spender und Empfänger sind genetisch eng verwandt, Bsp. Zwillinge
Allograft	Spender und Empfänger sind genetisch nicht verwandt, das Transplantat ist humanen Ursprungs
Xenograft	Das KEM ist tierischer Herkunft; je nach Spezies spricht man u.a. von bovinem (dem Rind entstammendem), porkinem (dem Schwein entstammendem) oder equinem (dem Pferd entstammendem) Material.
Allograft	Ersatz des Gewebes durch synthetisch hergestelltes Material

Tabelle 2

In ihren Eigenschaften unterscheiden sich die verschiedenen Arten von Knochenersatzmaterialien maßgeblich. Autologer Knochen wirkt sowohl osteoinduktiv als auch osteokonduktiv. Allogener Knochen wirkt hauptsächlich osteokonduktiv, steht jedoch in Verdacht, osteoinduktiv zu wirken. Xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien wirken ausschließlich osteokonduktiv (Carranza 2006).

Trotz multipler Variationen der Knochenersatzmaterialien bleibt das autologe Knochentransplantat mit den Eigenschaften der Osteoinduktion, Konduktion und Osteogenese bis heute der Goldstandard in der augmentativen zahnärztlichen Chirurgie (Chiapasco et al. 2006). Ist dies operativ nicht zu realisieren, erfolgt die Verwendung eines der oben genannten Materialien. Hierbei sollte beachtet werden, dass nicht nur die Herkunft des Materials eine Rolle für die Osteointegration spielt, sondern auch dessen physikalischen Eigenschaften. Die Porosität und die Porengrößen sind sowohl in vitro wie auch in vivo von entscheidender Bedeutung, da sie mit der Knochenneubildung korrelieren. Die kleinste empfohlene Porengröße aus früheren Studien betrug 100 microm, jedoch liegt die bevorzugte Porengröße für die Knochenneubildung und Einsprossung von Gefäßen bei 300 microm. Die physikalischen Eigenschaften des Materials sollten so gewählt werden, dass die Remodellation des Knochens im Gleichgewicht zur Degradation des Knochenersatzmaterials steht (Karageorgiou V. Kaplan 2005).

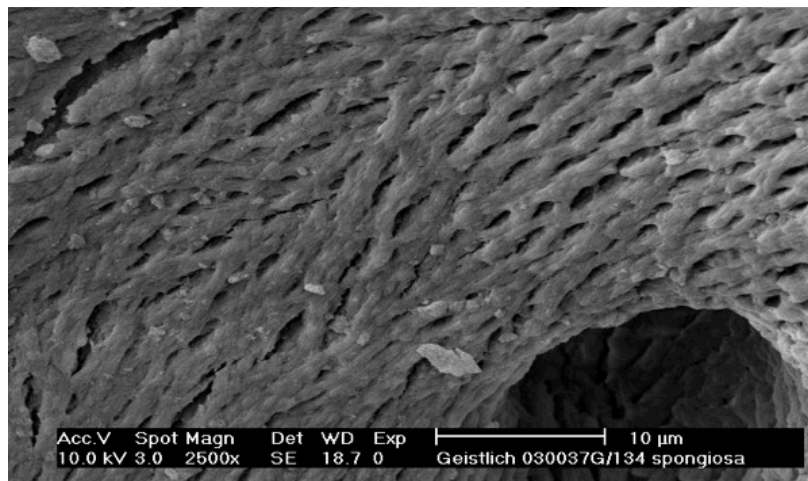


Abbildung 3

(Geistlich ® Bio-Oss REM, 10µm; mit freundlicher Genehmigung der Firma Geistlich)

Für die aktuelle Studie wurde das xenogene Knochenersatzmaterial Bio-Oss (Geistlich ®) als Trägersubstanz verwendet, welches bereits in der Praxis breite Anwendung findet und in einer Vielzahl an Studien als primär osteokonduktive Leitstruktur oder getränkt mit zusätzlichen

Substanzen gute Ergebnisse erzielte (Schwarz et al. 2008b, Simion et al. 2006 etc.). In einer Studie von Araújo et al. konnten die begünstigenden Eigenschaften des Bio-Oss® als Trägersubstanz und Augmentat bereits herausgestellt werden. Es behält über einen längeren Zeitraum sein Volumen und die Leitstruktur für den einwachsenden Knochen. Mineralisationszentren peripher des umrandenden Knochens in direktem Kontakt mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss® sowie sich auf das Augmentat auflagernde Zellen mit osteoblastischem Potential sind Anzeichen für einen osteogenen Prozess im betreffenden Areal (Araújo et al. 2002).

1.6 Gesteuerte Knochenregeneration (engl.: „guided bone regeneration“)

Das Prinzip der gesteuerten Knochenregeneration wurde anfangs ausschließlich im Fachbereich Parodontologie eingesetzt (Garret S. et al 1996), doch mittlerweile ist es auch im Bereich der Implantologie und intraossären Kieferkammdefekten State of the Art (Fritz ME. et al. 1996; Schwarz et al. 2008a). Die seit den neunziger Jahren etablierte Technik zur Augmentation des knöchernen Implantatlagers ist wissenschaftlich ausreichend dokumentiert (DZZ 6/2005 Schliephake T.). Erste Pilotstudien an Hunden sind bereits um das Jahr 1990 publiziert worden (Seibert/ Nyman et al. 1990). In der genannten Vorläuferstudie wurden durch die Extraktion der ersten und zweiten Prämolaren bei zwei Beagle Hunden bukkolinguale Kieferkammdefekte geschaffen, welche gemäß eines Splitmouthdesigns nach 90 Tagen entweder mit Membran und Hydroxylapatit augmentiert oder als Kontrollgruppe nativ belassen wurden (Seibert/ Nyman et al. 1990).

Zugelassen durch das Medizinproduktegesetz sind eine Vielzahl an Materialien für die gesteuerte Knochenregeneration, jedoch sollten alle Membranen folgende Eigenschaften besitzen. Hauptsächlich sind dies die Platzhalterfunktion, die Gewebekompatibilität, die Gewebsintegration und der Ausschluss von Zellen trotz Semipermeabilität für Blutgefäße. Desweiteren ist eine einfache klinische Handhabung für den langfristigen Erfolg von Vorteil. Laut vorangegangenen Studien spielt die Angiogenese eine Schlüsselrolle für den Erfolg der gesteuerten Knochenregeneration/ gesteuerten Geweberegeneration (Hardwick et al. 1994).

Grundsätzlich unterscheidet man Membranen nach folgenden Kriterien:

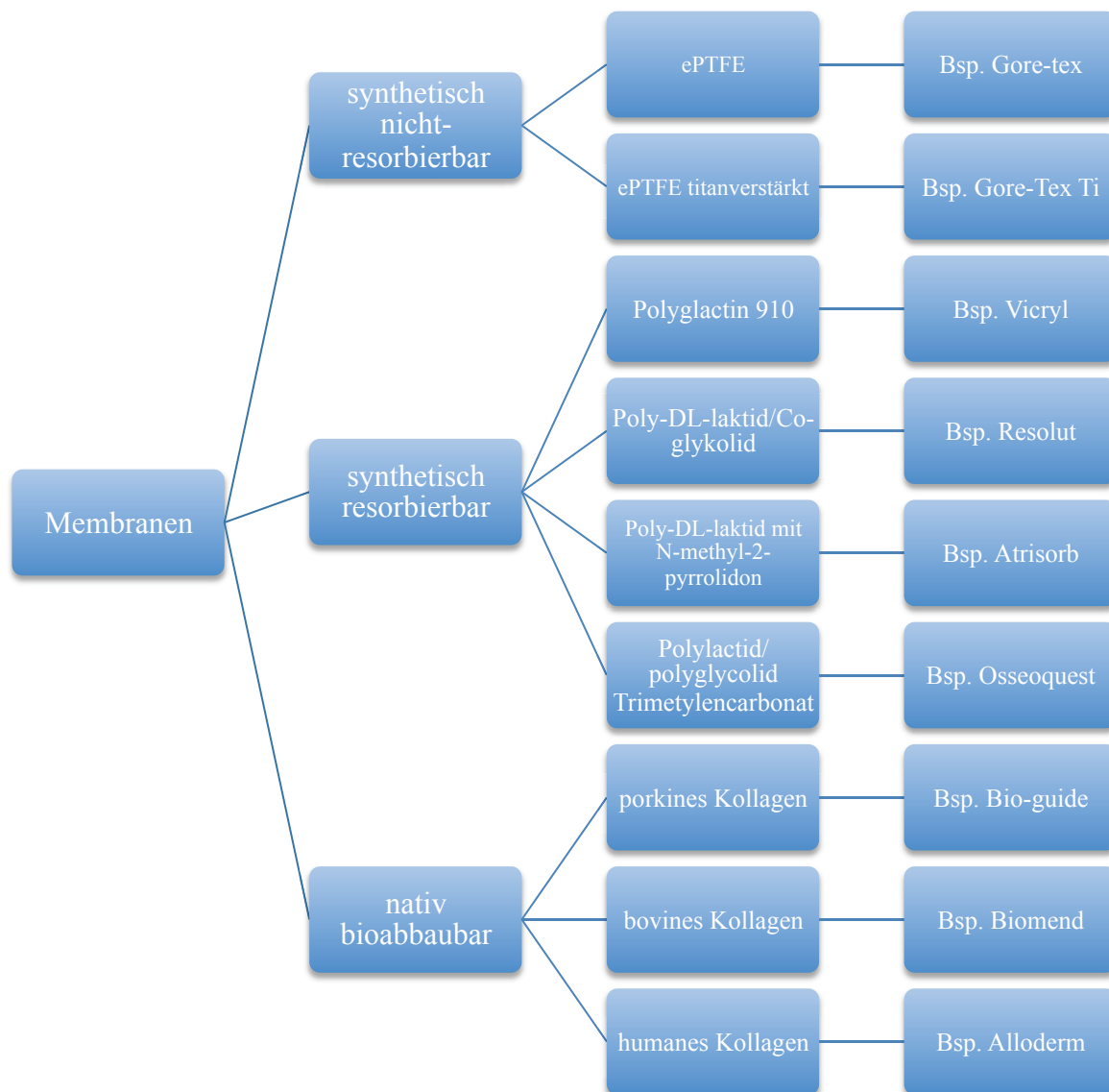


Abbildung 4 (modifiziert nach Rateitschak K.H., Wolff H.F., 2000)

Lekovic et al. führten im Jahr 1997 eine klinische Studie mit nicht resorbierbaren Membranen durch. Entsprechend eines Splitmouth Designs wurden mehrere Zähne extrahiert. Eine Alveole wurde anschließend mit einer ePTFE-Membran (expandiertes Polytetrafluoroethylen) bedeckt, während die andere konservativ einheilte. Nach sechs Monaten konnte anhand zuvor erstellter Modelle der Alveolen der Fortschritt beurteilt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten klinische Messungen und Modellanalysen eine statistisch voluminösere Kammdimension in den mit ePTFE bedeckten Alveolen.

Im gleichen Jahr veröffentlichten Dies et al. eine Studie in welcher die ePTFE-Membran mit und ohne allogenem oder xenogenem Knochenersatzmaterial nach sechs bis neun Monaten bewertet wurde. Die Regeneration der hier vorherrschenden bukkalen Dehiszenzen in Extraktionsalveolen war in dieser Studie mit Knochenersatzmaterial weniger erfolgreich als die Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu nichtresorbierbaren Membranen fördert die Verwendung von resorbierbaren Materialien die Wundheilung. Bezogen auf die primäre Wundheilung haben resorbierbare Membranen die Eigenschaft, das Blutkoagulum zu sichern, die Wunde zu stabilisieren und die Hämostase zu fördern. Gleichzeitig locken sie chemotaktisch proliferierende Zellen an und verstärken durch ihre Kollagenstruktur den Mukoperiostlappen. Quervernetzte Membranen weisen einen langsameren Zersetzungsprozess auf, dies führt zu einer Proliferation der im Defekt vorhandenen Zellen mit osteogenem Potential (Bunyaratavej, P. & Wang, H.L., 2001). Die Studien zu quervernetzten Membranen sind heterogen. Rothamel et al. leitete aus einer Studie an Ratten ab, dass die quervernetzten Membranen auch negative Eigenschaften bezogen auf die Wundheilung haben. So konnte er demonstrieren, dass die biologische Degradation der Membranen sich verzögert. Desweiteren schien die Quervernetzung zu einer schlechteren Biokompatibilität und somit zu einer erhöhten Fremdkörperreaktion zu führen. Auch die bei der Augmentation für die basale Nutrition erforderliche Vaskularisierung des Gewebes wurde beeinträchtigt (Rothamel et al. 2005). Die Möglichkeiten der Quervernetzung sind mannigfaltig. Es scheint, als wäre die Angiogenese abhängig von der jeweilig spezifischen Struktur der einzelnen Membran (Schwarz et al 2006a).

In der klinischen Anwendung werden heute zu Tage Kollagenmembranen und ePTFE-Membranen bevorzugt verwendet. Vergleichend zeigen beide ähnliche Erfolge. Ein Nachteil an nicht-resorbierbaren Membranen ist v.a. der notwendige Zweiteingriff zur Membranentfernung, der durch die Bildung eines Mukoperiostlappens mit einer Resorption des Alveolarknochens von ca. 1mm einhergeht (Philström et al. 1983).

Bisher zeigt das Verfahren der gesteuerten Knochenregeneration eine günstige Prognose hinsichtlich des Erhaltes der horizontalen und vertikalen Dimension des Alveolarkamms nach Zahnextraktion. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass das Membranmaterial per se keinen Einfluss auf den Erfolg nimmt. Der Zusatz von Knochenersatzmaterial zeigt in zuvor untersuchten Studien nur einen synergistischen Effekt bezogen auf die Membranstabilität, nicht aber auf die Knochenneubildung (Schwarz et al. 2006b).

In der aktuellen Studie wird in Anbetracht der heterogenen Studien, die den Erfolg der gesteuerten Knochenregeneration bewerteten (Rothamel et al. 2005; Schlegel et al. 1997), die Membran „Bio-Gide®“ verwendet. Neben dem im Folgenden spezifizierten primären Ziel der Studie soll der Einfluss dieser Membran auf die Augmentation mit rhPDGF-BB versetztem Knochenersatzmaterial weiter verifiziert werden.

1.7 Verwendung von Wachstumsfaktoren

Seitdem die Angiogenese eine Schlüsselrolle in der Knochenbildung eingenommen hat (Mair et al. 2007, Arnold^{*}/West[†] et al. 1991), wurde auch die Applikation von Zytokinen, die an der vaskulären Entwicklung beteiligt sind, als ein potentieller therapeutischer Ansatz für lokale Knochenaugmentationen in der implantatversierten Zahnmedizin betrachtet (Jung et al 2008).

Die biologische Wirkung von Zytokinen ist nicht spezifisch auf einen Zelltyp beschränkt und im Umkehrschluss können verschiedene Zytokine auf einen bestimmten Zelltyp wirken. Die Signalauswirkungen sind jedoch ähnlich. Das Wirkspektrum der Zytokine ist weitläufig umschrieben (T.Kishimoto et al 1994).

Bereits M.R. Urist 1965 vermutete einen Mechanismus von lokalen Faktoren im Wundgebiet. Umherschweifende Histiozyten, Riesenzellen und inflammatorische Bindegewebszellen wandern, angelockt durch Abbauprodukte der umgebenden Matrix, in das Wundareal ein und proliferieren am aufgebrachten Knochentransplantat. Vor Ort - so vermutete M.R.Urist - könnten sie Signale für den Gewebeabbau auf die Empfängerzellen übertragen und somit das Remodelling auslösen. Sowohl die Zellen, die das Signal geben, als auch die Zellen, die das Signal erhalten nehmen ihren Ursprung aus proliferierenden Zellen des Wundgebietes. M.R. Urist war ebenfalls der Annahme, dass die Differenzierung der Osteoprogenitorzellen zu proliferierenden Osteoblasten und Osteoklasten durch lokale Signalwege im Zellzyklus induziert wird (M.R.Urist 1965).

Auch R. Ross stellte während Forschungsarbeiten 1974 fest, dass die größte wachstumsfördernde Aktivität direkt oder indirekt mit einer Substanz assoziiert ist, welche während der Gerinnung freigesetzt wird (R. Ross et al. 1974).

Die Liste der in experimentellen Studien für Wachstumsfaktoren verwendeten Tiermodelle ist beträchtlich. Die den Polypeptiden zuzuordnenden Wachstumsfaktoren werden prinzipiell definiert als Mediatoren, welche die Zellproliferation sowie den Zellstoffwechsel über membranständige Rezeptoren vermitteln. Neuste Entwicklungen in der Biotechnologie und Gentechnik

haben die Untersuchungen zu Wachstumsfaktoren in humanen klinischen Studien vereinfacht, bislang kann man jedoch nur von vorläufigen Ergebnissen dieser humanen Studien sprechen (Kiritsy et al 1993).

Zu den Wachstumsfaktoren zählen u.a. der Transforming Growth Faktor- β (TGF- β), die Bone Morphogenic Proteins (BMP), der Fibroblast Growth Faktor (FGF), der Plateletd-derived Growth Factor (PDGF) und der Insulin-like Growth Factor (IGF).

