

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. Norbert Kübler

Regeneration periimplantären Knochengewebes mittels
Carrier-Zytokin-Komplexen

Dissertation

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

vorgelegt von
Lara Katharina Franziska Schorn

2018

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

Gez.:

Dekanin/Dekan: Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referentin/Referent: Frau Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Rita Depprich

Koreferentin/Koreferent: Herr Prof. Dr. med dent. Frank Schwarz

Gewidmet meiner Familie in Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schorn L, Sproll C, Ommerborn M, Naujoks C, Kübler NR, Depprich R (2017),
Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF, *Head Face Med*, 13(1):11

Zusammenfassung

Einführung: Voraussetzung für den langfristigen Erfolg eines dentalen Implantates ist seine knöcherne Einheilung (Osseointegration). Um das oftmals reduzierte Knochenangebot zu verbessern, werden verschiedene Techniken angewendet, bei denen autologer Knochen und/oder Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden (sog. Guided Bone Regeneration (GBR)). Die Regeneration periimplantären vertikalen Knochens stellt dabei eine besondere Herausforderung dar, da das Knochenaugmentat u.a. eine ausreichende Volumenstabilität aufweisen muss.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der dreidimensionalen vertikalen Knochenregeneration bei der Implantatinserterion *in vivo*. Mit Hilfe eines passgenauen ringförmigen Kollagenträgers (ICBM-Träger = *Insoluble Collagenous Bone Matrix- Träger*), der mit BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein-2*) und /oder VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dotiert war und der bei der Implantation über den koronaren, oberhalb des Knochenlevels befindlichen Implantatanteil platziert wurde, sollte periimplantärer Knochen generiert werden.

Material und Methode: Es wurden 108 Implantate in den Unterkiefer und die Tibia von zwölf Minischweinen implantiert. Vier Untersuchungsgruppen wurden unterschieden:

1. Kontrollgruppe (einfaches Implantat)
2. ICBM-Träger
3. ICBM-Träger + BMP2
4. ICBM-Träger + BMP2 + VEGF

Die Tiere wurden nach zwei, vier und zwölf Wochen geopfert und die regenerativen Prozesse um das Implantat herum histologisch und histomorphometrisch untersucht. Es wurden der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC%), das Knochenvolumen innerhalb einer definierten Fläche (BVD%), sowie die neugewonnene und die zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich gemessen.

Ergebnisse: Die Kombination von ICBM+BMP2+VEGF zeigte sich in den Bereichen BVD%, zugewonnene und neugewonnene Knochenhöhe über die gesamten zwölf Wochen der Knochenregeneration signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verbessert. Im Defektbereich ließ sich nach kurzer Zeit qualitativ und quantitativ hochwertiger Knochen nachweisen. Auch die Defektfüllung war effizienter als in den Vergleichsgruppen.

Diese Arbeit gibt Hinweise auf eine relevante synergistische Wirkung von BMP2 und VEGF in Kombination mit einem Kollagenträger bei der einzeitigen vertikalen Knochenregeneration.

Abstract

Background: Osseointegration is an indispensable process for successful placement of dental implants. Often quantity and quality of the residual bone are insufficient for implantation. In order to improve local bone conditions several techniques are used. Autogenous bone transplants or guided bone generation with or without bone substitutes are some examples. Especially vertical bone augmentation in terms of volume stability has proven to be challenging. This study examines three-dimensional vertical bone generation in a one-stage procedure in vivo. The coronal part of a dental implant was coated by a collagenous disc-shaped scaffold (ICBM = Insoluble Collagenous Bone Matrix) containing BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) during insertion.

Methods: 108 titanium implants were inserted into the mandible and the tibia of twelve mini pigs. Four experimental groups were formed:

1. Control group (implant alone)
2. ICBM
3. ICBM + BMP-2
4. ICBM + BMP-2 and VEGF

After one, four and twelve weeks animals were sacrificed and bone generation was investigated histologically and histomorphometrically. Values for bone implant contact (BIC%), bone volume density (BVD%), vertical bone gain (VBG%) and periimplant vertical bone gain (PVBGmm) were obtained.

Results: The combination of ICBM + BMP2 + VEGF showed significantly more bone volume density (BVD), a higher vertical bone gain (VBG) and more vertical bone gain around the implant (PVBG) in comparison to the control group after twelve weeks. Around the implant high-quality bone was detected in large quantities. Defect filling seemed more efficient in comparison. This study indicates a synergistic impact of BMP2 and VEGF on vertical bone regeneration when applied onto a collagenous carrier using a one-stage approach.

Abkürzungen

ANOVA	Analysis of Variance	O	Stickstoffmonoxid
BTCP	β-Trikalzium-Phosphat	p38MAPK	p38 Mitogen-activated Protein Kinase
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	PCL	Polycaprolactone
BAD	Bcl-2-associated Death Promoter	PEG	Polyethylenglycol
BIC	Bone-Implant Contact (Knochen-Implantat-Kontakt)	PGI₂	Prostacyclin
BMP	Bone Morphogenetic Protein	PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
BVD	Bone-Volume Density	PIP₂	Phosphatidylinositol (4,5) Bisphosphat
ca.	Circa	PIP₃	Phosphatidylinositol (3,4,5) Trisphosphat
cPLA2	cytosolic Phospholipase A2	PKB	Protein Kinase B
cGK1	cGMP-dependent Protein Kinase I	PKC	Protein Kinase C
DAG	sn-1,2-Diacylglycerol	PLC-γ	Phospholipase C-γ
DAN	Differential Screening-selected Gene-aberrant Neuroblastoma	PLGA	Poly(lactid-co-Glycolidsäure)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase	PRP	Pallet-rich Plasma
Erk 1/2	Extracellular regulated Kinasen 1 and 2	Shc	Shc-like Protein
FAK	Focal Adhesion Kinase	Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
Gab1	Grb2-associated binder 1	TCP	Trikalziumphosphat
GBR	Guided Bone Regeneration	TGFβ	Transforming Growth Factor β
GDF	Growth Differentiation Factor	TSAd	T-cell-spezifisches Adapter- Molekül
HSP27	Heat-Shock Protein 27	UK	Unterkiefer
ICBM	Insoluble Collagenous Bone Matrix	VAC	Vacuum-assisted Closure
IQR	Interquartilenabstand	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
IP3	Inositol (1,4,5) Trisphosphat	VRAP	VEGFR-associated Protein
KEM	Knochenersatzmaterialien		
MAPKAP 2/3	MAPK-activating Protein Kinase 2 und 3		
MEK	MAPK/Erk Kinase		
MKG-Chir.	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Knochenheilung	1
1.1.2 Knöcherne Einheilung von dentalen Implantaten (Osseointegration).....	2
1.2 Knochenersatz.....	3
1.3. BMP (Bone Morphogenic Protein)	6
1.3.1 BMP-Signalkaskade	7
1.3.2 BMP2.....	9
1.4. VEGF (Vaskular Endothelial Growth Factor)	10
1.3.4.1 VEGF-A-Signaltransduktion	10
1.5. Trägermaterialien	13
2. Ziel der Arbeit	14
3. Material und Methode	15
3.1. Versuchstiere.....	15
3.2. Implantate	15
3.4. Träger.....	15
3.5. Zytokine	16
3.6. Gruppeneinteilung.....	16
3.7. Implantatinsertion	17
3.8. Operation.....	18
3.8.1 Anästhesie	18
3.8.2 Zahnextraktion.....	19
3.8.3 Implantatinsertion.....	19
3.9. Röntgenkontrolle.....	23
3.10. Fluoreszenzmarkierung.....	23
3.12. Histologische Untersuchung des neugebildeten Knochens.....	24
3.12.1 Trenn-Dünnschliff-Technik.....	24
3.12.2 Färbungen	25
3.12.3 Histomorphometrie.....	26
3.12.3.1 BIC (Bone-implant contact).....	33
3.12.3.2 Neugewonnene Knochenhöhe.....	34
3.12.3.3 Zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich	34
3.13. Statistische Auswertung	34
4. Ergebnisse	35
4.2. Histologische Auswertung	35
4.2.1. Nach zwei Wochen.....	36
4.2.1.1 Kontrolle	36
4.2.1.2 ICBM	37
4.2.1.3 ICBM+BMP2.....	38
4.2.1.4 ICBM+BMP2+VEGF	39
4.2.2. Nach vier Wochen.....	40

4.2.2.1 Kontrolle	40
4.2.2.2 ICBM	41
4.2.2.3 ICBM+BMP2.....	42
4.2.2.4 ICBM+BMP2+VEGF	43
4.2.3 Nach zwölf Wochen	44
4.2.3.1 Kontrolle	44
4.2.3.2 ICBM	45
4.2.3.3 ICBM+ BMP2.....	46
4.2.3.4 ICBM+BMP2+VEGF	47
4.3 Histomorphometrie	49
4.3.1 BIC (Knochen–Implantat–Kontakt)	49
4.3.3 Zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich.....	55
4.3.4 Neugewonnene Knochenhöhe	58
4.3.5 Einzelergebnisse Tibia und Unterkiefer	61
5. Diskussion und Schlussfolgerung	62
5.1 Material und Methode	62
5.1.1 Messverfahren	63
5.2 Kontrolle	65
5.3 ICBM	66
5.4 ICBM+BMP2.....	67
5.5 ICBM+BMP2+VEGF	69
5.6 Aktuelle Ansätze im Hinblick auf die Knochenregeneration in der dentalen Implantologie...	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BMP-Signalkaskade	8
Abbildung 2: VEGF-Signalkaskade	12
Abbildung 3: Größe von ICBM-Träger und Implantat.....	16
Abbildung 4: Alveolarkamm Unterkiefer mit Defektsetzung zur Implantation	20
Abbildung 5: Implantatinsertion Alveolarkamm Unterkiefer.....	21
Abbildung 6: ICBM Träger über den Implantaten, Alveolarkamm Unterkiefer	22
Abbildung 7 a+b: Gesetzte Implantate an der Tibia	23
Abbildung 8 a+b: Messung der Länge des Implantates.....	28
Abbildung 9 a+b: Messung der Windungslänge	28
Abbildung 10 a+b: Messung des Knochens am Implantat	29
Abbildung 11 a+b: Messung MCBF	30
Abbildung 12 a+b: Messung MCBIC.....	31
Abbildung 13 a+b: Messung Defektlänge.....	32
Abbildung 14 a+b: Messung Fläche.....	33
Abbildung 15: Kontrollgruppe nach zwei Wochen	36
Abbildung 16: ICBM-Gruppe nach zwei Wochen	37
Abbildung 17: ICBM+BMP2-Gruppe nach zwei Wochen.....	38
Abbildung 18 a+b+c: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwei Wochen.....	39
Abbildung 19: Kontrolle nach vier Wochen.....	40
Abbildung 20: ICBM-Gruppe nach vier Wochen.....	41
Abbildung 21: ICBM+BMP2-Gruppe nach vier Wochen.....	42
Abbildung 22: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach vier Wochen	43
Abbildung 23: Kontrollgruppe nach zwölf Wochen.....	44
Abbildung 24: ICBM-Gruppe nach zwölf Wochen.....	45
Abbildung 25 a+b: ICBM+BMP2-Gruppe nach zwölf Wochen	46
Abbildung 26 a+ b+ c+ d: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwölf Wochen	48
Abbildung 27: Mittelwerte des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC%) nach zwölf Wochen	49
Abbildung 28: Boxplot-Diagramm der BIC% Messungen über zwei, vier und zwölf Wochen.....	50
Abbildung 29 : Normal Q-Q Diagramm der BIC-Werte	51
Abbildung 30: Mittelwerte der gemessenen Knochenfläche (BVD%) nach zwölf Wochen.....	52
Abbildung 31: Boxplot-Diagramm der BVD% Messungen über zwei, vier und zwölf Wochen.....	53
Abbildung 32 : Normal Q-Q-Diagramm der BVD%-Werte	54
Abbildung 33: Mittelwerte der gemessenen zugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen	55
Abbildung 34: Boxplot-Diagramm der zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich.....	56
Abbildung 35: Normal Q-Q-Diagramm der Werte für die zugewonnene Knochenhöhe.	57
Abbildung 36: Mittelwerte der gemessenen neugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen	58
Abbildung 37: Boxplot-Diagramm der Messungen für die neugewonnene Knochenhöhe	59
Abbildung 38: Normal Q-Q-Diagramm der Werte für die neugewonnene Knochenhöhe	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: VEGF-Rezeptorformen	11
Tabelle 2: Anzahl der Tiere pro Untersuchungsgruppe.....	16
Tabelle 3: Anzahl und Verteilung der Implantatinsertionen pro Unterkieferhälfte.....	17
Tabelle 4: Anzahl und Verteilung der Implantatinsertionen in die Tibia	17
Tabelle 5: Anzahl der Proben insgesamt	18
Tabelle 6: Applikation und Dosierung der Fluoreszenzfarbstoffe.....	24
Tabelle 7: Färbearbeitung Toluidinblau.....	25
Tabelle 8: Färbearbeitung Trichrom-Masson-Goldner-Färbung	26
Tabelle 9: Mittelwerte Knochen-Implantat-Kontakt% (BIC%) nach zwölf Wochen.....	49
Tabelle 10: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen BIC Werte nach zwölf Wochen	51
Tabelle 11: Mittelwerte der gemessenen Knochenfläche (BVD%) nach zwölf Wochen.....	52
Tabelle 12: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen BVD-Werte nach zwölf Wochen	54
Tabelle 13: Mittelwerte der gemessenen zugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen	55
Tabelle 14: Lineare Regressionsanalyse der zugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen.....	57
Tabelle 15: Mittelwerte der neugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen.....	58
Tabelle 16: Lineare Regressionsanalyse der neugewonnenen Knochenhöhe nach zwölf Wochen....	60
Tabelle 17: Mittelwerte der Messgruppen getrennt in Unterkiefer und Tibia	61

1. Einleitung

1.1 Knochenheilung

Von allen Geweben im menschlichen Körper besitzt Knochen das höchste regenerative Potential (Reddi und Reddi, 2009). Knochen besteht, bezogen auf das Trockengewicht, zu 65% aus anorganischer Matrix (v.a. Hydroxylapatit) und zu 35% aus organischer Matrix. Diese besteht wiederum aus einer ungeformten Komponente (Proteoglykane und adhäsive Glykoproteine - Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin) und einer geformten Komponente (Kollagen Typ I) (Spanel-Borowski, 2006). Die Knochenheilung folgt den gleichen Prozessen wie die embryologische Entwicklung des Skeletts (Urist und Strates, 2009). Die Knochenregeneration bzw. -heilung, an der alle Bestandteile des Knochens beteiligt sind, erfolgt durch folgende fundamentale Prozesse (Davies, 2003, Crha et al., 2009):

- Osseinduktion (Signal zur Aufnahme der Osteogenese)
- Osteogenese (Knochenformation)
- Osteokonduktion (Rekrutierung und Migration von osteogenen Zellen)

Bei der Frakturheilung (über Endost, Periost und Havers'sche-Knochenkanäle) läuft der physiologische ständige Knochenumbau (durch Osteoblasten und Osteoklasten) in verstärktem Maße ab. Hierbei kommt dem Periost eine besondere Rolle zu. Es dient dem Knochen als Basis für die Knochenregeneration, es sichert die Blutversorgung (Chanavaz, 1995) und versorgt den Knochen mit sensiblen Nervenfasern (Aumüller, 2006). Das Periost kann als Hülle um den Knochen beschrieben werden, welche Osteoprogenitorzellen enthält und durch tumoröse Prozesse, Trauma und lymphozytäre Mitogene aktiviert werden kann (Tran Van et al., 1982). Es setzt sich aus drei Zonen zusammen. Die außengelegene Zone 3 (Faserschicht) enthält überwiegend Kollagenfasern. Zone 2 (Cambiumschicht) enthält hauptsächlich Blutgefäße (vor allem Endothelzellen), Fibroblasten und Osteoprogenitorzellen. Zone 1 (osteogene Schicht) besteht vor allem aus Osteoblasten (Squier et al., 1990). Sie liegt dem Knochen und somit den Osteozyten an. Osteoprogenitorzellen initiieren gemeinsam mit den Osteoblasten die Zelldifferenzierung, die Kallusbildung und den Remodellierungsprozess (Tran Van et al., 1982). Außerdem schütten Zellen des Periostes VEGF aus, um die Gefäßbildung während der Knochenregeneration zu unterstützen (Mahajan, 2012).

Die Heilung der Kortikalis erfolgt als sogenanntes „*Havers-Remodelling*“. Es tritt nach allen Beeinträchtigungen des Knochens auf (Frakturen, Infektionen, unzureichende Blutversorgung, etc.). Durch einen entsprechenden Umbau der Kortikalis können alle geschädigten Stellen ersetzt werden (Trisi und Masei, 2010, Frost, 1983). Die Frakturheilung der Spongiosa erfolgt über die direkte Überbrückung der Trabekel.

Für eine ungestörte Frakturheilung sind essentiell:

1. Intakte Durchblutung
2. Ruhigstellung
3. Ausreichender Knochenkontakt

Induktoren der Frakturheilung sind Wachstumsfaktoren, Matrixproteine (z.B. Osteocalcin, *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), Osteogenin) und Interleukine, wobei die BMPs eine herausragende Rolle in der Osseinduktion spielen (Niethard et al., 2009).

Die Knochenregeneration des Kieferknochens wird durch mechanische Dehnungsreize beeinflusst, d.h., dass die Knochenregeneration unter Belastung beschleunigt wird. Wie alle Knochen unterliegt die Mandibula dem Transformationsgesetz, d.h. dadurch, dass der Unterkieferknochen durch die Kaubewegungen starken Scher- und Spannungskräften ausgesetzt ist, besteht er aus kompaktem Lamellenknochen und weist ein erhöhtes Potential zur Frakturheilung auf. In der Mandibula heilen Defekte von bis zu 2,5mm nach ca. zwei Monaten spontan ab und der neugebildete Knochen hat die gleiche Dichte wie der umgebene Knochen (Trisi und Masei, 2010, Trisi et al., 2003, Schenk, 1992).

Insbesondere spielt die zeitgerechte Wiederbelastung des Unterkiefers bei der knöchernen Einheilung von inserierten dentalen Implantaten eine große Rolle, da die fehlende Kaubelastung zur Atrophie des periimplantären Knochen führt. Dieser haftet zwar am Implantat, hat aber eine nur geringe mechanische und strukturelle Festigkeit. Spätestens drei Monate nach Implantatsetzung sollte der Kieferknochen, abhängig von der Knochendichte, wieder belastet werden (Trisi und Masei, 2010)

1.1.2 Knöcherne Einheilung von dentalen Implantaten (Osseointegration)

Die knöcherne Einheilung eines Implantates in den Kieferknochen lässt sich in verschiedene Phasen aufteilen. Osteokonduktion ist die erste und wichtigste Phase. Sie beruht auf der Rekrutierung und Migration von osteogenen Zellen an die Implantatoberfläche, initiiert durch den bei der Zahnextraktion bzw. Aufbereitung des

Implantatbettes entstandenen Thrombus (Davies, 2003, Niethard et al., 2009). Nach der Zahnextraktion wird das verbliebene Desmodont resorbiert und mit Geflechtknochen ausgefüllt (Jamjoom und Cohen, 2015, Tan et al., 2012, Wang und Lang, 2012, Pagni et al., 2012). Die wichtigsten Aspekte der Osteokonduktion sind Andockeffekte, generiert durch die Implantatoberfläche und die Induktion der Plättchenaktivierung, welche zusammen die Zellmigration initiieren (Davies, 2003, Niethard et al., 2009).

Die zweite Phase der periimplantären Knochenheilung ist die Osteogenese („De Novo-Knochenformation“). Der Geflechtknochen wird zunächst in Lamellenknochen umgebaut, welcher sich innerhalb von sechs Monaten zu reifem Knochen umwandelt (Jamjoom und Cohen, 2015, Tan et al., 2012, Wang und Lang, 2012, Pagni et al., 2012). Am Ende steht eine mineralisierte interfaziale Matrix, welche dem Knochen hinter der Zementlinie, die neuen von altem Knochen trennt, bereits sehr ähnelt. Aus diesen beiden Phasen kann, vorausgesetzt die Implantatoberfläche und der neugebildete Knochen können ausreichend gut miteinander interagieren, die Kontaktosteogenese folgen, die ihrerseits zu einer Osseointegration des Implantates führt.

Die dritte Heilungsphase entspricht dem „*Remodelling*“ (Knochenumbau), bei dem Blutgefäße einwachsen und der neu entstandene periimplantäre Knochen den physiologischen Ansprüchen des jeweiligen Implantatgebietes angepasst wird (Davies, 2003, Niethard et al., 2009). Die periostale Oberfläche wird beispielsweise durch Osteoblasten und Osteoklasteninteraktion umgebaut, wodurch der Knochen vertikal und horizontal kontrahiert (Pagni et al., 2012, Jamjoom und Cohen, 2015).

1.2 Knochenersatz

Der Verlust der natürlichen Zähne geht mit einer Inaktivitätsatrophie des Alveolarknochens einher, d.h. die fehlende Belastung des Knochens durch die Zähne führt zum horizontalen und vertikalen Abbau des Alveolarkammes. In der Folge kann dies dazu führen, dass eine konventionelle schleimhautgetragene prothetische Versorgung nicht mehr möglich ist (Cawood und Howell, 1988) und die Befestigung der Prothesen lediglich mit Hilfe von Implantaten ermöglicht wird (Depprich et al., 2005).

Eine zufriedenstellende knöcherne Einheilung von Implantaten kann nur bei ausreichendem Knochenangebot erreicht werden. Ein verringertes Knochenvolumen kann durch schlechte lokale Konditionen hervorgerufen, traumatisch, Krankheits- oder Atrophie-bedingt sein (Clementini et al., 2012). Vor allem in den westlichen Ländern,

in denen die Bevölkerung immer älter wird, entsteht im orthopädischen, aber auch im kieferchirurgischen Bereich, zunehmend das Problem des für die Implantation unzureichenden Knochenangebotes. Die Möglichkeiten des Knochenersatzes oder der verbesserten Knochenregeneration werden demnach auch in Zukunft immer wichtiger (Salgado et al., 2004).

Eine erfolgreiche Implantatinserterion in den Kieferknochen erfordert, dass das dentale Implantat ausreichend direkten Knochenkontakt (Jones et al., 2006) und stabile Knochenverankerung aufweist (Cochran et al., 1999).

Generell wird die Sofortimplantation von der verzögerten Implantation unterschieden (Giesenhausen, 2008). Bei der Sofortimplantation (häufig auch als einzeitige Implantation bezeichnet) wird das Implantat direkt nach der Zahnextraktion gesetzt, was zwar der Knochenresorption nach dem Zahnverlust vorbeugt (Gotfredsen et al., 1993), jedoch aufgrund der Inkongruenz zwischen der Extraktionsalveole und dem Implantat zu einer geringeren primären Stabilität des Implantates im Knochen führen kann. Bei der verzögerten Implantation (auch häufig zweizeitige Implantation genannt) wird nach der Zahnextraktion abgewartet, bis nach ca. ein bis zwei Monaten das Weichgewebe (sog. Frühimplantation) oder bis nach ca. drei Monaten das Weich- und Hartgewebe ausgeheilt sind (sog. Spätimplantation) (Watzek et al., 1995). Im Unterschied zur einzeitigen wird bei der zweizeitigen Vorgehensweise das Zahnfleisch über dem Implantat vernäht, sodass die Implantate nach der jeweiligen Einheilzeit freigelegt und mit Gingivaformern versehen werden müssen (Randelzhofer, 2015).

Damit die Implantate im Knochen halten, benötigen sie zumindest ein Minimum an Knochenhöhe und -breite, um in diesem verankert zu werden (Clementini et al., 2012, Buser et al., 2002).

Um ein ausreichendes Knochenangebot für die Implantatsetzung zu erhalten, muss oftmals Knochen wiederaufgebaut bzw. ersetzt werden. Ziele der Knochenaugmentation sind außerdem die Wiederherstellung der Relation von Unterkiefer zu Oberkiefer, die Schaffung einer biomechanischen Grundlage für Prothesen, ästhetische Vorteile und die Wiederherstellung eines gesunden Knochenumfeldes, welches zum Überleben und zur Osseointegration des Implantates beiträgt (Daga et al., 2015).

Folgende Möglichkeiten zur Knochenregeneration finden in der dentalen Implantologie Anwendung (Handschel et al., 2009c, Jones et al., 2006, Wallace, 2010):

- Autogener / patienteneigener Knochen:
 - mikrovaskular reanastomosierte Knochentransplantate (z.B. Fibula, Scapula, etc.)
 - freie Knochentransplantate
 - extraorale Entnahmestelle (z.B. kortikospongiöses Transplantat vom Beckenkamm)
 - intraorale Entnahmestelle (z.B. Knochenblock vom Kinn oder aufsteigenden Unterkieferast)
 - während der Implantatsetzung aufgesammelte Knochenbohrspäne
- Knochenersatzmaterialien
 - allogen (humaner Spenderknochen – demineralisiert oder mineralisiert)
 - xenogen (z.B. boviner Knochen)
 - alloplastisch (z.B. synthetische Tricalciumphosphatkeramiken, Hydroxylapatit)
- Gesteuerte Knochenregeneration (Guided Bone Regeneration, GBR)
- *Tissue-Engineering*

Ein Knochenersatzmaterial sollte die oben beschriebenen Prinzipien der Osseointegration, Osteogenese und der Osteokonduktion möglichst gut repräsentieren (Jamjoom und Cohen, 2015). Alloplastische Knochenersatzmaterialien in Kombination mit autogenen Knochentransplantaten werden derzeit klinisch am häufigsten verwendet (Salgado et al., 2004). „Goldstandard“ ist jedoch nach wie vor der autologe Knochen (Schuckert et al., 2010, Handschel et al., 2009b). Er ist in der Regel biokompatibel und hat große osseointegrative, osteogenetische und osteokonduktive Eigenschaften (Jamjoom und Cohen, 2015, Klijn et al., 2010, Vos et al., 2009).

Werden größere Mengen körpereigenen Knochens benötigt, z.B. für ausgedehnte Kieferkammaugmentation, bietet sich die Entnahme des Knochens aus dem Becken an. Geringere Knochenmengen lassen sich aus dem Kinn oder retromolar gewinnen. Größter Nachteil des autologen Knochens ist seine begrenzte Verfügbarkeit und die mit der Transplantatentnahme unter Umständen verbundene Entnahmemorbidity (sog. „*donorsite morbidity*“) (Meyer et al., 2009, Handschel et al., 2009b). Als mögliche Komplikationen bei der Verwendung autologer Knochentransplantate können

Infektionen (auf Spender- und Empfängerseite), Nekrosen, Blutungen und Spontanfrakturen (auf Spenderseite) (Schuckert et al., 2010), Abstoßungsreaktionen (Testori, 2010, Wallace, 2010), und Sensibilitätsstörungen (Lopes et al., 2012) auftreten.

Bei der gesteuerten Knochenregeneration (*Guided Bone Regeneration*, GBR) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Knochen unter dem Schutz einer resorbierbaren oder nichtresorbierbaren Membran regenerieren kann. Durch die Barrieremembran wird das zur Regeneration notwendige und nach der Extraktion entstandene Blutgerinnsel festgehalten und Platz für die Knochenzellen geschaffen, die ansonsten von den schneller wachsenden Bindegewebszellen verdrängt würden (Clementini et al., 2012).

Je nach Defektgröße und -form werden, neben der Membran, zusätzlich autologer Knochen oder Knochenersatzmaterialien verwendet. Dieses Verfahren eignet sich vor allem bei Patienten mit einem gesunden Weichgewebe und einer ausreichenden eigenen Knochenheilung (Jamjoom und Cohen, 2015, Dahlin und Johansson, 2011).

1.3. BMP (Bone Morphogenic Protein)

Urist und Strates entdeckten 1971 die *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), indem sie herausfanden, dass demineralisierter Knochen, in dem noch ein wenig Proteinrestaktivität vorzufinden war, genug Potential besaß, um Knochen zu rekalzifizieren.

BMPs gehören wie die GDFs (*Growth Differentiation Factor*), TGF β 1-5, MIS (*Mullerian Inhibiting Substance*) sowie Inhibine und Aktivine zur *Transforming Growth Factor β* (TGF β)-Superfamilie. Proteine der TGF β -Superfamilie regulieren die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. So ist TGF β 1 beispielsweise wegweisend für die frühen Phasen der osteoblastären und chondrozytären Differenzierung und inhibiert die Myogenese, die Adipogenese und in späten Phasen der Knochenregeneration auch die Osteoblastendifferenzierung. BMPs inhibieren ebenfalls die Myogenese, fördern aber die Osteoblastendifferenzierung (Roelen und Dijke, 2003, Depprich, 2009). 20 Gene im humanen Genom kodieren funktionelle BMPs (Reddi und Reddi, 2009).

Es gibt 21 (bisher bekannte) verschiedene BMPs, die alle unterschiedliche oder auch keine (BMP1 z.B. gehört nicht zur TGF β -Familie, sondern ist eine Protease (Reddi, 1996)) Wirkungen auf die mesenchymale Stammzellendifferenzierung haben. BMPs regulieren unter anderem den Eisenstoffwechsel, die braune Fettadipogenese und den

Energiemetabolismus (Schulz und Tseng, 2009). BMP-Signale werden zum Erhalt des erwachsenen Skeletts gebraucht. Postpartale Inhibition von BMPs in Mäusen führt zu Osteopenie, Osteoporose, erhöhter Knochenbrüchigkeit und zu Spontanfrakturen. Durch BMP-Signale am BMP I-Rezeptor wird im Knochen die Hämatopoese aufrechterhalten (Rosen, 2009). Durch ihre hohe osteoinduktive Potenz sind BMPs vor allem in den Bereichen der Orthopädie und der Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie für die Knochenregeneration interessant. BMP2 beispielsweise wurde 2006 in der Europäischen Union zur Behandlung von Tibia(-defekt-)frakturen zugelassen (Bergenholtz et al., 2006).