Dem Wachstumsfaktor PDGF wird eine regulatorische Position im Wachstum des Bindegewebes zugeordnet, weil er ausnahmslos im Areal traumatisierten Gewebes ausgeschüttet wird (Stiles CD et al. 1979).

In den siebziger und achtziger Jahren wurden Untersuchungen zur Identifikation des PDGF durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen ein molekulares Model des PDGF, wonach PDGF aus 2 verschiedenen, kovalent verbundenen Polypeptidketten aufgebaut ist (Heldin C-H. et al 1981) und im Vergleich zu anderen Proteinen ein totales Molekulargewicht von etwa 20-30 000 ausmacht (Heldin C-H. et al 1977). Sein isoelektrischer Punkt liegt ungefähr bei 9 (Antoniades HN. Et al. 1979). Später konnten drei verschiedene dimere Formen des PDGF gefunden werden: PDGF-AA, -BB, -AB (Johnsson et al. 1984).

PDGF-BB - ein stark mitogener und chemotaktischer Faktor - reguliert hauptsächlich die Reifung und Remodellation von neuen Blutgefäßen (Risau 1997). Zusätzlich fördert PDGF-BB die Proliferation der Osteoprogenitorzellen und der kollagensynthetisierenden Zellen (Canalis et al 1989; Zhang et al. 1991), jedoch verursacht rhPDGF-BB auch eine stärkere Stimulation der nicht-kollagenen Proteinsynthese. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass die Auswirkungen nicht spezifisch für die Kollagensynthese sind (Canalis et al 1989).

Es wird suggeriert, dass eine exogene Applikation der verschiedenen Kombinationen an Wachstumsfaktor - wie z.B. PDGF-BB, IGF und TGF- β - die Wundheilung zusätzlich verbessert, weil die Verwendung dieser Kombinationen näher die physiologische Konstitution der Wunde imitiert als die Verwendung von ausschließlich einem Wachstumsfaktor.

Vorherige experimentelle Tierstudien haben gezeigt, dass die lokale Applikation von rekombiniertem humanen (rh)PDGF-BB in Kombination mit den Grundbestandteilen der gesteuerten Knochenregeneration das Potential haben könnten, die Knochenbildung in kranialen (Vikjaer et al 1997) oder periimplantären Knochendefekten (Becker et al 1992) zu begünstigen.

Kürzlich wurde ein sehr langsam resorbierendes xenogen-abgeleitetes Knochenersatzmaterial (partikuliert oder als Blocktransplant) in Betracht gezogen, um als geeignetes Gerüst für die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren wie z.B. BMP-2 (Jung et al. 2003; Schwarz et al 2008b) und PDGF-BB (Rezeptor Ligand-BB) (Lioubavina-Hack et al. 2005a; Simion et al 2006, 2007; Rocchietta et al. 2007) zu dienen. Erst vor kurzer Zeit wurde PDGF-BB in Kombination mit β -Tricalciumphosphat für die Behandlung von parodontalbezogenen Defekten durch die United States Food and Drug Administration in den USA genehmigt (Simion et al. 2006).

Ein förderlicher Effekt von rhPDGF-BB getränktem KEM (Knochenersatzmaterial) in Form eines Blocktransplantates wurde in einer Hundestudie vier Monate nach vertikaler Kieferkammaugmentation von Simion et al. beobachtet. Dieser positive Effekt zeigte sich hauptsächlich, wenn die augmentierten Areale nicht von einer nativen Kollagenmembran bedeckt waren (Simion et al. 2006). Obgleich dieser Typ von Kollagenmembran (CM) nachweislich die frühe transmembranäre Angiogenese unterstützt (Schwarz et al. 2006a), wird vermutet, dass ihr Einbringen die Osteoprogenitorzellen ausgrenzen könnte, die dem Periost entstammen (Simion et al 2006). Jedoch haben die Ergebnisse von jüngst durchgeführten experimentellen Studien gezeigt, dass das Einbringen von nativen Kollagenmembranen dazu führt, eine Stabilität für partikuläres KEM bei der lateralen Kieferkammaugmentation an Hunden zu sichern und dass sie scheinbar nicht mit der knocheninduktiven Kapazität von rhBMP-2 interferieren (Schwarz et al. 2008b).

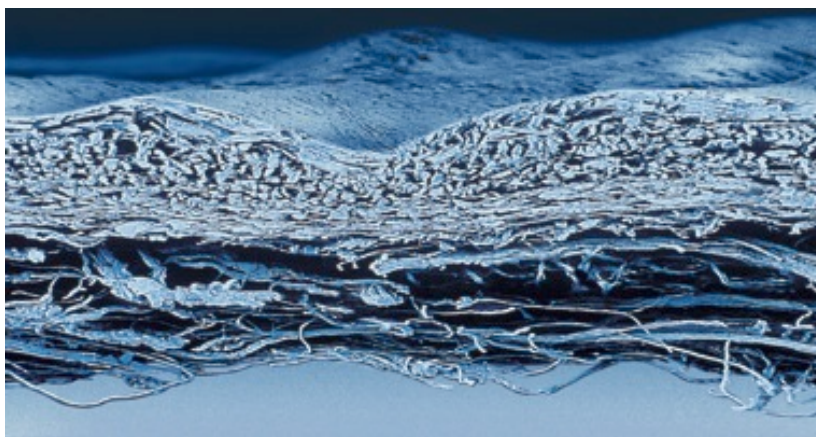


Abbildung 5

(Geistlich ® 2008, Biogide, HG-blau; mit freundlicher Genehmigung von Geistlich)

2. Ziele und Arbeitshypothesen

Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine histologischen Daten verfügbar, die den Effekt von partikulärem KEM mit und ohne den Zusatz von rhPDGF-BB für die laterale Kieferkammaugmentation bewerten. Obwohl Barrieremembranen grundsätzlich die Stabilisierung partikulären Knochenersatzmaterials insbesondere in nicht selbst erhaltenden Defektbereichen verbessern, kann die temporäre Separation des angrenzenden Periosts zu einer Verminderung der Vaskularisation und somit eingeschränkter Effektivität biologisch aktiver Faktoren (hier rhPDGF-BB) führen.

Für die vorliegende präklinische Untersuchung wurden nachfolgende Ziele formuliert:

1. den Effekt von rhPDGF-BB im initialen Stadium der Wundheilung bei lateraler Kieferkammaugmentation an chronischen Defekten unter Verwendung von partikulärem Knochenersatzmaterial zu bewerten.
2. den Einfluss einer nativen Kollagenmembran auf die biologische Aktivität von rhPDGF-BB in chronischen Defekten unter Verwendung von partikulärem Knochenersatzmaterial zu bewerten.

Nachfolgende Arbeitshypothesen wurden formuliert:

1. rhPDGF-BB hat einen positiven Einfluss auf die Vaskularisation und initiale Knochenregeneration
2. eine native Kollagenmembran fördert die transmembranäre Vaskularisation und nimmt somit keinen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität von rhPDGF-BB.

3. Material und Methode

3.1 Tiere

Für diese Studie wurden vier männliche Beagle-Hunde

Alter 18,5 +/- 1 Monat

Ø Gewicht 11,9 +/- 0,6kg

verwendet. Alle Tiere wiesen eine vollständig durchgebrochene, permanente Dentition auf. Während des Experimentes wurden die Hunde einmal pro Tag mit weicher Nahrung und Wasser versorgt. Die Studie wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt.

Der experimentelle Teil der Studie startete nach einer vierwöchigen Eingewöhnungsphase der Versuchstiere.

3.2 Studiendesign und Randomisierung

Die Studie wurde in zwei chirurgischen Phasen durchgeführt. In der ersten Phase wurde im Ober-(OK) und im Unterkiefer (UK) die Extraktion der zweiten, dritten und vierten Prämolaren sowie der ersten beiden Molare (P2-M2) bilateral an jedem Hund durchgeführt. Nach der Zahnextraktion wurden chirurgisch standardisierte, kastenförmige Defekte in jedem Quadranten an der bukkalen Fläche des Kieferkamms operativ geschaffen (drei im Unterkiefer und zwei im Oberkiefer). Nach acht Wochen geschlossener Einheilung wurden die chronischen Defekte zufällig im Splitmouth-Design zugeteilt, um den Einfluss von entweder rhPDGF-BB im UK oder einer Kollagenmembran mit rhPDGF-BB im OK zu ergründen.

Dementsprechend erhielten alle Hunde die folgende Behandlung:

OK: KEM+ rhPDGF-BB vs. KEM + rhPDGF-BB + CM

UK: KEM + rhPDGF-BB + CM vs. KEM + CM

Die zufällige Zuordnung wurde entsprechend einer computergenerierten Liste organisiert (Randlist, DatInf GmbH, Tübingen, Germany). Die Tiere wurden nach einer geschlossenen Wundheilung von drei Wochen eingeschläfert.

3.3 **Tabelle 3** Chirurgische Phase 1 (Zahnextraktion und Defektbildung)

Ablauf	Präparate und Dosierung	Hersteller
Präoperative Medikation	•intramuskulärer Sedierung mit 0,17mg/kg Acepromazine	•Vetranquil 1% Ceva Tiergesundheit Düsseldorf, D
Intraoperative Medikation	• Anästhesie wurde mit 21,5mg/kg Thiopentalsodium initiiert. • Während aller Eingriffe wurde eine Inhalationsnarkose mittels Sauerstoff, Lachgas und Isofluran durchgeführt. • Um die Hydratation aufrecht zu erhalten, erhielten alle Tiere eine konstante Infusion mit Laktatringerlösung. • Intraoperative Analgesie wurde über intravenöse Injektion von 0,4mg/kg Piritramid und 4,5mg/kg Carprofen herbeigeführt.	- Trapanal 2,5% Altana GmbH Konstanz, D - Dipidolors, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany - Rimadyl, Pfitzer Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Postoperative Medikation	• Piritramid und Carprofene wurden für drei Tage in der oben beschriebenen Dosis subkutan appliziert. • Prophylaktisch wurde intra- und postoperativ drei Tage Clindamycin verabreicht.	11mg/kg KG Clerobe, Pharmacia Tiergesundheit, Erlangen, D

In der ersten Operation wurden nach Präparation eines Mukoperiostlappen und Zahnseparation in beiden Kiefern vorsichtig bilateral P2-M2 entfernt. Nach der Extraktion wurden standardisierte, kastenförmige Defekte im bukkalen Kieferknochen in einer Distanz von 5 mm mit einer geraden Hartmetallfräse präpariert.

9 mm in der Höhe vom krestalen Knochen ausgehend

6 mm in die Tiefe von der Oberfläche des bukkalen Knochens ausgehend

12 mm Breite in mesiodistal Richtung



Abbildung 6

Die korrespondierende linguale Knochenwand wurde intakt gelassen.



Abbildung 7

Insgesamt wurden n=6 Defekte im UK bilateral präpariert. Vier dieser Defekte wurden verwendet, um den Einfluss von rhPDGF-BB auf die Knochenbildung in Kombination mit Knochenersatzmaterial und GBR einzuschätzen.

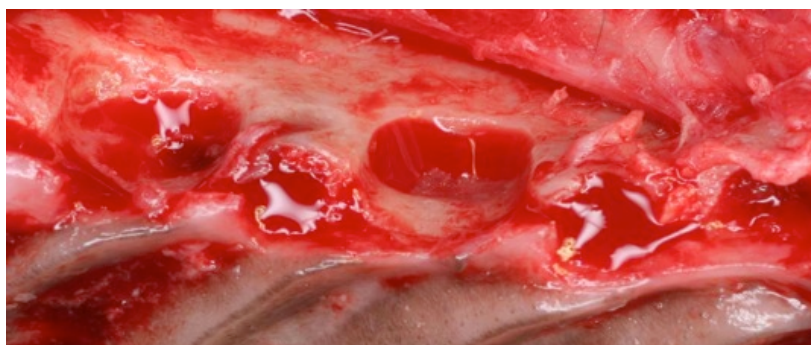


Abbildung 8

Insgesamt n=4 Defekte wurden im OK bilateral präpariert und bestimmt, um den Einfluss von GBR auf die Knochenbildung unter der Verwendung von rhPDGF-BB versetztem Knochenersatzmaterial, zu bemessen.

Die Defektgröße wurde durch die Benutzung einer Parodontalsonde standardisiert (PCP12, Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA). Insgesamt wurden n=6 Defekte im Unterkiefer präpariert, während der Oberkiefer nur insgesamt n=4 Defekte erlaubte (Abbildung 6, 7 und 8).

Tabelle 4a Dimension der chronisch-lateralen Kieferkammdefekte (mm) im UK (n=4 Hunde)

	KEM+rhPDGF+CM			KEM+CM		
	Mittelwert	Standard-abweichung	Median	Mittelwert	Standard-abweichung	Median
Höhe	8,70	0,50	8,60	8,42	0,46	8,50
Breite	10,87	1,10	11,25	10,45	0,88	10,40
Tiefe	3,55	0,64	3,80	3,17	0,38	3,35

Tabelle 4b Dimension der chronisch-lateralen Kieferkammdefekte (mm) im OK (n=4 Hunde)

	KEM+rhPDGF+CM			KEM+rhPDGF		
	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Höhe	7,85	0,77	8,00	8,12	0,56	8,20
Breite	9,82	0,61	9,80	10,17	0,76	10,25
Tiefe	3,45	0,63	3,55	3,55	0,38	3,65

Alle Osteotomien wurden unter ausreichender Kühlung mit steriler, 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Nach Wundverschluss mit Matratzennaht (Resorba, Nürnberg, Germany) konnten die Wunden für acht Wochen heilen.

3.4 Adsorption von rhPDGF-BB

Für die Durchtränkung wurde 0,5g partikuläres Knochenersatzmaterial mit 0,5ml rhPDGF-BB befeuchtet, die Kontrollprobe hingegen mit 0,5ml steriler Kochsalzlösung. Das KEM wurde jeweils nach einer Rehydratation von 15min implantiert.

	Material	Hersteller
Testgruppe	0,5g partikuläres Knochener- satzmaterial	Geistlich BioOss spongiosa Gra- nula, Partikelgröße 0,25-1mm, Geistlich Biomaterial, Wolhusen Schweiz
	0,5ml rhPDGF-BB (vorgefüllte Spritze mit 0,3mg/ml Inhalt)	XFBZ02, Osteohealth ®, Shirley, NY, USA
Kontrollgruppe	0,5g partikuläres Knochener- satzmaterial 0,5ml Kochsalzlösung	Geistlich BioOss spongiosa Gra- nula, Partikelgröße 0,25-1mm, Geistlich Biomaterial, Wolhusen Schweiz

Tabelle 5

Geistlich Bio-Oss® ist ein bovines Knochenersatzmaterial, welches aus deproteinierten, australischen Rinderknochen hergestellt wird. Die organische Komponente wird bei der Bearbeitung der Knochenpartikel vollständig eliminiert. Zurück bleibt eine harte anorganische Komponente aus Kalziumverbindungen, die als Leitstruktur für einwachsenden Knochen dienen soll(Geistlich®).

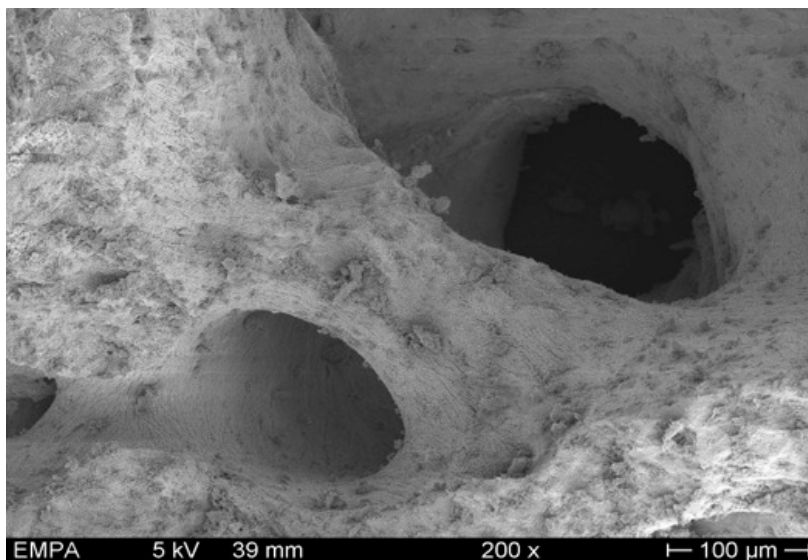


Abbildung 9

(Geistlich ®, Bio-Oss REM; mit freundlicher Genehmigung von Geistlich)

3.5 Operative Phase 2 (Knochenaugmentation)

In der zweiten operativen Phase wurden bilateral vestibuläre Inzisionen in beiden Kiefern angelegt und zur Freilegung der entsprechenden Bereiche ein Mukoperiostlappen präpariert.

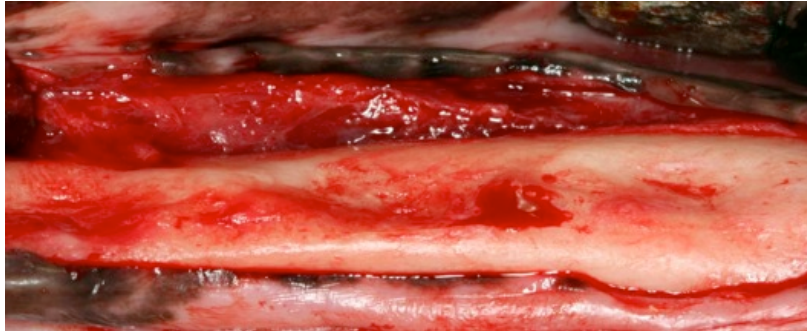


Abbildung 10

Hier zeigt sich der Kieferkamm 8 Wochen nach geschlossener Einheilung. Vor der Augmentation wurde das Granulationsgewebe sorgfältig entfernt.