In der MKG-Chirurgie eignen sich folgende Indikationen für die Verwendung von BMPs (Schuckert et al., 2010):

- Augmentation des Alveolarfortsatzes
- Sinuslift
- Rekonstruktion großer Knochendefekte
- Rekonstruktion nach Frakturen
- Rekonstruktion von Anomalien
- Parodontalchirurgie

BMPs können zu alloplastischen, allogenen oder xenogenen Knochenersatzmaterialien hinzugefügt werden, um deren osteoindukiven Eigenschaften zu verbessern (Depprich, 2009, Jamjoom und Cohen, 2015, Wallace et al., 2014)

1.3.1 BMP-Signalkaskade

Die Signalkaskade der TGF β -Superfamilie erfolgt über Serin/Threoninkinase Rezeptoren und Smad-Proteine. Extrazelluläre Bindungsproteine der TGF β -Signalkaskade sind Noggin, Chordin, DAN (*Differential screening-selected gene aberrant neuroblastoma*), Sclerostin, Follistatin und GRSP (*Glomalin-related soil Protein*). Die Rezeptoren sind zwei transmembranöse Serin /Threoninkinase Rezeptoren Typ I und Typ II. BMP bindet zunächst an den Typ II-Rezeptor, dieser phosphoryliert den Typ I-Rezeptor am Serin und Threonin, woraufhin der aktivierte Typ I-Rezeptor das Signal an die Smad-Proteine weiterleitet. Es gibt drei Klassen von Smad-Proteinen: *Receptor regulated Smads* (R-Smads), *common partner Smads* (Co-Smads) und inhibitorische Smads (I-Smads). In der BMP-Signalkaskade werden die R-Smads 1, 5 oder 8 vom aktivierten BMP Typ I-Rezeptor phosphoryliert und die nun aktivierten R-Smads 1, 5 oder 8 formen daraufhin einen Komplex mit Co-Smad 4, welches im

Zytoplasma lokalisiert ist. Dieser Komplex aus R-Smads 1, 5, 8 und Co-Smad 4 kann nun in den Zellkern eindringen und dort, zusammen mit DNA-Bindungspartnerproteinen, Transkriptions-Co-Faktoren und Co-Repressoren, die Transkription regulieren (Reddi, 2001, Roelen und Dijke, 2003, Sieber et al., 2009, Rosen, 2009). Eine schematische Darstellung dieses Prozesses zeigt Abbildung 1.

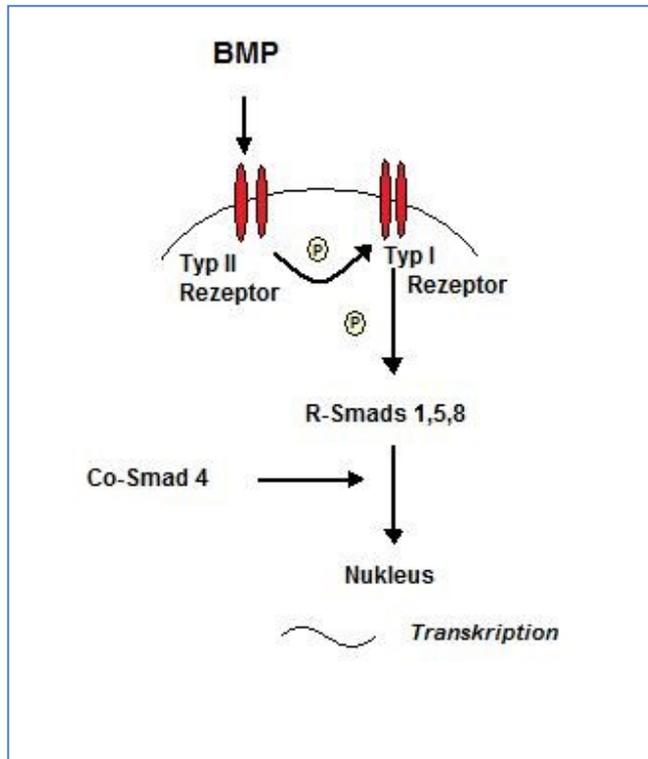


Abbildung 1: BMP-Signalkaskade

BMP bindet an den transmembranösen BMP Typ II-Rezeptor, woraufhin der Typ I-Rezeptor durch Phosphorylierung (P) aktiviert wird. Es folgt die Signalweiterleitung über R-Smads 1, 5 und 8, welche zusammen mit Co-Smad 4 einen Komplex bilden. Durch die Komplexbildung kann das Signal an den Zellkern weitergeleitet und die Transkription initiiert werden (eigene Darstellung mit Informationen aus (Reddi, 2001, Roelen und Dijke, 2003, Sieber et al., 2009, Rosen, 2009).

Reguliert wird die BMP-Signalkaskade vor allem durch Phosphatasen. Eine Hochregulation der Signalstärke und damit auch eine erhöhte Transkription kann durch Trb 3 (Smurf 1 wird ubiquitiniert) und cGK 1 (erhöht die BMP-Rezeptor-Typ II-Aktivität und ist nukleärer Co-Transkriptionsfaktor) erfolgen. Eine Senkung der BMP-Signalstärke geschieht vor allem durch negative Rückkopplung von BMP 2, 4 und 7 (über Noggin – dieses Glykoprotein verhindert die Bindung der BMPs an die Rezeptoren, indem es sich direkt auf die Bindungsstellen der BMPs 2, 4, 5, 6 und 7 setzt und die I-Smad-Proteine setzt).

I-Smads können die Signalübertragung auf verschiedenen Ebenen inhibieren (Reddi, 2001, Roelen und Dijke, 2003, Sieber et al., 2009, Tzialogiannis et al., 2009, Deprich, 2003):

- mittels einer Konkurrenzsituation mit R-Smads um den Typ I-Rezeptor
- indem sie mit Smad 4 um die Komplexbindung mit den R-Smads konkurrieren und so die Aktivität des Typ I-Rezeptors herabsetzen (I-Smads 6 und 7)
- indem sie als Co-Repressoren (I-Smad 6) bei der Transkription agieren

Außerdem kann die Signalstärke der BMP-Kaskade durch proteosomalen Abbau der R-Smads durch SMURF-Ligasen (*Smad ubiquitination regulatory factor*) (SMURF 1 und SMURF 2, E 3 ubiquitin Ligasen), *Growth Factor* oder RAS-induzierte MAP-Kinase-Aktivierung (phosphoryliert die R-Smads in der Linker-Region und verhindert so die nukleare Akkumulation (Moustakas et al., 2001) und auf Transkriptionslevel über Ski- und SnoN-Onkoproteine (interagieren direkt mit den R-Smads und Smad 4 (Sun et al., 1999)) heruntergesetzt werden.

1.3.2 BMP2

In vivo hat BMP2 die höchste osteoinduktive Potenz der BMP-Familie (Jiang et al., 2011). BMP2 ist an der Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Abhängigkeit von komplementären Co-Faktoren zu Chondrozyten, Osteozyten oder Adipozyten maßgeblich beteiligt. Beim Knochenaufbau induziert Vitamin D3 vor allem die direkte und BMP2 vorrangig die indirekte Ossifikation, da es sowohl die Knorpel-, als auch die Knochenentwicklung beeinflusst (zur Nieden et al., 2005). BMP2 wird von glatten Muskelzellen in Gefäßen, vaskulären Endothelzellen und hypertrophierten Chondrozyten und Osteozyten exprimiert (Matsubara et al., 2012). Raida et al. bewiesen 2005 außerdem, dass BMP2 die Angiogenese durch Aktivierung der Endothelzellfunktion in Tumoren induziert und eine Rolle in der Tumorgenese des Mamma-Karzinoms spielt. Ist die BMP2-Produktion behindert, kommt es zu signifikanten Verzögerungen in der Formation von sekundären Ossifikationszentren der enchondralen Extremitätenknochen. Die Progression von Osteoprogenitorzellen zu Osteozyten kann nicht mehr stattfinden (Rosen, 2009). Auch wenn noch andere BMPs vor Ort sind, ist es BMP2, welches die Frakturheilung initiiert (Axelrad und Einhorn, 2009). Dies beweist die essentielle Rolle von BMP2 bei der Knochenregeneration.

1.4. VEGF (Vaskular Endothelial Growth Factor)

Gospodarowicz et al. (Gospodarowicz et al., 1989) und Ferrara et al. (Ferrara, 2000) entdeckten 1989 einen Wachstumsfaktor für Endothelzellen. Senger et al. (Ferrara und Davis-Smyth, 1997, Senger et al., 1986) hatten bereits 1986 einen vaskulären Permeabilitätsfaktor beschrieben. Beide wurden vom gleichen VEGF-(*Vaskular Endothelial Growth Factor*)Gen kodiert (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). VEGF (= VEGF-A) gehört wie VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und PlGF (*Placental Growth Factor*) zur VEGF-Familie. Durch alternatives Splicen können fünf VEGF-A-Isoformen unterschieden werden: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₃, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. Diese unterscheiden sich in ihrer biologischen Masse, in ihren biologischen Eigenschaften und in ihrer Fähigkeit, an die Zelloberfläche zu binden. Die Expression von VEGF kann durch Hypoxie, Hypoglykämie, aktivierte Onkogene und verschiedene Zytokine ausgelöst werden (Neufeld et al., 1999). So führt beispielsweise ein Mangel an Sauerstoff im Gewebe zur Bildung des hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktors I (HIF). Dieser verursacht eine erhöhte Expression von VEGF in Zellen. VEGF wird in unmittelbarer Nähe zum Wirkungsort ausgeschüttet und wirkt dort vor allem parakrin auf die Endothelzellen (Löffler, 2008).

VEGF-A fördert die Angiogenese, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Vaskulogenese (Neufeld et al., 1999) und erhöht die Permeabilität von Gefäßen indirekt über NO Freisetzung (Cross et al., 2003). Es induziert die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Kleinheinz et al., 2002), hat chemotaktische Eigenschaften und beeinflusst die Osteoblastendifferenzierung. Des Weiteren spielt VEGF-A eine große Rolle in der frühen und späten enchondralen Ossifikation, indem es Knorpel resorbiert und die Angiogenese fördert (Kumar et al., 2010).

1.3.4.1 VEGF-A-Signaltransduktion

Die verschiedenen VEGF-Formen binden an drei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Cross et al., 2003). Die unterschiedlichen Rezeptorformen werden in Tabelle 1 aufgeführt.

	Nomenklatur	Bindungspartner	Vorkommen
VEGF Rezeptor 1	VEGFR1, flt-1	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	Endothelzellen, Hämatopoetische Stammzellen, Makrophagen, Monozyten, Spermatozoen, Leydig Zellen, Osteoklasten
VEGF Rezeptor 2	VEGFR2, KDR/flk-1	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E	Vaskuläre und lymphatische Endothelzellen, Megakaryozyten und hämatopoetische Stammzellen
VEGF Rezeptor 3	VEGFR3, Flt-4	VEGF-C, VEGF-D	Lymphatische Endothelzellen

Tabelle 1: VEGF-Rezeptorformen (modifiziert aus CROSS, M. J., DIXELIUS, J., MATSUMOTO, T. & CLAESSION-WELSH, L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci, 28, 488-94.)

Co-Rezeptoren sind Neutrophiline, Heparan-Sulfat-Proteoglykane, Cadherine und Integrin $\alpha\beta_3$, an die unterschiedliche VEGFs binden (Cross et al., 2003). VEGF-A bindet mit einer höheren Affinität an VEGFR1 als an VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994). Der genaue Signaltransduktionsweg von VEGFR1 ist noch unbekannt. Bisher wird vermutet, dass die VEGFR1 und VEGFR2 sich unterscheiden und VEGFR1 einen hemmenden Effekt auf VEGFR2 hat (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). Die VEGFR2-Signalkaskade ist von Holmes et al. 2007 schematisch zusammengefasst worden und in Abbildung 2 neu dargestellt (Holmes et al., 2007).

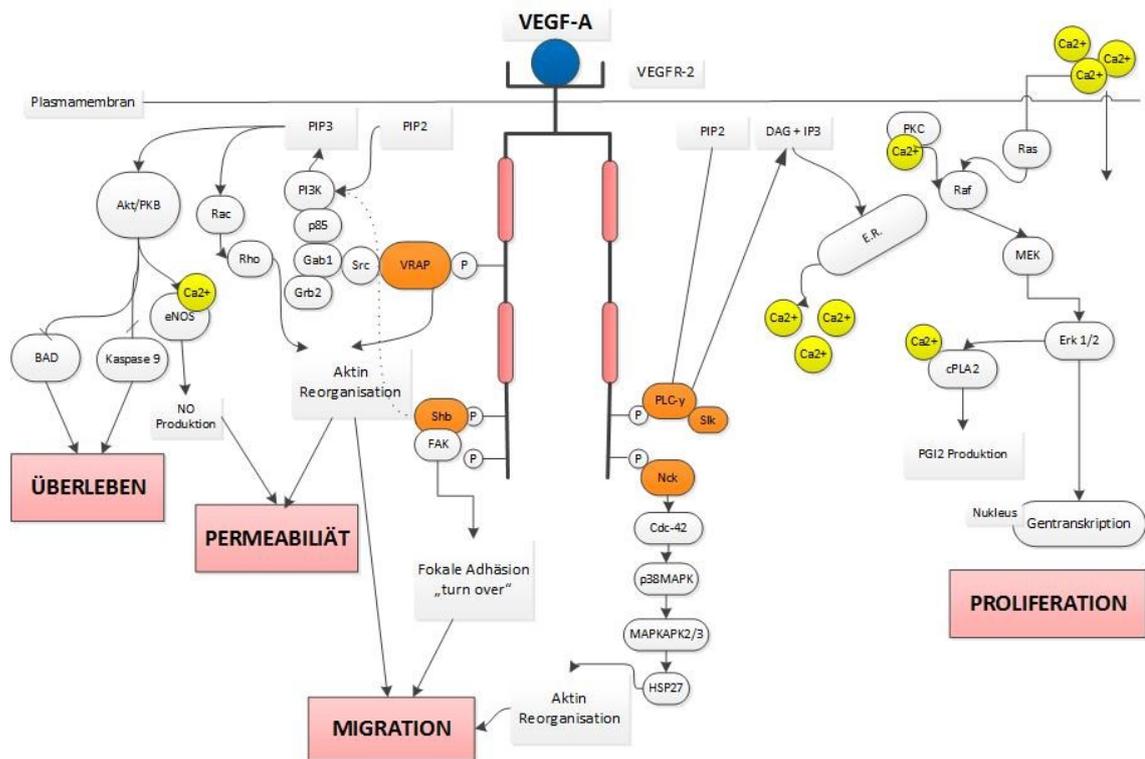


Abbildung 2: VEGF-Signalkaskade

Die Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor 2 resultiert in der Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinanteile des Rezeptors. Die Aktivierung der Signalkaskade führt in der Konsequenz zur Proliferation, Migration, zum Überleben und einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellen.

Verschiedene intrazelluläre Proteine binden an spezifische phosphorylierte Tyrosinanteile (pY) im VEGFR-2 über ihre SH2-Domänen, wodurch sie phosphoryliert und damit aktiviert werden. Die Bindung von PLC- γ an Y1175 löst die Hydrolyse von PIP₂ aus, wodurch die *second messenger* DAG und IP₃ freigesetzt werden. DAG ist ein physiologischer Aktivator der Proteinkinase C (PKC). IP₃ veranlasst die Ausschüttung von intrazellulärem Kalzium (Ca²⁺) aus dem Endoplasmatischen Retikulum (E.R.).

Der Eintritt von extrazellulärem Kalzium durch entsprechende Kanäle ist ebenfalls wichtig zur Aktivierung von Proteinen der Signalkaskade. VRAP/TSAd bindet an pY951 und formt einen Komplex mit Src. Die Bindung von Nck an pY1214 aktiviert Cdc42 und p38 MAPK und die Bindung von Shb an pY1175 reguliert die Aktivierung von FAK und PI3K.

(Modifiziert aus: HOLMES, K., ROBERTS, O. L., THOMAS, A. M. & CROSS, M. J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19, 2003-12.)

Auch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine, die selbst die Angiogenese nicht direkt stimulieren, können in den Angiogeneseprozess eingreifen, indem sie die VEGF-Produktion in bestimmten Zelltypen beeinflussen und somit einen indirekten angiogenen oder antiangiogenen Effekt haben. PDGF (Finkenzeller et al., 1997) und TGF β (Pertovaara et al., 1994) zum Beispiel stimulieren die VEGF-Produktion, während IL10 und IL13 die VEGF-Produktion hemmen (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001). Des Weiteren wird die VEGF-Expression von p53, einem Tumorsuppressorgen und dem Hippel-Landau Gen reguliert (beide inhibieren unter physiologischen Umständen die Angiogenese), was unter anderem VEGF auch eine Bedeutung in der Tumorgenese zuschreibt (Neufeld et al., 1999).

1.5. Trägermaterialien

Das Trägermaterial dient den Osteoblasten als Gerüst und wird benötigt, um aktive Proteine zu übertragen (Sigurdsson et al., 1997). Es müssen folgende Eigenschaften des Trägermaterials bei der Trägersauswahl beachtet werden, um den Knochenbildungsprozess zu unterstützen (Salgado et al., 2004):

1. Biokompatibilität
2. Poröses Material (um eine gute Zellverteilung und die Einsprossung von Gefäßen zu ermöglichen, wobei die Porengröße zwischen 200-900µm betragen sollte)
3. Günstige Oberflächeneigenschaften, um die zelluläre Adhäsion und Proliferation zu fördern
4. Osteoinduktivität (erhöht das Zellrecruitment und die Zelldifferenzierung)
5. Mechanische Stabilität und Biodegradabilität (um Platz für den neu wachsenden Knochen zu erhalten)

Den o.g. Kriterien entsprechen verschiedene in der Medizin verwendete Trägermaterialien mehr oder weniger. Trägermaterialien können z. B. aus Keramik hergestellt sein oder aus natürlich vorkommenden Materialien, wie z.B. korallinen Hydroxylapatit, Fibrin oder Kollagen bestehen. Des Weiteren können Trägermaterialien synthetisch hergestellt sein, wie z.B. synthetisches Hydroxylapatit oder das häufig verwendete β -Trikalzium-Phosphat (β TCP) (Salgado et al., 2004). ICBM (insoluble collagenous bone matrix) hat sich bereits in früheren Studien als geeignetes Trägermaterial für das Tissue Engineering von Knochen bewährt (Kahle et al., 2010, Langenbach et al., 2012b). Kollagen ist Teil der natürlichen organischen Knochenmatrix. Im Knochen ist es strukturgebend und an der Kalzifizierung der Matrix beteiligt. Die Vorteile von Kollagen als Trägermaterial sind eine geringe Immunantwort auf das Material, gute zelladhäsive Eigenschaften und eine chemotaktische Wirkung (Salgado et al., 2004). Das Hauptkollagen im Knochen ist mit über 90% Kollagen Typ I. Es besitzt hauptsächlich eine osteokonduktive Wirkung (Rammelt et al., 2004). Typ I-Kollagen fördert die Adhäsion von Osteoblasten über die Bindung an Integrinrezeptoren (Becker et al., 2002), ist wesentlich an der Signalkaskade zur Expression von Osteoblasten beteiligt und unterstützt die Mineralisation der extrazellulären Matrix (Eckelt et al., 2007).

2. Ziel der Arbeit

Die gesteuerte Knochenregeneration (*guided bone regeneration*, GBR) stellt mittlerweile ein etabliertes Verfahren in der dentalen Implantologie dar (Lang et al., 1994). Neben einer Barrieremembran werden autologer Knochen und/oder Knochenersatzmaterialien (KEM) eingesetzt. Mit dieser Methode kann in geringem Maße periimplantärer Knochen regeneriert werden (Jamjoom und Cohen, 2015, Salgado et al., 2004, AlGhamdi et al., 2010). Eine besondere Schwierigkeit stellt die periimplantäre vertikale Knochenregeneration dar (Daga et al., 2015, Sigurdsson et al., 1996). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *in vivo* zu untersuchen, ob sich mit einer Kombination aus osteoinduktivem Protein (BMP2) und Angiogenese-förderndem Wachstumsfaktor (VEGF) auf einem kollagenen Träger eine signifikante vertikale Knochenregeneration gleichzeitig mit der Implantatsetzung erzielen lässt. Zudem sollte herausgefunden werden, ob die Kombination BMP2+VEGF ein synergistisches Potential besitzt, um periimplantären Knochen zu generieren (Schorn et al., 2017).

3. Material und Methode

Für die vorliegende tierexperimentelle Studie lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf unter dem Aktenzeichen 50.05-240-90/05 vor. Die Operationen wurden von PD Dr. Dr. Depprich und PD Dr. Dr. Naujoks durchgeführt. Die histologische und histomorphometrische Auswertung erfolgte eigenständig. Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter: Schorn L, Sproll C, Ommerborn M, Naujoks C, Kübler NR, Depprich R (2017), Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF, *Head Face Med*, 13(1):11.

3.1. Versuchstiere

Für die vorliegende tierexperimentelle Studie wurden zwölf ausgewachsene Minischweine (durchschnittlich 66 kg, beide Geschlechter) verwendet. Bezugsquelle war die eigene Zucht aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Haltung der Tiere erfolgte als Gruppe in den Stallungen der TVA der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ Raumlufttemperatur und 40-55% Luftfeuchtigkeit (Luftaustausch 12 Mal pro Stunde, Hell-/Dunkel-Rhythmus 12 Stunden). Bis zum Abklingen der Narkosewirkung wurden die Tiere postoperativ in Einzelboxen untergebracht und unter Wärmelampen gelegt, um eine Unterkühlung und die damit einhergehenden Risiken wie Immunsuppression und erhöhte Blutungsneigung zu minimieren. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchszeit mit frei zugänglichem Leitungswasser und einer speziellen Futtermischung für Minipigs (ssniff® MPig-H, Alleinfuttermittel für Minipigs, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gefüttert. Postoperativ wurde das Futter zunächst (für drei Tage) eingeweicht, um Irritationen des Heilungsprozesses zu vermeiden.

3.2. Implantate

Es wurden 11 mm lange und 3,5 mm durchmessende dentale Implantate (Nobel Replace Straight NP, Nobel Biocare, Göteborg, Schweden) verwendet.

3.4. Träger

Der resorbierbare kollagene bovine Träger (*insoluble collagenous bone matrix*, ICBM-Träger) wurde nach Protokoll aus Rinderknochen selbst hergestellt (Depprich et al., 2005, Wurzler et al., 2004, Naujoks, 2011). Der scheibenförmige Kollagenträger hatte einen Gesamtdurchmesser von 10mm, einen Innenlochdurchmesser von 3,5mm, eine

Höhe von 5mm und ein Volumen von 345mm^3 , sodass der Träger exakt passend über das 5mm über dem Knochenniveau herausstehende Implantat platziert werden konnte (siehe Abbildung 3).

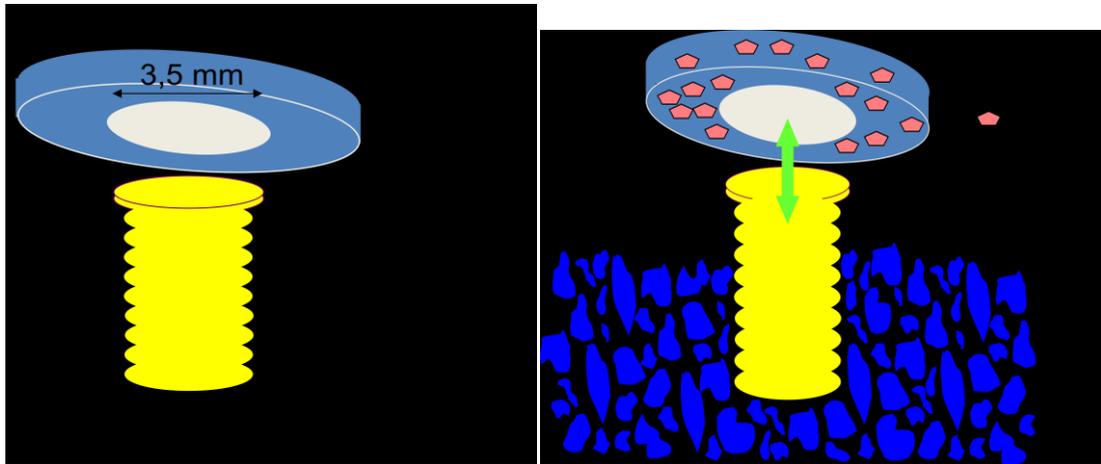


Abbildung 3: Größe von ICBM-Träger und Implantat (links). Der exakt passende Träger wird über das 5mm über das Knochenniveau herausstehende Implantat platziert.

3.5 Zytokine

Je nach Untersuchungsgruppe wurden $138\mu\text{g}$ rekombinantes humanes BMP2 und/oder $18,4\mu\text{g}$ VEGF (Recombinant Human VEGF165 #293-VE-050, R&D Systems Europe, Ltd., Abington, United Kingdom) auf den Träger aufgebracht. Das rhBMP2 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Sebold (Würzburg, Deutschland) bereitgestellt.

3.6 Gruppeneinteilung

Die Unterteilung erfolgte in drei Gruppen entsprechend einer Einheilungszeit von zwei Wochen, vier Wochen und zwölf Wochen mit jeweils vier Tieren (siehe Tabelle 2).

Untersuchungszeitpunkt:	Anzahl der Tiere
2 Wochen	4
8 Wochen	4
12 Wochen	4
Σ	12

Tabelle 2: Anzahl der Tiere pro Untersuchungsgruppe

3.7 Implantatinsertion

Die Reihenfolge der Implantationen wurde nach Protokoll durchgeführt. Bei allen zwölf Minischweinen wurden neun Implantate gesetzt, womit eine Gesamtprobengröße von 108 erreicht wurde, welche eine aussagekräftige statistische Analyse gestattet (siehe Tabellen 3-5). Jeweils drei Implantate wurden in die rechte Tibia und sechs Implantate in den Unterkiefer (drei Implantate pro Unterkieferhälfte) inseriert. Eine detaillierte Übersicht über die gesetzten Implantate geben Tabellen 3 und 4. Die Implantate wurden entweder ohne weitere Behandlung inseriert (K=Kontrolle) oder wurden im koronalen, dem Knochenniveau überstehenden Anteil, entweder mit einem passgenauen unbehandelten Kollagenträger (I=ICBM-Träger), einem mit BMP2-dotierten ICBM-Träger (II= ICBM-Träger+BMP2) oder einem mit BMP2+VEGF-dotierten ICBM-Träger (III=ICBM-Träger+BMP2+VEGF), versehen. Einige Implantate, die ohne Kollagenträger gesetzt wurden, waren vorher an der Oberfläche mit BMP2 benetzt worden (IV= BMP2-überzogene Implantate). Diese Implantate wurden jedoch nicht in die Auswertung miteinbezogen. Eine detaillierte Übersicht über die Verteilung und Anzahl der einzelnen Untersuchungsgruppen geben Tabellen 3-5.

Tier 1 (Gruppe 1-3)		Tier 2 (Gruppe 1-3)		Tier 3 (Gruppe 1-3)		Tier 4 (Gruppe 1-3)	
rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
III	IV	II	IV	II	K	III	II
III	IV	II	IV	II	I	III	II
III	IV	II	IV	II	I	III	II

Tabelle 3: Anzahl und Verteilung der Implantatinsertionen pro Unterkieferhälfte (rechts bzw. links) pro Tier und Gruppe

Tier 1 (Gruppe 1-3)	Tier 2 (Gruppe 1-3)	Tier 3 (Gruppe 1-3)	Tier 4 (Gruppe 1-3)
II	III	IV	K
II	III	IV	I
II	III	IV	I

Tabelle 4: Anzahl und Verteilung der Implantatinsertionen in die rechte Tibia pro Tier und Gruppe

	K	I	II	III	IV
Tibia	3	6	9	9	9
Mandibula	3	6	27	18	18
Total	6	12	36	27	27
Total pro Gruppe	2	4	12	9	9

Tabelle 5: Anzahl der Proben insgesamt. Abkürzungen: K=Kontrolle, I = ICBM-Träger, II = ICBM-Träger + BMP2, III = ICBM-Träger+ BMP2 + VEGF, IV = BMP2-überzogene Implantate

3.8 Operation

3.8.1 Anästhesie

Die Zahnextraktion und Implantation erfolgten in Inhalationsnarkose unter Verwendung von Isofluran mit zusätzlicher Verwendung von Lokalanästhetika. Die präoperative Sedierung der am Operationstag nüchternen Minischweine erfolgte intramuskulär mit 10mg/kgKG Ketamin (Ketavet®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 5mg/kgKG Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland). Die Narkoseeinleitung erfolgte mittels 3-5ml Kurzzeithypnotikum (Thiopental inresa®, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) über einen venösen Zugang in der Ohrvene. Danach erfolgte die endotracheale Intubation. Die Intubationsnarkose wurde mittels Narkosegerät (Sulla 808, Fa. Dräger, Lübeck, Deutschland) und Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch (O₂:N₂=1:3, Einleitung mit 1,5% Isofluran (Isoflurane® 250ml, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt, die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran 1%. Zusätzlich wurde zur intraoperativen Schmerztherapie 0,5ml Piritramid (Dipidolor®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) eingesetzt, Articainhydrochlorid (Ultracain® DS, 1:200.000, Aventis, Frankfurt, Deutschland) wurde zusätzlich als Lokalanästhetikum eingesetzt. Als intravenöse Infusion während der Narkose bekamen die Tiere Glucose 5% (Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland). Zur Infektprävention wurde allen Tieren eine perioperative Antibiotikaprophylaxe mit 10mg/kg KG Amoxicillin i.m. (Duphamox LA®, Fort Dodge, Würselen, Deutschland) und als Schwellungs- und Entzündungsprophylaxe 4,4mg/kgKG Carproven p.o. (Rimadyl®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) bis zum dritten postoperativen Tag gegeben. Postoperative Röntgenaufnahmen wurden in Kurznarkose bzw. unter Sedierung durchgeführt.

3.8.2 Zahnextraktion

Nach Lagerung und Narkoseeinleitung wurde zunächst die Mundhöhle durch Chlorhexidinspülung (Hexoral®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) gesäubert und, um postoperativen Wundschmerz zu vermeiden, wurden 4ml Ultracain® DS (Aventis, Frankfurt, Deutschland) in das Unterkiefervestibulum injiziert.

Es folgte ein Zahnfleischrandschnitt mit vestibulären Entlastungsschnitten. Nach Abpräparation des Mukoperiostlappens wurden den Tieren unter Zuhilfenahme einer Lindemannfräse und unter ständiger Kühlung mit steriler Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) die Prämolaren und der erste Molar beider Unterkieferhälften zerteilt und mit Hebel oder Zange entfernt. Ließen sich die Zähne nicht als Ganzes extrahieren, wurden die Wurzeln unter ständiger NaCl-Kühlung mittels Rosenbohrer mit steriler Kochsalzlösung entfernt. Im Anschluss wurden die Knochenkanten geglättet und es folgte die plastische Deckung der Extraktionsalveolen. Ein speicheldichter Wundverschluss der Alveole wurde durch Rückstichnähte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) sichergestellt.

3.8.3 Implantatinsertion

Nach einer Abheilphase von ca. drei Monaten folgte die Implantation von insgesamt 108 Implantaten in die Tibia und den UK der zwölf Minischweine.

Die Tiere wurden entsprechend gelagert und nach Anästhesieeinleitung die jeweiligen Operationsgebiete wurde mit Kodan®-Tinktur forte (Kodan® Tinktur forte gefärbt, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) (Tibia) oder mit Chlorhexidinlösung (Hexoral®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) desinfiziert. Zur Lokalanästhesie wurden 8ml (Tibia) bzw. 4 ml (Unterkiefervestibulum) Ultracain® DS (Aventis, Frankfurt, Deutschland) subkutan injiziert.