Die Dimension des resultierenden Defektes wurde mit derselben Parodontalsonde gemessen (Tabelle 4a/b). Anschließend wurden vier Defekte im UK ($n = 2$ pro Seite) nach dem Zufallsprinzip mit partikulärem KEM (Geistlich BioOss spongiosa Granula, Partikelgröße 0,25-1mm, Geistlich Biomaterial, Wolhusen Schweiz) augmentiert, welches entweder mit rhPDGF-BB (Test1) oder mit Kochsalzlösung versetzt war (Kontrollgruppe1). Beide Gruppen wurden mit einer porkinen, nativen Kollagenmembran CM Typ I/III ohne Quervernetzungen bedeckt (Geistlich Biogide, Geistlich Biomaterial).

Für die verbleibenden Defektareale wurde ein alloplastisches Knochenersatzmaterial als Aggregatträger benutzt. Diesbezügliche Ergebnisse werden an anderer Stelle erwähnt (Schwarz et al. 2009).

BioGide (Geistlich Biomaterials)

Diese Membran ist entsprechend eines Bilayers aufgebaut. Sie zeigt auf der einen Seite eine glatte, zellokklusive Seite, während die andere Seite rau und offen porig ist (Geistlich Biomaterial). Ihre Struktur dient als Leitschiene für einwachsende Blutgefäße (Rothamel et al. 2005, Schwarz et al 2006a, Schwarz et al 2008b).

Durch ausreichende Integration in das umliegende Gewebe ohne dabei eine Fremdkörperreaktion auszulösen, soll die Membran das heilende Gewebe stabilisieren (Hardwick et al. 1994).

Im Oberkiefer wurde jeder Defektbereich mit rhPDGF-BB versetztem KEM augmentiert und entweder mit einer Kollagenmembran bedeckt (Test2) oder unbedeckt belassen (Kontrolle2). Entsprechend eines Splitmouth-Designs wurden die Defektareale der Test- oder der Kontrollgruppe zugeordnet. Die folgenden Bereiche im Ober- und Unterkiefer sind demzufolge von jedem Hund getestet:

Tabelle 6 Splitmouth-Design:

OK:	Areal 1+2	Areal 3+4
	KEM + rhPDGF-BB + CM (Testgruppe1)	KEM + rhPDGF-BB (Kontrollgruppe1)
UK:	Areal 1+2	Areal 3+4
	KEM + rhPDGF-BB + CM (Testgruppe 2)	KEM + CM (Kontrollgruppe 2)

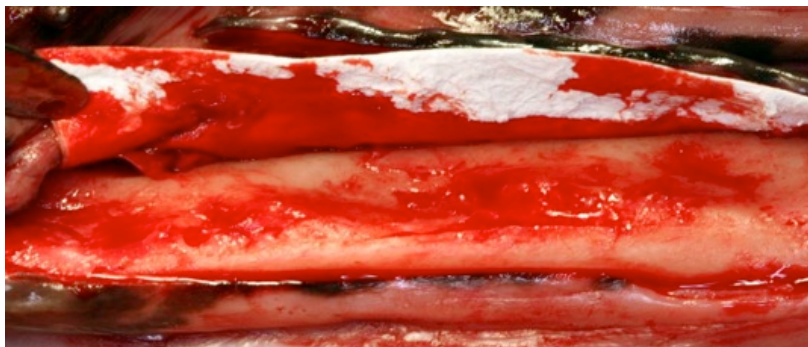


Abbildung 11

Vor der Augmentation in den entsprechenden Gruppen wurde die Kollagenmembran getrimmt und entlang des Kieferkamms adaptiert. Dies sollte die Stabilität des Knochenersatzmaterials am Defektboden sichern. (Unterkiefer)

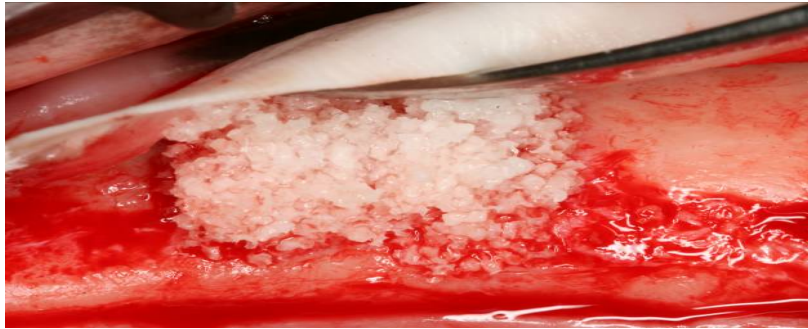


Abbildung 12

Das KEM wurde homogen in jeden Defekt eingebracht.

(0,1-0,15g KEM korrespondierend zu 0,03-0,045mg rhPDGF-BB pro Defekt)



Abbildung 13

Nach der Augmentation wurde die Kollagenmembran über den gesamten Defekt gelegt, sodass sie 1-2 mm des umgebenden Kieferkammes bedeckt. Weder Nähte noch Stifte wurden für die Membranfixation und Stabilisation eingesetzt.

Nach der Periostschlitzung wurde der Mukoperiostlappen angehoben, koronal reponiert und mit vertikalen oder horizontalen Matratzennähten (Resorba) fixiert, um optimale Heilungskonditionen zu erreichen.

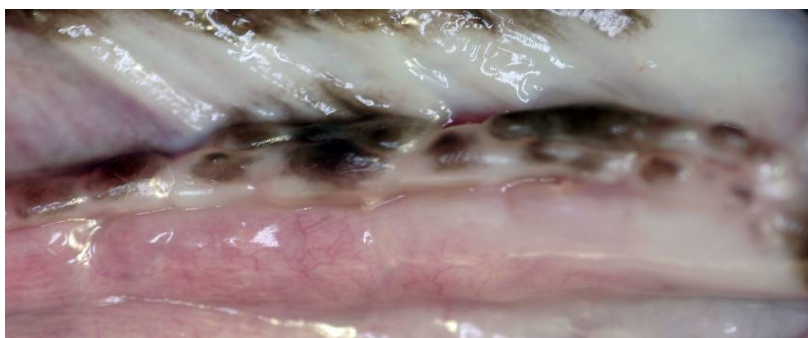


Abbildung 14

Das augmentierte Areal konnte für drei Wochen einheilen. Das Bild zeigt ein nicht-exponiertes Areal im Unterkiefer (KEM+rhPDGF-BB+CM) vor der Einschläferung des Hundes.

3.6 Untersuchung der Alkalinen Phosphatase (ALP) und Laktatdehydrogenase (LDH)

Zu Beginn des experimentellen Teils der Studie wurde der Effekt von SaOs-2 osteoblastenähnlichen Zellen (DSMZ No. ACC 243, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland) (vierte Passage 5×10^3 cells per culture well, 96-well flat-bottom plates (Corning Costar, Schipol-Rijk, the Netherlands)) durch die Induktion der Laktatdehydrogenasesynthese (LDH) (CytoTox 96 non-radioactivity, tototoxicity Assay, Promega Madison, WI, USA) (Zellproliferation) und der ALP (Biologische Aktivität) de novo Synthese am Tag 0 (2h) und 7 verifiziert. In zweifacher Ausführung wurde 0,5g rhPDGF-BB versetztes KEM gleichmäßig in insgesamt $n=24$ Behältnisse verteilt (vier Gruppen, $n = 6$ pro Gruppe), daraus resultiert eine finale rhPDGF-BB Konzentration von $6 \mu\text{g}/\text{Behältnis}$. Natives KEM diente als entsprechende Kontrollgruppe (vier Gruppen, $n= 6$ pro Gruppe). Das Kulturmedium (DMEM, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) wurde nach drei Tagen gewechselt. Für die ALP Probe wurden $80 \mu\text{l}$ einer Standardlösung (P6774, $50 \text{ U}/\mu\text{l}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), $20 \mu\text{l}$ einer Pufferlösung (5 mM MgCl_2 , 0.5 M 2-amino-2methyl-1-propanol), und $100 \mu\text{l}$ einer Substratlösung (0.5 M Paranitrophenylphosphat, A3469, Sigma-Aldrich) in jedes Behältnis hinzugefügt und für 1h bei 37°C inkubiert. Die LDH Probe wurde nach den Vorschriften des Händlers angewendet, wobei $50 \mu\text{l}$ Zelllysate mit $50 \mu\text{l}$ Substratlösung verwendet wurden. Mittels eines spektrophotometrischen Kartenlesers wurde die Absorption (ALP bei 405 nm oder LDH bei 492 nm) in jedem Behältnis gemessen. Die Messung wurde innerhalb einer Stunde nach Addition einer Stopplösung (ALP: 3 M NaOH) durchgeführt.

3.7 Bereitstellung des Probensatzes

Die Tiere wurden nach einer Einheitszeit von drei Wochen getötet. Durch die Carotis applizierte, 10% gepufferte Formalinlösung fixierte das orale Gewebe. Die Kiefer wurden reseziert und Blöcke mit Probenmaterial sichergestellt. Alle Einzelproben wurden in 10% neutralgepufferter Formalinlösung für 4-7 Tage fixiert.

3.8 **Tabelle 7** Histologische Präparation in zeitlicher Reihenfolge

Versuchsdurchführung	Materialquelle	Besondere Maßnahmen
Die Proben wurden unter der Verwendung einer Reihe aufsteigender Alkohole und Xylen dehydriert und für eine nicht-dekalzifizierende Sektion eingebettet in Methylmethacrylat.	MMA, Technovit9100 NEU, Heraeus Kulzer, Werheim, D	Während der Prozedur wurde jeglicher Einfluss von Polymerisationshitze dank kontrollierter Polymerisation in kalter Atmosphäre (-4°C) vermieden. Nach 20h waren die Proben vollständig polymerisiert.
Serienschnitte wurden vom Zentrum aller Defektareale in bukkoraler Richtung präpariert; ungefähr 10 Schnitte a ca. 500µm Dicke (Donath 1985).	Exakt®, Apparatebau, Nordestedt, D	
Anschließend wurden alle Proben mit Kleber (Acrylzement) auf Opakes Plexiglas geklebt.	Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim D	
Die Schnitte wurden auf eine finale Dicke von ungefähr 30µm abgeschliffen.		
Gleichmäßige und zufällige Zuteilung der histomorphometrischen (T1) oder der immunhistochemischen Analyse (T2)	(1) Toluidine Blau Färbung- TB (2) Siehe 2.9	Keine Abstoßungsreaktion

3.9 **Tabelle 8** Immunhistochemische Untersuchung in zeitlicher Abfolge:

Versuchsdurchführung	Materialquelle	Hinweise
Die in MMA- eingebetteten Gewebe- stücke wurden in Xylen deplastifiziert.		(2x 30min) (Schwarz et al. 2008a, 2008b)
Behandlung mit 2-Methoxyethylacetat		(2x20min) (Schwarz et al. 2008a, 2008b)
Behandlung mit Aceton		(2x5min) (Schwarz et al. 2008a, 2008b)
Rehydratation in Phos- phat-pufferlösung (PBS)		
Antigendemaskierung, die Schnitte wurden in Trypsin inkubiert.	0,05% in PBS, PAA Laborato- ries GmbH, Austria	(15min bei 37°C)
Die Aktivität der endo- genen Peroxidase wurde durch 0,9% hydrogene Peroxidase in PBS ge- tilgt.		(10min bei Raumtemperatur)
Die Proben wurden ge- waschen und nicht- spezifische Bindungs- stellen mit einer Blo- ckierungslösung besetzt.	DakoCytomation, Hamburg, Germany	(30min)
Der primäre mono- klonale Antikörper der Maus zu Transgluta- minase II (TG) (Angio- genese) und die kor- responierenden unspezi- fischen Antikörper ent- sprechend als Negativ-	(1 : 40 Verdünnung, Labvision, Fremont, CA, USA) (MausIgG1) (DakoCytomati- on)	(über Nacht bei 8°)

kontrolle wurden in einem befeuchteten Raum auf die Gewebeschnitte appliziert und inkubiert.

Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und mit sekundärem Biotin-markiertem Primer für Antimausantikörper inkubiert.	1:50 Verdünnung, DakoCytomation	(90min bei Raumtemperatur)
--	---------------------------------	----------------------------

Waschung mit PBS

Visualisierung von Antigen-Antikörperkomplexen unter Verwendung einer Strepta-vidinperoxidase Lösung und AEC (3-amino-9-ethylcarbozole) als Chromogen	1:250 Verdünnung, DakoCytomation
---	----------------------------------

3.10 Histologische Analyse

Für die Bildgewinnung wurde eine Farb-CCD-Kamera (Color View III, Olympus, Hamburg, Germany) auf einem binokularen Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus) angebracht. Digitale Bilder (originale Vergrößerung 200x) wurden mit Hilfe eines Softwareprogramms (analysis FIVE, Soft image system, Münster Germany) ausgewertet. Die folgenden Merkmale wurden in den gefärbten Bereichen identifiziert:

der Boden des Knochendefekts (BD)
die koronale Extension des Kieferkamms angrenzend an BC
Defektlänge (DL) in mm wurde vom BD zu BC gemessen (Basis für AA)
Bemessungen des augmentierten Areals in mm ² (AA)
neu gebildeter mineralisierter Knochen (MT) + nicht mineralisiertes Gewebe(NMT)
der Betrag an verbleibendem KEM (NBM)

Im augmentierten Defektbereich wurde das Areal von neu gebildeten mineralisierten Knochen (MT) und nicht mineralisiertem Gewebe (NMT) genauso wie der Betrag an verbleibendem KEM automatisch durch die Bildanalysesoftware geschätzt (mm²). Vor Beginn der morphometrischen Analyse wurde ein Kalibriervorgang sowohl für die Bildanalysesoftware, als auch für den erfahrenen Forscher durchlaufen. Es zeigte sich, dass wiederholte Messungen von n=12 unterschiedlichen Bereichen in mehr als 95% entsprechend ähnlich waren.

3.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Softwareprogramms (SPSS 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung wurden für jede Variable und Gruppe berechnet. Die Datenreihen wurden durch den Kolmogorow-Smirnow-Test für den normalen Vertrieb untersucht. Gruppenvergleiche von Mittelwerten der ALP und LDH wurden unter Zuhilfenahme des t-Tests durchgeführt. Der Alphafehler wurde bei 0,05 gesetzt. Auf Grund der geringen Anzahl an Tieren wurden nur deskriptive statistische Analysen der klinischen (Defektdimension) und histomorphometrischen Parameter angewendet.

4. Ergebnisse

4.1 Wundheilung

Die postoperative Wundheilung verlief bei allen Hunden ohne Besonderheiten. Es wurden während der gesamten Studie keine Komplikationen beobachtet (Bild 1.8).



Abbildung 15

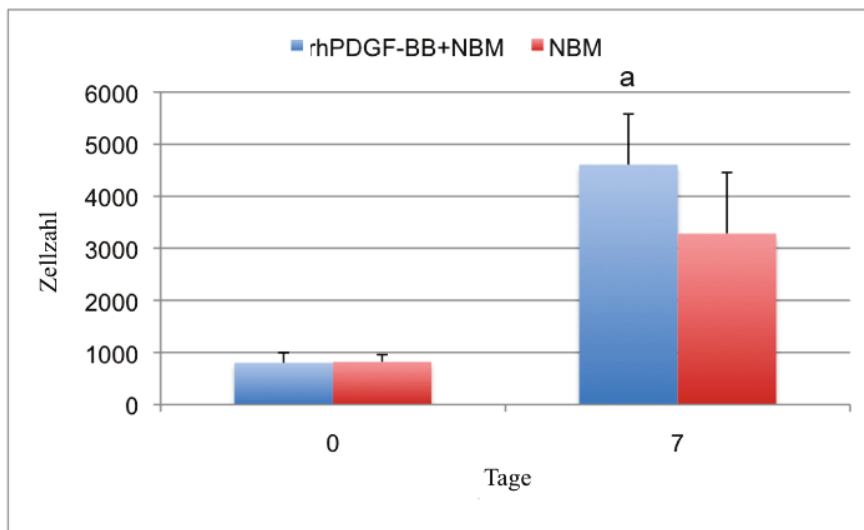
Aus der statistischen Analyse wurden zwei Defektareale ausgeschlossen. Bei diesen Defekten kam es zu einer frühzeitigen Exposition des augmentierten Areal.