Intraoral erfolgten zunächst ein Zahnfleischrandschnitt in der Region der extrahierten Zähne und vestibuläre Entlastungsschnitte sowohl mesial als auch distal des Zahnfleischrandschnittes. Es folgte die Abpräparation des Mukoperiostes und Nivellierung des Knochens. In der vestibulo-lingualen Mitte des Alveolarkammes wurden drei Implantate unter Ausnutzung des mesio-distalen Platzangebotes inseriert. Zunächst wurde eine Pilotbohrung mit dem Rosenbohrer durchgeführt (max. 800U/min) und dann das Implantatbett nach Herstellerprotokoll unter dauerhafter NaCl-Kühlung präpariert (siehe Abbildung 4).

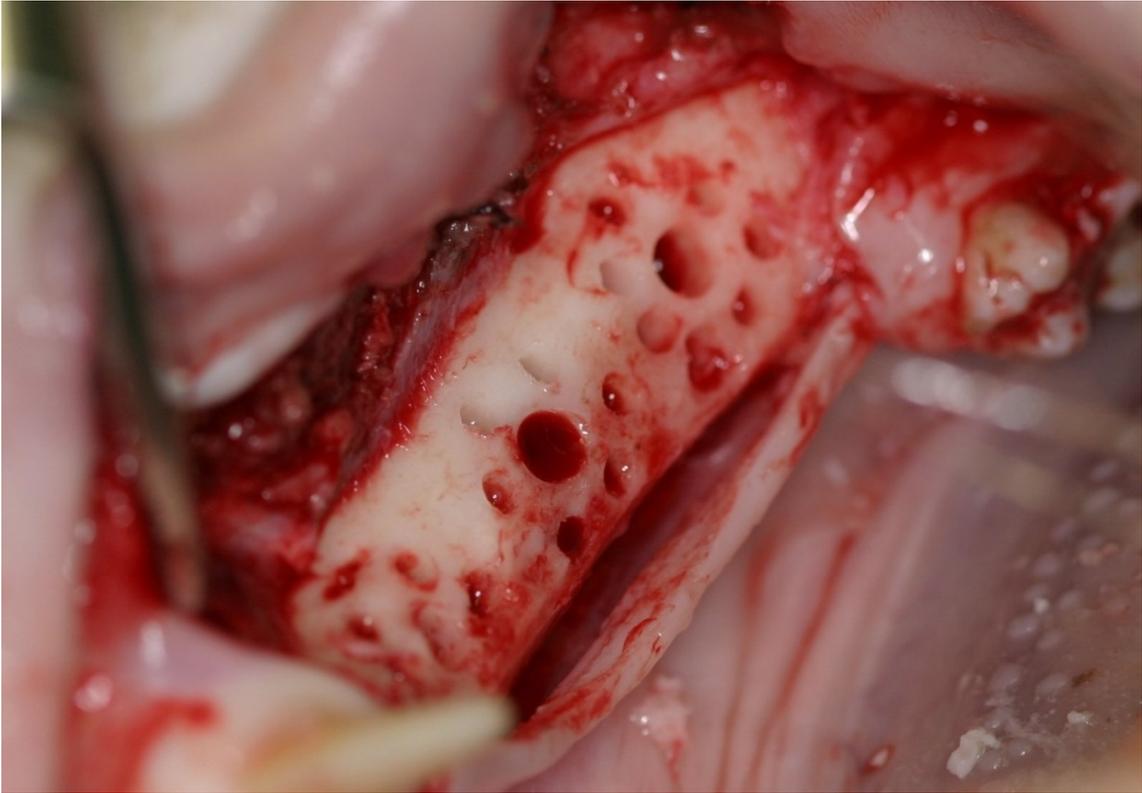


Abbildung 4: Alveolarkamm Unterkiefer mit Defektsetzung zur Implantation.

Anschließend wurden die Implantate (Länge: 11mm, Durchmesser: 3,5mm) entweder manuell mit der Ratsche oder maschinell mit geringer Umdrehungszahl (≤ 15 U/min) gesetzt. Die Implantate wurden so gesetzt, dass sie Primärstabilität aufwiesen und 5mm über das Knochenniveau herausstanden. Auf der kontralateralen Unterkieferseite wurden die Implantate analog inseriert. Die Primärstabilität der Implantate wurde mit Hilfe von Periotest und der Resonanz-Frequenz-Analyse (Osstell® mentor, Integration Diagnostics, Göteborg, Schweden) überprüft.



Abbildung 5: Implantatinsertion Alveolarkamm Unterkiefer.

Im Anschluss wurde der ICBM-Träger (Gesamtdurchmesser: 10mm, Innenlochdurchmesser: 3,5mm, Höhe: 5mm, Volumen: 345mm^3) mit bzw. ohne Zytokin (BMP2:138 μg und/oder VEGF:18,4 μg) über das Implantat gesetzt (siehe Abbildung 6).

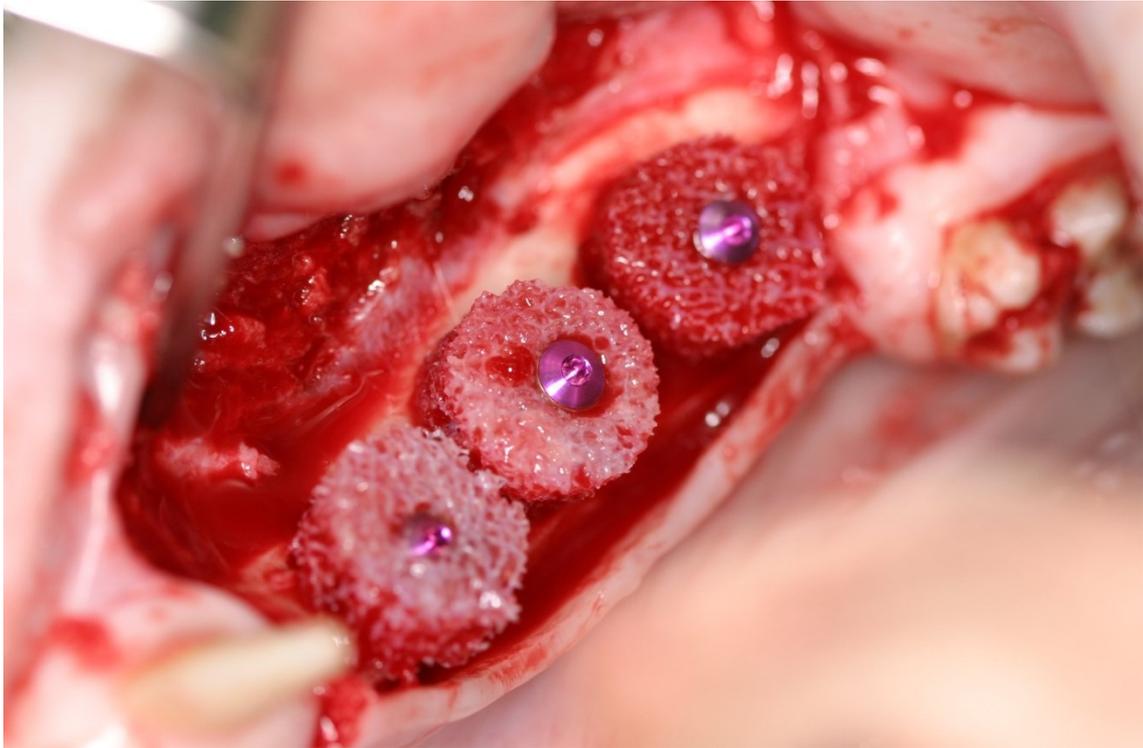


Abbildung 6: ICBM Träger über den Implantaten, Alveolarkamm Unterkiefer.

Anschließend wurde eine Periostschlitzung durchgeführt und der Mukoperiostlappen reponiert. Mit resorbierbaren Vicryl®-Fäden wurde ein spannungsfreier speicheldichter Wundverschluss mit Einzelknopf- und Rückstichnähten durchgeführt (Vicryl® 2/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

An der Tibia erfolgte nach Applikation von Lokalanästhetika und Anlegen einer sterilen Operationsfolie das scharfe Durchtrennen von Haut und Subkutis in einer lateralen Schnittführung. Daraufhin folgte die spitz-stumpfe Abpräparation der Muskulatur bis auf das Periost und eine Periostschlitzung. Eventuelle Blutstillung erfolgte durch Elektrokoagulation, größere Gefäße wurden mit Vicryl® 2/0 (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) unterbunden.

Die Knochenvorderfläche wurde auf ca. 10cm dargestellt und o.g. Knochendefekte angelegt (Abbildung 7a). Es folgte die Implantatinsertion analog wie im Unterkiefer und das Platzieren der ICBM-Träger mit bzw. ohne Zytokin (Abbildung 7b).

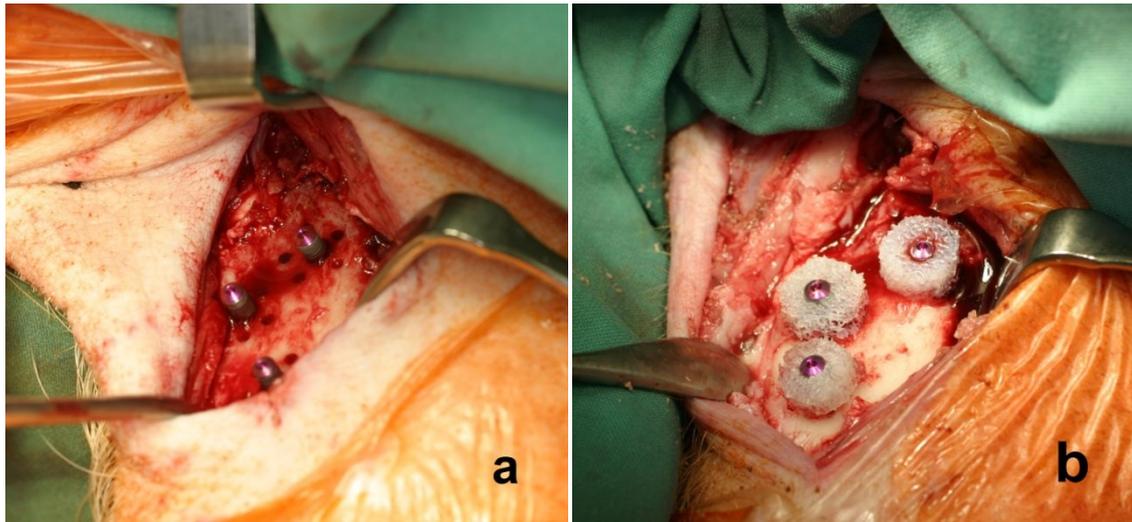


Abbildung 7 a+b: a) Gesetzte Implantate mit umgebenden Bohrlöchern an der Tibia, b) mit ICBM-Trägern bestückte Implantate, Tibia.

Zum mehrschichtigen Wundverschluss (Periost-, Muskel- und Subcutannaht) sowie zur Hautnaht wurden resorbierbare Vicryl®-Fäden (Vicryl® 2/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Abschließend wurde ein Sprühverband (Nobecutan®, Astra Chemicals GmbH, Wedel/Holstein, Deutschland) aufgebracht. Zur Schmerzlinderung nach Abklingen der Betäubung wurde Piritramid i.v (Dipidolor®, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) intraoperativ gegeben.

3.9 Röntgenkontrolle

Röntgenaufnahmen zur Lagekontrolle der Implantate wurden nach der Insertion, in einmonatigen Abständen und unmittelbar nach der Opferung der Versuchstiere angefertigt. Die Sedierung erfolgte durch Injektion von Ketamin (Ketavet® 10mg/kgKG), Azaperon (Stresnil®, 5mg/kgKG) und 1ml Atropin in den Nacken (zusätzlich gegebenenfalls 3-5ml Thiopental inresa® über einen Venenverweilkatheter in der Ohrvene).

3.10 Fluoreszenzmarkierung

Die Markierung neugebildeten Osteoids erfolgt mittels intravitale Fluoreszenzfarbstoffe. Die Farbstoffe wurden als 3%-ige Lösung in 2% NaHCO₃ durch einen Sterilfilter in den Nacken der Minischweine injiziert (Applikationszeitpunkt und Dosierung der Fluoreszenzfarbstoffe: siehe Tabelle 6). Es wurden Calcein (C0875-10G, Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, Deutschland), Alizarin Red S (A5533-25G, Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, Deutschland) und Rolitetraacycline (R2253 Fluka, Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

Farbstoff	Applikation	Dosierung	Fluoreszenzfarbe
Calcein	11. post-op. Tag	15 mg/kg KG	Grün
Alizarin	17. post-op. Tag	30 mg/kg KG	Rot
Rolitetracycline	23. post-op. Tag	20 mg/kg KG	Gelb

Tabelle 6: Applikation und Dosierung der Fluoreszenzfarbstoffe

3.12 Histologische Untersuchung des neugebildeten Knochens

3.12.1 Trenn-Dünnschliff-Technik

Die Präparate wurden in einer 4%-igen Formalinlösung gelagert und fixiert. Die Formalinlösung wurde 60 Minuten lang mit Leitungswasser ausgewaschen und durch eine aufsteigende Glycolmethacrylat-Reihe entwässert. Die Infiltration erfolgte mit einem Gemisch aus Glycolmethacrylat (GMA, Methacrylicacid-hydroxylester, PSI Grünewald GmbH & Co KG, Laudenbach, Deutschland) und lighthärtendem Einbettmedium Technovit® 7200 VLC (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) bzw. reinem Technovit® 7200 VLC.

Die Präparate wurden dunkel gelagert und die Substanzen wurden alle 72 Stunden gewechselt.

Die Einbettung und Fixierung wurden mit einem Tropfen Technovit® 7230 VLC Fixationskleber in EXACT-Einbettmulden (EXACT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt. Die Mulden wurden blasenfrei mit Technovit® 7200 VLC aufgefüllt und bedeckt. Es folgte die Aushärtung mit dem EXAKT-Lichtpolymerisationsgerät (EXACT-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 400 bis 500nm über 10 Stunden. (zweiphasig, 2 Std. Gelblichtphase und 8 Std. Blaulichtphase). Die Polymerisation erfolgte bei einer Temperatur von unter 40°C im Kulzer-EXAKT-Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT-Apparatebau, Norderstedt; Deutschland), wobei mit Leitungswasser gekühlt wurde.

Die polymerisierten Blöckchen wurden aus den Einbettformen genommen, beschriftet und für einige Tage zum Nachtrocknen in eine dunkle Kühlkammer gelegt.

Nach Feststellung der korrekten Implantatebene wurde die nicht zu untersuchende Seite der eingebetteten Präparate mit dem Präzisionskleber Technovit 7210® VLC (Heraeus Kulzer, Dormagen, Deutschland) bestrichen und ein Plexiglasobjektträger wurde planparallel und blasenfrei auf den Klebstoff gelegt und mit Hilfe der Exakt-Vakuum-Klebpresse 10 Minuten lang unter Fotopolymerisation verklebt.

Im Anschluss wurden die Proben mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem und Silizium-Karbid-Schleifpapier weiterverarbeitet. Auf diese Weise wurden Trenndünnschliffe mit einer Dicke von 100µm (für die Mikroradiographie), 30µm (für die Fluoreszenzmikroskopie) und 3-5µm (für die Histologie) hergestellt.

3.12.2 Färbungen

Um eine lichtmikroskopische Unterscheidung von unterschiedlichen Zell- bzw. Gewebebestandteilen zu ermöglichen, wurden in dieser Studie eine Masson-Trichrom-Goldner- und eine Toluidinblau-Färbung verwendet.

Toluidinblau-Färbung

Durch Färbung der Präparate mit Toluidinblau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ergaben sich Differenzierungsmöglichkeiten durch metachromatische Farbeffekte (Farbreaktion mit sauren Glykosaminoglykanen). Knochenapposition oder -resorption wurden darstellbar. Mineralisierte Knochengewebe werden mit dieser Färbung nicht bzw. leicht blau gefärbt, Zellen, Zellkerne, Kollagenfasern und Osteoidsäume stellen sich unterschiedlich blau dar. Mastzellengranula, frühe Wundheilungsareale und Knorpelmatrix färben sich metachromatisch rotviolett an. Eine Färbeanleitung zeigt Tabelle 7.

3 min.	Einlegen in 3%ige Essiglösung
2 min.	Spülen mit Leitungswasser
Trocknen	
10 min.	Einlegen in 10 %iges H ₂ O ₂
2 min.	Spülen mit Leitungswasser
30 min.	Färben mit Toluidinblau-Lösung
2 min.	Spülen mit Leitungswasser
20 sec.	Spülen in 70 %igem Ethanol

Tabelle 7: Färbeanleitung Toluidinblau

Danach Eindeckung der Trenn-Dünnschliffe mit Technovit T200VCL und Glasdeckplättchen.

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Diese Färbung stellt eine klare farbliche Unterscheidung mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochenmatrix sicher. Knochen und Kollagen färben sich leuchtend grün, Osteoid und Zytoplasma rot, Zellkerne blauschwarz und Erythrozyten orange. Eine Färbearbeitung zeigt Tabelle 8. Verwendet wurde ein Masson-Goldner-Färbekit (Azophloxin-Lösung, Phosphorwolframsäure Orange G-Lösung, Lichtgrün SF-Lösung, Essigsäure 10 %, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

5 min	Färben mit Hämatoxylin nach Weigert
5 min	Spülen mit Leitungswasser
Schwenken in 1%iger Essigsäure	
10 min	Azophloxin-Lösung
Schwenken in 1%iger Essigsäure	
5 min	Färben in Orange-G
Schwenken in 1%iger Essigsäure	
15 min	Färben mit Lichtgrün-Lösung
Schwenken in 1%iger Essigsäure	
Spülen mit Aqua destilla und Lufttrocknung	

Tabelle 8: Färbearbeitung Trichrom-Masson-Goldner-Färbung (nach Anleitung der Firma Merck (Merck, 2004))

Danach folgte die Eindeckung der Trenn-Dünnschliffe mit Technovit T200VCL und Glasdeckplättchen.

3.12.3 Histomorphometrie

Die Auswertung und Vermessung der Präparate erfolgte mit Hilfe von Lichtmikroskopen (Olympus BX50, Olympus, Hamburg, Deutschland und Leica DM 5000B, Leica, Wetzlar, Deutschland), einer mikroskopischen Kamera (Leica DFC 40020C, Leica Wetzlar, Deutschland) und Bildvermessungsprogrammen (Cell D®, Soft Imaging System, Münster, Deutschland und Leica Application-Suite LA5 V3.7 Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., 2003, Wetzlar, Deutschland). Die zu vermessenden Flächen konnten manuell markiert werden. Für die Flächenvermessung wurden konkrete Areale durch Farbkontrastierung markiert und nur diese wurden mit in die Auswertung einbezogen. Die Messungen wurden zwei Mal pro Implantat durchgeführt und der Mittelwert wurde berechnet. Es erfolgte eine allgemeine Betrachtung und Bewertung der Implantate in 12,5-facher Vergrößerung und eine

Vermessung unter 40-facher Vergrößerung: Um den Knochen-Implantat-Kontakt angemessen beurteilen zu können, wurden die Implantate unter 100-facher Vergrößerung betrachtet.

Es wurden folgende Messgrößen erhoben:

1. Länge des Implantates (Abbildung 8 a+b)
2. Länge der Windungen an einer Seite des Implantates (Abbildung 9 a+b)
3. Länge des am Implantat anliegenden Knochens (Abbildung 10 a+b)
4. MCBF (Most Coronal Bone Formation) Höchste gemessene Knochenhöhe im Schnittpräparat (Abbildung 11 a+b)
5. MCBIC (Most Coronal Bone Implant Contact) Höchster Knochen-Implantat-Kontakt (Abbildung 12 a+b)
6. Defektlänge (Abbildung 13 a+b)
7. Fläche des neugebildeten Knochens, der direkt am Implantat anliegt (Bone Volume Density = BVD) (Abbildung 14 a+b)

1. Messung der Länge des Implantates

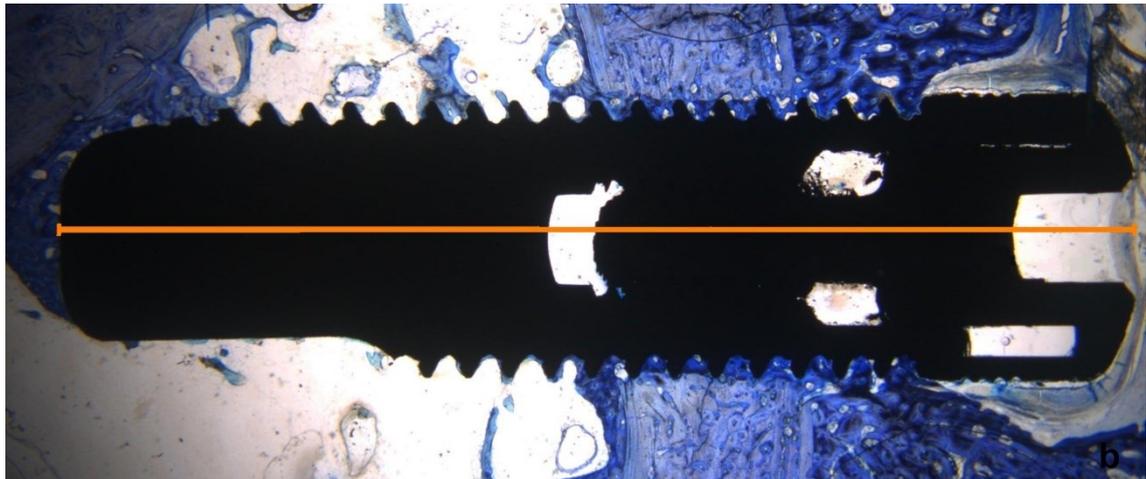
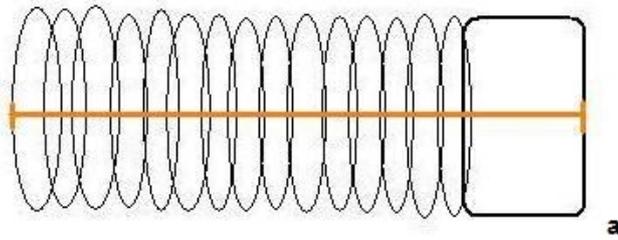


Abbildung 8 a+b: Messung der Länge des Implantates a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung.

2. Messung der Windungslänge

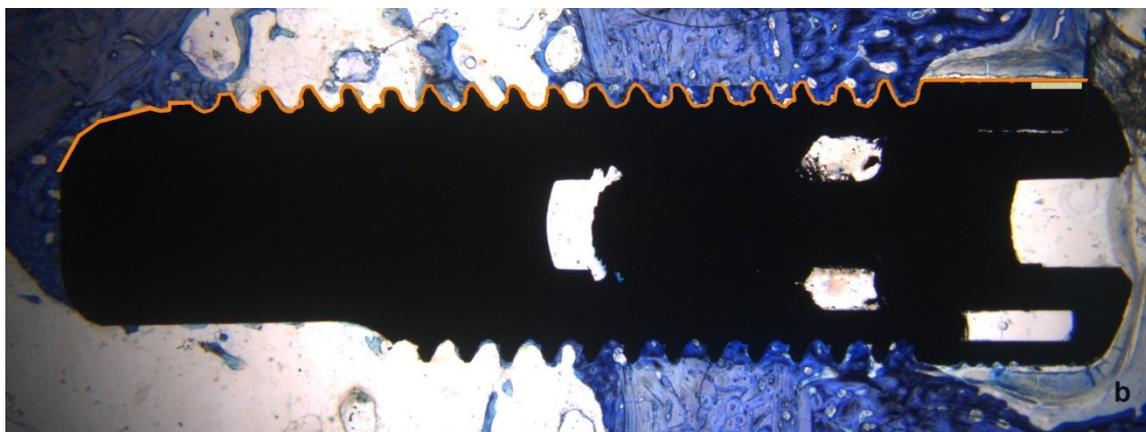
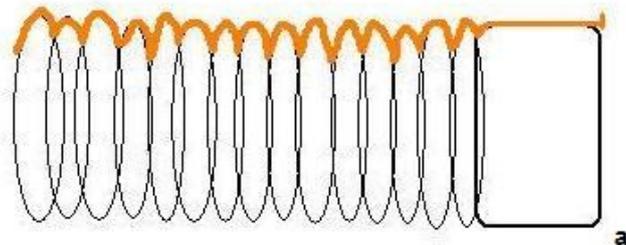


Abbildung 9 a+b: Messung der Windungslänge a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung.

3. Messung des Knochens am Implantat

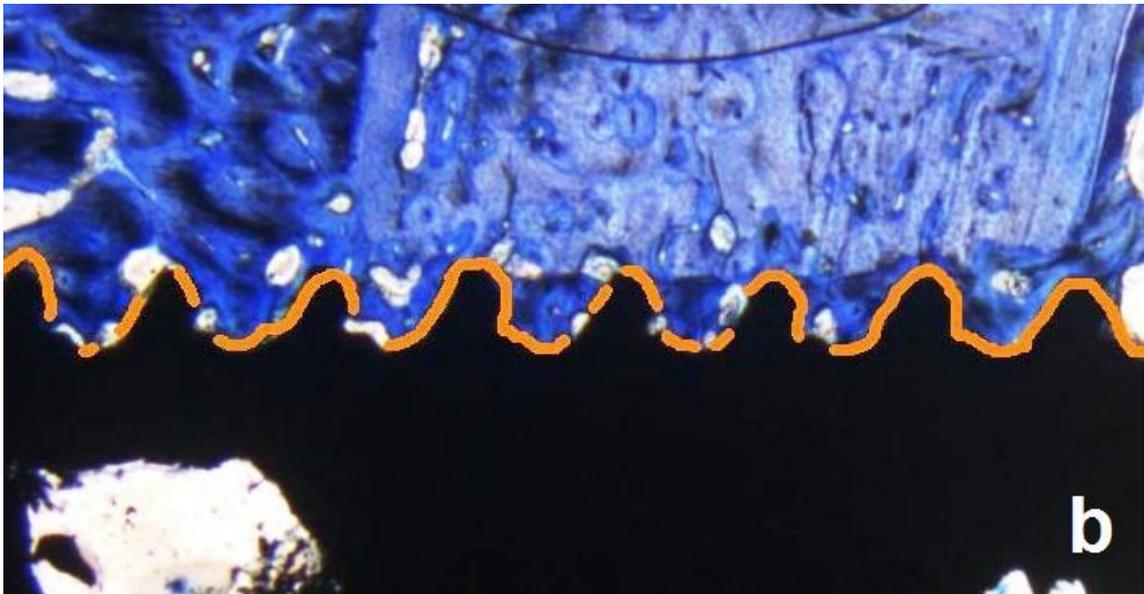
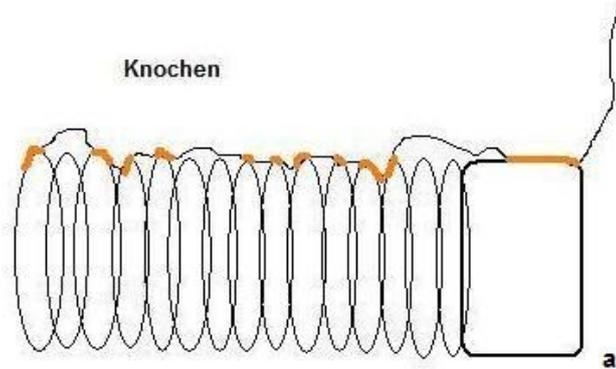


Abbildung 10 a+b: Messung des Knochens am Implantat a) schematisch, b) histomorphometrisch, 40-fache Vergrößerung.

4. Messung der MCBF

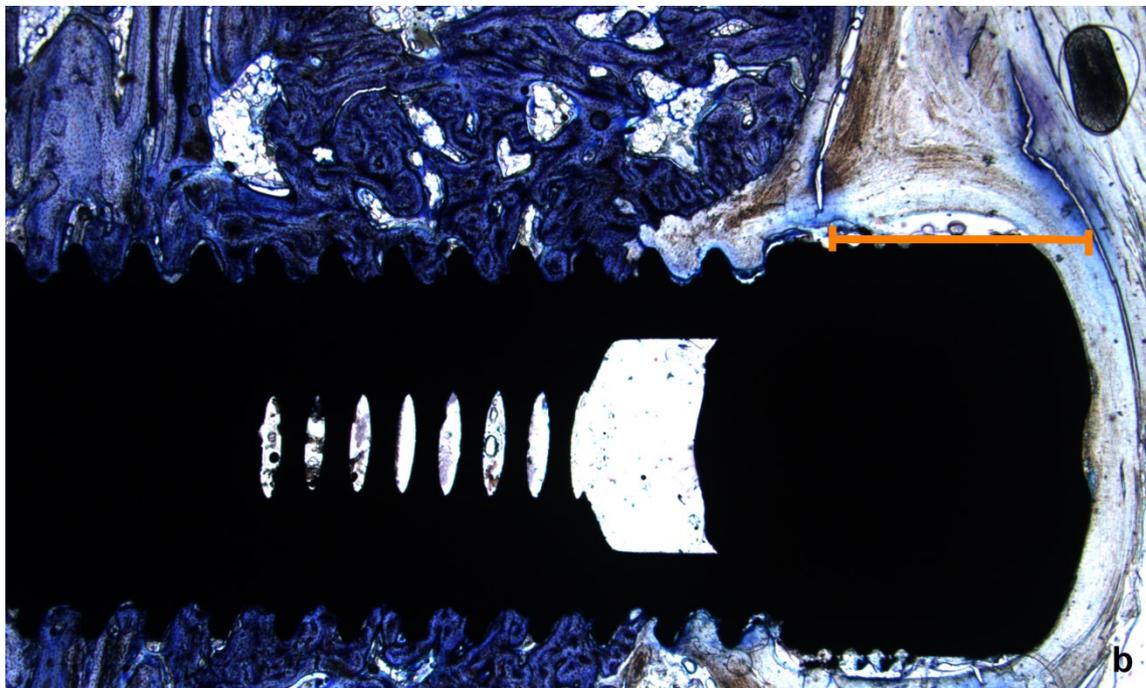
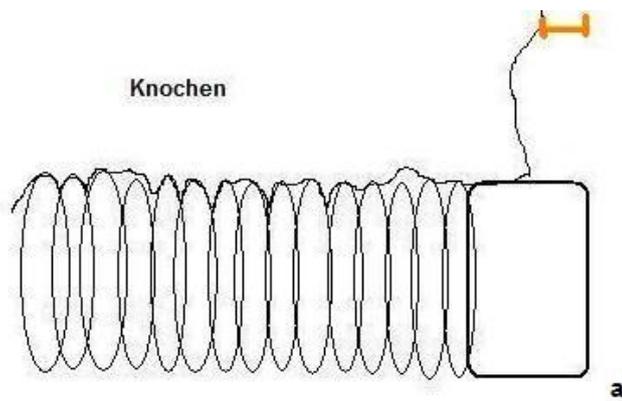


Abbildung 11 a+b: Messung MCBF a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung.

5. Messung des MCBIC

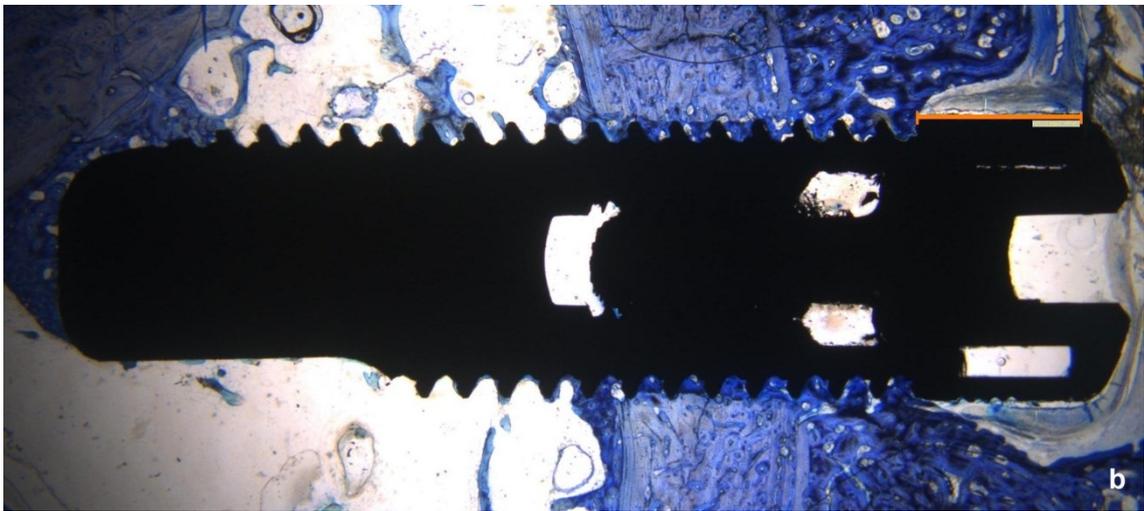
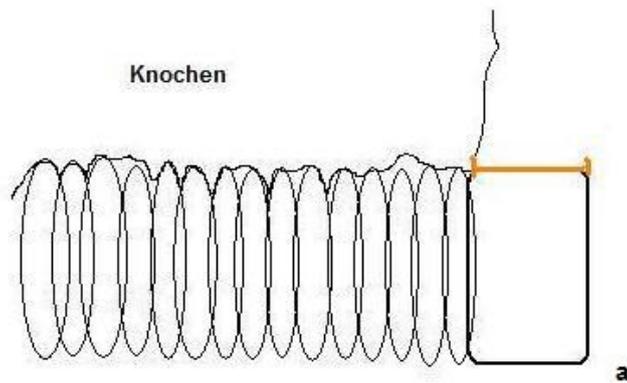


Abbildung 12 a+b: Messung MCBIC a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung.

6. Messung der Defektlänge

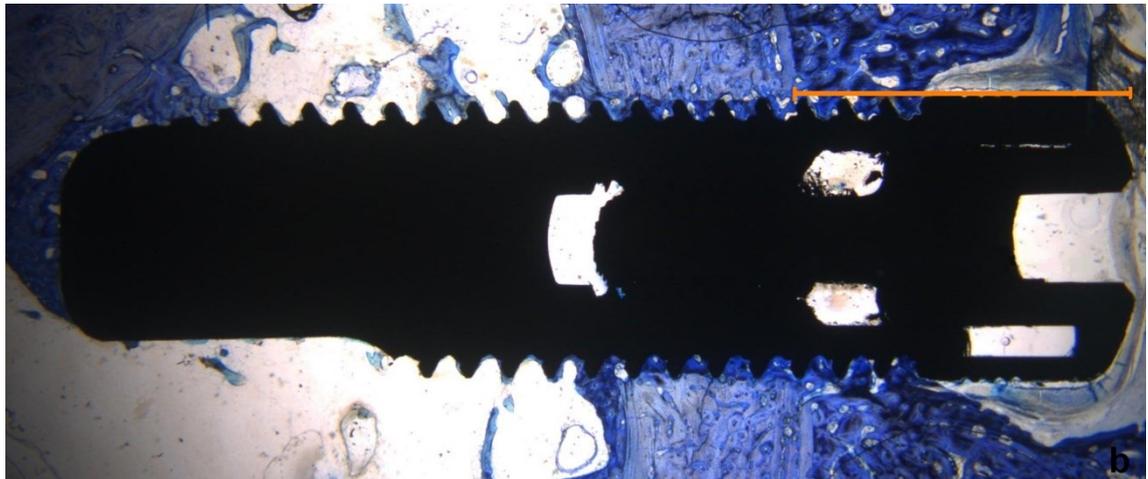
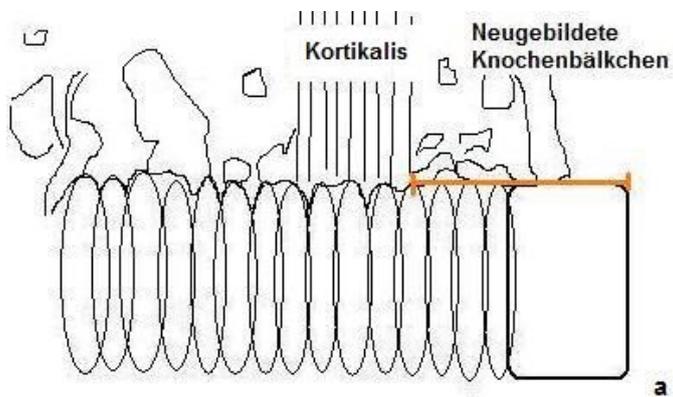


Abbildung 13 a+b: Messung Defektlänge a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung

7. Messung Bone-Volume Density% (BVD%)

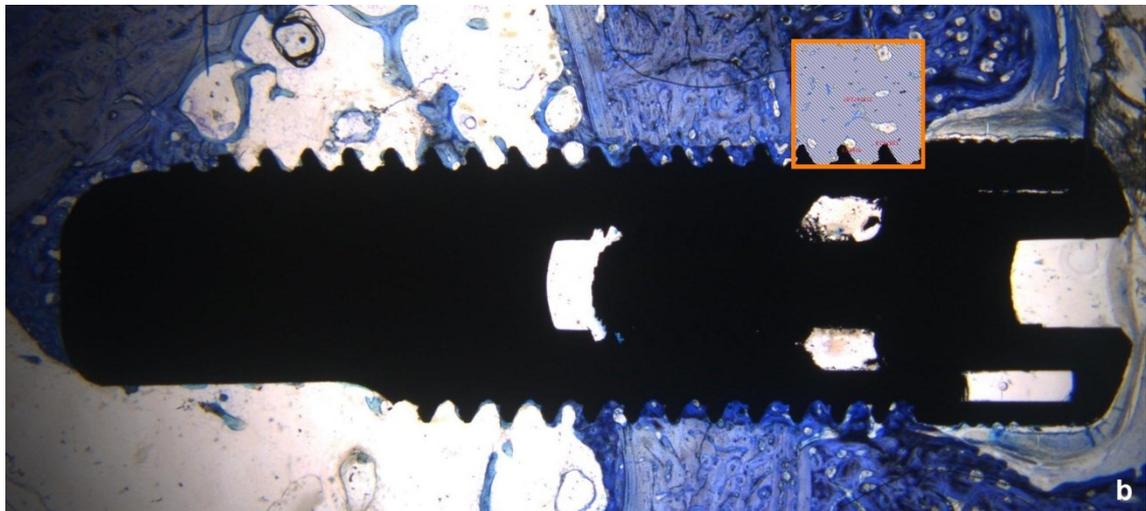
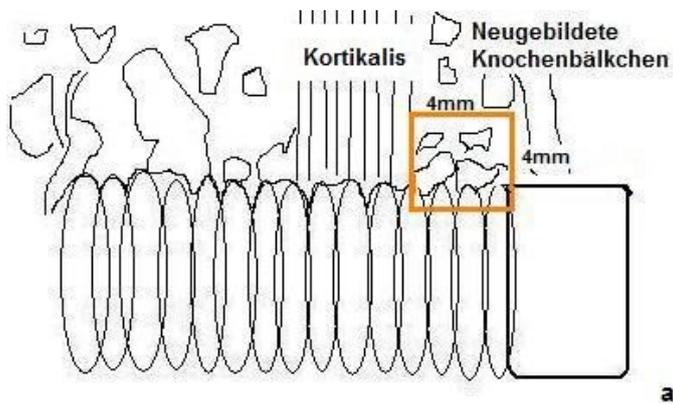


Abbildung 14 a+b: Messung Fläche a) schematisch, b) histomorphometrisch, 12,5-fache Vergrößerung.

3.12.3.1 BIC (Bone-implant contact)

Aus den gemessenen Werten konnten die zu vergleichenden Größen berechnet werden.

Der BIC errechnet sich wie folgt aus den gemessenen Daten:

$$\frac{\text{Knochen am Implantat}}{\text{Gesamtlänge der Windungen}} \times 100 = \mathbf{BIC} \%$$

3.12.3.2 Neugewonnene Knochenhöhe

Die neugewonnene Knochenhöhe lässt sich durch folgende Formel errechnen:

$$\text{Defektlänge} - \text{MCBIC} = \text{Neugewonnene Knochenhöhe in mm}$$

3.12.3.3 Zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich

Formel zur Berechnung der zugewonnenen Knochenhöhe:

$$-\left(\frac{\text{MCBF}}{\text{Defektlänge}}\right) + 1 = \text{Zugewonnene Knochenhöhe}$$

3.13 Statistische Auswertung

Die Erfassung der Daten und die Erstellung von Diagrammen und Mittelwerttabellen erfolgte mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 21 (IBM SPSS Inc. Chicago, USA). Mit Unterstützung von Dr. Wolfgang Kaisers (CBiBs, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) konnten die Daten überprüft, weiter ausgewertet und auf signifikante Unterschiede untersucht werden. Zunächst wurden die Häufigkeiten der Werte zusammengefasst und jede Variable auf ihre richtige Übernahme und Plausibilität überprüft (entsprechende Konsequenzen wurden gezogen). Mittels des Shapiro-Wilk-Testes wurden die Werte auf ihre Normalverteilung geprüft. Eine Lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen darzustellen. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

Nach einer Einheilungszeit von zwei, vier und zwölf Wochen wurden die Präparate gewonnen und der Fortschritt des regenerativen Prozesses wurde bestimmt. Alle Tiere überlebten die chirurgischen Maßnahmen und konnten in den weiteren Auswertungsprozess einbezogen werden. Es gab keine Anzeichen auf eine Infektion während der Heilungsperiode.

Die Knochenbildung in den unterschiedlichen Präparaten wurde untersucht. Dabei kamen folgende Verfahren zur Anwendung:

- Histologische Untersuchung an Trenndünnschliffen
- Histomorphometrische Messung

Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Menge und der Qualität des neugebildeten periimplantären Knochens (Schorn et al., 2017).

4.2 Histologische Auswertung

Die Implantatproben wurden nach der Färbung unter dem Mikroskop betrachtet und ausgewertet. In der Masson-Goldner-Trichromfärbung färbt sich reifer Knochen hellgrün, neugebildeter Knochen zunächst orange und zunehmend mineralisierter Knochen dunkelgrün. Die Schleimhaut lässt sich durch ihre dunkelgrün bis fast schwarze Farbe erkennen.

In der Toluidinblau-Färbung stellt sich lamellärer reifer Knochen hellblau dar, während neugebildeter Knochen etwas dunkler blau erscheint. Auch hier wirkt die Schleimhaut sehr viel dunkler bis schwarz.

In beiden Färbungen ist der Unterschied zwischen reifem und neugebildetem Knochen nicht nur durch die farblichen Unterschiede erkennbar. Beweisend für das Vorliegen von Lamellenknochen lassen sich Osteone mit Havers'schen Knochenkanälen, Schaltlamellen, Speziallamellen, das Periost mit äußeren Grundlamellen und in 10-facher Vergrößerung auch Osteozyten erkennen. Der neugebildete Knochen ist durch das Osteoid mit darin enthaltenen Osteozyten erkennbar. Die Struktur dieser primären Knochenbälkchen ist noch leicht faserig und zwischen den primären Knochenbälkchen liegt gefäßreiches Mesenchym, das primäre Knochenmark (hell mit grauen Umrissen der Gefäße in der Toluidinblau-Färbung und hell mit orangenen Umrissen in der Masson-Goldner-Trichromfärbung). Das Implantat stellt sich in beiden Färbungen schwarz dar (Kühnel, 2008).

Die dargestellten Implantatproben zeigen sowohl die mit Masson-Goldner-Trichrom als auch die mit Toluidinblau gefärbten repräsentativen Präparate aus der jeweiligen Gruppe. Sie sollen die Knochenbildung und -anlegung in den verschiedenen Versuchsgruppen aufzeigen. Mit Hilfe der histomorphometrischen Auswertung werden die morphologischen Unterschiede anhand von gemessenen Daten dargestellt.

4.2.1 Nach zwei Wochen

4.2.1.1 Kontrolle

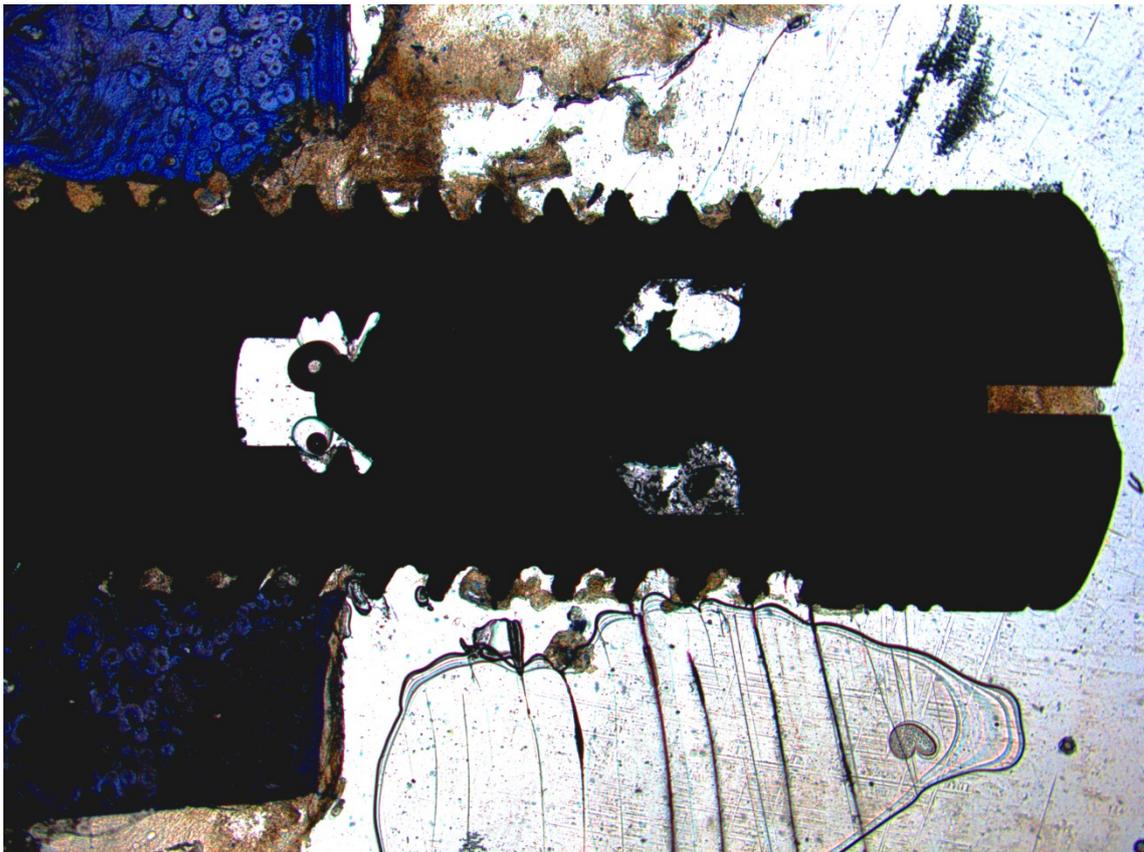


Abbildung 15: Kontrollgruppe nach zwei Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung. Das Implantat (schwarz) steht im Lamellenknochen (blau). Neugebildeter Knochen lässt sich nicht erkennen (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med*, 13, 11.).

Nach zwei Wochen lässt sich in der Kontrollgruppe kein neugebildeter Knochen oberhalb des ursprünglichem Knochenniveaus feststellen. Der periimplantäre Bohrspalt ist im ortsständigen Knochen erkennbar (Abbildung 15).

4.2.1.2 ICBM



Abbildung 16: ICBM-Gruppe nach zwei Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, das Implantat (schwarz) steht im Lamellenknochen (blau) (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Das in Abbildung 16 mit einem ICBM-Träger umgebene Implantat zeigt zwei Wochen nach der Implantation einen erkennbaren Bohrspalt, der mit Osteoid aufgefüllt wird. Die Kompakta lässt sich gut vom darüberliegenden Gewebe abgrenzen. Im Trägerbereich ist bläuliches Osteoid erkennbar.

4.2.1.3 ICBM+BMP2

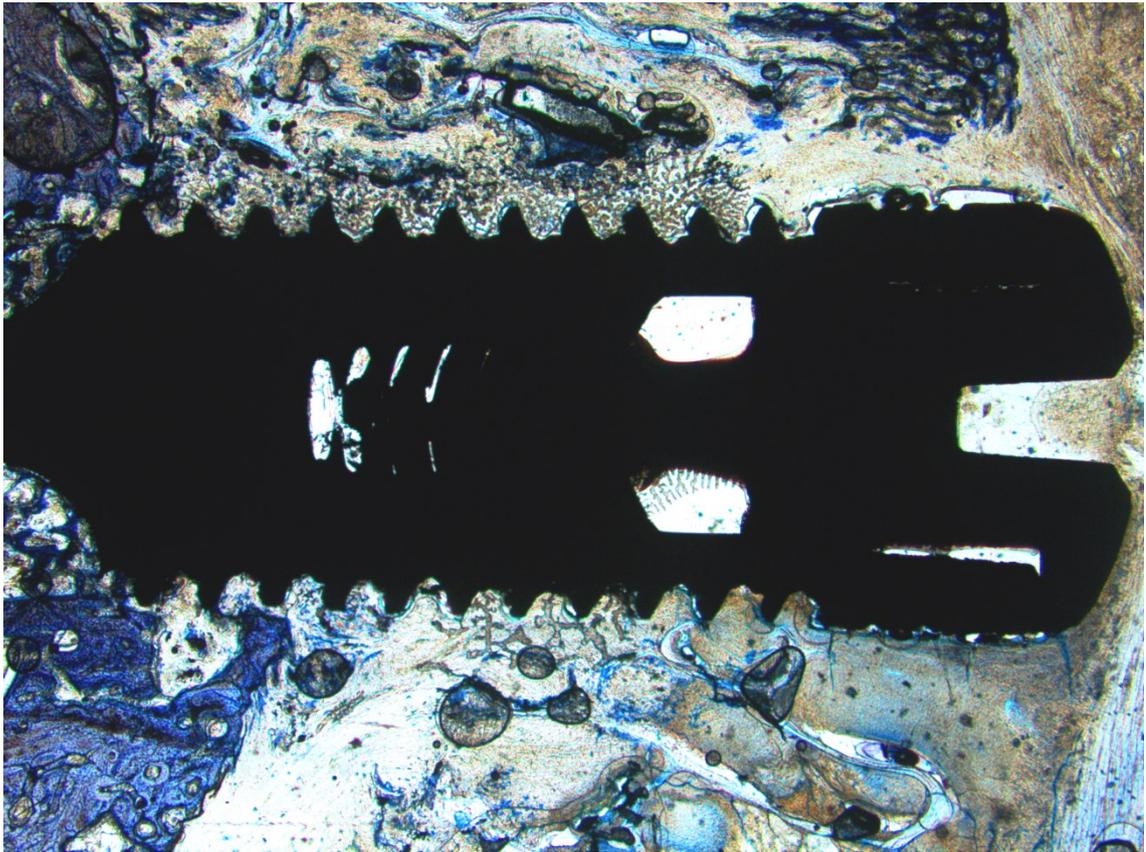


Abbildung 17: ICBM+BMP2-Gruppe nach zwei Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung. Das Implantat (schwarz) steht im Lamellenknochen (blau). Im Trägerbereich sind Gefäßlakunen mit Osteoid (hellblau) zu sehen (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Zwei Wochen nach der Implantation sind bei den Präparaten mit ICBM+BMP2 im Defektbereich primäre Knochenbälkchen und primäres Knochenmark oberhalb des Lamellenknochens erkennbar (Abbildung 17). Der periimplantäre Spalt ist mit Osteoid angefüllt. Träger und Implantatkopf sind mit Schleimhaut (hellbraun) überzogen.

4.2.1.4 ICBM+BMP2+VEGF

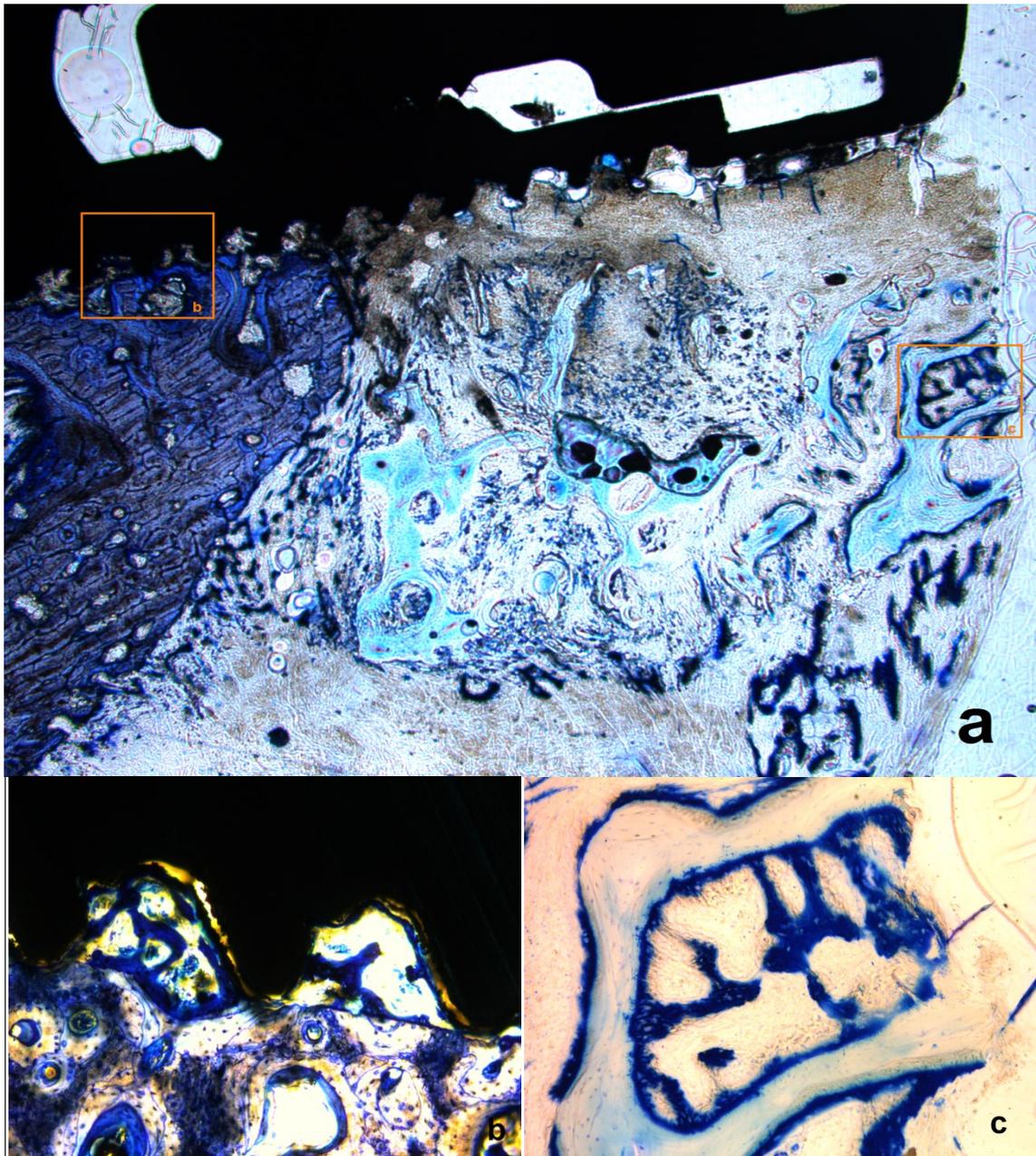


Abbildung 18 a+b+c: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwei Wochen, Toluidinblau-Färbung, a) 12,5-fache Vergrößerung, der Knochen stellt sich blau unter dem Implantat (schwarz) dar. Der Trägerbereich ist mit Osteoid durchzogen (dunkelblau) b) Neugebildeter Knochen am Implantat (50-fach vergrößert), der neugebildete Knochen (blau) liegt dem Implantat direkt an c) Neugebildeter Knochen im Trägerbereich (100-fach vergrößert), Osteoid im Trägerbereich.

Die Präparate mit ICBM+BMP2+VEGF-Trägern zeigen nach zwei Wochen ein ähnliches Bild wie die ICBM- und die ICBM+BMP2-Gruppen. Der Bohrspalt ist noch zu sehen. Die Knochenbildung im Trägerbereich und an den Implantatwindungen ist gut erkennbar. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die direkt dem Implantat anliegende Knochenbildung im Trägerbereich (Abbildung 18 a+b). Der Trägerbereich selbst ist

noch gut abgrenzbar, jedoch bildet sich innerhalb des kollagenen Trägergerüsts neuer Knochen (Abbildung 22c)

4.2.2 Nach vier Wochen

4.2.2.1 Kontrolle

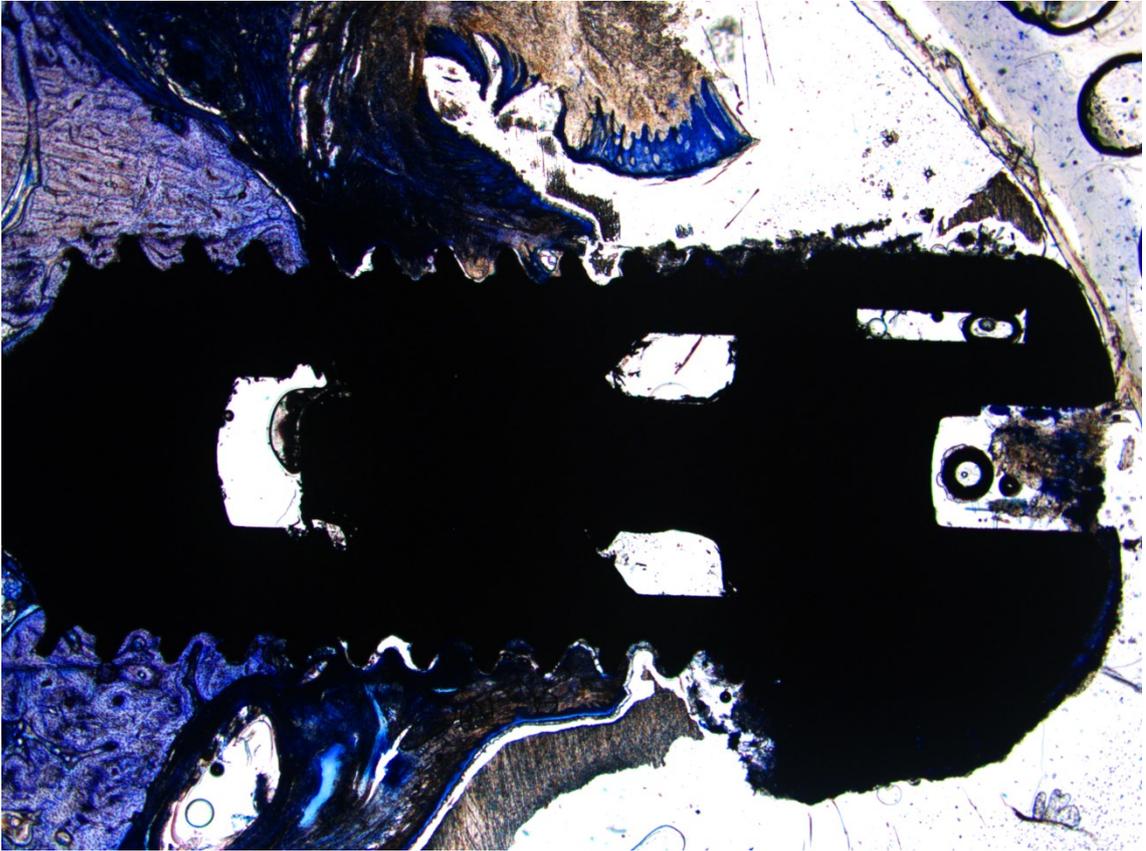


Abbildung 19: Kontrolle nach vier Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, Knochenwachstum ist vor allem im unteren Teil des Implantates sichtbar, über dem Implantatkopf und seitlich hat Schleimhaut den Träger verdrängt.

Vier Wochen nach der Implantation lässt sich in Abbildung 19 etwas neugebildeter Knochen oberhalb des ortsständigen Knochens unter intaktem Periost darstellen. Die Kompakta ist gut abgrenzbar, der kompakte Knochen liegt dem Implantat dicht an.

4.2.2.2 ICBM

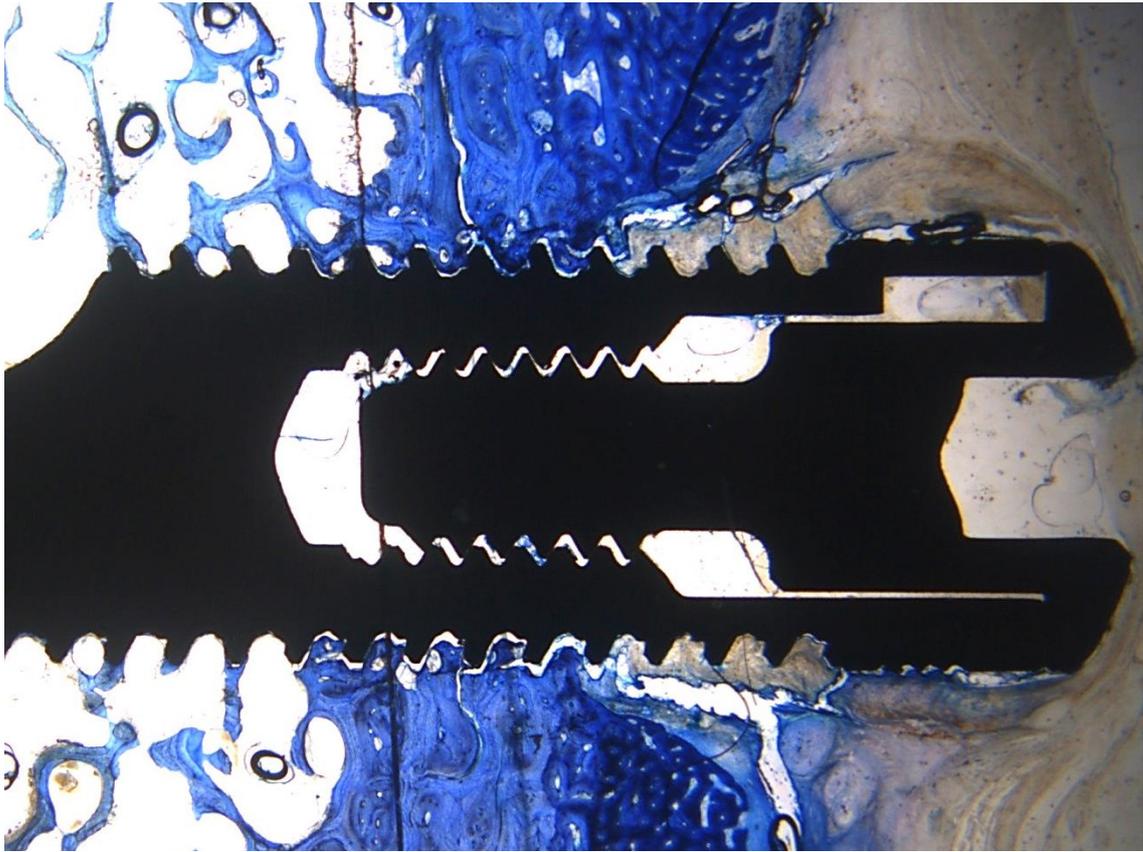


Abbildung 20: ICBM Gruppe nach vier Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung. Knochenwachstum ist im unteren Teil des Implantates sichtbar, über dem Implantatkopf liegt die Schleimhaut, welche sich seitlich nach unten zieht.