(UK: KEM + rhPDGF-BB + CM und KEM + CM)

4.2 ALP- und Laktatdehydrogenaseversuch (engl. „-assay“)

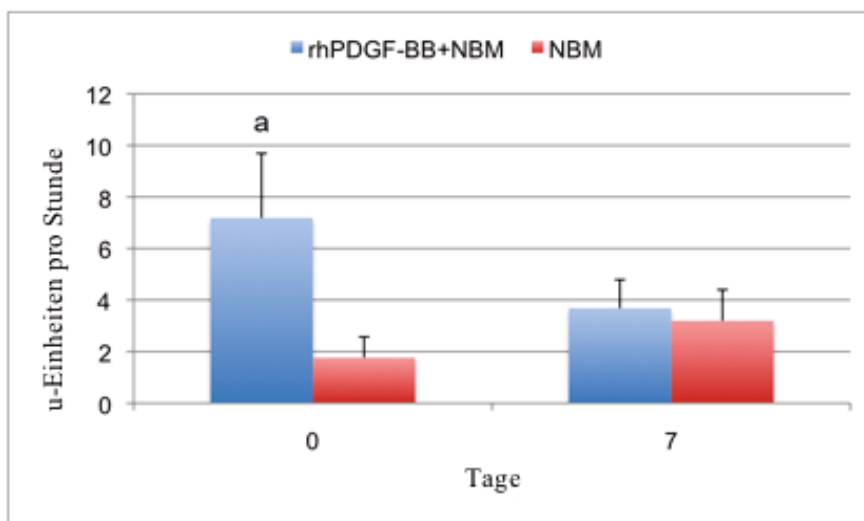
Die in vitro Freisetzung von rhPDGF-BB aus getränktem Knochenersatzmaterial wurde in einer SaOs-2 osteoblastenähnlichen Zellkultur an Tag 0 (2h) und 7 gemessen. Die Abbildung 16 zeigt das Verhältnis von mittlerer Zellzahl bezogen auf die Messtage. Der blaue Balken steht für die Testgruppe (rhPDGF-BB + KEM), der rote Balken steht für die Kontrollgruppe (natives KEM). Die LDH-Probe zeigte eine signifikant erhöhte mittlere Zellzahl in der Testgruppe (rhPDGF-BB + KEM) ($P < 0,01$; unpaarter t-Test) an Tag 7 (Abbildung 16) im Vergleich zu nativem Knochenersatzmaterial in der Kontrollgruppe. Die mittlere Zellzahl stieg innerhalb der Testgruppe von 900 auf 4500, während sie in der Kontrollgruppe nur auf 3200 anstieg.

Abbildung 16:



Die relative biologische Aktivität stellt sich durch die mittlere ALP-Produktion der Zellen in Mikroeinheiten pro Stunde in der Abbildung 17 dar. Der blaue Balken steht für die Testgruppe (rhPDGF-BB + KEM), der rote Balken steht für die Kontrollgruppe (natives KEM). Sie war in der Testgruppe (rhPDGF-BB+KEM)($P < 0,001$; unpaarter t-Test) bereits nach zwei Stunden Inkubationszeit signifikant erhöht (Abbildung 17). Nach sieben Tagen Inkubationszeit wiesen sowohl die Test- als auch die Kontrollgruppe annähernd ähnliche Werte für die biologische Aktivität auf.

Abbildung 17:



4.3 Histomorphometrische Analyse/ histologische Beobachtung

Sowohl die Test- wie auch die Kontrollgruppe zeigten vergleichbare Werte (Mittel und Zentralwert) im Ober- und Unterkiefer (Tabelle 4a und b).

Die histomorphometrischen Ergebnisse für

das augmentierte Areal (AA),

den neugebildeten mineralisierten Knochen (MT),

das nicht mineralisierte Gewebe (NMT) und

das verbleibende Knochenersatzmaterial (KEM = NBM)

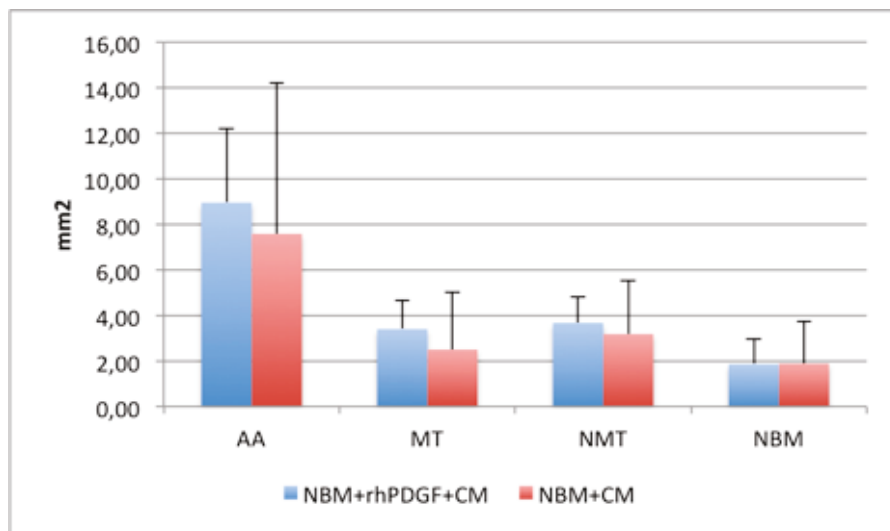
sind in den Tabellen 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9 Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm²) – im UK (n=4)

	NBM+rhPDGF+Membran			NBM+Membran		
	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
AA	8,95	3,25	9,28	7,58	3,25	6,62
MT	3,40	1,25	3,05	2,50	1,09	2,52
NMT	3,67	1,15	3,90	3,18	2,06	2,34
NBM	1,86	1,09	1,76	1,89	1,35	1,82

Die Abbildung 18 zeigt die Fläche des augmentierten Areals, des mineralisierten Gewebes, des nichtmineralisierten Gewebes und des Knochenersatzmaterial mm² in der Test- und der Kontrollgruppe im Unterkiefer. Der blaue Balken steht für die Testgruppe (rhPDGF-BB + KEM), der rote Balken steht für die Kontrollgruppe (natives KEM). Die histomorphometrische Messung ergibt ähnliche Messwerte in beiden Gruppen (Tab.9; Abbildung 18).

Abbildung 18: Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm²) – im UK (n=4) in grafischer Darstellung

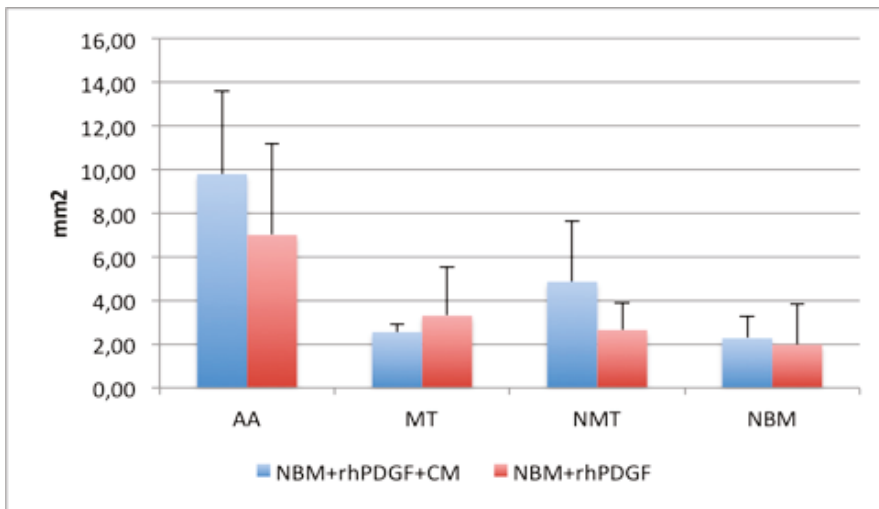


Die Abbildung 19 zeigt die Fläche des augmentierten Areals, des mineralisierten Gewebes, des nichtmineralisierten Gewebes und des Knochenersatzmaterial mm² in der Test- und der Kontrollgruppe im Oberkiefer. Der blaue Balken steht für die Testgruppe (rhPDGF-BB + KEM + CM), der rote Balken steht für die Kontrollgruppe (rhPDGF + KEM). Die histomorphometrische Messung ergibt ähnliche Messwerte in beiden Gruppen (Tab.10; Abbildung 19).

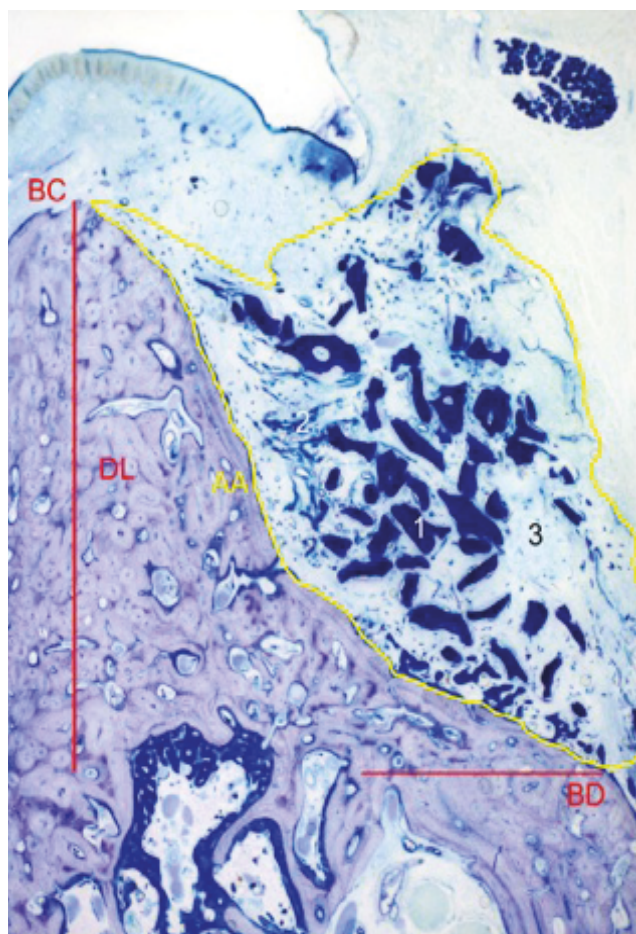
Tabelle 10 Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm²) – im OK (n=4)

	NBM+rhPDGF+Membran			NBM+rhPDGF		
	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
AA	9,79	3,78	8,25	7,00	4,17	4,71
MT	2,55	0,36	2,55	3,30	2,21	2,90
NMT	4,86	2,76	3,65	2,65	1,23	2,52
NBM	2,27	0,98	2,35	1,97	1,85	1,60

Abbildung 19: Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm²) – im OK (n=4) in grafischer Darstellung



Die folgenden Orientierungspunkte sind in der Touluidineblau-Färbung zu sehen:



- BD Boden des Knochendefektes (engl.: bottom of the bone defect)
- BC koronale Extension des Alveolarkammes angrenzend an den Defekt
- DL Defektlänge (mm); gemessen von BC zu BD, es dient als Basis für die Messung des AA
- AA Im AA (mm²) ist das Areal des verbleibenden Knochenersatz-materials (NBM) (1), das neu-gebildete mineralisierte (2) und das nichtmineralisierte Gewebe (3) automatisch mittels Image Analysis Software (Test group, lower jaw, TG stain, original magnification x 25) eingerechnet.
- NBM Knochenersatzmaterial (NBM = natural bone mineral; deutsch: KEM)

Abbildung 20 Messpunkte im Wundbereich

4.4 UK- Einfluss von rhPDGF-BB

Aus den histologischen Untersuchungen geht hervor, dass die Kollagenmembran die Stabilität des Knochenersatzmaterials im Bereich des krestalen Kieferkammabschnittes unterstützt (Abbildung 20 und 21).

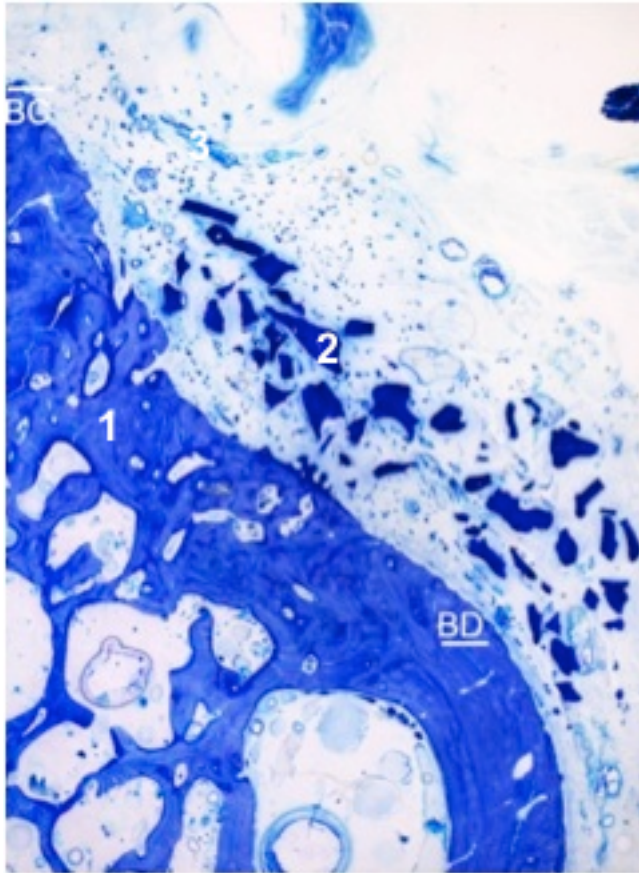


Abbildung 21

Die Abbildung zeigt den durch eine Kollagenmembran abgedeckten, augmentierten Defektbereich lateral des Kieferkammes im Unterkiefer.

(Kontrollgruppe 2, TB-Färbung, Originalvergrößerung x25)

- 1 ortsständiger Knochen
- 2 Knochenersatzmaterial
- 3 Kollagenmembran
- BC krestaler Kieferkamm
- BD Defektboden

Die Gewebeintegration der Membran verlief in allen Proben ohne besondere Auffälligkeiten. Ein Spalt zwischen der Kollagenmembran und dem angrenzenden Bindegewebe wurde nur gelegentlich beobachtet. Die Korrelation zu einer spezifischen Gruppe war nicht ersichtlich. Histomorphometrische Analysen zeigten vergleichbare Werte (Mittelwert und Median) in der Testgruppe 2 (KEM+rhPDGF-BB+CM) und Kontrollgruppe 2 (KEM+CM). Grundsätzlich schien die initiale Matrixmineralisation in allen Defektarealen demselben Schema zu folgen. Durch die Toulooudineblau-Färbung wurden winzige Mineralisationszentren sichtbar, die ihren Ursprung hauptsächlich in den lateralen und basalen Wänden des angrenzenden Alveolarknochens nahmen. Die auf diese Weise gebildeten Trabekel breiteten sich homogen sowohl in koronaler als auch zentraler Richtung in das Wundgebiet aus. Die primäre Invasion verlief entlang der Leitstruktur des KEM in engem Kontakt mit den Partikeln (Abbildung 21 und 22).

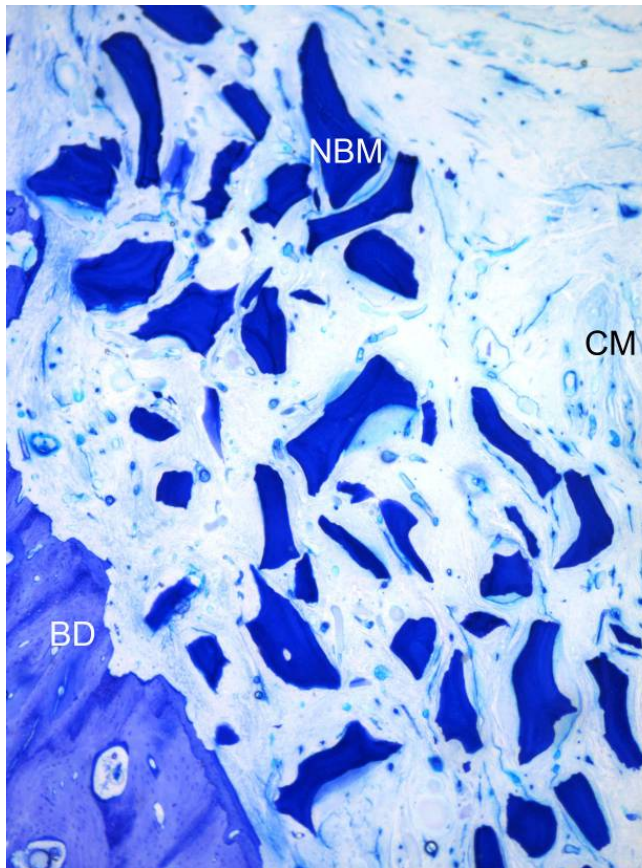


Abbildung 22

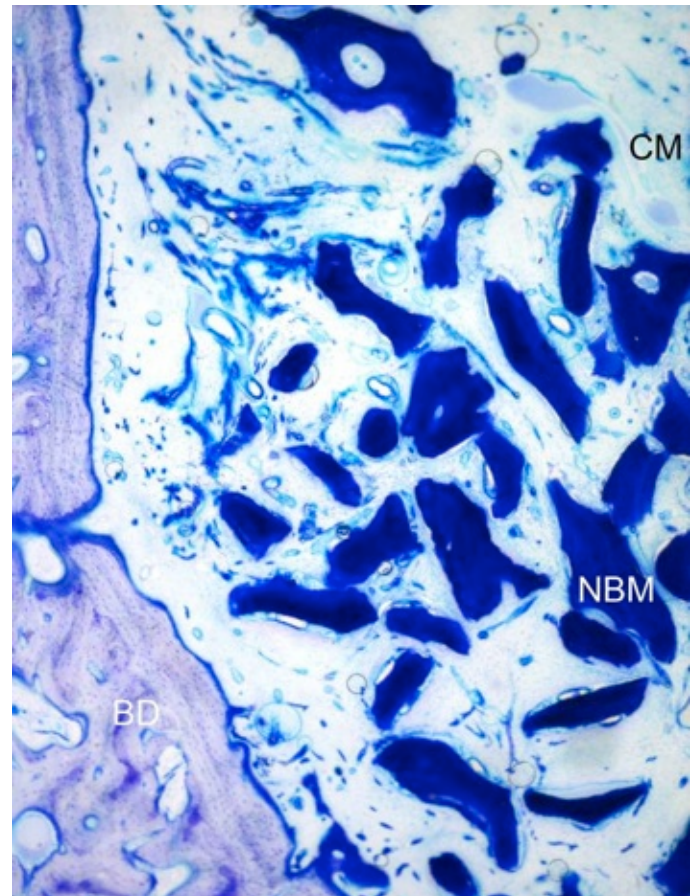
Die Histologie zeigt das initiale Muster der Knochenbildung, die primär aus offenen Markräumen des angrenzenden Alveolarknochens entstammt. Sowohl die Test- als auch die Kontrollgruppe 2 zeigen vergleichbare Ergebnisse.