In Abbildung 20 zeigt sich, dass sich die Schleimhaut nach kaudal retrahiert und den Träger komprimiert hat. Der Implantatkopf liegt unter der Schleimhaut. Im kaudalen Anteil hat sich Knochen im ehemaligen Trägerbereich gebildet. Der reife Knochen liegt dem Implantat dicht an.

4.2.2.3 ICBM+BMP2



Abbildung 21: ICBM+BMP2 Gruppe nach vier Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung. Knochenwachstum ist vor allem im unteren Teil des Implantates sichtbar, der coronale Teil des Implantates ist nicht von Knochen umgeben.

Vier Wochen nach der Implantation (Abbildung 21) ist in der ICBM+BMP2-Gruppe eine gute Knochenanlagerung im kaudalen Implantatanteil erkennbar. Oberhalb des ortsständigen Knochens kann die gleichmäßige neugebildete Knochenschicht abgegrenzt werden. Die Knochenbildung reicht nicht bis zum Implantatkopf, über diesem liegt die Schleimhaut dem Implantat dicht an.

4.2.2.4 ICBM+BMP2+VEGF

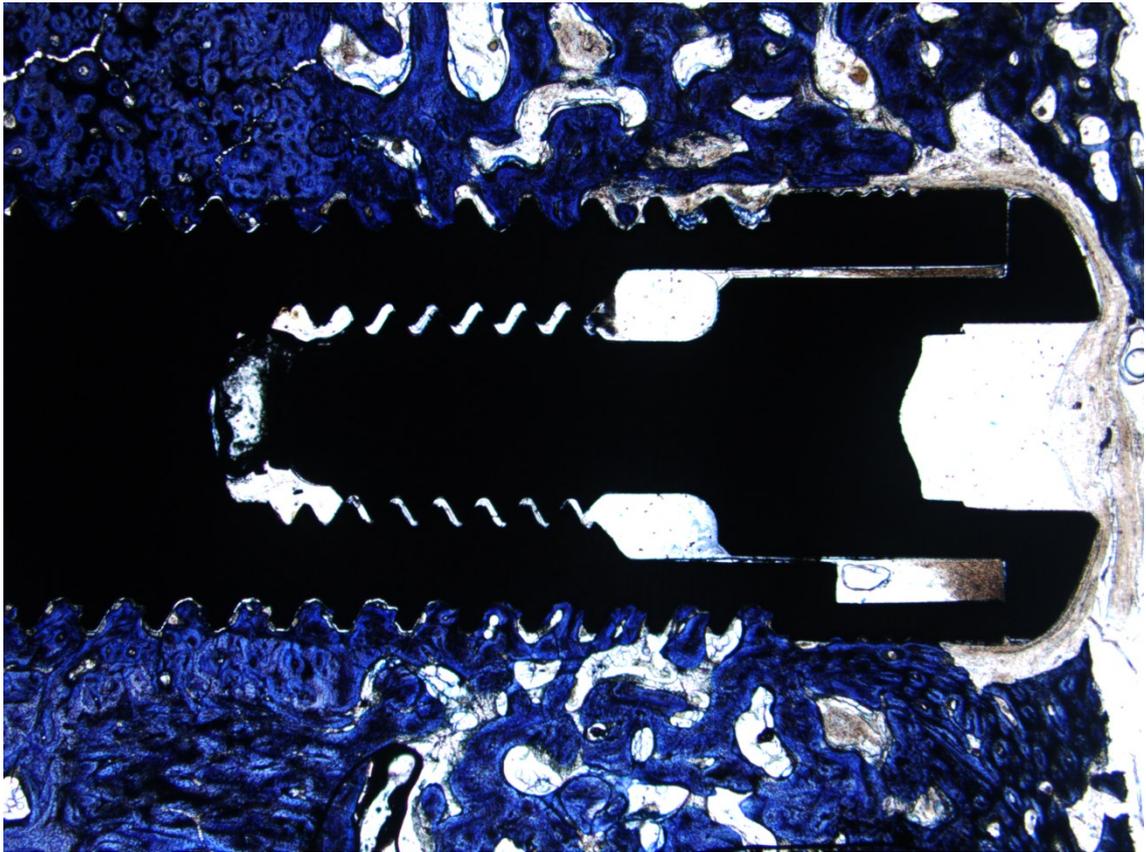


Abbildung 22: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach vier Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, das Implantat wird von neugebildetem Knochen umgeben.

Vier Wochen nach der Implantation ist das Implantat vollständig knöchern eingeeilt, der Träger ist vollständig knöchern durchbaut. Dichter Knochen-Implantat-Kontakt im ehemaligen Trägerbereich ist erkennbar. Knochenbälkchen und primäres Knochenmark stellen sich deutlich dar (siehe Abbildung 22).

4.2.3 Nach zwölf Wochen

4.2.3.1 Kontrolle

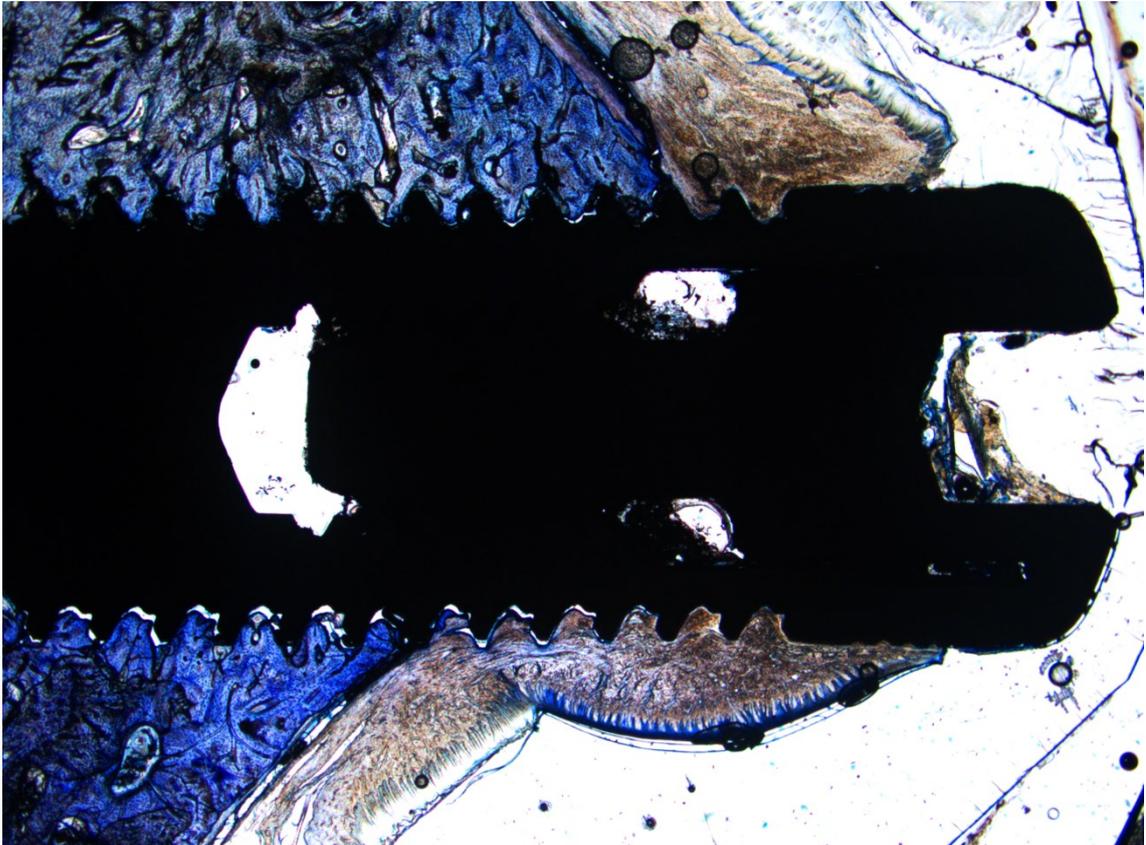


Abbildung 23: Kontrollgruppe nach zwölf Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, Schleimhaut liegt um den Implantatkopf herum. Schleimhaut und Periost bilden mit dem laminären Knochen und dem Implantat einen dreieckigen Bereich, in dem sich ausgereifter Knochen bildet (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Kaudal liegt dichter Knochen-Implantatkontakt vor, was für eine gute Osseointegration des Implantates spricht. Im Bereich des ehemaligen Bohrspaltes ist reifer Knochen erkennbar, der dem Implantat dicht anliegt. Es wird deutlich, dass die Schleimhaut und das Periost sich von kranial um das Implantat legen und sich bis zum Lamellenknochen zeltartig herunterziehen. Daraus resultiert ein pyramidenförmiger Bereich, in dem sich neuer Knochen gebildet hat (Abbildung 23).

4.2.3.2 ICBM

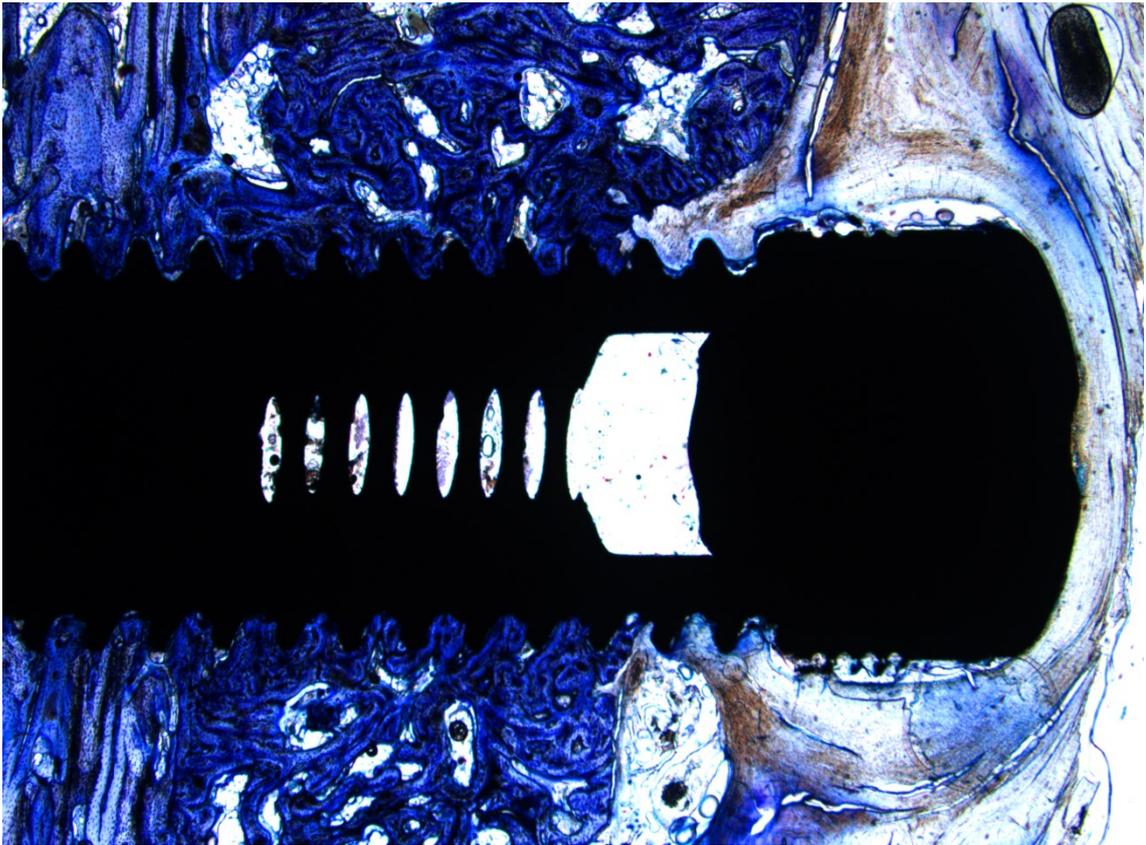


Abbildung 24: ICBM-Gruppe nach zwölf Wochen, Toluidinblau-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung. Neues Knochenwachstum ist im unteren und mittleren Teil des Implantates sichtbar (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Nach zwölf Wochen ist in der ICBM+BMP2-Gruppe eine deutliche Knochenbildung im Bereich des Trägers erkennenbar. In Abbildung 24 sind viele primäre Knochenbälkchen und primäres Knochenmark bis unterhalb des Implantatkopfes zu sehen. Jedoch reicht die Knochenbildung nicht bis zum Implantatkopf, über diesem liegt die Schleimhaut dem Implantat dicht an.

4.2.3.3 ICBM+ BMP2

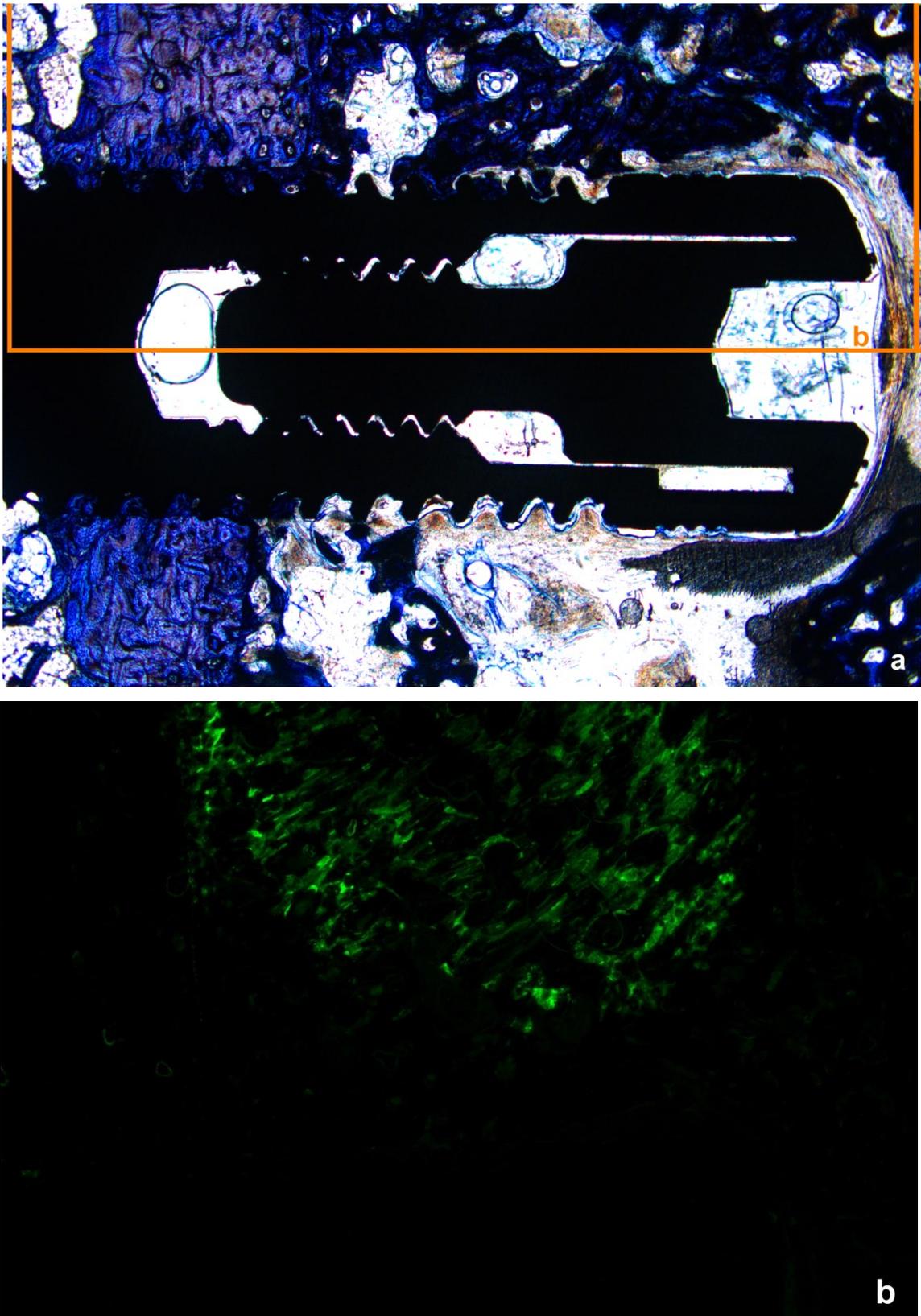
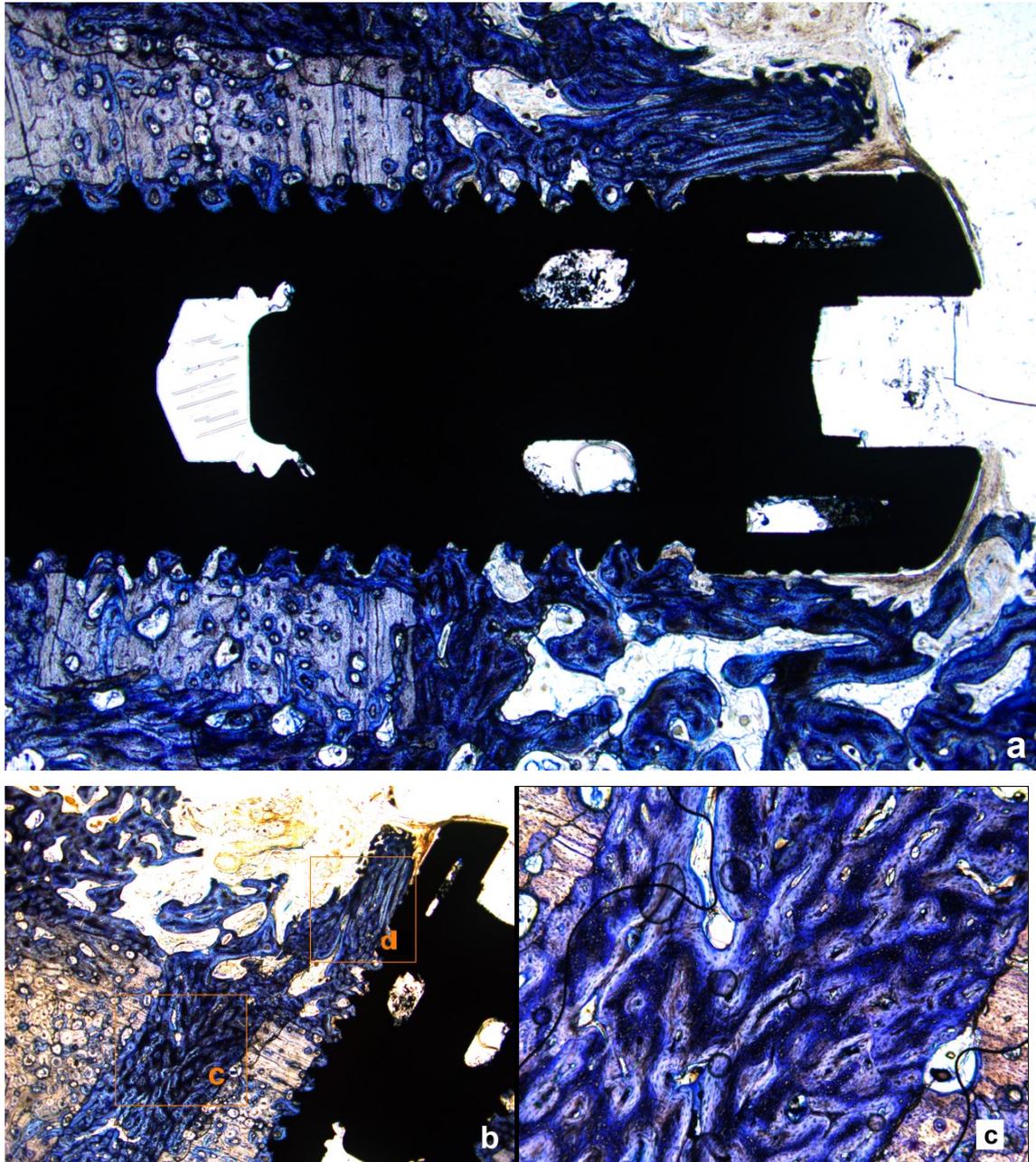


Abbildung 25 a+b: ICBM+BMP2-Gruppe nach zwölf Wochen, Toluidinblau-Färbung 12,5 fache Vergrößerung, a) Übersichtsaufnahme, mittig zeigt sich das im Lamellenknochen stehende Implantat, im ehemaligen Trägerbereich zeigt sich neugebildeter Knochen b) Fluoreszenzaufnahme, die grüne Färbung zeigt neugebildeten Knochen im Trägerbereich.

Die Übersichtsaufnahme (Abbildung 25a) zeigt eine ausgeprägte Knochenneubildung im ehemaligen Trägerbereich. Der Knochen liegt dem Implantat dicht an. Das helle Areal im unteren Bildanteil stellt ein Schliffartefakt dar. In der Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 25b) lässt sich eine deutliche Grünfärbung erkennen, welche den neugebildeten Knochen im ehemaligen Trägerbereich deutlich macht.

4.2.3.4 ICBM+BMP2+VEGF



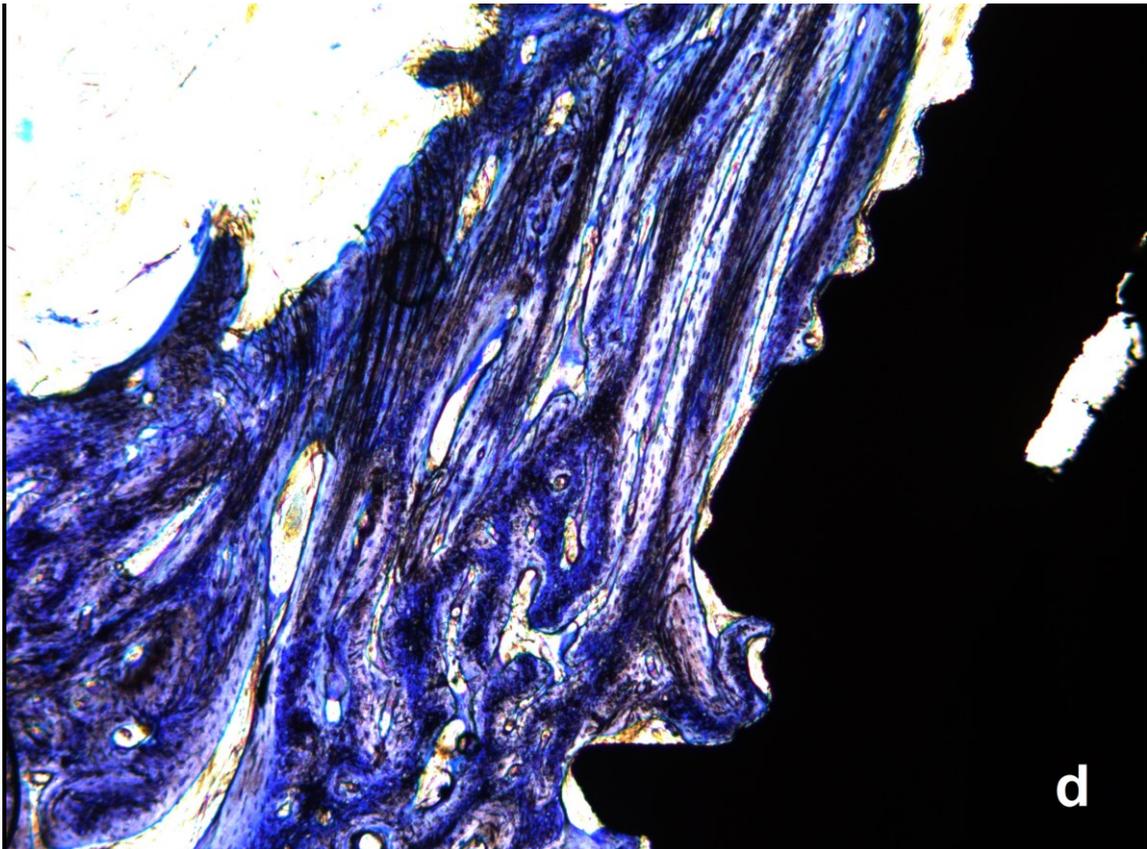


Abbildung 26 a+ b+ c+ d: ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwölf Wochen, Toluidinblau-Färbung.
 a) 12,5-fache Vergrößerung, Übersichtsaufnahme. Das Implantat ist im unteren Bereich von Lamellenknochen umgeben, am oberen Teil liegt neugebildeter Knochen dem Implantat an b) Übersicht mit Darstellung des Bohrlochs neben dem Implantat, welches mit neugebildetem Knochen gefüllt ist 12,5-fach vergrößert c) mit Knochen gefülltes Bohrloch (50-fach vergrößert) d) neugebildeter Knochen am Implantat angelagert (50-fach vergrößert). (26a modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med*, 13, 11.)

In Abbildung 26a ist neue Knochenbildung im Trägerbereich deutlich erkennbar. Knochenbälkchen und primäres Knochenmark haben sich im Träger gebildet. Sehr deutlich ist in Abbildung 26 b und c zu sehen, wie der neugebildete spongiöse Knochen aus einem Bohrloch in der Kompakta herauswächst. Der ehemalige Bohrspalt im Bereich der Kompakta ist ebenfalls gänzlich mit Knochenbälkchen gefüllt (Abbildung 26 a+d). Dichter und reifer Knochen ist im Trägerbereich und direkt am Implantat (Abbildung 26d) deutlich erkennbar.

4.3 Histomorphometrie

4.3.1 BIC (Knochen-Implantat-Kontakt)

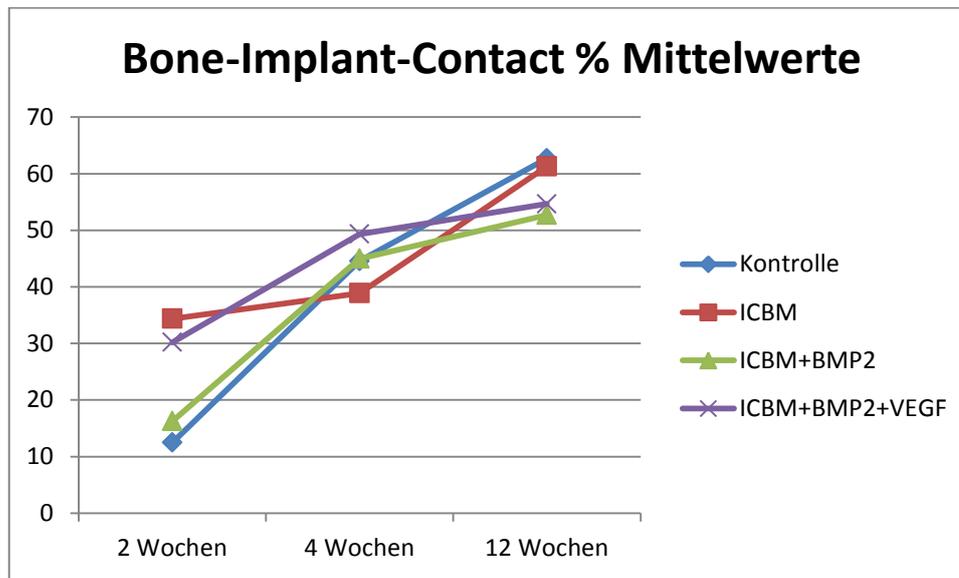


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Mittelwerte des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) in Prozent über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

	Kontrolle	ICBM-Carrier	ICBM+BMP2	ICBM + BMP2+VEGF
2 Wochen	12,47	34,36	16,25	30,19
4 Wochen	44,56	38,88	44,99	49,32
12 Wochen	62,69	61,28	52,7	54,67

Tabelle 9: Mittelwerte Knochen-Implantat-Kontakt% (BIC%) über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Der Knochen-Implantat-Kontakt ist bereits zwei Wochen postoperativ in allen vermessenen Gruppen nachweisbar, wobei hier der ICBM-Träger und die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe mit einer Knochenanlagerung von über 30% den höchsten Wert erzielen (ICBM 34,36% ($\pm 8,89\%$), ICBM+BMP2+VEGF 30,19% ($\pm 11,67\%$)). Die Kontrollgruppe und die ICBM+BMP2-Gruppe zeigen geringere Anlagerungswerte (Kontrolle 12,47% ($\pm n.a.$), ICBM+BMP2 16,25% ($\pm 19,65\%$), siehe Tabelle 9 und Abbildungen 27, 28).

Nach vier Wochen Regenerationszeit stellt sich insgesamt ein im Vergleich zu den Messungen nach zwei Wochen deutlich gesteigener Knochen-Implantat-Kontakt dar. Die Kontrollgruppe zeigt einen BIC von 44,56% ($\pm 12,51\%$). Die ICBM-Gruppe liegt mit 38,88% ($\pm 10,37\%$) darunter. Die anderen Gruppen liegen darüber und zeigen nach vier Wochen Knochenanlagerungswerte um 45-50% (ICBM+BMP2 44,99% ($\pm 21,64\%$) und ICBM+BMP2+VEGF von 49,32% ($\pm 19,71\%$)), wobei die Gruppe

ICBM+BMP2+VEGF den höchsten Wert aufweist (siehe Tabelle 9 und Abbildungen 27, 28).

Nach zwölf Wochen sind die BIC%-Werte der Kontroll- (62,69%, ($\pm 15,09\%$)) und der ICBM-Gruppe (61,28% ($\pm 16,17\%$)) am höchsten. Die Werte beider Gruppen steigen über die gesamten zwölf Wochen nahezu linear an. Die ICBM+BMP2 (52,7% ($\pm 11,06\%$)) und ICBM+BMP2+VEGF (54,67% ($\pm 10,75\%$)) zeigen ebenfalls Wachstum über die gesamte Zeit. Allerdings sind die Werte zum gemessenen Zeitpunkt geringer (Schorn et al., 2017).