(Kontrollgruppe 2, TB-Färbung, Originalvergrößerung x30)

Wenige, von der Ausdehnung eher zu vernachlässigende, mineralisierende Punkte wurden auch im submembranösen Gewebe der Kollagenmembran gefunden. Diese Areale schienen - bisher ohne plausible Erklärung - nur einen kleinen Bereich des augmentierten Areals zu besetzen. Das neu gebildete, mineralisierte Gewebe entstammte hauptsächlich dem umgebenden Alveolarknochen (Abbildung 20 und 21).

Abbildung 23

Viele histologische Proben sind durch eine unreife Erscheinung des neu gebildeten, trabekulären Knochens gekennzeichnet. (Testgruppe 2, TB_Färbung, Originalvergrößerung x100)



Die meisten entnommenen Proben wiesen primitiv erscheinende Knochentrabekel auf, welche hauptsächlich aus Osteoid bestanden (Abbildung 23). Dennoch zeigten einige Proben einen reifen, verflochtenen Knochen, der durch mineralisierte Matrix und zahlreiche, in großen Lakunen liegende Osteozyten charakterisiert ist (Abbildung 24). Unterschiede in der Reifung des mineralisierten Gewebes sind zwischen den Gruppen nicht erkennbar.

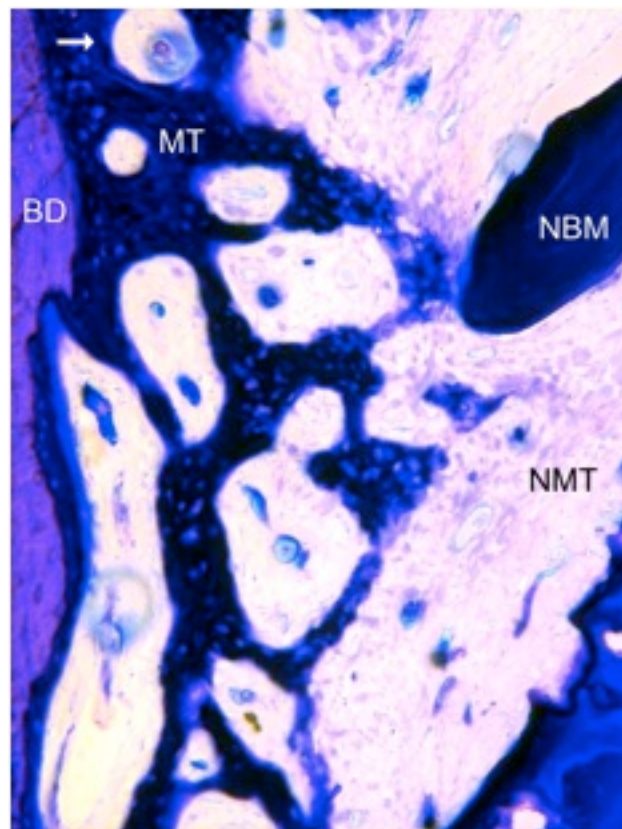


Abbildung 24

Manche Proben zeichnen sich durch einen reifen, trabekulären Geflechtknochen aus, der in engem Kontakt mit den Partikeln des Knochenersatzmaterials steht. Oben links im Bild ist charakteristisch für alle Gruppen ein Osteozyt in einer großen Lakune erkennbar (→).

(Kontrollgruppe, TB-Färbung, Originalvergrößerung x100)

Die immunhistochemische Färbung der Präparate für die Transglutaminase II (TG) zeigte die Bildung vaskulärer Strukturen, die ursprünglich aus offenen Markräumen des angrenzenden Alveolarknochens stammten. Die meisten der Gefäße glichen sinusoidalen Kapillaren mit vielen Anastomosen. In der vorrückenden Front des mineralisierenden Gewebes schienen die Trabekel die Blutgefäße zu umschließen und auf diese Weise den intertrabekulären Raum zu einzugrenzen.

Obwohl das Muster der Angiogenese sich in beiden Gruppen vergleichbar darstellt, war die TG-Antigenreaktivität insbesondere in der Testgruppe (Abbildung 25 und 26) erhöht.

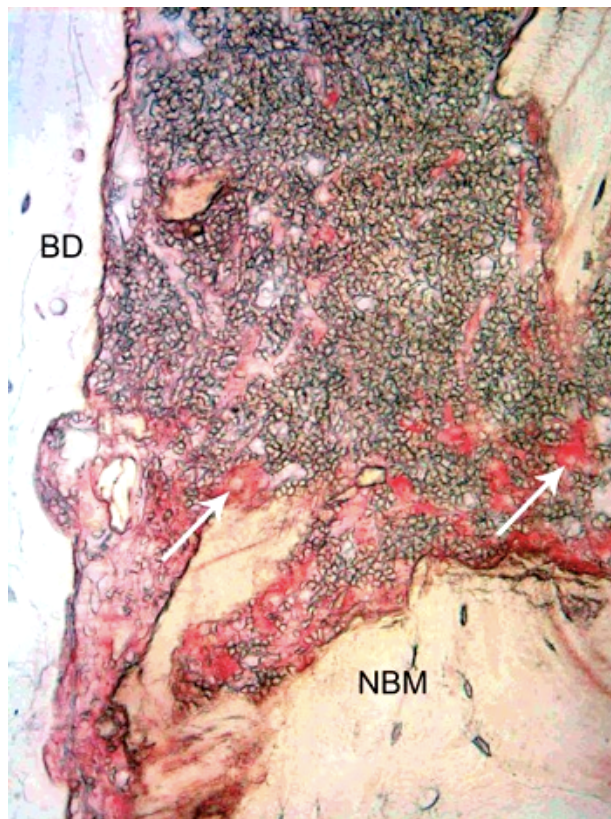


Abbildung 25

Die Bildung eines vaskulären Systems (→) wurde in der Test- und Kontrollgruppe 2 gleichermaßen beobachtet.

(Kontrollgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung x200)

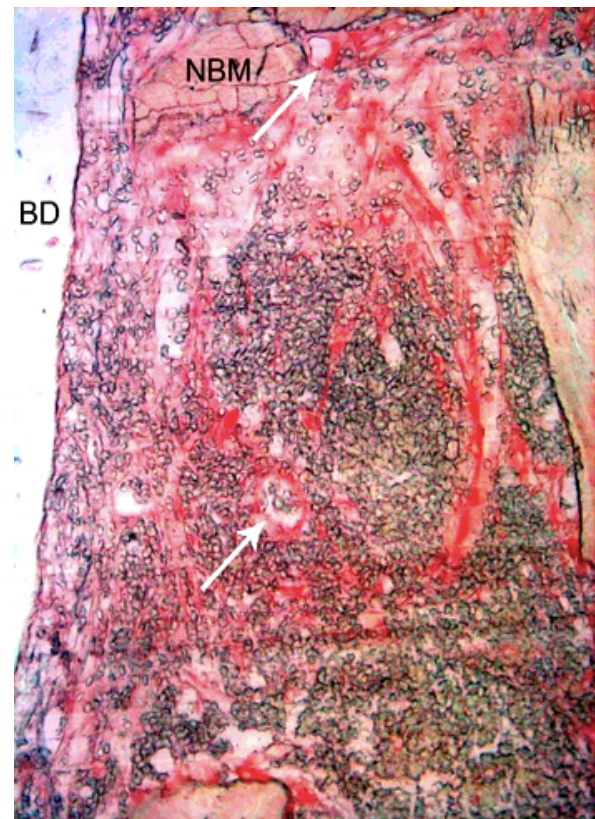


Abbildung 26

Die TG-Antigenaktivität (→) war im Wundbereich der Testgruppe sichtbar ausgeprägter.

(Kontrollgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung x200)

Aus der histomorphometrischen Analyse ging hervor, dass trotz ähnlicher Mengen an Knochenersatzmaterial die Werte (Mittelwert und Median) für das mineralisierte Gewebe in der Testgruppe 2 (KEM + rhPDGF-BB + CM) höher waren als in der korrespondierenden Kontrollgruppe 2 (KEM + CM) (siehe Tabelle 9).

4.5 OK- Einfluss der gesteuerten Knochenregeneration

Das Knochenersatzmaterial der Testgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB + CM) wurde durch die Verwendung der Kollagenmembran zusätzlich zu den stützenden Knochenwänden im Defektbereich stabilisiert. Aus Tabelle 10 ist zu entnehmen, dass in der Kontrollgruppe 1 geringfügig weniger Knochenersatzmaterial eingebracht wurde als in der Testgruppe 1. Im Gegensatz zur Testgruppe rutschten in der Kontrollgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB) geringe Mengen des Knochenersatzmaterials aus dem Defektbereich heraus. Ähnlich eines Sandsackphänomens folgten die Partikel der Lücke unterhalb des Periostes entlang des Alveolarkammes; dies resultierte in einer minimalen Dislokation des augmentierten Areals nach kaudal (Abbildung 27 und 28).

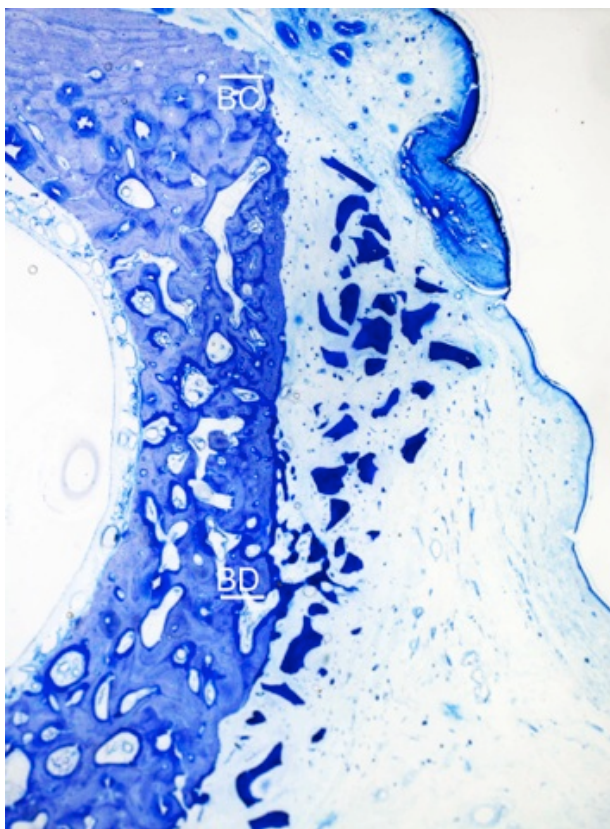


Abbildung 27

Die Kontrollgruppe zeigte eine leichte Dislokation des Knochenersatzmaterials nach kaudal.

(TB-Färbung, Originalvergrößerung 25x)

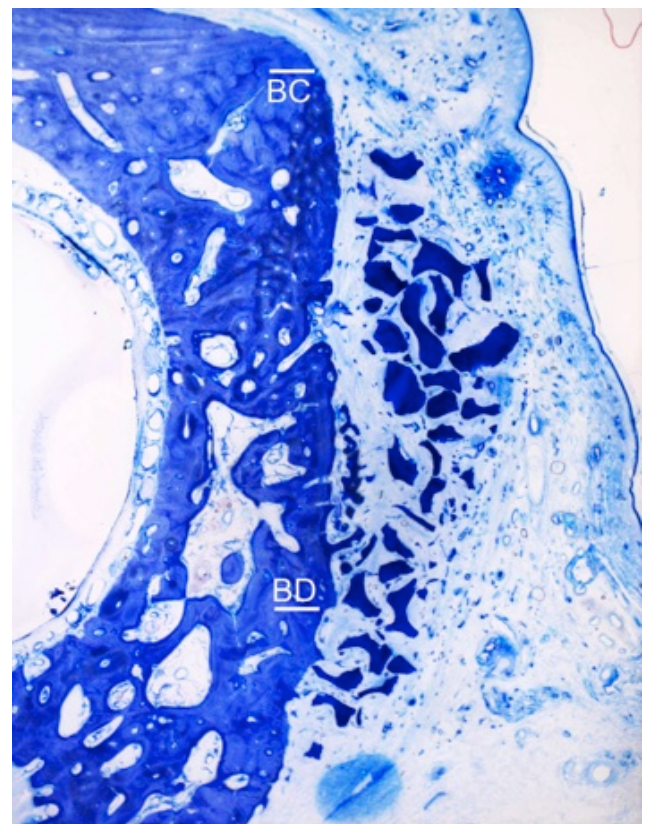


Abbildung 28

Die Partikel des Knochenersatzmaterials wurden in allen Defektarealen homogen stabilisiert.

(TB_Färbung, Originalvergrößerung 25x)

Im Oberkiefer zeigten sowohl Testgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB + CM) als auch Kontrollgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB) eine vergleichbare TG-Antigenaktivität. Prinzipiell schien die initiale Knochenbildung sowohl in der Testgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB + CM) als auch in der Kontrollgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB) nach demselben Schema abzulaufen - wie es auch im Unterkiefer beobachtet wurde. Der Defektbereich wurde ausgehend von offenen Markräumen des Alveolarkamms mit Knochen durchbaut. Hierbei handelte es sich um einen trabekulär durchwobenen Knochen variierender Dichte. Neu gebildete Blutgefäße und Mineralisationszentren schienen straff miteinander verbunden zu sein. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen wurde in Hinblick auf die Ergebnisse der Knochenneubildung im peripheren Kompartiment des Wundbereiches beobachtet. Besonders hervorstechend war die ausgeprägt trabekulär durchwobene Knochenstruktur aller Proben der Kontrollgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB) im neu gebildeten Knochen unterhalb des Periostes. Diese Mineralisationszentren sind auch in tiefere Bereiche des Wundareals vorgedrungen und haben dort die Partikel des Knochenersatzmaterials bedeckt. Dies führte zu einer Fusion der peripheren Mineralisationszentren mit dem, aus dem Alveolarkamm entsprungenen, mineralisierten Gewebe (Abbildung 29 und 30).

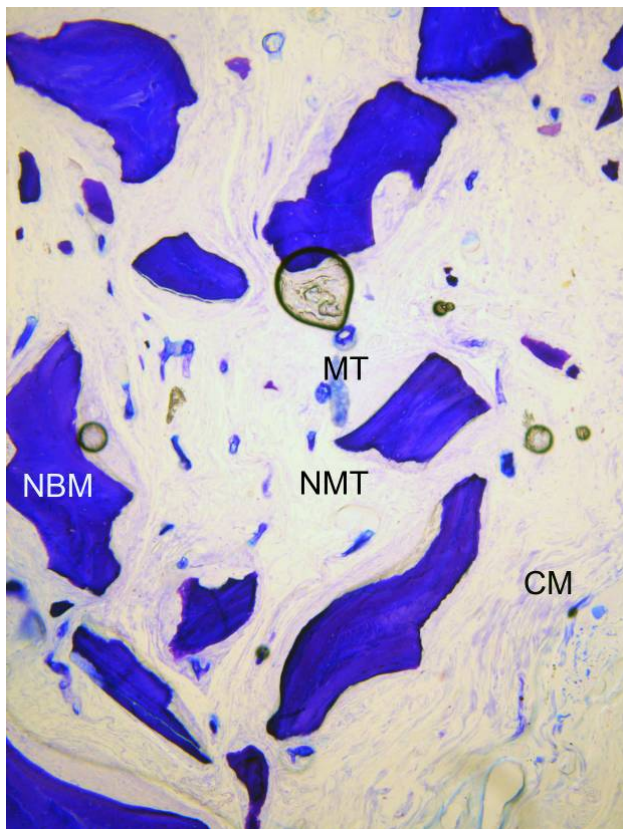


Abbildung 29

Die Abbildung links zeigt kleine Mineralisationszentren im submembranösen Gewebe der Testgruppe 1. Sie liegen in engem Kontakt zu den Partikeln des Knochenersatzmaterials. (TB-Färbung, Originalvergrößerung 40x)

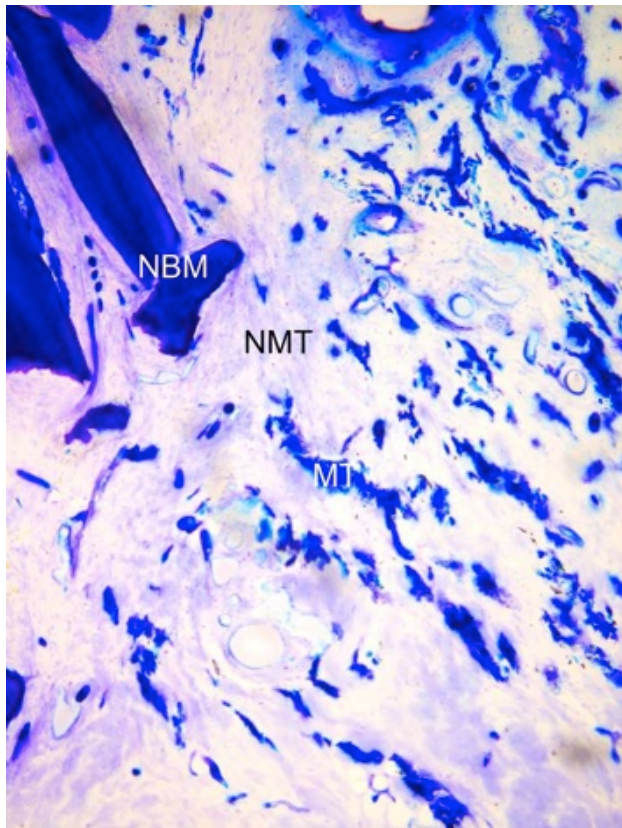
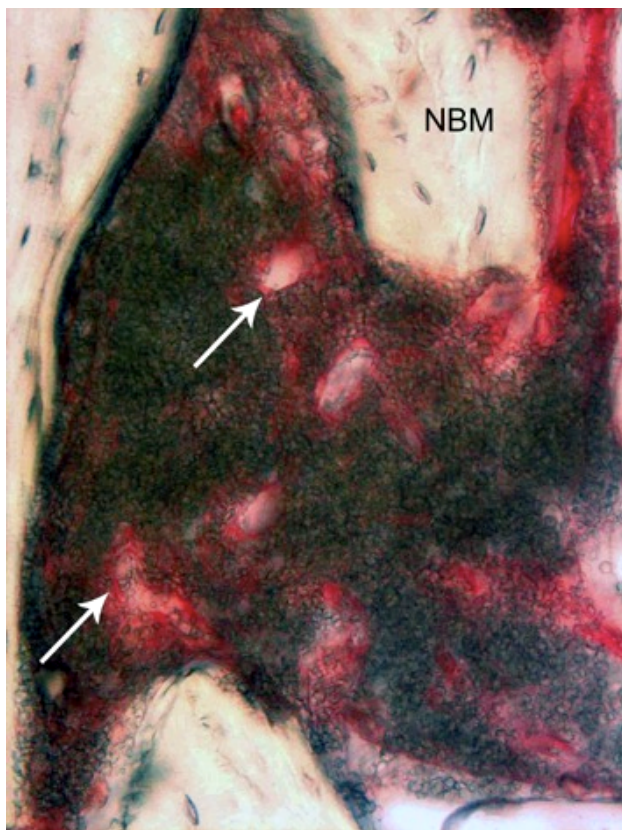


Abbildung 30

Die Abbildung links verdeutlicht den ausgeprägt trabekulären Geflechtknochen im peripheren Kompartiment der Wunde in der Kontrollgruppe 1. (TB-Färbung, Originalvergrößerung 40x)



Alle Proben der Kontrollgruppe 1 (KEM + rhPDGF-BB) wiesen in der immunhistochemischen Analyse ein gut vaskularisiertes, subepitheliales Bindegewebe auf, welches eine ausgeprägte TG-Antigenreaktivität innerhalb der Wand der Blutgefäße zeigte. Das ursprüngliche Gefäßsystem dilatierte, ausgelöst durch den Reiz des gesetzten Wunddefektes. Die subepitheliale Region wurde zusätzlich zu den bereits vorhandenen Gefäßen durch kleinere neu gebildete Gefäße durchwandert (Abbildung 31).

Abbildung 31

Die Abbildung links zeigt das gut vaskularisierte, subepitheliale Bindegewebe mit kleineren Gefäßneubildungen und dilatierten, bereits existierenden Gefäßen (→).

(Kontrollgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

In allen Testproben trennte die Kollagenmembran die gut vaskularisierte Gewebezone vom Augmentat. Jedoch sind zahlreiche neu gebildete Blutgefäße homogen in die externe, mittlere und interne Schicht der Kollagenmembran infiltriert und haben sich verbreitet. Wenn die Blutgefäße einmal das submembranöse Kompartiment des Wundbereiches erreicht hatten, schien ihr Wachstum in Richtung der angrenzenden Partikel des Knochenersatzmaterials gerichtet zu sein (Abbildung 32).

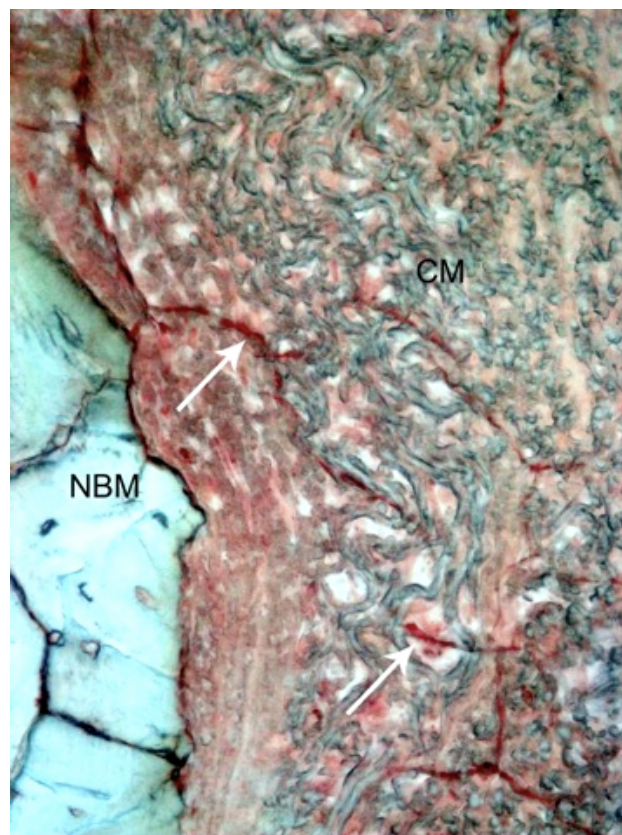


Abbildung 32

Neu gebildete Blutgefäße (→) sind homogen in die Kollagenmembran eingesprosst und vaskularisieren das submembranösen Kompartiments des Wundareals.

(Testgruppe 1, TG-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

Aus der deskriptiven, statistischen Analyse gingen bezogen auf die Neubildung mineralisierten Gewebes vergleichbare Ergebnisse (Median) in allen Gruppen hervor.

5. Diskussion

Dies sind die ersten experimentellen Daten, die über die Wundheilung an chronisch-lateralen Kieferkammdefekten unter der Verwendung von rhPDGF-BB versetztem Knochenersatzmaterial in Kombination mit einer nativen Kollagenmembran berichten.

Die aktuelle Studie wurde primär designed, um den Effekt von rhPDGF-BB im initialen Stadium der Wundheilung bei lateraler Kieferkammaugmentation an chronischen Defekten unter Verwendung von partikulärem Knochenersatzmaterial auszuwerten. Hierfür wurde ein partikuläres Knochenersatzmaterial als Transportvehikel verwendet. Als Versuchstiere wurden Beagle-Hunde ausgewählt. Das sekundäre Ziel bestand darin, den Einfluss einer nativen Kollagenmembran auf die biologische Aktivität von rhPDGF-BB in chronischen Defekten unter Verwendung von partikulärem Knochenersatzmaterial zu bewerten. Die experimentellen Modalitäten, wie beispielsweise die Ausmaße der nicht selbsterhaltenden Kieferkammdefekte, die Wahl des Knochenersatzmaterials, der Studienaufbau etc. wurden entsprechend vorangegangener Studien konfiguriert, die dasselbe Modell benutzt haben (von Arx et al. 2001a, 2001b; Araújo et al. 2002; Schwarz et al. 2008b). Jedoch muss betont werden, dass die aktuelle Studie nicht die statistische Aussagekraft hat, die möglichen Unterschiede zwischen den Gruppen herauszustellen.

5.1 Diskussion der Wirkung von rhPDGF-BB im Vergleich zu anderen Studien

Grundsätzlich manifestiert sich in den aktuellen, histomorphometrischen Analysen eine begünstigende Wirkung des rhPDGF-BB auf die Summe an mineralisiertem Gewebe (MT).

Sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe entstammten die Mineralisationszentren hauptsächlich den Defektgrenzen des umliegenden Alveolarknochens. Innerhalb der Gruppen hat sich insbesondere die Reifung des mineralisierten Gewebes (MT) unterschieden und schien nicht von der Präsenz oder Abstinenz des zugefügten Wachstumsfaktors beeinflusst zu sein. Jedoch bekräftigt diese Beobachtung die Ergebnisse von kürzlich durchgeführten Tierstudien, die ein alloplastisches Knochenersatzmaterial (biphasisches Kalziumphosphat bestehend aus 60% HA und 40% β -TCP) als Trägersystem verwendeten (Schwarz et al 2009). In einem nahezu identischen Studiendesign zeigte die Testgruppe in der Mandibula nach drei Wochen der Wundheilung eine signifikante Steigerung des mineralisierten Gewebes (MT) und in Konsequenz des augmentierten Areals (AA) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Apriori muss die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Transportmolekülsystemen als entscheidender Schritt zur Bereitstellung therapeutischer Konzentrationen über eine suffiziente Zeitperiode betrachtet werden. Problematisch schien bisher die optimale Dosis für rhPDGF-BB zu sein. Mehrere Forschungsgruppen vermuteten eine empfindliche Dosiswirkungsbeziehung, das Optimum ist jedoch noch nicht genau definiert (Marden et al. 1993) (Bateman et al. 2005). In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die Adsorption von rhPDGF-BB durch die Knochenersatzmaterialien und demzufolge die Freisetzungskinetik weiterhin unbekannt sind. Obwohl die biologische Aktivität von getränktem Knochenersatzmaterial in vitro über eine Periode von sieben Tagen mittels ALP und LDH-Versuche verifiziert wurde, ist es unmöglich abzuschätzen, ob diese Erkenntnisse auf ein alternierendes, biologisches System transferiert werden können.

In der gegenwärtigen Studie wurde getränktes Knochenersatzmaterial entsprechend der Herstellerangaben modifiziert (0,5ml rhPDGF-BB-Lösung + 0,5g β -Trikalziumphosphat (TCP) mit der Partikelgröße 0,25-1mm) und als Transportmolekül verwendet. Die Ergebnisse vorangegangener Studien haben gezeigt, dass die Adsorption von rhPDGF-BB zu β -Trikalziumphosphat (TCP) in vitro in einem konzentrations- und einem zeitabhängigen Muster auftritt, sodass schätzungsweise 45% des adsorbierten rhPDGF-BB nach 10 Tagen freigesetzt wird. Jedoch ist die Freisetzung in vivo, wie bereits in einem Mausmodell gemessen, schneller aufgetreten als in vitro (Bateman et al. 2005). Die lokal variierenden Bedingungen im Gewebe könnten Ursache für die abweichenden Messergebnisse sein. So wird vermutet, dass die vorherrschende Konzentration an endogenem rhPDGF direkt verknüpft ist mit dem PH-Wert und demfolgend mit der Ionenverteilung. Die Freisetzung des endogenen Faktors wird also durch lokal ablaufende Prozesse auf biochemischer Ebene reguliert (Bateman et al. 2005).

Es wäre zu spekulieren, dass das Protein einer schnelleren Diffusion im Anschluss an eine in vivo Implantation mit Knochenersatzmaterial unterliegt und deshalb die Verfügbarkeit im Wundareal limitiert wird. Die Freisetzungskinetik von β -Trikalziumphosphat wäre somit in vivo verändert.

5.2 Vergleich zu vorangegangenen Studien bezüglich initialer Knochenbildung

Das Schema der initialen Knochenbildung, wie ebenfalls in der aktuellen Test- und Kontrollgruppe beobachtet, stimmte mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein. Generell zeigte sich, dass neu gebildeter Knochen, ausgehend von den Defektgrenzen entlang der Suprastruktur des Augmentates in den Dehiszenzbereich einwuchs.

Schwarz et al. veröffentlichten bereits 2008 eine Studie mit partikulärem Knochenersatzmaterial, welches jedoch nicht mit rhPDGF-BB sondern mit rhBMP-2 oder steriler Kochsalzlösung versetzt war und durch eine Kollagenmembran bedeckt wurde. Ein merklicher Unterschied wurde in Anbetracht der Summe an Knochenbildung herausgestellt, da diese Areale einen offensichtlich höheren Median nach drei Wochen der Heilung aufwiesen. Mehrere Gründe könnten die Diskrepanz der Studien ursächlich erklären.

Zuerst sollte bedacht werden, dass diverse histologische Ergebnisse die biologische Variabilität in der Knochenremodellation reflektieren, so wie sie hauptsächlich im Kiefer junger Hunde (Huja & Beck 2007) beobachtet wurde. In der genannten Studie (Huja & Beck 2007) wurden junge Hunde mit einem Knochenmarker gekennzeichnet. Nach der Einschläferung konnten aus eruptierenden Arealen des Kieferkamms Proben gewonnen werden. Die histomorphometrische Analyse der Proben sollte Ergebnisse zur Appositionsrate der Mineralien ($\mu\text{m/d}$), zum Anteil an mineralisierendem Gewebe (%) und zur Knochenbildungsrate (%/a) liefern. Die Knochenbildungsrate unterschied sich maßgeblich zwischen den beiden Kiefern. So war die Rate an neugebildetem Knochen im Oberkiefer doppelt so hoch wie im Unterkiefer (Huja & Beck 2007). Auf Grund der Knochenmodellation bei heranwachsenden Hunden ist eine Schwankung der Ergebnisse in den vergleichenden Studien möglich. Diese Beobachtung vergegenwärtigt, dass nicht von durchgehend konstanten Voraussetzungen ausgegangen werden kann.

Zweitens müssen auch die Unterschiede im knochenbildenden Potential des Wachstumsfaktors in Betracht gezogen werden. Während das mitogene und chemotaktische rhPDGF-BB hauptsächlich die Angiogenese reguliert, weisen die osteoinduktiven Eigenschaften von rhBMP-2 nachgewiesenermaßen ein hohes Potential auf, die lokale Kieferkammaugmentation in verschiedenen Defektkonfigurationen zu unterstützen (Jung et al 2008). Vorangegangene experimentelle Studien berichten von einem gewissen Anteil an Knochenresorption nach lateraler Kieferkammaugmentation, insbesondere in den Bereichen, die nicht von einer Barrieremembran bedeckt waren (von Arx et al. 2001a, 2001b; Araújo et al. 2002). Letzt genannte Studie weist einen ähnlichen Aufbau auf wie die Aktuelle. Bei fünf Hunden wurde ein lateraler Defekt an der bukkalen Mandibula kreiert und folglich drei Monate später mit einem Block Bio-Oss® bzw. autologem Knochen und einer Kollagenmembran augmentiert. Als Resultat der Studie zeigt sich, dass der auf der Lateralfläche des Kieferkamms aufgelagerte kortikale Knochen nach sechs Monaten der Wundheilung zwar mit ortsständigem Knochen durchwachsen war, jedoch einer nennenswerten Resorption (1/3 der Höhe und 1/2 der Länge des Transplantates) unterlag. Dieser Bereich wurde durch Bindegewebe ersetzt (Araújo et al. 2002). Die Applikation einer Kollagenmembran ermöglicht dem Behandler, den Resorptionsprozess über einen

Zeitraum von drei Wochen zu verringern (Schwarz et al. 2008b). Durch eine Barrieremembran abgedeckte Blockaugmentate zeigen ausgezeichnete klinische Ergebnisse bezogen auf die Wundheilung und auf die Osteogenese lateral entlang des Kieferkammes. Die Augmentation eines Blockes ohne die Abdeckung mittels Membran ist klinisch eindeutig im Nachteil. Zwar wird die Angiogenese durch den direkten Kontakt des Blockes mit dem Periost gefördert, jedoch wachsen schnell proliferierende Zellen in das Wundareal ein und verhindern so den Umbau des Blockes zu neuem Knochen. Die Resorption verläuft von bukkal nach krestal (Von Arx et al. 2001a) Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse einer neueren Studie unterstützt, welche eine signifikante Biodegradation der Kollagenmembran nach vier bis sechs Wochen Einheilzeit in einer Beaglestudie kenntlich macht (Schwarz et al. 2008b). In dieser Studie ist ebenfalls erwähnenswert, dass Schwarz et al. (2008b) eine Überaugmentation durchführten, die mit einer größeren Menge an KEM (0,2-0,25g) pro Defektbereich einherging. Prinzipiell dehnt ein Knochenersatzmaterial, das auf den lateralen Bereich des zahnlosen Kiefers platziert wird, den angrenzenden Mukoperiostlappen und kann somit die osteoklastische Aktivität steigern (Chiapasco et al 1999). Da der zweite Teil der aktuellen Studie eine Applikation von Knochenersatzmaterial mit rhPDGF-BB ohne Kollagenmembran (z.B. im Oberkiefer) erforderte, wurde entschieden, eine Überaugmentation zu vermeiden, die eventuell Einfluss auf die Wundheilung hätte haben könnte.