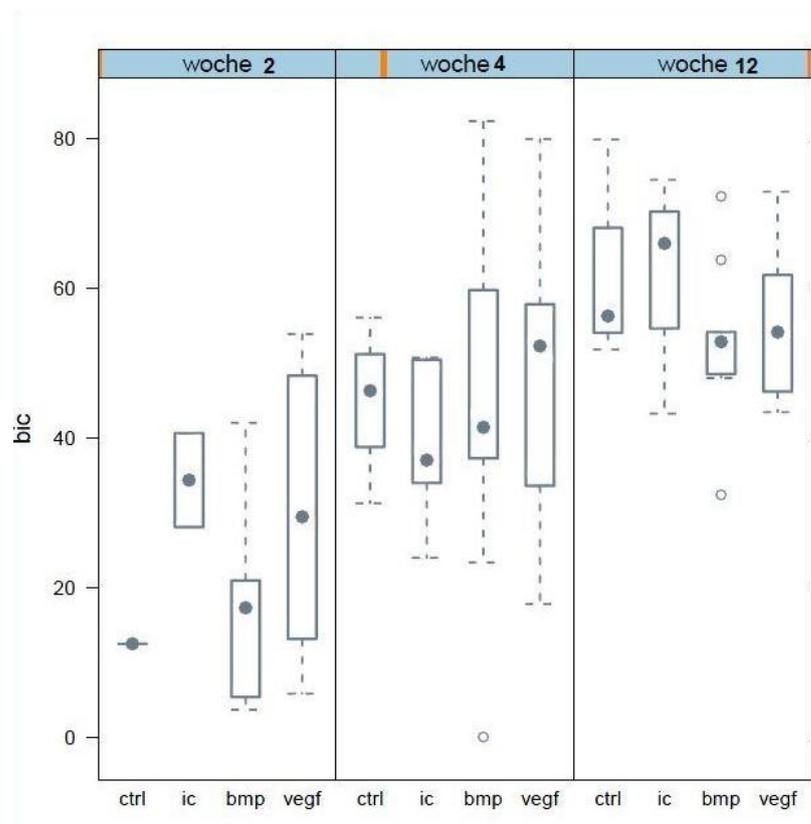


Abbildung 28: Boxplot-Diagramm der BIC%-Messungen über zwei, vier und zwölf Wochen. Box = mittlere 50% der Daten (25-75%), Länge der Whisker: $1,58 \times \text{IQR}$, ausgefüllte Punkte = Median, nicht-gefüllte Punkte = Ausreißer. Innerhalb der Whisker liegt das 95% Konfidenzintervall. ctrl = Kontrollgruppe, ic = ICBM-Gruppe, bmp = ICBM+BMP2-Gruppe und vegf = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Es zeigt sich eine breite Verteilung der Werte. Im Verlauf über zwölf Wochen ist ein Anstieg der BIC%-Werte in jeder Gruppe erkennbar.

Die Verteilung der Werte ist mittels eines Boxplot-Diagramms (Abbildung 32) dargestellt. Innerhalb der Whisker liegt das 95%-Konfidenzintervall. Die Box enthält die mittleren 50% der Daten. Vor allem in den ICBM- und ICBM+BMP2-Gruppen nach vier Wochen liegen große Wertschwankungen zwischen kleinsten und größten gemessenen Wert vor. Am dichtesten liegen die Werte nach Woche zwölf zusammen. Der Median hat sich, bis auf die ICBM-Gruppe, auf einem gleichbleibenden Wertniveau

eingependelt. Über die gesamten zwölf Wochen lässt sich die Tendenz eines steigenden BIC%-Wertes in allen Gruppen erkennen.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-6.1391	11.2067	-0.55	0.5855
groupic	-1.1198	7.7408	-0.14	0.8854
groupbmp	-4.4029	6.6659	-0.66	0.5110
groupveg	2.0713	6.8274	0.30	0.7625
woche	17.1462	3.6783	4.66	0.0000
l(woche^2)	-0.9920	0.2484	-3.99	0.0002

Tabelle 10: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen BIC Werte nach zwölf Wochen. Groupic = ICBM-Gruppe, groupbmp = ICBM+BMP2-Gruppe und groupveg = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die $Pr(<|t|)$ -Werte sind das Ergebnis einer linearen Regressionsanalyse, bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen errechnet werden.

Die lineare Regressionsanalyse ist in Tabelle 10 aufgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede der Gruppen errechnet werden.

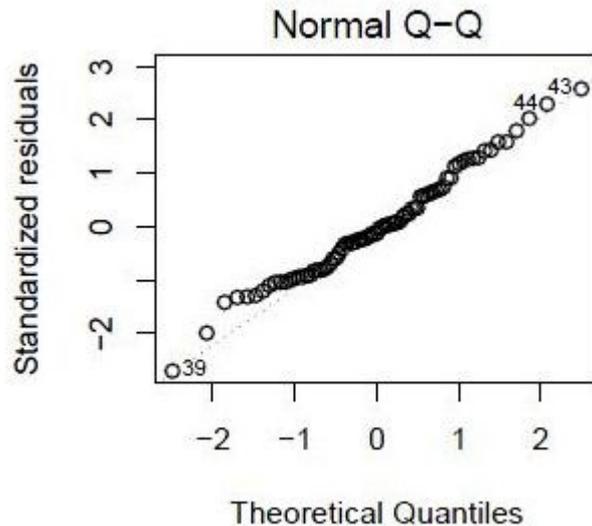


Abbildung 29 : Normal Q-Q Diagramm der BIC-Werte. Die Werte liegen annähernd auf einer Geraden.

Das Quantile-Quantile-Diagramm ist ebenfalls ein Teil der Datenanalyse. Es dient der subjektiven Beurteilung einer Werteverteilung auf Normalverteilung. Liegen die Werte wie in diesem Fall annähernd auf der zu erwartenden Geraden einer angenommenen Standardnormalverteilung (Abbildung 29), lässt sich annehmen, dass die Daten normalverteilt sind. Ist die Verteilung der Werte bekannt, können weitere Werte vorhergesagt werden (Thode, 2002).

4.3.2 Fläche (BVD)

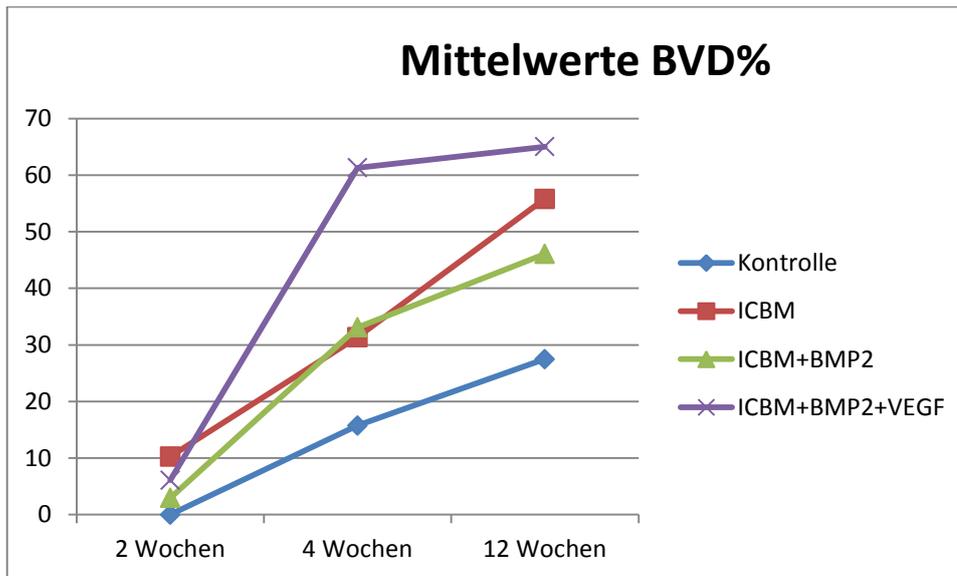


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Knochenfläche (BVD) in Prozent über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

	Kontrolle	ICBM	ICBM+BMP2	ICBM+BMP2+VEGF
2 Wochen	0	10,28	2,96	6,09
4 Wochen	15,75	31,37	33,10	61,31
12 Wochen	27,47	55,81	46,06	65,03

Tabelle 11: Mittelwerte der gemessenen Knochenfläche (BVD) in Prozent über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Nach zwei Wochen lässt sich in der Kontrollgruppe kein neugebildeter periimplantärer Knochen nachweisen. Die Implantate, welche nur von einem ICBM-Träger umgeben waren, weisen im Mittelwert den größten periimplantären Knochenwuchs auf (10,28% ($\pm 7,88\%$)), die Gruppe ICBM-Träger+BMP2 im Mittel 2,96% ($\pm 6,27\%$) und die Gruppe ICBM-Träger+BMP2+VEGF 6,09%. ($\pm 8,88\%$) (siehe Tabelle 11 und Abbildungen 30, 31).

In der vierten Woche des Regenerationsprozesses lässt sich vor allem in der ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe mit 61,31% ($\pm 14,48$) ein deutliches Knochenwachstum verzeichnen. In den anderen Gruppen lassen sich mit Werten um die 30% (ICBM 29,91% ($\pm 30,90\%$) und ICBM+BMP2 35,26% ($\pm 28,12\%$)) ebenfalls Knochenwachstum nachweisen, jedoch nicht so stark wie in der ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die Kontrollgruppe zeigt mit 15,75% ($\pm 22,57\%$) das geringste Knochenwachstum nach vier Wochen.

In der zwölften Woche der Einheilungsphase zeigt sich erneut im Vergleich zur vorherigen Messung vor acht Wochen ein gestiegenes Knochenwachstum in allen Gruppen. Den höchsten Wert weist mit 65,03% ($\pm 20,45\%$) die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe auf. Die ICBM- und die ICBM+BMP2-Gruppen befinden sich mit 55,81% ($\pm 46,8\%$) und 46,06% ($\pm 27,41\%$) im Mittelfeld, wobei ein Anstieg von fast 25% in der ICBM-Gruppe innerhalb der acht Wochen hervorzuheben ist. Auch in der BVD-Messung zeigt die Kontrollgruppe ein fast lineares Knochenwachstum über die gesamten zwölf Wochen und zeigt zum gemessenen Zeitpunkt den geringsten Wert (27,47% ($\pm 47,57\%$)) (Schorn et al., 2017).

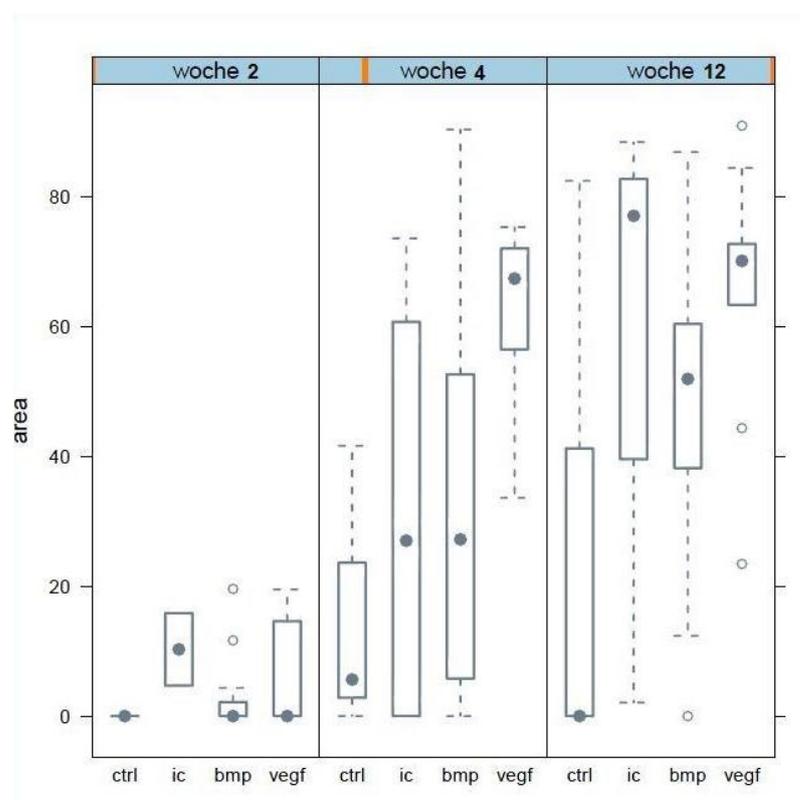


Abbildung 31: Boxplot-Diagramm der BVD%-Messungen über zwei, vier, und zwölf Wochen
 Box = mittlere 50% der Daten (25-75%), Länge der Whisker: $1,5 \times \text{IQR}$, ausgefaltete Punkte = Median, nicht-gefüllte Punkte = Ausreißer. Zwischen den Whiskern liegt das 95% Konfidenzintervall. ctrl = Kontrollgruppe, ic = ICBM-Gruppe, bmp = ICBM+BMP2-Gruppe und vegf= ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Es zeigen sich große Wertunterschiede vor allem in der ICBM- und ICBM+BMP2-Gruppen nach vier Wochen und in der Kontroll- und ICBM-Gruppe nach zwölf Wochen. Die ICBM+VEGF+BMP2-Gruppe zeigt den deutlichsten Anstieg und die geringste Verteilung.

Die Verteilung der Werte ist mittels eines Boxplot-Diagramms (Abbildung 31) dargestellt. Vor allem in den ICBM- und ICBM+BMP2-Gruppen nach vier Wochen und in der Kontroll- und ICBM-Gruppe nach zwölf Wochen liegen große Wertschwankungen zwischen kleinsten und größten gemessenen Wert vor. In der ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe zeigen sich die engsten Boxen und die Tendenz einer steigenden BVD über die gesamten zwölf Wochen zeigt sich am deutlichsten.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-67.3894	16.3851	-4.11	0.0001
groupic	18.9722	11.3177	1.68	0.0980
groupbmp	16.9039	9.7461	1.73	0.0871
groupveg	34.0643	9.9821	3.41	0.0011
woche	28.1446	5.3779	5.23	0.0000
l(woche^2)	-1.6650	0.3631	-4.59	0.0000

Tabelle 12: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen BVD%-Werte nach zwölf Wochen. Groupic = ICBM-Gruppe, groupbmp = ICBM+BMP2-Gruppe und groupveg = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die $Pr(<|t|)$ -Werte sind das Ergebnis einer linearen Regressionsanalyse, bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen errechnet werden.

Die lineare Regressionsanalyse ergab die in Tabelle 12 aufgeführten Daten. Betrachtet man die $Pr(<|t|)$ -Werte, so ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ in der ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe mit $p=0,0011$ ein signifikanter Unterschied. Das bedeutet, dass rein rechnerisch der Zusatz von ICBM+BMP2+VEGF die Knochenregeneration wesentlich beeinflusst hat.

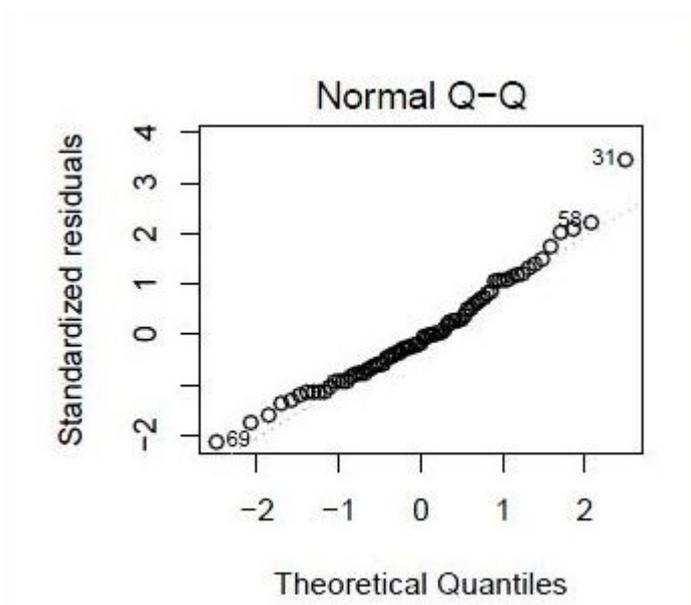


Abbildung 32 : Normal Q-Q-Diagramm der BVD%-Werte. Die Werte liegen annähernd auf einer Geraden.

Abbildung 32 zeigt das Quantile-Quantile-Diagramm der BVD-Werte. Durch die lineare Anordnung lässt sich auf eine Normalverteilung schließen.

4.3.3 Zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich

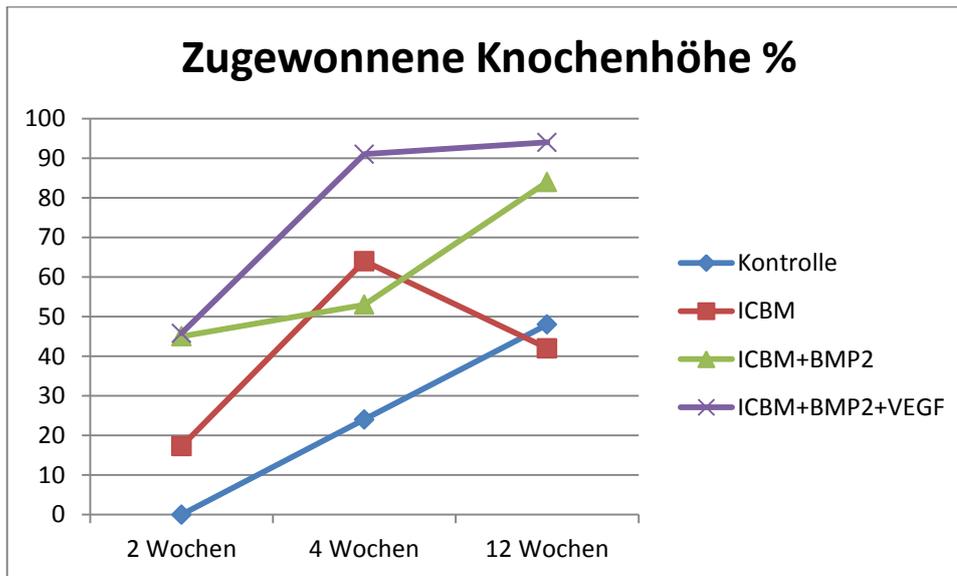


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich in Prozent über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

%	Kontrolle	ICBM	ICBM+BMP2	ICBM+BMP2+VEGF
2 Wochen	0	17	45	46
4 Wochen	24	64	53	91
12 Wochen	48	42	84	94

Tabelle 13: Mittelwerte der gemessenen zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich in Prozent über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

Bereits nach zwei Wochen zeigt sich in allen Gruppen außer der Kontrollgruppe zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich. Die Gruppe des ICBM-Trägers weist einen Durchschnittswert von 17% ($\pm 8\%$), die Gruppe ICBM+BMP2 einen Durchschnittswert von 45% ($\pm 40\%$) und die ICBM+BMP2+VEGF einen Durchschnittswert von 46% ($\pm 54\%$) auf (siehe Tabelle 13 und Abbildungen 33, 34).

Die einmonatige Regenerationszeit ergibt im gesamten Defektbereich in der Gruppe ICBM+BMP2+VEGF 91% ($\pm 40\%$) zugewonnene Knochenhöhe. Auch in den anderen Gruppen bildet sich kontinuierlich neuer Knochen (Kontrolle 24% ($\pm 29\%$), und ICBM+BMP2 53% ($\pm 43\%$)). Hier sticht die ICBM-Gruppe mit der größten Knochenhöhe nach vier Wochen heraus (ICBM 64%, $\pm 75\%$).

Nach zwölf Wochen zeigt die Kontrollgruppe einen fast linearen Anstieg der Knochenhöhe im Defektbereich (48% ($\pm 83\%$)). Die Werte der ICBM-Gruppe sinken im Vergleich zu den Werten nach vier Wochen bis auf ein Niveau unter der

Kontrollgruppe (ICBM 42%, \pm 39%) nach zwölf Wochen. Die Knochenhöhe in der ICBM+BMP2-Gruppe steigt steil auf 84% (\pm 67%) an, während die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nur noch um 3% während der acht Wochen steigt (94%, \pm 54%) (Schorn et al., 2017).

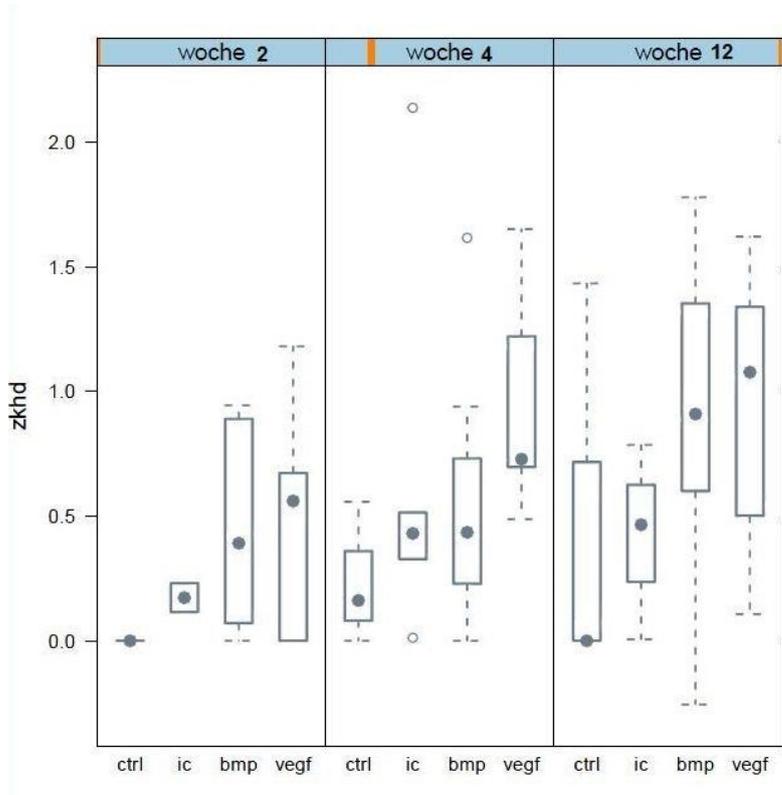


Abbildung 34: Boxplot-Diagramm der zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich, Messungen über zwei, vier, und zwölf Wochen. Box = mittlere 50% der Daten (25-75%), Länge der Whisker: $1,58 \times \text{IQR}$, ausgefüllte Punkte = Median, nicht-gefüllte Punkte = Ausreißer, Zwischen den Whiskern liegt das 95%-Konfidenzintervall. ctrl = Kontrollgruppe, ic = ICBM-Gruppe, bmp = ICBM+BMP2-Gruppe und vegf = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die Werteverteilung ist in der ICBM+BMP2-Gruppe am höchsten. In allen Gruppen kann man einen Anstieg der Knochenhöhe im Defektbereich sehen. Die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe zeigt jeweils den höchsten Wert.

Das Boxplott-Diagramm zeigt die Werteverteilung der einzelnen Versuchsgruppen nach jeweils zwei, vier und zwölf Wochen (Abbildung 34). Die breiteste Verteilung der Messwerte zeigt die ICBM+BMP2-Gruppe nach zwölf Wochen. Zum gegebenen Messzeitpunkt kann man erkennen, dass die Kontrollgruppe jeweils den geringsten Median aufweist, die ICBM-Gruppe den zweithöchsten, die ICBM+BMP2-Gruppe den dritthöchsten und die ICBM+VEGF-Gruppe den höchsten Median darstellt.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.3266	0.3499	-0.93	0.3536
groupic	0.2204	0.2417	0.91	0.3648
groupbmp	0.3497	0.2081	1.68	0.0972
groupveg	0.5269	0.2131	2.47	0.0158
woche	0.1983	0.1148	1.73	0.0884
I(woche^2)	-0.0113	0.0078	-1.46	0.1488

Tabelle 14: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen Werte der zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich nach zwölf Wochen. Groupic = ICBM- Gruppe, groupbmp = ICBM+BMP2-Gruppe und groupveg = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die $Pr(<|t|)$ -Werte sind das Ergebnis einer linearen Regressionsanalyse; bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen errechnet werden.

Betrachtet man die Daten der linearen Regressionsanalyse in Tabelle 14, fällt vor allem der $Pr(<|t|)$ -Wert der zugewonnenen Knochenhöhe in der ICBM+BMP2+VEGF nach zwölf Wochen auf. Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen Wert von $p=0,0158$. Bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ zeigt sich demnach ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Zugabe von ICBM+BMP2+VEGF hat die Knochenregeneration im Defektbereich über die gesamten zwölf Wochen demnach entscheidend beeinflusst.

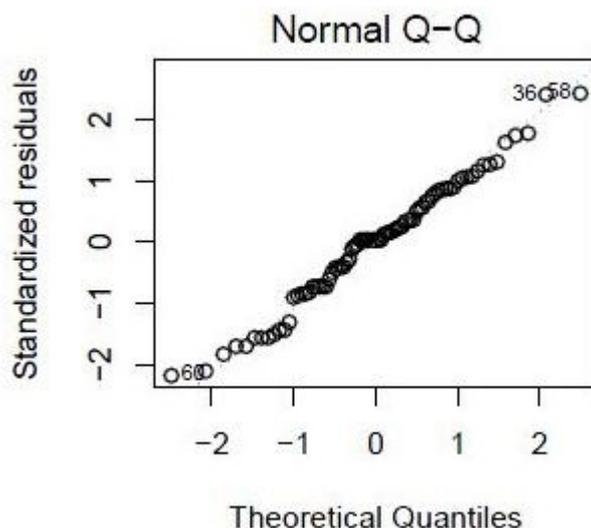


Abbildung 35: Normal Q-Q-Diagramm der Werte für die zugewonnene Knochenhöhe. Die Werte liegen annähernd auf einer Geraden.

Das Quantile-Quantile-Diagramm (Abbildung 35) der Messwerte lässt eine annähernde Normalverteilung annehmen.

4.3.4 Neugewonnene Knochenhöhe

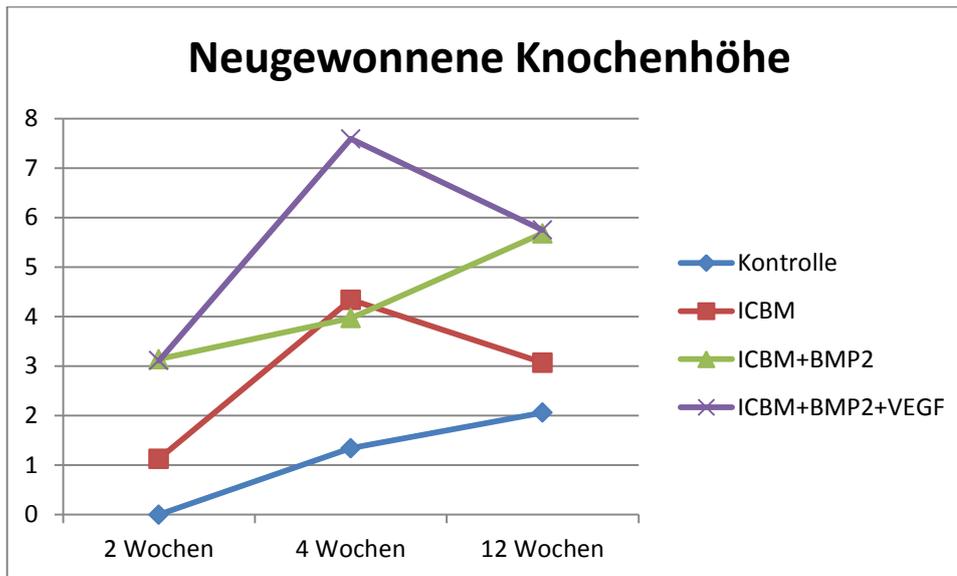


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Mittelwerte der gemessenen neugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

	Kontrolle	ICBM	ICBM+BMP2	ICBM+BMP2+VEGF
2 Wochen	0	1,13	3,14	3,11
4 Wochen	1,34	4,34	3,97	7,59
12 Wochen	2,06	3,07	5,68	5,75

Tabelle 15: Mittelwerte der gemessenen neugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich über den gesamten Untersuchungszeitraum von zwölf Wochen in Millimetern (modifiziert aus SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.).

In der Kontrollgruppe zeigt sich nach zwei Wochen noch keine neugewonnene Knochenhöhe. Die Gruppen ICBM (1,13mm (\pm 0,58mm)), ICBM+BMP2 (3,14mm (\pm 3,1mm)) und ICBM+BMP2+VEGF (3,11mm (\pm 3,03mm)) weisen unterschiedlich hohes neues Knochenwachstum auf (siehe Tabelle 15 und Abbildungen 36, 37).

In der Kontrollgruppe (1,34mm (\pm 2,32 mm)) präsentieren sich nach vier Wochen die niedrigsten Werte. ICBM (4,34mm (\pm 4,5mm)) und ICBM+BMP2 (3,97mm (\pm 3,14 mm)) liegen mit Werten um 4mm im Mittelfeld. Die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe weist nach vier Wochen die größte neugewonnene Knochenhöhe mit 7,59mm (\pm 3,01mm) im Durchschnitt auf.

Wie auch in den anderen Messungen ist in der Kontrollgruppe über die gesamten zwölf Wochen ein nahezu linearer Anstieg der neugewonnenen Knochenhöhe zu erkennen (2,06mm (\pm 3,57mm)). Sowohl die ICBM-Gruppe als auch die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe können die hohen Werte nach vier Wochen nicht wieder erreichen (ICBM 3,07

mm ($\pm 2,92\text{mm}$)). Die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe ($5,6\text{mm}$ ($\pm 3,83\text{mm}$)) liegt nach zwölf Wochen ungefähr auf Höhe der ICBM+BMP2-Gruppe ($5,75\text{mm}$ ($\pm 3,16\text{mm}$)) (Schorn et al., 2017).