5.3 Ergebnisse des Einflusses von rhPDGF-BB auf die Knochenbildung

Die Beobachtung, dass die Adsorption von rhPDGF-BB durch das Knochenersatzmaterial einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung hat, untermauert zu mindestens in Teilen vorangegangene experimentelle Daten (Simion et al. 2006). Hauptsächlich Simion et al. (2006) evaluierten die Wirkung von lateraler Kieferkammaugmentation an Hetzhunden unter Verwendung eines bovinen Blocktransplantates, das entweder mit rhPDGF-BB getränkt oder unbehandelt war. Zusätzlich wurde die Wirkung von Kollagenmembranen auf die Wundheilung an den entsprechenden Bereichen gemessen. Nach vier Monaten der Heilung zeigte das native Blocktransplantat innerhalb seiner Struktur keine nachweisbare Knochenbildung und schien in das Bindegewebe eingelagert zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die mit rhPDGF-BB augmentierten Areale – additiv mit gesteuerter Knochenregeneration - beobachtet. Im Gegensatz dazu schienen die Areale, die mit rhPDGF-BB versetztem Knochenersatzmaterial ohne die zusätzliche Verwendung einer Kollagenmembran augmentiert wurden, durch neuen Knochen ersetzt worden zu sein. Leider wurde die applizierte Dosis an rhPDGF-BB nicht bekannt gegeben (Simion et al. 2006). Die Erkenntnis, dass rhPDGF-BB die Knochenbildung ohne Verwen-

derung einer Membran unterstützt, steht im Einklang mit der gegenwärtigen Studie. Insbesondere die Kontrollbereiche im Oberkiefer enthüllten einen deutlichen Unterschied in Hinsicht auf den Gewinn an mineralisiertem Gewebe im peripheren Kompartiment des Wundbereiches. Es wird vermutet, dass die Kollagenmembran initial das Periost als eine Ressource für Vaskularisation und Osteoprogenitorzellen ausgegrenzt hat (Eyre-Brook 1984; Skawina & Gorczyca 1984).

5.4 Vergleich einiger Studien zum Thema „gesteuerte Knochenregeneration“

In einer Beagle-Studie (Schwarz et al. 2008a) wurden standardisierte, bukkale Dehiszenzdefekte an Implantaten geschaffen und zur Erprobung sechs verschiedener Verfahrenstechniken verwendet:

- Knochenersatzmaterial nativ

- KEM in Kombination mit einer nativen Kollagenmembran

- KEM in Kombination mit drei verschiedenen quervernetzten Kollagenmembranen

- KEM in Kombination mit einer Titan-verstärkten Kollagenmembran,

- KEM in Kombination mit einer Polytetrafluorethylenmembran

In regelmäßigen Abschnitten wurden Proben entnommen. Schwarz et al. (2008a) konnten herausstellen, dass alle getesteten Membrantypen die Knochenbildung gleichermaßen begünstigen. Die immunhistochemische Analyse unserer Studie liefert klare Beweise, dass das augmentierte Areal in allen Testbereichen vom gut vaskularisierten, subepithelialen Bindegewebe durch die Membran getrennt wurde. Die in der aktuellen Studie verwendete Kollagenmembran unterstützt die transmembranöse Gefäßbildung und somit die Mineralisation im peripheren Wundareal. Die Angiogenese und Knochenneubildung beginnt vorwiegend aus offenen Markräumen des angrenzenden Alveolarknochens und wird somit nicht negativ durch die Verwendung einer Barrieremembran verändert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorangegangenen Tierstudien (Schwarz et al. 2008a).

5.5 Transglutaminase II

In dieser Studie wurde die Angiogenese zusätzlich mittels primärer monoklonaler Antikörper der Maus zum Enzym Transglutaminase II gemessen. Dieses Enzym stabilisiert die Strukturen des Gewebes durch kovalent bindende extrazelluläre Matrixmoleküle. Vorangegangene experimentelle Daten liefern klare Beweise dafür, dass die Transglutaminase II direkt in den Prozess der Angiogenese involviert ist (Haroon et al. 1999; Buemi et al. 2004). So führten Haroon et al. (1999) eine Studie zu Transglutaminase II nach Stanzbiopsie bei Ratten durch. Die Studie zeigte, dass TG Antigene im Rahmen der Angiogenese und des provisorischen Wundverschlus-

ses in den ersten 24 Stunden nach Integritätsverlust durch z.B. Endothelzellen, Makrophagen oder Skelettmuskelzellen, exprimiert werden und am dritten tag postoperativ die höchste Konzentration erreichen. Die Freisetzung von Transglutaminase II steht in direkter Korrelation zur Bildung von Transforming growth factor β (TGF- β), Tumornekrose-faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Vascular endothelial growth factor (VEGF). Diese Ergebnisse verleihen der Transglutaminase II eine Vorreiterposition bezogen auf die Gefäßneubildung im Wundbereich (Haroon et al. 1999). Die in der aktuellen Studie gewonnenen Daten zur Transglutaminase II zeigen, dass in der Testgruppe die Gefäßneubildung im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war. rhPDGF scheint demnach erwiesenermaßen einen positiven Einfluss auf die Angiogenese zu haben.

5.6 Standpunkt zur gesteuerten Knochenregeneration

Vom klinischen Standpunkt aus gesehen, indiziert der Verzicht auf eine Membran in der aktuellen Studie eine Reduktion des augmentierten Areals. Durch die Dislokation des Knochenersatzmaterials entlang des Kieferkamms wurde das Augmentat nicht vollständig in die histomorphometrische Analyse einbezogen. Die dislozierten Partikel konnten keinen positiven Einfluss auf die Knochenbildung im augmentierten Areal (AA) nehmen. Das Alveolarkammprofil kann nicht vorhersagbar rekonstruiert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen besteht Grund zu der Annahme, dass die Applikation von Kollagemembranen essentiell zur Stabilisierung des Augmentates an lateralen Knochendefekten beiträgt nicht aber in die biologische Aktivität des rhPDGF eingreift. Diese Beobachtung wird durch die Resultate vorangegangener experimenteller Studien in Wistar Ratten unterstützt (Lioubavina-Hack et al. 2005a, 2005b). In der ersten Studie wurde eine kompakte, hemisphärische Teflonkapsel mit einem Durchmesser von 7mm bilateral an den Ramus der Tiere platziert (n=8). Vor der Platzierung der Kapseln wurden diese mit BioOss® gefüllt. Das Knochenersatzmaterial war entsprechend des Zufallsprinzip mit rhPDGF-BB und autogenem Blut versetzt oder allein mit autogenem Blut. Nach drei und fünf Monaten der Wundheilung zeigten sowohl die augmentierten Areale der Test- als auch der Kontrollgruppe einen geringen Gewinn an Knochenbildung. Nach drei Monaten überstieg der Ertrag an mineralisiertem Gewebe in der Kontrollkapsel sogar den der Testgruppe. Die mangelnde biologische Aktivität von rhPDGF, wie in dieser Studie beobachtet wurde, könnte durch die kompakte Struktur der Teflonkapsel bedingt gewesen sein (Lioubavina-Hack et al. 2005a). Die Resultate einer ähnlichen vorangegangenen experimentellen Studie haben aufgezeigt, dass zellausschließende Membranen wie nicht-poröse, expandierende Polytetrafluorethylen (ePTFE) nicht die transmembranöse Blutgefäßbildung unterstützen (Schwarz et al.

2008a). Demzufolge diene in der zuvor genannten Studie (Lioubavina-Hack et al. 2005a) die kortikale Schicht des Mandibularastes als einzige Quelle der Vaskularisierung. Möglicherweise ist der ortsständige Knochen als einzige Blutversorgung nicht ausreichend für einen PDGF-vermittelten regenerativen Prozess (Lioubavina-Hack et al. 2005a). Diese Behauptung wird durch eine Studie der gleichen Forschungsgruppe unterstützt, die Methylzellulosegel als Trägersubstanz für die begleitende Implantation von rhPDGF-BB/ insulin-like-growth-factor I (IGF-1)(150, 160 oder 1200mg/ml) verwendete (Lioubavina-Hack et al. 2005b). Die Teflonkapseln wurden ebenfalls an der lateralen Seite des Mandibularastes befestigt. Die Auswahl wurde gemäß dem Zufallsprinzip gewählt. Die Applikation erfolgte entweder an einem nicht-denudierten, periostalen oder an einem denudierten, nichtperiostalen Bereich des Unterkieferastes. Nach zwei Monaten der Wundheilung zeigten histomorphometrische Analysen eine signifikant bessere Knochenbildung in allen periostalen Bereichen im Vergleich zu den korrespondierenden nicht-periostalen Bereichen.

Diese Daten zeigten hauptsächlich eine signifikante Verbesserung der Knochenregeneration unabhängig von der Verwendung einer Membran (Lynch et al. 1991; Becker et al. 1992; Vikjaer et al. 1997). Als Konklusion ist festzustellen, dass die native Kollagenmembran wie in dieser Studie verwendet, das Augmentat stabilisiert, eine Barriere für das umliegende Gewebe darstellt, nicht in den Effekt des Wachstumsfaktors rhPDGF eingreift und die transmembranöse Angiogenese fördert. Diese Eigenschaften führen zu besseren klinischen Ergebnissen, deswegen ist es unerlässlich, bei folgenden Studien und in der Praxis eine Barrieremembran zu verwenden.

5.7 RhPDGF-BB im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren

Ziel vieler Forscher ist es, ein Knochenersatzmaterial zu finden, das neben der osteokonduktiven Wirkung auch die Osteogenese durch Osteoinduktion und Angiogenese per se zum Beispiel Wachstumsfaktoren positiv beeinflusst. Bereits im jetzigen Stand der Forschung gibt es verschiedene Studienansätze in denen Wachstumsfaktoren getestet wurden. Jung veröffentlichte diesbezüglich eine systematische Übersichtsarbeit, um die Modulatoren Knochenmodulierendes Protein 2+7 (BMP-2+7), Wachstums-/Differenzierungsfaktor 5 (GDF-5), plättchenaktivierender Wachstumsfaktor (PDGF) und Parathormon (PTH) in den bisherigen Studien miteinander zu vergleichen (Jung et al. 2008). Zur Verfügung standen ihm jedoch nur 4 klinische Studien zu BMP-2. Alle anderen Wachstumsfaktoren sind noch nicht in klinischen Studien getestet und somit rein tierexperimentell beurteilt worden. Dies ist mitunter durch die Zulas-

sungsbeschränkungen der Präparate zu erklären. BMP-2/-7 sind bereits im Fachbereich der Orthopädie am Menschen zur Verwendung gekommen. Die Zulassung der Präparate basiert auf einer Übersichtsarbeit (Poynton&Lane 2002), welche die Stoffe unter anderem auf folgende Fragestellungen evaluiert haben:

- Knochenwachstum
- Osteoklastenaktivität
- Kanzerogenität
- lokale und systemische Toxizität
- Immunologie
- Organbeteiligung

Für rhPDGF-BB liegt die Zulassung zur Verwendung in der Zahnmedizin nicht vor.

Die evaluierten Studien zu BMP-2 bezogen sich bei Jung et al. (2008) auf selbst erhaltende Defekte. Zu nicht selbst erhaltenden Defekten gibt es zu diesem Zeitpunkt keine greifbaren Daten. Sowohl BMP-2 wie auch BMP-7 haben laut der oben zitierten Studie eine positive Wirkung auf die Knochenneubildung. Es wird jedoch auch in dieser darauf hingewiesen, dass weitere klinische Studien erforderlich sind. Für GDF-5 und PTH fehlt es qualitativ und quantitativ an ausreichenden Studien, um eine Beurteilung abgeben zu können. PTH scheint eventuell ebenfalls die Knochenbildung günstig zu beeinflussen (Jung et al. 2008).

Bezogen auf rhPDGF steht die aktuelle Studie mit den Ergebnissen der Übersichtsarbeit von Jung im Einklang.

6. Zusammenfassung und klinische Relevanz der Ergebnisse

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie gezeigt, dass (i) rhPDGF-BB versetztes, partikuläres Knochenersatzmaterial an chronischen Kieferkammdefekten das Potential hat, die initiale Knochenbildung und Vaskularisation zu unterstützen. (ii) Die Applikation von nativen Kollagenmembranen interferiert nicht in die biologische Aktivität von rhPDGF-BB und sichert die Stabilisation der Knochenersatzpartikel. Die Arbeitshypothesen wurden in der aktuellen Untersuchung bestätigt.

RhPDGF-BB ist in Europe derzeit noch nicht für die Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde zugelassen. In den USA besteht die Zulassung durch die „Food and Drug Administration (FDA)“ bereits für die in der Parodontaltherapie. In der Parodontaltherapie können sehr gute klinische Ergebnisse erzielt werden. Der signifikant positive Effekt an parodontalen Defekten wurde ebenfalls in vorangegangenen Studien getestet (Nevins et al, 2005; Kwon, Wikesjö et al. 2010), doch auch in diesem Fachbereich sind klinische Studien gefordert, die Wirkung zu verifizieren.

In präklinischen Untersuchungen traten unter der Verwendung von rhPDGF-BB keinerlei Komplikationen auf. Es sind weder negative Auswirkungen auf die Wundheilung bekannt, noch traten systemische Komplikationen wie beispielsweise allergische Reaktionen auf. Die präklinischen Daten zeigten die Sicherheit und Effektivität der Applikation von rhPDGF-BB und legitimieren den klinischen Einsatz am Menschen. Der Nächste Schritt ist demnach die klinische Anwendung von rhPDGF-BB auf nicht selbsterhaltende Kieferkammdefekte in einem genehmigten Heilversuch.

Die Heterogenität der oben genannten Studien bezüglich der Verwendung einer Membran zeigen, dass der Effekt dieser Technik dem Anschein nach nicht ausschließlich von deren Eigenschaft, sondern auch der Präferenz des Behandlers abhängt. Die hier evaluierte Studie etabliert die Verwendung einer Kollagenmembran in Bezug auf die Stabilisierung lateraler Kieferkammdefekte, die Knochenneubildung und die Förderung der transmembranösen Angiogenese als essentielle Technik.

7. Literaturangaben:

Amler, M.H.: The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;27:309-318.

Antoniades, H.N., Scher, C.D., Stiles, C.D.: Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1809-1813.

Araújo, M.G., Sonohara, M., Hayacibara, R., Cardaropoli, G. & Lindhe, J.: Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 2002, 29: 1122–1131.

Araújo, M.G., Lindhe, J.: Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 2005; 32: 212–218.

Arnold, F., West, D.C.: Angiogenesis in wound healing.
Pharmacology & Therapeutics Volume 52, Issue 3, December 1991, Pages 407-422

Atwood, D.A.: Some clinical factors related to the rate of resorption of residual ridges. *J Prosthet Dent* 1962;12:441- 450.; *J Prosthet Dent*. 2001 Aug;86(2):119-25.

Bateman, J., Intini, G., Margarone, J., Goodloe, S., Bush, P., Lynch, S.E. & Dziak, R.: Platelet-derived growth factor enhancement of two alloplastic bone matrices. *Journal of Periodontology* 2005, 76: 1833–1841.

Becker, W., Lynch, S.E., Lekholm, U., Becker, B.E., Caffesse, R., Donath, K. & Sanchez, R.: A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *Journal of Periodontology* 1992, 63: 929–940.

Brunel, G., Piantoni, P., Elharar, F., Benque, E., Marin, P. & Zahedi, S.: Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *Journal of Periodontology* 1996, 67: 1342–1348.

Buemi, M., Galeano, M., Sturiale, A., Ientile, R., Crisafulli, C., Parisi, A., Catania, M., Calapai, G., Impala, P., Aloisi, C., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., Tuccari, G. & Frisina, N.: Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 2004, 22: 169–173.

Bunyaratavej, P. & Wang, H.L.: Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology* 2001 72: 215–229.

Canalis, E., McCarthy, T.L. & Centrella, M.: Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 1989, 140: 530–537.

Cardaropoli, G., Araujo, M., Lindhe, J.: Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 2003;30:809-818.

Carranza, Newman, Takei, Klokkevold 2006, *Clinical Periodontology*, 10th Edition

Cawood, J.I., Howell, R.A.: A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988 Aug;17(4):232-6.

Chiapasco, M., Abati, S., Romeo, E. & Vogel, C.: Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clinical Oral Implants Research* 1999, 10: 278–288.

Chiapasco, M., Zaniboni M, Boisco M.: Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:136-59.

Clark, R.A. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol.* 1985 Nov;13(5 Pt 1):701-25.

Dahlin, C. Linde, A, Gottlow, J, Nyman, S.: Healing of bone defects by guided tissue regeneration *Plast Reconstr Surg.* 1988 May;81(5):672-6.

Dies, F., Etienne, D., Abboud, N.B., Ouhayoun, J.P.: Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an ePTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 1996;7:277-285

Donath, K.: The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (âage-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pathology, Research and Practice* 1985, 179: 631–633.

Eyre-Brook, A.L.: The periosteum: its function reassessed. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1984, 189: 300–307.

Felsenberg, D., Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit, Struktur und Funktion des Knochens. *Pharmazie in unserer Zeit*, 30. Jahrgang 2001 Nr. 6

Fritz, ME.: Implant therapy. II *Ann Periodontol* 1996; 1: 796-815

Frost, H.M.: The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab.* 2000; 18:305–316

Garret, S. Periodontal regeneration around teeth. *Ann Periodontal* 1996; 1:621-666

Hardwick, R., Scantlebury, T.V., Sanchez, R., Whitley, N. & Ambruster, J. Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. Berlin: Quintessenz Pub. (1994), ISBN: 0-86715-249-4

Haroon, Z.A., Hettasch, J.M., Lai, T.S., Dewhirst, M.W. & Greenberg, C.S.: Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB Journal* 1999, 13: 1787–1795.

Heldin, C.-H., Wasteson A. & Westermark B.: Partial purification and characterization of factors stimulating the multiplication of normal human glia cells. *Experimental Cell Research* 1977, Volume 109, Issue 2, October, Pages 429-437

Heldin C.-H., Westermark B. & Wasteson A.: Platelet derived growth factor. Isolation by a large scale procedure and analysis by subunit composition. *Biochem J* 1981; 193: 907-913.

Huja, S.S. & Beck, F.M.: Bone remodeling in maxilla, mandible, and femur of young dogs. *Anatomical Record* 2007, 291: 1–5.

Jung, R.E., Glauser, R., Scharer, P., Hammerle, C.H., Sailer, H.F. & Weber, F.E.: Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clinical Oral Implants Research* 2003, 14: 556–568.

Jung, R.E., Thoma, D.S. & Hammerle, C.H.: Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 2008, 35:255–281.

Juvenal (Decimus Iunius Iuvenalis): Satire 10, 356: „Orandum est, ut sit mens sana in corpore sano.“

Karageorgiou, V., Kaplan, D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis *Biomaterials*. 2005, 26 (27): 5474-91

Kiritsy, C.P. & Lynch, S.E.: Role of Growth Factors in Cutaneous Wound Healing: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):729-60

Kishimoto T. & Taga T.: Cytokine Signal Transduction. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):253-62.

Kwon, H.R., Wikesjö, U., Park, J.C., Kim, Y.T., Bastone, P., Pippig, S.D., Kim, C.K.: Growth/differentiation factor-5 significantly enhances periodontal wound healing/ regeneration compared with platelet-derived growth factor-BB in dogs. *J Clin Periodontol* 2010, 37: 739-746

Lekovic, V., Kenney, E.B., Weinlaender, M., Han, T., Klokkevold, P., Nedic, M., Orsini, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol* 1997;68:563-570.

Lioubavina-Hack, N., Carmagnola, D., Lynch, S.E. & Karring, T.: Effect of Bio-Oss with or without platelet-derived growth factor on bone formation by “guided tissue regeneration”: a pilot study in rats. *Journal of Clinical Periodontology* 2005a, 32: 1254–1260.

Lioubavina-Hack, N., Karring, T., Lynch, S.E. & Lindhe, J.: Methyl cellulose gel obstructed bone formation by GBR: an experimental study in rats. *Journal of Clinical Periodontology* 2005b, 32: 1247–1253.

Long, M.W., Robinson, J.A., Ashcraft, E.A. & Mann, K.G.: Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest*. 1995; 95(2): 881–887.

Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H. & Williams, R.C. Effects of the platelet-derived growth factor/ insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *Journal of Periodontology* 1991, 62: 710–716.

Mair, B., Fuerst, G., Kubitzky, P., Tangl, S., Bergmeister, H., Losert, U., Watzek, G. & Gruber, R.: The anti-angiogenic substance TNP-470 impairs peri-implant bone formation: a pilot study in the rabbit metaphysis model. *Clinical Oral Implants Research* 2007, 18: 370–375.

Marden, L.J., Fan, R.S., Pierce, G.F., Reddi, A.H., Hollinger, J.O.: Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest.* 1993, Dec;92(6):2897-905.

Minabe, M., Kodama, T., Kogou, T., Tamura, T., Hori, T., Watanabe, Y. & Miyata, T.: Different cross-linked types of collagen implanted in rat palatal gingiva. *Journal of Periodontology* 1989, 60: 35–43.

Neukam, F.W., Hausamen, J.E., Scheller, H.: Possibilities and limitations of implantology in older patients; *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* 1989;44(7):490-2.

Nevins M., Giannobile, McGuire et al, 2005, Platelet-Derived Growth Factor Stimulates Bone Fill and Rate of Attachment Level Gain: Results of a Large Multicenter Randomized Controlled Trial; *J Periodontol.* 2005 Dec;76(12):2330-2.

Pihlström, B.L., McHugh, R.B., Oliphant, T.H., Ortiz-Campos, C.: Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. *J Clin Periodontol* 1983;10:524-541.

Poynton A.R., Lane J.M.: Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. 2002, Aug 15;27(16 Suppl 1):S40-8.

Rateitschak, K.K., Wolff, H.F., *Farbatlant der Zahnmedizin, Parodontologie*; 3.Auflage

Risau, W.: Mechanisms of angiogenesis. 1997, *Nature* 386: 671–674.

Rocchietta, I., Dellavia, C., Nevins, M. & Simion, M.: Bone regenerated via rhPDGF-BB and a deproteinized bovine bone matrix: backscattered electron microscopic element analysis. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2007, 27: 539–545.

Roche Lexikon Medizin [Elektronische Ressource] 5. Auflage; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; München/Jena 2003; ISBN 3-437-15072-3; Online-Version Stichwort: Wolff-Transformationsgesetz

Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L.: A Platelet-Dependent, Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 April, 71(4): 1207–1210.

Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Herten, M., Sculean, A. & Becker, J.: Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes. An experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research* 2005, 16: 369–378.

Schlegel, A.K., Mijhler, H., Busch, F. & Mehli, A.: Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®) *Biomaterials* 18 1997, 535-538 0 1997 Elsevier Science

Schliephake, T. Gesteuerte Knochenregeneration in der Implantologie. Stellungnahme der DGZMK, DZZ 6/2005

Schropp, L, Wenzel, A, Kostopoulos, L, Karring, T.: Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003, 23:313-323.

Schwarz, F., Rothamel, D., Hertel, M., Sager, M. & Becker, J.: Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clinical Oral Implants Research* 2006a, 17: 403–409.

Schwarz, F., Rothamel, D., Ferrari, D., Becker, J.: Aktuelle Aspekte zur Beeinflussung der Dimensionsveränderung des Alveolarknochens nach Zahnentfernung, *Implantologie* 2006b, 14(4):319-333

Schwarz, F., Rothamel, D., Hertel, M., Wüstefeld, M., Sager, M., Ferrari, D. & Becker, J.: Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2008a, 19: 402–415.

Schwarz, F., Rothamel, D., Hertel, M., Ferrari, D., Sager, M. & Becker, J.: Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes biocoated with rhGDF-5 and rhBMP- 2: an immunohistochemical study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2008b, 19: 642–652.

Schwarz, F., Ferrari, D., Mihatovic, I. & Becker, J.: Influence of recombinant human platelet derived growth factor on lateral ridge augmentation using a biphasic calcium phosphate and guided bone regeneration. A histomorphometrical study in dogs. *Journal of Periodontology* 2009, 80: 1315–1323.

Seibert, J.S., Nyman, S.: Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *Journal of Periodontology* 1990, 61:157-165

Simion, M., Rocchietta, I., Kim, D., Nevins, M. & Fiorellini, J.: Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: a histologic study in a dog model. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2006, 26: 415–423.

Simion, M., Rocchietta, I. & Dellavia, C.: Three-dimensional ridge augmentation with xenograft and recombinant human platelet-derived growth factor-BB in humans: report of two cases. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2007, 27: 109–115.

Sipe, J.D.: Tissue engineering and reparative medicine. *Ann NY Acad Sci.* 2002 Jun;961:1-9.

Skawina, A. & Gorczyca, W.: Role of nutrient and periosteal blood vessels in the vascularization of the cortex of shafts of the long bones in human fetuses. *Folia Morphologica* 1984, 43: 159–164.

Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J., Pledger, W.J.: Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979, Mar;76(3):1279-83.

Taba, M., Jin, Jr Q., Sugai, J.V., & Giannobile, W.V.: Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005 November; 8(4): 292–302.

Terheyden H., Becker J.: Osteoinduktive Substanzen und Faktoren in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, 10/2006, DGZMK

Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov 12;150(698):893-9.

Vikjaer, D., Blom, S., Hjorting-Hansen, E. & Pinholt, E.M.: Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *European Journal of Oral Sciences* 1997, 105: 59–66.

von Arx T., Cochran D.L., Hermann J.S., Schenk R.K. & Buser D.: Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clinical Oral Implants Research* 2001a, 12: 260–269.

von Arx T., Cochran D.L., Hermann J.S., Schenk R.K., Higginbottom F.L. & Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2001b, 16: 343–354.

Wolff, J.: *Das Gesetz der Transformation der Knochen* - 1892. Reprint: Pro Business, Berlin 2010, ISBN 978-3-86805-648-8.

Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D.C. & Graves, D.T.: Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *American Journal of Physiology* 1991, 261: C348–C354.

8. Abkürzungsverzeichnis:

AA	augmentiertes Areal
AEC	3-Amino-9-ethyl-carbozole
ALP	Alkalinen Phosphatase
BC	krestaler Knochen
BD	Boden des Defektes
BFR	Knochenbildungsrate
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BMP-2	Bone Morphogenic Protein 2
BMP-7	Bone Morphogenic Protein 7
CM	Kollagenmembran
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DL	Defektlänge
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ePTFE	expandiertes Polytetrafluoroethylene
CCD	Charge-coupled Device
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth Factor
GBR	gesteuerte Knochenregeneration
GDF	Growth/differentiation factor
GDF-5	Growth/differentiation factor-5
IGF	Insulin-like growth factor
IL-6	Interleukin-6
KEM	Knochenersatzmaterial
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
LDH	Laktatdehydrogenase
M2	zweiter Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMA	Methylmethacrylat
MT	mineralisiertes Gewebe
NaOH	Natriumhydroxid

NBM	verbliebenes Knochenersatzmaterial
NMT	nicht mineralisiertes Gewebe
OK	Oberkiefer
P2	zweiter Prämolare
PBS	Phosphatpufferlösung
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGF-AA	Platelet derived growth factor mit zwei A-Ketten
PDGF-BB	Platelet derived growth factor mit zwei B-Ketten
PDGF-AB	Platelet derived growth factor mit einer A und einer B Kette
PTH	Parathormon
rhBMP-2	human rekombiniertes Bone morphogenetic Protein-2
REM	Rasterelektronenmikroskop
rhPDGF	human rekombinierter Platelet derived growth factor
SaOs2	Sarcoma osteogenic 2 cells
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCP	Trikalziumphosphat
TB	Toulouidineblau
TG	Transglutaminase
TGF- β	Transforming Growth Faktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UK	Unterkiefer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung der Resorptionsklassen modifiziert nach Cawood und Howell (Cawood & Howell 1988; Schwenzer/Ehrenfeld 2009)
Tabelle 2:	Einteilung der Knochenersatzmaterialien (modifiziert nach Koeck 2004)
Tabelle 3:	chirurgische Phase 1
Tabelle 4a:	Dimension der chronisch-lateralen Kieferkammdefekte (mm) im UK (n=4 Hunde)
Tabelle 4b:	Dimension der chronisch-lateralen Kieferkammdefekte (mm) im OK (n=4 Hunde)
Tabelle 5:	Vorbereitung des Knochenersatzmaterials
Tabelle 6:	Splitmouthdesign
Tabelle 7:	Histologische Präparation in zeitlicher Reihenfolge
Tabelle 8:	Immunhistochemische Untersuchung in zeitlicher Abfolge
Tabelle 9:	Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm ²) – im UK (n=4)
Tabelle 10:	Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm ²) – im OK (n=4)

10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Wundheilung der Alveole nach Zahnextraktion
(modifiziert entsprechend Abb. 1, Amler et al 1969, Cardaropoli G. & Araujo M. et al. 2003)
- Abbildung 2: Knochenaufbau
(modifiziert nach Felsenberg 2001)
- Abbildung 3: Geistlich ® Bio-Oss REM, 10µm
- Abbildung 4: Einteilung der Membranen
(modifiziert nach Rateitschak K.H., Wolff H.F., 2000)
- Abbildung 5: Geistlich ® 2008, Biogide, HG-blau
- Abbildung 6: Die korrespondierende linguale Knochenwand wurde intakt gelassen.
- Abbildung 7: Insgesamt wurden n=6 Defekte im UK bilateral präpariert. Vier dieser Defekte wurden eingepant, um den Einfluss von rhPDGF-BB auf die Knochenbildung in Kombination mit Knochenersatzmaterial und GBR einzuschätzen.
- Abbildung 8: Insgesamt n=4 Defekte wurden im OK bilateral präpariert und bestimmt, um den Einfluss von GBR auf die Knochenbildung unter der Verwendung von rhPDGF-BB getränktem Knochenersatzmaterial, zu bemessen.
- Abbildung 9: Geistlich ®, Bio-Oss REM
- Abbildung 10: 6 Wochen nach geschlossener Einheilung. Vor der Augmentation wurde das Granulationsgewebe aus dem chronischen Defekt sorgfältig entfernt.
- Abbildung 11: Vor der Augmentation in den entsprechenden Gruppen wurde die Kollagenmembran getrimmt und entlang des Kieferkamms adaptiert. Dies sollte die Stabilität des Knochenersatzmaterials am Defektboden sichern. (Unterkiefer)
- Abbildung 12: Das KEM wurde homogen in jeden Defekt eingebracht.
(0,1-0,15g KEM korrespondierend zu 0,03-0,045mg rhPDGF-BB pro Defekt)
- Abbildung 13: Nach der Augmentation wurde die Kollagenmembran über den gesamten Defekt gelegt, sodass sie 1-2 mm des umgebenden Kieferkamms bedeckt. Weder Nähte noch Stifte wurden für die Membranfixation und Stabilisation eingesetzt.

- Abbildung 14: Das augmentierte Areal konnte für 3 Wochen einheilen. Das Bild zeigt ein nicht-exponiertes Areal im Unterkiefer (KEM+rhPDGF+CM) vor der Einschläferung.
- Abbildung 15: Mögliche Komplikationen
- Abbildung 16: Die relative biologische Aktivität, ausgedrückt durch die mittlere ALP-Produktion der Zellen in Mikroeinheiten pro Stunde
- Abbildung 17: Die relative biologische Aktivität, ausgedrückt durch die mittlere ALP-Produktion der Zellen in Mikroeinheiten pro Stunde nach sieben Tagen Inkubationszeit
- Abbildung 18: Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm^2) – im UK (n=4) in grafischer Darstellung
- Abbildung 19: Histomorphometrische Ergebnisse nach 3 Wochen (mm^2) – im OK (n=4) in grafischer Darstellung
- Abbildung 20: Messpunkte im Wundareal
- Abbildung 21: Kontrollgruppe, TB-Färbung, Originalvergrößerung x25
- Abbildung 22: Initiales Muster der Knochenbildung, welche hauptsächlich aus offenen Markräumen des angrenzenden Alveolarknochens entstammt und in beiden Gruppen vergleichbare Ergebnisse zeigt. (Kontrollgruppe, TB-Färbung, Originalvergrößerung x30)
- Abbildung 23: Die meisten Proben enthüllten eine unreife Erscheinung des neu gebildeten trabekulären Knochens (Testgruppe, TB_Färbung, Originalvergrößerung x100)
- Abbildung 24: Manche Proben zeichnen sich durch einen reifen trabekulären Geflechtknochen aus, welcher im engen Kontakt mit den NBM-Partikeln steht. (Kontrollgruppe, TB-Färbung, Originalvergrößerung x100)
- Abbildung 25: Die Bildung eines vaskulären Systems ($\rightarrow$) wurde allgemein in der Test- und Kontrollgruppe beobachtet. (Kontrollgruppe, TG-färbung, Originalvergrößerung x200)
- Abbildung 26: Die TG-antigenaktivität ($\rightarrow$) waren offenbar in den Defektarealen der Testgruppe ausgeprägter. (Kontrollgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung x200)
- Abbildung 27: Die Kontrollgruppe zeigte eine leichte Dislokation des NBM nach kaudal. (TB-Färbung, Originalvergrößerung 25x)

- Abbildung 28: Die NBMpartikel wurden in allen Defektarealen homogen stabilisiert.
(TB_Färbung, Originalvergrößerung 25x)
- Abbildung 29: Kleine Mineralisationskerne im submembranösen Gewebe der Testgruppe.
(TB-Färbung, Originalvergrößerung 40x)
- Abbildung 30: Ausgeprägter trabekulärer Geflechtknochen im peripheren Kompartiment der Wunde der Kontrollgruppe.
(TB-Färbung, Originalvergrößerung 40x)
- Abbildung 31: Gut vaskularisiertes subepitheliales Bindegewebe mit kleineren Gefäßneubildungen und dilatierenden bereits existierenden Gefäßen (→).
(Kontrollgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung 400x)
- Abbildung 32: Neu gebildete Blutgefäße (→) sind homogen in die Kollagenmembran eingesprosst, welches in der Vaskularisierung des submembranösen Kompartiments des Wundareals resultiert.
(Testgruppe, TG-Färbung, Originalvergrößerung 400x)

Danksagung:

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. F. Schwarz für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Köln, den 07.07.13

Laura Podolsky