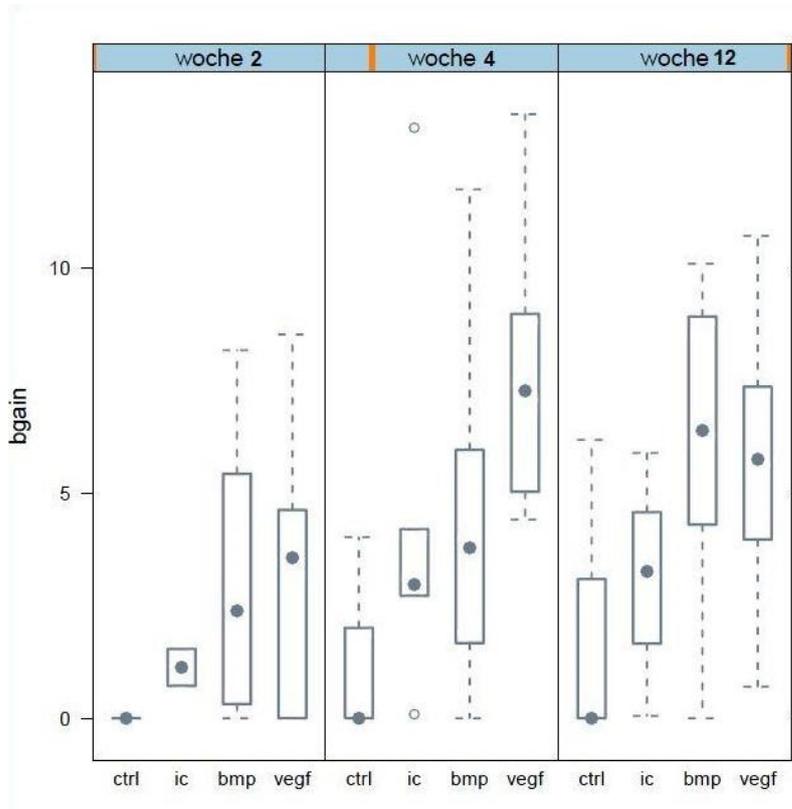


Abbildung 37: Boxplot-Diagramm der Messungen für die neugewonnene Knochenhöhe über zwei, vier, und zwölf Wochen. Box = mittlere 50% der Daten (25-75%), Länge der Whisker: $1,5 \times \text{IQR}$, ausgefüllte Punkte = Median, nicht-gefüllte Punkte = Ausreißer. Zwischen den Whiskern liegt das 95%-Konfidenzintervall. ctrl = Kontrollgruppe, ic = ICBM-Gruppe, bmp = ICBM+BMP2-Gruppe und vegf= ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die Verteilungsbreite ist in der ICBM+BMP2-Gruppe nach vier und nach zwölf Wochen am höchsten. Die Mediane zum jeweiligen Messzeitpunkt zeigen klare Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Das Boxplott-Diagramm zeigt die Werteverteilung der einzelnen Versuchsgruppen nach jeweils zwei, vier und zwölf Wochen (Abbildung 37). Die Verteilungsbreite ist in der ICBM+BMP2-Gruppe nach vier und nach zwölf Wochen am höchsten. Die Mediane zum jeweiligen Messzeitpunkt zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, wobei die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwei und vier Wochen die höchsten Mediane der neugewonnenen Knochenhöhe darstellt und die ICBM+BMP2-Gruppe nach zwölf Wochen.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-3.8643	2.2845	-1.69	0.0950
groupic	2.0480	1.5780	1.30	0.1984
groupbmp	3.1430	1.3589	2.31	0.0235
groupveg	4.5069	1.3918	3.24	0.0018
woche	1.8830	0.7498	2.51	0.0142
l(woche^2)	-0.1176	0.0506	-2.32	0.0230

Tabelle 16: Lineare Regressionsanalyse der gemessenen Werte für die neugewonnene Knochenhöhe nach zwölf Wochen. Groupic = ICBM- Gruppe, groupbmp = ICBM+BMP2-Gruppe und groupveg = ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe. Die $Pr(<|t|)$ -Werte sind das Ergebnis einer linearen Regressionsanalyse; bei einem Signifikanzniveau von $p= 0,05$ konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen errechnet werden.

Die Daten der linearen Regressionsanalyse der Werte der Messungen der neugewonnenen Knochenhöhe sind in Tabelle 16 aufgeführt. Auch hier fällt vor allem der $Pr(<|t|)$ -Wert der ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe nach zwölf Wochen auf. Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen Wert von $p= 0,0018$. Was einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe entspricht. Die Zugabe von ICBM+BMP2+VEGF hat den vertikalen Knochenaufbau über die gesamten zwölf Wochen demnach maßgeblich beeinflusst.

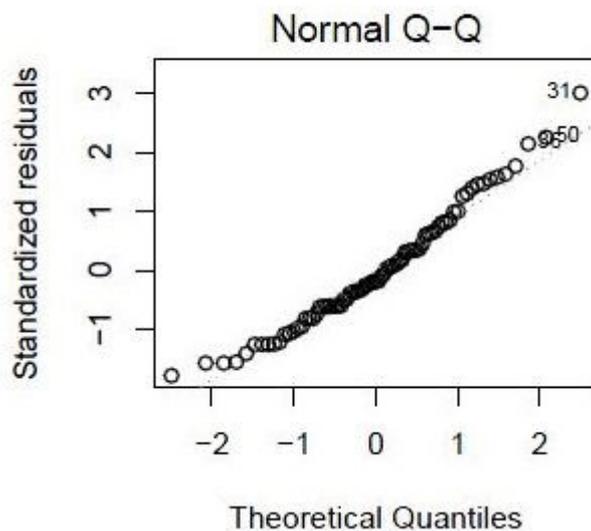


Abbildung 38: Normal Q-Q-Diagramm der Werte für die neugewonnene Knochenhöhe. Die Werte liegen annähernd auf einer Geraden.

Im Q-Q-Diagramm der Messwerte für die neugewonnene Knochenhöhe (Abbildung 38) stellen sich die Werte in linearer Form dar. Eine Normalverteilung der Daten kann angenommen werden.

4.3.5 Einzelergebnisse Tibia und Unterkiefer

Tendentiell zeitigen Implantate die in die Tibia gesetzt wurden höhere Messwerte. Um aber statistisch zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten konnten die Werte nicht separat ausgewertet werden. Die Einzelwerte sind in Tabelle 17 aufgeführt.

	Kontrollgruppe		ICBM-Träger		ICBM+BMP2		ICBM+BMP2+VEGF	
	Mandibula	Tibia	Mandibula	Tibia	Mandibula	Tibia	Mandibula	Tibia
BIC (%)								
2 Wochen	no data	12.5	no data	34.4	18.4	14.1	42	10.7
4 Wochen	44.6	no data	39.6	37.4	40.3	73.3	43.8	60.4
12 Wochen	68.1	51.8	43.3	70.3	49.1	57.2	49.4	65.2
BVD (%)								
2 Wochen	no data	0	no data	10.3	5.9	0	9.7	0
4 Wochen	15.8	no data	13.5	67.1	1.1	68.6	58.5	66.9
12 Wochen	0	82.4	2.1	82.7	42.9	50	59.7	75.6
Zugewonnene Knochenhöhe (%)								
2 Wochen	no data	0	no data	17.3	40	35.1	46.1	44.9
4 Wochen	24	no data	30.1	137.2	41.8	117.5	66.1	139.8
12 Wochen	0	143.4	0.6	62.6	38.4	141	66.8	148.8
Neugewonnene Knochenhöhe (mm)								
2 Wochen	no data	0	no data	1.1	4.4	1.9	3.2	3.1
4 Wochen	1.3	no data	2.5	8	3.5	6.7	5.9	10.9
12 Wochen	0	6.2	0.1	4.9	3.1	9	5	7.2

Tabelle 17: Mittelwerte der Messgruppen getrennt in Unterkiefer und Tibia (aus: SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPPRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. Head Face Med, 13, 11.)

5. Diskussion und Schlussfolgerung

5.1 Material und Methode

Der Aufbau von verlorengegangenem Alveolarknochen ist häufig notwendig, um dentale Implantate sicher im Knochen zu verankern und somit deren langfristigen Erfolg zu sichern. Obwohl oftmals nur eine geringe Knochenhöhe zu ersetzen ist, stellt sich die vertikale Knochenkammaugmentation als besonders schwierig dar (Daga et al., 2015, Scarano et al., 2011, Rocchietta et al., 2008). Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, eine periimplantäre vertikale Knochenbildung mittels einer Kombination aus kollagenem Träger und Zytokinen zu generieren.

Zwölf Minischweinen (Durchschnittsgewicht 66,5kg) aus eigener Zucht der TVA der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden bereits beim Menschen im Einsatz befindliche Implantate inseriert. Um ein vertikales periimplantäres Knochendefizit zu generieren, wurden insgesamt 108 Implantate sowohl in die Mandibula als auch in die Tibia so gesetzt, dass sie fünf Millimeter über das Knocheniveau herausstanden. Mit Hilfe eines (Zytokin-haltigen) Kollagenträgers, der passgenau über das überstehende Implantat platziert wurde, sollte die Bildung des fehlenden periimplantären vertikalen Knochens generiert werden. Die Opferung der Tiere erfolgte nach zwei, vier und zwölf Wochen. Durch die verschiedenen Zeitabstände sollte die Knochenregeneration im zeitlichen Verlauf dargestellt und untersucht werden. Um die Verwendbarkeit der Trägersysteme *in vivo* zu prüfen, war ein Tierversuch notwendig. Durch die Art und Größe der Versuchstiere kommt die knöcherne Regenerationskraft der klinischen Situation beim Menschen sehr nahe, zudem können auch beim Menschen im Einsatz befindliche dentale Implantate verwendet werden (Mosekilde, 1995, Wen et al., 2015). Das Knochenwachstum von Unterkiefer und Tibia unterscheidet sich. Der Unterkiefer unterliegt der desmalen Ossifikation, die Tibia jedoch der chondralen Ossifikation (Niethard et al., 2009). Des Weiteren wurden die Implantate an der Tibia nicht der oralen Mundflora ausgesetzt. Die Mundhygiene kann bei Schweinen jedoch, anders als beim Menschen, nicht kontrolliert werden, was zu Implantatverlust führen kann. Die Implantate wurden dennoch in den Unterkiefer und in die Tibia gesetzt, um möglichst wenig Tiere für die Studie nutzen zu müssen. Tendenziell zeigten Implantate, die in die Tibia gesetzt wurden, höhere Messwerte (Tabelle 17). Um aber statistisch zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, konnten die Werte nicht separat ausgewertet werden.

Zu den verschiedenen Studienelementen liegen bereits einzelne Publikationen vor. So konnten Marin et al eine verbesserte periimplantäre Knochenheilung durch BMP2 in Nagetieren nachweisen (Marin et al., 2003). Auch Studien bezüglich Kombinationen von BMP2 und VEGF (Bai et al., 2013, Lin et al., 2014b) und zu verschiedenen Trägermaterialien zeigten erhöhte Knochenheilungsraten durch die Verwendung von BMP2 und VEGF zusammen (Schliephake, 2010). *In vivo* Versuche mit BMP2 und VEGF gekoppelt an passgenau gestaltete resorbierbare Kollagenträger zur Regeneration vertikaler periimplantärer Knochendefizite wurden in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben. Sie sind aber zwingende Voraussetzung für eine spätere klinische Anwendung am Patienten.

In dieser Studie wurde die Knochenbildung mittels Histologie und Histomorphometrie untersucht. In letzterer wurden der BIC%, die BVD%, die neugewonnene Knochenhöhe im gesamten untersuchten Präparat und die zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich beurteilt. Der BIC% gibt an, wieviel Knochen im Verhältnis zur Gesamtoberfläche des Implantates am Implantat angelagert wurde, und macht somit die Wirkung der Träger und der Zytokine auf die Verbindung Implantat–Knochen vergleichbar. Die Kontaktstelle Implantat-Alveole verfügt, im Unterschied zum natürlichen Zahnhalteapparat, über kein Desmodont, was zu einem direkten Knochen-Implantat Verbund (BIC%) führt (John et al., 2009). Es handelt sich somit um ein Maß für die knöcherne Einheilung (Osseointegration) und lässt damit Rückschlüsse auf die Stabilität zu, mit der das Implantat im Knochen verankert ist. Die Knochendichte (Bone Volume Density - BVD%) beschreibt die Dichte des neugebildeten Knochens innerhalb der gemessenen Fläche. Sie ist ein Maß für die Qualität des neugebildeten Knochens. Die neugewonnene Knochenhöhe insgesamt und die zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich dienen vor allem dazu, den vertikalen Knochenzugewinn messbar zu machen.

5.1.1 Messverfahren

Vor allem BIC% und BVD% haben sich als geeignete Messverfahren erwiesen und werden in experimentellen Studien regelmäßig verwendet, um die physiologische und durch *Tissue-Engineering* oder andere Verfahren induzierte Knochenregeneration zu untersuchen (Jones et al., 2006, Streckbein et al., 2013, Casati et al., 2007, Huh et al., 2012). Schwierigkeiten bereiteten in Bezug auf die Messungen des BIC-Wertes vor allem nicht völlig mittig angeschnittene Implantate. Wird das Implantat nicht genau in

der Mitte angeschnitten und ohne untere Windungen dargestellt, verringert sich die Strecke der messbaren Windungen und verzerrt somit den BIC%. Diese Problematik könnte durch eine weitere Optimierung der Schnitttechnik vermieden werden.

Auch im Bereich der Messungen der BVD% war es aufgrund der zum Teil sehr geringen Farbunterschiede zwischen Implantat und neugebildetem Knochen erschwert, mithilfe des Bildvermessungsprogramms die korrekte neugebildete Knochenfläche zu berechnen. Diese Fehler konnten allerdings durch manuelles Nachjustieren weitgehend ausgeglichen werden. Empfehlenswert für nachfolgende Studien wäre eventuell die Verwendung einer anderen Färbung für die Messungen, die den Unterschied zwischen altem und neugebildetem Knochen besser erkennen lässt.

Durch die Knochenhöhe im Defektbereich und die neugewonnene Knochenhöhe sollte das Potential der vertikalen Knochenregeneration dargestellt werden. Messungen dieser Werte konnten ohne schwerwiegende Probleme durchgeführt werden.

In der histologischen Untersuchung war an einigen intraoralen Präparaten eine Weichteildehiszenz erkennbar, die dazu führte, dass die Funktion des Trägers beeinträchtigt wurde. Blieb das bedeckende Weichteil, insbesondere das Periost über dem Träger, intakt, konnte eine gute Knochenregeneration erreicht werden. Hieraus wird ersichtlich, wie wichtig eine dichte Weichteildecke für die Regeneration des darunterliegenden Knochengewebes ist. Sobald das Weichgewebe kompromittiert ist, kommt es zum Einwachsen von Bindegewebe und zur Resorption des Trägers. Eine Regeneration des Knochengewebes findet nicht statt. Solche Vorgänge können nur mittels *in vivo* Studie untersucht werden. Bei weiteren Studien ähnlicher Art gilt es, Wundheilungsstörungen zu vermeiden, um die Ergebnisse noch besser vergleichen zu können.

Um das Knochenwachstum durchgehend und realistisch beobachten zu können, müsste außerdem ein Modell angewendet werden, mit dessen Hilfe es möglich wäre, die Schweine lebend zu untersuchen. Nur so könnte die Knochenregeneration mittels mehrerer Messungen am gleichen Tier beobachtet und individuelle Unterschiede im Knochenstoffwechsel der Tiere etc. besser berücksichtigt werden.

Die in der vorliegenden Studie verwendete Stichprobengröße stellte sich als zu klein heraus, um deutlich signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen auch schon nach vier Wochen zeigen zu können, was sich auch an den teilweise sehr großen Standardabweichungen abzeichnet. Die Stichprobengröße wurde so gewählt, da es sich hier um eine erste tierexperimentelle Studie (Pilotstudie) handelt. Kosten und ethische

Aspekte verbieten bei der Erstuntersuchung große Tierzahlen. Bei einem positiven Ergebnis können weitere und auch zahlenmäßig größere Studien konzipiert werden.

5.2 Kontrolle

Um biokompatibel zu sein und osseointegriert zu werden, muss ein Implantat aus gewebeverträglichem Material bestehen, das knochenwachstumsfördernde Oberflächeneigenschaften besitzt. Selektive und spezifische Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe müssen möglich sein und dürfen bei der Implantation nur minimalste inflammatorische Reaktionen hervorrufen. Der Oberfläche können chemotaktische (Zielzellen anlocken), juxtakrine (Zielzellen aktivieren) und bestenfalls beide Eigenschaften zuteilwerden (Jennissen et al., 1999).

Die in dieser Studie verwendeten Implantate aus Reintitan mit gestrahlter und geätzter Oberfläche werden bereits seit Längerem im klinischen Alltag erfolgreich eingesetzt (Esposito et al., 2009, Rammelt et al., 2004). Viele Studien haben bereits untersucht, ob modifizierte Implantatoberflächen verglichen mit unbehandelten Oberflächen einen Vorteil besitzen in Bezug auf die Osseointegration des Implantates. Es zeigte sich zum Beispiel, dass der BIC% bei aufgerauten Implantaten ebenfalls besser ist als bei glatten. Der Knochenhalt und die Osseointegration sind im Vergleich besser (Novaes et al., 2002). Deshalb werden heute im klinischen Alltag nur noch Implantate mit behandelten, in der Regel gestrahlten und geätzten, Oberflächen verwendet.

In keiner der Messungen zeigt sich in der Kontrollgruppe neugebildeter Knochen nach zwei Wochen. Die kontinuierlich steigenden Werte der Kontrollgruppe über vier und zwölf Wochen (Abbildungen 31, 34, 37, 40 und Tabellen 11, 13, 15 und 17) zeigen, dass unter einem zeltartig über dem Implantat liegenden Periostüberzug Knochenregeneration möglich ist. Dies ist auf die osteogene Potenz des Periostes zurückzuführen (Tran Van et al., 1982). Periostlappen werden regelmäßig zur Verbesserung der Knochenregeneration genutzt (Lin et al., 2014a, Ortak et al., 2005, Verma et al., 2011). Verdugo und D'Addona konnten zeigen, dass *guided bone regeneration* (GBR) nur mittels Periost und Perforation der Kortikalis auch bei größeren Knochendefekten möglich ist (Verdugo und D'Addona, 2012, Lin et al., 2014a). In der Regel werden bei der GBR jedoch Membranen eingesetzt, um das Einwachsen von Weichgewebe in den Defektbereich zu verhindern, damit sich das langsamer wachsende Knochengewebe ungestört regenerieren kann (Dimitriou et al., 2012, Lang et al., 1994).

Tritt jedoch eine Dehiszenz des darüber liegenden Weichgewebes auf, geht die Barrierefunktion der Membran in den meisten Fällen verloren.

Knochendistanzen bis ca. 1,5 mm können auch ohne zusätzliche knochenregenerative Massnahmen ausheilen, wenn das umgebende Gewebe intakt ist („*jumping distance*“). Dies ist vor allem bei der Sofortimplantation relevant (Botticelli et al., 2003), bei der oftmals eine Inkongruenz zwischen der Alveole und dem inserierten Implantat besteht.

5.3 ICBM

BMP ist ein potentes Agens für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in die Knochenzelllinie. BMPs müssen, um wirken zu können, direkt an ihrem vorgesehenen Wirkungsort appliziert werden. Dazu brauchen sie einen Träger oder ein Übertragungssystem (Li und Wozney, 2001). BMPs wurden bereits mit verschiedenen Trägern für unterschiedliche Indikationen eingesetzt, aber der optimale Träger ist bisher noch nicht gefunden. Sigurdsson et al. testeten 1996 verschiedene Trägermaterialien, darunter gefriergetrocknete demineralisierte Knochenmatrix, mineralisierte Rinderknochenmatrix und DL-Polylaktosesäure-Granulate, wobei alle mit autologem Blut gemischt wurden. In dieser Studie erbrachte rhBMP2 zusammen mit demineralisierter Knochenmatrix das beste Ergebnis hinsichtlich Knochenqualität, -quantität und –resorption. Demineralisierte Knochenmatrix hat jedoch den Nachteil, dass ihre mechanische Stabilität für größere vertikale Augmentationen nicht ausreicht (Sigurdsson et al 1996). Werden Polycaprolactone (PCL) als Träger verwendet, dauert ihr biologischer Abbau zu lange und die Knochenregeneration wird behindert. Tricalciumphosphate gehören derzeit zu den Standardmaterialien für Träger. Ohne Hinzufügen von Kollagenen und/oder PRP (*platelet rich plasma*) ist eine kontrollierte Freisetzung von BMPs allerdings auch hier nicht gewährleistet (Schuckert 2010). Jones et al. testeten PLGA (Polylactid-co-Glycolid-Säure)-Träger im Vergleich zu Kollagenträgern. In ihrer Studie zeigte sich, dass die Kombination von einem Wachstumsfaktor und einem PLGA-Carrier die frühe Knochenheilung um das Implantat herum zwar stimulierte, der Kollagen-Träger zusammen mit einem Wachstumsfaktor allerdings signifikant bessere Ergebnisse erzielte (Jones et al 2006). Durch die runde Form des Trägers konnte eine sehr gute Passform um das Implantat und auf dem Knochenkamm erzielt werden, zudem wurde dadurch eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Wachstumsfaktoren um das Implantat gewährleistet. Aber auch bezüglich des Knochenwachstums scheint eine ringförmige Struktur von Vorteil

zu sein. Giesenhagen verwendete in seinen Studien ringförmige autologe Knochenblöcke vom Kinn. Er stellte fest, dass vor allem dreidimensionale Knochendefekte dadurch besser augmentiert werden können und somit auch bei schwierigen knöchernen Voraussetzungen ein einzeitiges Vorgehen bei der Implantation ermöglicht wird (Giesenhagen, 2008).

ICBM (*insoluble collagenous bone matrix*) konnte sich bereits in früheren Studien als geeignetes Trägermaterial beweisen, unter anderem in Kombination mit embryonalen Stammzellen (Kahle et al., 2010, Langenbach et al., 2012a). Auch in dieser Studie wiesen die Implantate mit ICBM-Trägern im Vergleich zur Kontrollgruppe schon nach zwei Wochen bessere Werte in allen Messbereichen auf. Dies kann durch die im ICBM-Träger enthaltenen kollagenösen Strukturen erklärt werden, welche den einwandernden Osteoblasten als Leitstruktur dienen (Osteokonduktion).

Im Verlauf zeigt sich, dass sich die BIC-Werte, die zugewonnene Knochenhöhe im Defektbereich und die neugewonnenen Knochenhöhwerte nach zwölf Wochen nur geringfügig von der Kontrolle unterscheiden (Abbildungen 27, 30, 33 und 36). Die BIC-Werte nach zwei Wochen sind jedoch die höchsten von allen Gruppen. In der Knochenhöhe lässt sich nach vier Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein größerer Zuwachs der Knochenhöhe erkennen, welcher aber nicht über die zwölf Wochen bestehen bleibt. Der ICBM-Träger behauptet sich somit als ein gutes Gerüst für den vertikalen Knochenaufbau und den frühen BIC. Der Rückgang bis zur zwölften Woche und der nur geringe Unterschied zur Kontrollgruppe im BIC nach zwölf Wochen weist am ehesten auf Resorptionsvorgänge des Trägermaterials hin. Die BVD-Werte liegen nach zwölf Wochen deutlich über denen der Kontrollgruppe. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Dichte des umliegenden Knochens durch den ICBM-Träger verbessert wird. Resorptionsprozesse des Trägers scheinen also nur in den Grenzbereichen des Trägers am Implantat und zur Schleimhaut hin von Bedeutung zu sein. Eine Versorgung mit ICBM-Trägern alleine scheint somit nur in den ersten vier Wochen nach Implantation einen Vorteil für die vertikale Augmentation zu bringen.

5.4 ICBM+BMP2

1992 wurde eine Pilotstudie veröffentlicht, die BMPs nutzte, um den Knochenaufbau zu verbessern. In ihr wurde BMP7 zusammen mit den Implantaten in den Knochen implantiert (Rutherford et al., 1992). Daraufhin folgten verschiedene Studien mit

BMP2, die alle zeigten, dass auch rekombinantes BMP2 (rhBMP2) den Knochenaufbau und die Regeneration verbessert (Huh et al., 2012, Jones et al., 2006, Weng et al., 2009). BMP2 kann embryonale Stammzellen zu Knorpel, Osteoblasten oder Adipozyten differenzieren. Dabei unterstützen niedrige Konzentrationen von substituiertem BMP2 die Chondrogenese und höhere Konzentrationen die Osteogenese (zur Nieden et al., 2005). Unter bestimmten Voraussetzungen kann BMP2 auch myogene Zellen in osteogene umwandeln (Katagiri et al., 1994).

BMPs haben in der Knochenregeneration allerdings auch Nachteile. Zum einen hängt der Gebrauch von BMPs mit erheblichen Kosten zusammen und zum anderen induziert BMP nicht nur die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten, sondern auch zu Osteoklasten, welche den neugebildeten Knochen wieder abbauen (Schuckert 2011).

ICBM+BMP2 zeigt im Vergleich zur ICBM-Gruppe, ähnlich wie die Kontrollgruppe, geringere BIC%-Werte nach zwei Wochen. Über die gesamte Regenerationszeit ist der BIC im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verbessert. Über vier Wochen zeigt sich allerdings in der zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich, der neugewonnenen Knochenhöhe und der BVD eine deutlich verbesserte Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildungen 27, 30, 33 und 36). Eine Studie von Jones et al. zeigte einen ähnlichen Effekt. Die rhBMP2-induzierte periimplantäre Knochenheilung wies nach vier Wochen einen besseren BIC, mehr neuen Knochen und eine bessere Defektfüllung auf. Nach zwölf Wochen allerdings konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden (Jones et al., 2006). Dies könnte auf eine negative Rückkopplung in der BMP2-Kaskade zurückzuführen sein, welche dann das Knochenwachstum bremst. Dagegen sprächen allerdings die hohen Werte der zugewonnenen Knochenhöhe im Defektbereich, der neugewonnenen Knochenhöhe und der BVD nach zwölf Wochen. Vor allem in der Defektfüllung und in Bezug auf die vertikale Augmentation lässt sich ein klarer Unterschied im Vergleich zum ICBM-Träger alleine und zur Kontrollgruppe erkennen. Knochenwachstum findet also sehr wohl auch später noch statt. Eine weitere Erklärung könnte eine für die BMP2 aktivierte Knochenbildung unzureichende Angiogenese nach vier Wochen sein. Diese Theorie würde auch den Knick in der Kurve der Knochenhöhemessungen nach vier Wochen erklären (Abbildungen 33 und 36). Matsubara et al. gehen davon aus, dass das BMP2-vermittelte Knochenwachstum verzögert werden kann, um eine ausreichende Vaskularisation zu gewährleisten (Matsubara et al., 2012).

Der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC%) liegt bis zu den ersten vier Wochen im Bereich der Kontrollgruppe, fällt nach zwölf Wochen jedoch zurück. Die anderen Messungen zeigen deutlich gesteigerte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Unterschiede lassen darauf schließen, dass die Knochenheilung durch das vom Träger abgegebene BMP2 vor allem im Bereich direkt um das Implantat herum reduziert ist. Etwas weiter vom Implantat entfernt kann die Wirkung vor allem nach zwölf Wochen nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür wäre, dass das BMP im direkten Implantatbereich entweder sehr schnell aufgebraucht wird oder gar nicht erst dorthin gelangt. Im gesamten Defektbereich scheint die BMP2-Dosis ausreichend oder der Verbrauch geringer zu sein bzw. kann das BMP2 effektiver zur Induktion der Knochenregeneration genutzt werden. Mit Hilfe eines anderen Trägers, wie zum Beispiel einer Kombination von Träger- und PEG-Hydrogel (Kölpin, 2009) oder mittels Kombination von synthetischen und organischen Trägermaterialien (Schliephake, 2010), könnte eine kontinuierliche und damit langzeiteffektivere Knochenneubildung direkt am Implantat erzielt werden.

Der große Vorteil der Knochenheilung unter BMP2-Einfluss liegt in dem durch BMP2 beschleunigten vertikalen Knochenwachstum. Eine schnelle Einheilung der Implantate, insbesondere, wenn zusätzlich knochenaufbauende Maßnahmen durchgeführt wurden, stellt eine entscheidende Verbesserung für die Praxis dar. Läge eine ausreichende Knochenhöhe schneller vor, müsste man nach einer Implantation mit Knochenaugmentation nicht mehr bis zu sechs Monate lang warten, bis die Implantate freigelegt werden und weitere Maßnahmen folgen können.

5.5 ICBM+BMP2+VEGF

Die Angiogenese ist für die Osteogenese unverzichtbar. Ohne ausreichende Blutversorgung ist eine Knochenregeneration nicht möglich. Angiogene Prozesse finden unmittelbar vor der Osteogenese statt und bilden somit die Grundlage für die nachfolgende Knochenformation. BMP2 und VEGF sind über verschiedene Wege an der frühen Knochenformation beteiligt, was eine synergistische positive Beeinflussung des Knochenwachstums ermöglicht. Eine lokale Freisetzung von VEGF verlängert die Angiogenese im Regenerationsbereich und verstärkt somit die Osteogenese. Durch VEGF-Substitution wird die Aktivierungsphase und damit auch die Angiogenese über den Zeitpunkt der physiologischen Gefäßregression hinaus verlängert. So kann die

Angiogenese bis zu 14 Tage nach Reizauslösung aufrecht erhalten bleiben (Kumar et al., 2010, Kleinheinz et al., 2002).

Peng et al. stellten bereits 2002 bzw. 2005 einen Zusammenhang zwischen der BMP2-induzierten Osteogenese und VEGF her. Sie kamen in ihren Studien zu folgenden Ergebnissen (Peng et al., 2005, Peng et al., 2002):

- VEGF vermittelt die Angiogenese während des durch BMP2 stimulierten Knochenaufbauprozesses. Durch Gabe von exogenem VEGF werden BMP2-induzierte Knochenformationen und Knochenaufbau durch Modulation der Angiogenese verbessert, da die Resorption des aufgebauten Knorpels gesteigert und die Knochenmineralisierung verbessert wird
- BMP2-induzierter Knochenaufbau umfasst zwei Phasen der Angiogenese: eine frühe, vor der Bildung von hypertrophem Knorpel, gefolgt von einer späten, verbunden mit dem Erscheinen von hypertrophem Knorpel
- VEGF-Antagonisten (z.B. sFlt1) inhibieren die durch BMP2 induzierte Knochenformationen
- VEGF interagiert synergistisch mit BMP4 und BMP2. Allerdings gibt es Unterschiede zwischen der Interaktion mit BMP4 und BMP2 (VEGF hat einen größeren Effekt auf die BMP4-induzierte enchondrale Knochenformation)
- BMP2:VEGF-Ratio ist wichtig. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Heilungsgrad und der BMP2:VEGF-Ratio (höherer VEGF-Spiegel = weniger Knochenaufbau; niedrigerer VEGF zu BMP2-Spiegel = mehr Knochenregeneration)

Außerdem steigert VEGF die mRNA- und die Protein-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen und stimuliert die chemotaktische Migration und Differenzierung von Osteoblasten (Bouletreau PJ et al., 2002, Samee et al., 2008). Auch Jiang et al. konnten zeigen, dass die Kombination von BMP2 und VEGF einen größeren Effekt auf die Knochenregeneration hat als einer dieser Faktoren alleine. Anhand der Ergebnisse ihrer *in vitro*-Studie schlussfolgerten sie, dass VEGF der Faktor ist, welcher während der Knochenregeneration mit einer Kombination aus VEGF und BMP2 den entscheidenden Vorteil bringt (Jiang et al., 2011). Diese Aussage kann durch die vorliegende *in vivo*-Studie unterstützt werden. Im Vergleich zu ICBM+BMP2 alleine weist die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe bei allen gemessenen Werten bessere oder ähnliche Ergebnisse auf. Vor allem die BVD und die zugewonnene Knochenhöhe im

Defektbereich sind nach vier und zwölf Wochen erheblich gesteigert (siehe Abbildungen 30 und 33).

Song et al. (Song et al., 2011) hingegen zeigten in einer Studie, dass die Kombination von BMP2 und VEGF zwar die Angiogenese fördert, aber die Differenzierung von Osteoblasten während der Knochenregeneration behindert. Dies erklärten sie mit einer durch BMP2 und VEGF bedingten Id1-Gen-Überexpression. Das Id1-Gen wirkt auf die endothelialen Progenitorzellen, indem es die Zellrekrutierung, die Chemotaxis und die Mobilisation der Zellen steuert (Matsubara et al., 2012). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Knochenregeneration mit Hilfe von BMP2 und VEGF während der ersten vier Wochen signifikant beschleunigt ist gegenüber der ICBM-Gruppe, das Knochenwachstum jedoch nach der vierten Woche abflacht oder - im Fall der neugewonnenen Knochenhöhe - sogar wieder zurückgeht (siehe Tabellen 9, 11, 13, 15 und Abbildungen 27, 28, 30, 31, 33, 34, 36 und 37). Allerdings brachten Song et al. verschiedene Kombinationen von BMP2, VEGF und endothelialen Progenitor-Zellen auf einem Alginat-Gel in die Muskulatur von Mäusen ein, was einen großen Unterschied zu der Methodenwahl dieser Studie zeigt und eine gemeinsame Schlussfolgerung schwierig macht. Dennoch kommen Song et al. zu dem Fazit, dass die Kombination von VEGF-modifizierten endothelialen Stammzellen und BMP2 die Knochenregeneration durch verbesserte Vaskularisation beschleunigt (Song et al., 2011).

Bisher wurde in der Literatur davon ausgegangen, dass eine unzureichende Angiogenese die BMP2-vermittelte Knochenheilung durch eine konsekutive Hypoxie und zu wenig Nutrition behindert (Hirao et al., 2006). Eine neuere Studie von Matsubara et al. gibt Hinweise darauf, dass die vaskuläre Angiogenese an sich die strukturelle Voraussetzung zur Knochenheilung darstellt. Die kortikalen Knochenanteile scheinen sich um die Havers'schen Kanäle herum zu organisieren und die trabekulären Knochenanteile um die vaskulären Strukturen herum, welche in den leeren Lakunen entstehen, nachdem die Chondrozyten abgebaut wurden. Auch VEGF und BMP2 stehen laut dieser Studie in einem größeren Zusammenhang als bisher vermutet. Es wird davon ausgegangen, dass die vaskulären Endothel- und Muskelzellen eine primäre Quelle der BMP2-Expression während der Osteogenese darstellen. Außerdem zeigten PCR-Analysen, dass nicht nur Endothelzellen, sondern auch Chondrozyten und mesenchymale Stammzellen VEGF-A exprimieren. Diese Resultate weisen darauf hin, dass Knochen-/Gewebeformation und Angiogenese sich gegenseitig durch ein Set von

parakrinen Schleifen koordinieren. In diesem Set scheinen es dann vor allem die Blutgefäße zu sein, welche die BMP2s ausschütten, und die mesenchymalen Stammzellen, welche das VEGF synthetisieren. Als Vermittler dieser parakrinen Schleifen steht hier das BMP im Vordergrund (Matsubara et al., 2012). Durch seine Angiogenese-vermittelnden Eigenschaften wird BMP2 unter anderem auch mit der Vaskularisation von Tumoren assoziiert (Raida et al., 2005).

Schmitt et al. kombinierten BMP2 und VEGF mit aufbereitetem bovinem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss®). Sie nutzten die BioOss-Blöcke als Trägermaterialien für die zugeführten Zytokine. Die Träger wurden einerseits in *critical size defects* eingebracht und andererseits auf den Knochen aufgelegt. Sie konnten sie zeigen, dass, wie im BMP2-Abschnitt vermutet, der Kontaktbereich zwischen dem eingebrachten Material und dem ortsständigen Knochen einen kritischen Bereich in der Knochenheilung darstellt. Außerdem wurde deutlich, dass sich ein *critical size defect* schneller mit Knochen füllt als vertikal augmentiert wird. Sie konnten keinen Vorteil von VEGF und BMP2 feststellen (Schmitt et al., 2013). Sie verwendeten allerdings ein anderes Trägermaterial und kombinierten die Träger nicht mit Implantaten.

In der vorliegenden Studie zeigt die ICBM+BMP2+VEGF-Gruppe bis zur vierten Woche nach Implantatinsertion ein im Vergleich rapides Knochenwachstum, was aber bis zur zwölften Woche nicht aufrechterhalten werden kann und stark abflacht (siehe Abbildungen 27, 28, 30, 31, 33, 34, 36 und 37). Physiologisch sind VEGF-Level nur bis zum 31. Tag nach dem Trauma in und um die Bruchstelle gesteigert (Matsubara et al., 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und anderer Studien (Lin et al., 2014b) scheinen einen Hinweis darauf zu geben, dass auch künstlich gesteigerte VEGF-Level spätestens ab dem 31. Tag nach Implantatinsertion keinen großen Vorteil in der Knochenformation mehr darstellen.

Eine andere Überlegung könnte sein, dass die VEGF+BMP2-Dosen im Träger nicht ausreichen, um das rapide Wachstum aufrecht zu erhalten. Kumar et al. haben dieses Problem mit dem Einbringen von VEGF- und BMP2-exprimierenden Stammzellen in Knochendefekte von Mäusen umgangen. Somit wird eine regelmäßige und den Ansprüchen angepasste Ausschüttung von VEGF und BMP2 gewährleistet (Kumar et al., 2010). Arasawa et al. konnten durch eine neue 3D-CT-Technik eine signifikante Knochenresorption nach dem Einsatz von Knochenersatzmaterialien feststellen und messen (Arasawa et al., 2012). Auch die Ergebnisse dieser Studie weisen vor allem zwischen der vierten und zwölften Woche Knochenresorptionsprozesse auf. Der

Versuch, diese mit einer Substitution von VEGF und BMP2 zu reduzieren, gelang nur bedingt (siehe Abbildungen 27, 28, 30, 31, 33, 34, 36 und 37).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kombination von ICBM+BMP2+VEGF die periimplantäre Knochenregeneration in den Bereichen BVD%, zugewonnene und neugewonnene Knochenhöhe über die gesamten zwölf Wochen der Knochenregeneration signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verbessert. Im Defektbereich lässt sich schnell qualitativ und quantitativ hochwertiger Knochen nachweisen. Auch die Defektfüllung ist verbessert. Den Knochen-Implantat-Kontakt verbessert es nur kurzfristig (bis zur zweiten Woche). ICBM+BMP2+VEGF bringen somit einen erkennbaren Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe und auch gegenüber ICBM oder ICBM+BMP2 alleine (Schorn et al., 2017).

5.6 Aktuelle Ansätze im Hinblick auf die Knochenregeneration in der dentalen Implantologie

Die periimplantäre Knochenregeneration ist ständiger Gegenstand der aktuellen Forschung. Auch die Applikation von Medikamenten in die Defektstelle wird diskutiert. Moriyama et al. und Du et al. konnten beispielsweise eine positive Wirkung von HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statinen) auf die periimplantäre Knochenregeneration zeigen (Moriyama et al., 2008, Du et al., 2013).

Insbesondere die vertikale periimplantäre Knochenregeneration stellt durch ihre anatomischen Grenzen und den großen technischen Aufwand eine Herausforderung dar (Scarano et al., 2011, Penarrocha et al., 2012, Rocchietta et al., 2008, Daga et al., 2015). Verschiedene Techniken wie die *guided bone regeneration* (GBR), die Distraktionsosteogenese und der Knochenaufbau mittels *onlay grafts* wurden speziell zur vertikalen Augmentation eingesetzt (Scarano et al., 2011, Rocchietta et al., 2008, Block et al., 1996). Als eine vielversprechende Methode zur vertikalen Knochenaugmentation hat sich außerdem die sog. „*Tentpole Technique*“ herausgestellt. Hierbei werden Titanschrauben in den Knochen eingebracht. Um die Schrauben herum werden Platelet rich plasma oder zerkleinerte Knochenersatzmaterialien platziert und das Periost wird wie ein Zelt darüber aufgespannt. Durch die osteogene Potenz des Periostes und durch die örtliche Fixierung der Knochenersatzmaterialien kann so die vertikale Augmentation verbessert werden (Daga et al., 2015, Wannfors et al., 2009, Le et al., 2010). Welche die beste Methode ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Bis heute stellt der autologe Knochen den „Goldstandard“ unter den Materialien zur Knochenregeneration dar. Giesenhagen (Giesenhagen, 2008, Meyer et al., 2009) konnte anhand der von ihm beschriebenen Knochenringtechnik zeigen, dass ein vertikaler Knochenaufbau zugleich mit der Implantatsetzung möglich ist. Er verwendete jedoch autologen Knochen vom Kinn, was nicht nur eine zweite Intervention bedeutet, sondern u. U. auch mit Komplikationen wie z.B. Sensibilitätsstörungen der Unterkieferfrontzähne verbunden ist. Somit wäre eine vertikale periimplantäre Knochenregeneration mithilfe anderer Techniken wünschenswert. Bis heute ist der Einsatz von kortikospongiösen Xenoblöcken dem Einsatz von autologen Knochenersatzmaterialien unterlegen (Rothamel et al., 2008). Eine Studie von Penarrocha et al. konnte mit einer Kombination aus autologem Knochentransplantat, welches auf dem Knochenkamm des Unterkiefers fixiert wurde, und GBR gute Ergebnisse zeigen (Penarrocha et al., 2012). Die GBR kann zwar zum Teil sehr gute Resultate aufzeigen, sie bringt allerdings auch eine große Variabilität der Ergebnisse mit sich. Daraus lässt sich schließen, dass vor allem die Fähigkeiten des jeweiligen Chirurgen und die patientenindividuellen Gewebeunterschiede die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen (Clementini et al., 2012, Wallace, 2013).

Die Kombination aus Trägermaterial und Zytokinen scheint vielversprechend zu sein. So hat sich der Zusatz von basic fibroblast growth factor (bFGF) in Kombination mit BMP2 und VEGF in einer *in vitro*-Studie als zusätzlicher Verbesserungsfaktor für die Knochenregeneration herausgestellt (Bai et al., 2013). Hier scheint der Effekt auf die Knochenheilung am besten zu sein, wenn zu Beginn der Knochenregeneration bFGF und VEGF hinzugegeben werden und in den letzten sieben Tagen der Regenerationsphase dann BMP2.

Generell ist es ein noch nicht gelöstes Problem in der Anwendung von Kombinationen aus Trägern und Zytokinen, wie eine kontinuierliche bzw. kontrollierte Freisetzung der Zytokine aus dem Träger in das Zielgebiet gewährleistet werden kann. Hier wird u. a. mit Hilfe der Stammzellforschung versucht, praktikable Lösungen zu finden (Wu et al., 2009, Handschel et al., 2009a, Handschel et al., 2009b, Kögler, 2009, Djouad und Tuan, 2009). Weitere Forschung ist somit nötig, um einen sicheren und vorhersagbaren Einsatz von Zytokinen für die Knochenregeneration im klinischen Alltag zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- ALGHAMDI, A. S., SHIBLY, O. & CIANCIO, S. G. 2010. Osseous grafting part I: autografts and allografts for periodontal regeneration--a literature review. *J Int Acad Periodontol*, 12, 34-8.
- ARASAWA, M., ODA, Y., KOBAYASHI, T., UOSHIMA, K., NISHIYAMA, H., HOSHINA, H. & SAITO, C. 2012. Evaluation of bone volume changes after sinus floor augmentation with autogenous bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 853-7.
- AUMÜLLER, G. 2006. Kiefergelenk und Kaumuskulatur. In: AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., WURZINGER, L., WESKER, K., VOLL, M., VANSELOW, H., BAUM, K. & LACKNER, C. (eds.) *Anatomie*. Stuttgart: Thieme.
- AXELRAD, T. W. & EINHORN, T. A. 2009. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 481-8.
- BAI, Y., LI, P., YIN, G., HUANG, Z., LIAO, X., CHEN, X. & YAO, Y. 2013. BMP-2, VEGF and bFGF synergistically promote the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*, 35, 301-8.
- BECKER, D., GEISLER, U., HEMPEL, U., BIERBAUM, S., SCHARNWEBER, D., WORCH, H. & WENZEL, K. W. 2002. Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res*, 59, 516-27.
- BERGENHOLTZ, G., WIKESJO, U. M., SORENSEN, R. G., XIROPAIDIS, A. V. & WOZNEY, J. M. 2006. Observations on healing following endodontic surgery in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*): effects of rhBMP-2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101, 116-25.
- BOTTICELLI, D., BERGLUNDH, T., BUSER, D. & LINDHE, J. 2003. The jumping distance revisited: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, 14, 35-42.
- BOULETREAU PJ, WARREN SM, SPECTOR JA, PELED ZM, GERRETS RP, GREENWALD JA & MT, L. 2002. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: Implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg*, 2384-2397.
- BUSER, D., INGIMARSSON, S., DULA, K., LUSSI, A., HIRT, H. P. & BELSER, U. C. 2002. Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 22, 109-17.
- CASATI, M. Z., DE VASCONCELOS GURGEL, B. C., GONCALVES, P. F., PIMENTEL, S. P., DA ROCHA NOGUEIRA FILHO, G., NOCITI, F. H., JR. & SALLUM, E. A. 2007. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects--a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36, 132-6.
- CAWOOD, J. I. & HOWELL, R. A. 1988. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 17, 232-6.
- CHANAVAL, M. 1995. Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with ⁸⁵Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implantol*, 21, 214-9.
- CLEMENTINI, M., MORLUPI, A., CANULLO, L., AGRETTINI, C. & BARLATTANI, A. 2012. Success rate of dental implants inserted in horizontal

- and vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 847-52.
- COCHRAN, D. L., SCHENK, R., BUSER, D., WOZNEY, J. M. & JONES, A. A. 1999. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol*, 70, 139-50.
- CRHA, M., NEČAS, A., SRNEC, R., JANOCEK, J., STEHLÍK, L., RAUŠER, P., URBANOVÁ, L., PLÁNKA, L., JANČÁŘ, J. & AMLER, E. 2009. Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. *Acta Vet. Brno*, 635-642.
- CROSS, M. J., DIXELIUS, J., MATSUMOTO, T. & CLAESSION-WELSH, L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 28, 488-94.
- DAGA, D., MEHROTRA, D., MOHAMMAD, S., SINGH, G. & NATU, S. M. 2015. Tentpole technique for bone regeneration in vertically deficient alveolar ridges: A review. *J Oral Biol Craniofac Res*, 5, 92-7.
- DAHLIN, C. & JOHANSSON, A. 2011. Iliac crest autogenous bone graft versus alloplastic graft and guided bone regeneration in the reconstruction of atrophic maxillae: a 5-year retrospective study on cost-effectiveness and clinical outcome. *Clin Implant Dent Relat Res*, 13, 305-10.
- DAVIES, J. E. 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*, 67, 932-49.
- DEPPRICH, R. 2003. *Die osteoinduktive Potenz verschiedener gentechnisch modifizierter Bone Morphogenetic Proteins*. Dr. med. dent., Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg.
- DEPPRICH, R., HANDSCHEL, J., SEBALD, W., KUBLER, N. R. & WURZLER, K. K. 2005. [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 9, 363-8.
- DEPPRICH, R. A. 2009. Biomolecule Use in Tissue Engineering. In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Engineering*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- DIMITRIOU, R., MATALIOTAKIS, G. I., CALORI, G. M. & GIANNOUDIS, P. V. 2012. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*, 10, 81.
- DJOUAD, F. & TUAN, R. S. 2009. Mesenchymal Stem Cells: New Insight Into Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- DU, Z., CHEN, J., YAN, F., DOAN, N., IVANOVSKI, S. & XIAO, Y. 2013. Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin. *Clin Oral Implants Res*, 24, 422-7.
- ECKELT, U., PILLING, E., MAI, R., HUHLE, M., BIERBAUM, S., BERNARDT, R., SCHARNWEBER, D., KUHLISCH, E., HEMPEL, U. & STADLINGER, B. 2007. Beschleunigte Osseointegration durch Implantatbeschichtungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix. *Z Zahnärztl Impl*, 23, 101-110.
- ESPOSITO, M., GRUSOVIN, M. G., FELICE, P., KARATZOPOULOS, G., WORTHINGTON, H. V. & COULTHARD, P. 2009. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*, 2, 167-84.

- FERRARA, N. 2000. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 55, 15-35; discussion 35-6.
- FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.
- FINKENZELLER, G., SPARACIO, A., TECHNAU, A., MARME, D. & SIEMEISTER, G. 1997. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*, 15, 669-76.
- FROST, H. M. 1983. The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J*, 31, 3-9.
- GIESENHAGEN, B. 2008. Die einzeitige vertikale Augmentation mit ringförmigen Knochentransplantaten. *Z Zahnärztl Impl* 24, 129-132.
- GOSPODAROWICZ, D., ABRAHAM, J. A. & SCHILLING, J. 1989. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7311-5.
- GOTFREDSEN, K., NIMB, L., BUSER, D. & HJORTING-HANSEN, E. 1993. Evaluation of guided bone generation around implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, 51, 879-84; discussion 885-6.
- HANDSCHEL, J., BERR, K., DEPPRICH, R., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R., MEYER, U., OMMERBORN, M. & LAMMERS, L. 2009a. Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials. *J Biomater Appl*, 23, 549-60.
- HANDSCHEL, J., MEYER, U. & WIESMANN, H. P. 2009b. Embryonic Stem Cell Use. In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- HANDSCHEL, J., SIMONOWSKA, M., NAUJOKS, C., DEPPRICH, R. A., OMMERBORN, M. A., MEYER, U. & KUBLER, N. R. 2009c. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Med*, 5, 12.
- HIRAO, M., TAMAI, N., TSUMAKI, N., YOSHIKAWA, H. & MYOUI, A. 2006. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281, 31079-92.
- HOLMES, K., ROBERTS, O. L., THOMAS, A. M. & CROSS, M. J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19, 2003-12.
- HUH, J. B., KIM, S. E., KIM, H. E., KANG, S. S., CHOI, K. H., JEONG, C. M., LEE, J. Y. & SHIN, S. W. 2012. Effects of anodized implants coated with Escherichia coli-derived rhBMP-2 in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 1577-84.
- JAMJOOM, A. & COHEN, R. E. 2015. Grafts for Ridge Preservation. *J Funct Biomater*, 6, 833-48.
- JENNISSEN, H., ZUMBRINK, T., CHATZINIKOLAIDOU, M. & STEPPUHN, J. 1999. *Biocoating of Implants with Mediator Molecules: Surface Enhancement of Metals by Treatment with Chromosulfuric Acid - Biologisierung von Implantaten mit Biomolekülen: Oberflächenveredelung von Metallen durch Behandlung mit Chromschwefelsäure*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- JIANG, J., FAN, C. Y. & ZENG, B. F. 2011. Experimental Construction of BMP2 and VEGF Gene Modified Tissue Engineering Bone in Vitro. *Int J Mol Sci*, 12, 1744-55.
- JOHN, A., VARMA, H. K., VIJAYAN, S., BERNHARDT, A., LODE, A., VOGEL, A., BURMEISTER, B., HANKE, T., DOMASCHKE, H. & GELINSKY, M. 2009.

- In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic. *Biomed Mater*, 4, 015007.
- JONES, A. A., BUSER, D., SCHENK, R., WOZNEY, J. & COCHRAN, D. L. 2006. The effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model. *J Periodontol*, 77, 1184-93.
- KAHLE, M., WIESMANN, H. P., BERR, K., DEPPRICH, R. A., KUBLER, N. R., NAUJOKS, C., COHNEN, M., OMMERBORN, M. A., MEYER, U. & HANDSCHEL, J. 2010. Embryonic stem cells induce ectopic bone formation in rats. *Biomed Mater Eng*, 20, 371-80.
- KATAGIRI, T., YAMAGUCHI, A., KOMAKI, M., ABE, E., TAKAHASHI, N., IKEDA, T., ROSEN, V., WOZNEY, J. M., FUJISAWA-SEHARA, A. & SUDA, T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, 127, 1755-66.
- KLEINHEINZ, J., WIESMANN, H. P., STRATMANN, U. & JOOS, U. 2002. Beeinflussung der Angiogenese und Osteogenese unter dem Einfluss von vascular endothelial growth factor (VEGF). *Mund-Kiefer Gesichtschir* 175-182.
- KLIJN, R. J., MEIJER, G. J., BRONKHORST, E. M. & JANSEN, J. A. 2010. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 493-507.
- KÖGLER, G. 2009. The Unrestricted Somatic Stem Cell (USSC) From Cord Blood For Regenerative Medicine. In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- KÖLPIN, F. 2009. Ossäre Regeneration eines experimentellen critical-size Defektes der Schweinekalotte durch ein biphasisches Knochenersatzmaterial mit lokalem Gentransfer - Einfluss einer biodegradierbaren PEG-Membran auf Ossifikation und Mineralisation. Dissertation ed.: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU).
- KÜHNEL, W. 2008. *Taschenatlas Histologie*, Stuttgart, New York, Thieme.
- KUMAR, S., WAN, C., RAMASWAMY, G., CLEMENS, T. L. & PONNAZHAGAN, S. 2010. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Mol Ther*, 18, 1026-34.
- LANG, N. P., HAMMERLE, C. H., BRAGGER, U., LEHMANN, B. & NYMAN, S. R. 1994. Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clin Oral Implants Res*, 5, 92-7.
- LANGENBACH, F., NAUJOKS, C., KERSTEN-THIELE, P. V., BERR, K., DEPPRICH, R. A., KUBLER, N. R., KÖGLER, G. & HANDSCHEL, J. 2012a. Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. *Tissue Eng Part A*, 16, 759-66.
- LANGENBACH, F., NAUJOKS, C., LASER, A., KELZ, M., KERSTEN-THIELE, P., BERR, K., DEPPRICH, R., KUBLER, N., KÖGLER, G. & HANDSCHEL, J. 2012b. Improvement of the cell-loading efficiency of biomaterials by inoculation with stem cell-based microspheres, in osteogenesis. *J Biomater Appl*, 26, 549-64.
- LE, B., ROHRER, M. D. & PRASAD, H. S. 2010. Screw "tent-pole" grafting technique for reconstruction of large vertical alveolar ridge defects using human

- mineralized allograft for implant site preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 68, 428-35.
- LI, R. H. & WOZNEY, J. M. 2001. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol*, 19, 255-65.
- LIN, Z., FATEH, A., SALEM, D. M. & INTINI, G. 2014a. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res*, 93, 109-16.
- LIN, Z., WANG, J. S., LIN, L., ZHANG, J., LIU, Y., SHUAI, M. & LI, Q. 2014b. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*, 7, 625-629.
- LÖFFLER, G. 2008. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Heidelberg, Springer.
- LOPES, N. M., VAJGEL, A., DE OLIVEIRA, D. M., DE SANTANA SANTOS, T. & WASSALL, T. 2012. Use of rhBMP-2 to reconstruct a severely atrophic mandible: a modified approach. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 1566-70.
- MAHAJAN, A. 2012. Periosteum: a highly underrated tool in dentistry. *Int J Dent*, 2012, 717816.
- MATIN, K., SENPUKU, H., HANADA, N., OZAWA, H. & EJIRI, S. 2003. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 around immediate implants: a pilot study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18, 211-7.
- MATSUBARA, H., HOGAN, D. E., MORGAN, E. F., MORTLOCK, D. P., EINHORN, T. A. & GERSTENFELD, L. C. 2012. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone*, 51, 168-80.
- MATSUMOTO, T. & CLAEISSON-WELSH, L. 2001. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 2001, re21.
- MERCK. 2004. *Masson-Goldner Trichromfärbekit* [Online]. Darmstadt, Germany: Merck KGaA. Available: <http://193.218.17.133/ex/downloads/brochures/clinical/W287018.pdf> [Accessed].
- MEYER, U., WIESMANN, H. P., HANDSCHEL, J. & KÜBLER, N. R. 2009. Bone Tissue Engineering. In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- MORIYAMA, Y., AYUKAWA, Y., OGINO, Y., ATSUTA, I. & KOYANO, K. 2008. Topical application of statin affects bone healing around implants. *Clin Oral Implants Res*, 19, 600-5.
- MOSEKILDE, L. 1995. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*, 17, 343S-352S.
- MOUSTAKAS, A., SOUCHELNYTSKYI, S. & HELDIN, C. H. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114, 4359-69.
- NAUJOKS, C. 2011. Untersuchungen zur Biokompatibilität osteogen verdifferenzierter humaner Nabelschnurstammzellen auf verschiedenen Biomaterialien und zum Einfluss der Biomaterialien auf den Differenzierungsprozess. Dissertation ed. Düsseldorf: deutsche-digitale-bibliothek.de.
- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13, 9-22.
- NIETHARD, U., PFEIL, B. & BIEBERTHALER, P. 2009. *Orthopädie und Unfallchirurgie*, Stuttgart, Thieme.
- NOVAES, A. B., JR., SOUZA, S. L., DE OLIVEIRA, P. T. & SOUZA, A. M. 2002. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4

- different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17, 377-83.
- ORTAK, T., OZDEMIR, R., UYSAL, A., ULUSOY, M. G., SUNGUR, N., SAHIN, B., KOCER, U. & SENSOZ, O. 2005. Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study. *J Craniofac Surg*, 16, 594-600.
- PAGNI, G., PELLEGRINI, G., GIANNOBILE, W. V. & RASPERINI, G. 2012. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. *Int J Dent*, 2012, 151030.
- PENARROCHA, M. A., VINA, J. A., MAESTRE, L. & PENARROCHA-OLTRA, D. 2012. Bilateral vertical ridge augmentation with block grafts and guided bone regeneration in the posterior mandible: a case report. *J Oral Implantol*, 38 Spec No, 533-7.
- PENG, H., USAS, A., OLSHANSKI, A., HO, A. M., GEARHART, B., COOPER, G. M. & HUARD, J. 2005. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res*, 20, 2017-27.
- PENG, H., WRIGHT, V., USAS, A., GEARHART, B., SHEN, H. C., CUMMINS, J. & HUARD, J. 2002. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest*, 110, 751-9.
- PERTOVAARA, L., KAIPAINEN, A., MUSTONEN, T., ORPANA, A., FERRARA, N., SAKSELA, O. & ALITALO, K. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 269, 6271-4.
- RAIDA, M., CLEMENT, J. H., LEEK, R. D., AMERI, K., BICKNELL, R., NIEDERWIESER, D. & HARRIS, A. L. 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131, 741-50.
- RAMMELT, S., SCHULZE, E., BERNHARDT, R., HANISCH, U., SCHARNWEBER, D., WORCH, H., ZWIPP, H. & BIEWENER, A. 2004. Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res*, 22, 1025-34.
- RANDELZHOFFER, P. 2015. Verzögert versus spät - Implantation in regio 11 und 21 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Extraktion. *teamwork J CONT DENT EDUC*, 18. Jahrgang, 212-219.
- REDDI, A. H. 1996. BMP-1: resurrection as procollagen C-proteinase. *Science*, 271, 463.
- REDDI, A. H. 2001. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1, S1-6.
- REDDI, A. H. & REDDI, A. 2009. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 341-2.
- ROCCHIETTA, I., FONTANA, F. & SIMION, M. 2008. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 35, 203-15.
- ROELEN, B. A. & DIJKE, P. 2003. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFbeta family members. *J Orthop Sci*, 8, 740-8.
- ROSEN, V. 2009. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 475-80.
- ROTHAMEL, D., SCHWARZ, F., HERTEN, M., BERNDSEN, K., STEIGMANN, M., NEUGEBAUER, J. & BECKER, J. 2008. [Vertical augmentation of the

- mandible using cortico-spongy xenoblocks. A histomorphometrical study in dogs]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 118, 1162-9.
- RUTHERFORD, R. B., SAMPATH, T. K., RUEGER, D. C. & TAYLOR, T. D. 1992. Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 7, 297-301.
- SALGADO, A. J., COUTINHO, O. P. & REIS, R. L. 2004. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*, 4, 743-65.
- SAMEE, M., KASUGAI, S., KONDO, H., OHYA, K., SHIMOKAWA, H. & KURODA, S. 2008. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci*, 108, 18-31.
- SCARANO, A., CARINCI, F., ASSENZA, B., PIATTELLI, M., MURMURA, G. & PIATTELLI, A. 2011. Vertical ridge augmentation of atrophic posterior mandible using an inlay technique with a xenograft without miniscrews and miniplates: case series. *Clin Oral Implants Res*, 22, 1125-30.
- SCHENK, R. 1992. *Biology of fracture repair*, Philadelphia,, Saunders.
- SCHLIEPHAKE, H. 2010. Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg*, 14, 17-22.
- SCHMITT, C., LUTZ, R., DOERING, H., LELL, M., RATKY, J. & SCHLEGEL, K. A. 2013. Bio-Oss(R) blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implants Res*, 24, 450-60.
- SCHORN, L., SPROLL, C., OMMERBORN, M., NAUJOKS, C., KUBLER, N. R. & DEPFRICH, R. 2017. Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med*, 13, 11.
- SCHUCKERT, K. H., JOPP, S. & OSADNIK, M. 2010. Modern bone regeneration instead of bone transplantation: a combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and platelet-rich plasma for the vertical augmentation of the maxillary bone-a single case report. *Tissue Eng Part C Methods*, 16, 1335-46.
- SCHULZ, T. J. & TSENG, Y. H. 2009. Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 523-31.
- SENGER, D. R., PERRUZZI, C. A., FEDER, J. & DVORAK, H. F. 1986. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, 46, 5629-32.
- SIEBER, C., KOPF, J., HIEPEN, C. & KNAUS, P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 343-55.
- SIGURDSSON, T. J., FU, E., TATAKIS, D. N., ROHRER, M. D. & WIKESJO, U. M. 1997. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin Oral Implants Res*, 8, 367-74.
- SIGURDSSON, T. J., NYGAARD, L., TATAKIS, D. N., FU, E., TUREK, T. J., JIN, L., WOZNEY, J. M. & WIKESJO, U. M. 1996. Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 16, 524-37.
- SONG, X., LIU, S., QU, X., HU, Y., ZHANG, X., WANG, T. & WEI, F. 2011. BMP2 and VEGF promote angiogenesis but retard terminal differentiation of osteoblasts in bone regeneration by up-regulating Id1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 796-804.
- SPANIEL-BOROWSKI, K. 2006. Zytologie und Histologie - Grundlagen. In: AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE,

- S., WURZINGER, L., WESKER, K., VOLL, M., VANSELOW, H., BAUM, K. & LACKNER, C. (eds.) *Anatomie*. Stuttgart: Thieme.
- SQUIER, C. A., GHONEIM, S. & KREMENAK, C. R. 1990. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat*, 171, 233-9.
- STRECKBEIN, P., KLEIS, W., BUCH, R. S., HANSEN, T. & WEIBRICH, G. 2013. Bone Healing with or without Platelet-Rich Plasma around Four Different Dental Implant Surfaces in Beagle Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*.
- SUN, Y., LIU, X., NG-EATON, E., LODISH, H. F. & WEINBERG, R. A. 1999. SnoN and Ski protooncproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12442-7.
- TAN, W. L., WONG, T. L., WONG, M. C. & LANG, N. P. 2012. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Implants Res*, 23 Suppl 5, 1-21.
- TESTORI, T. D. F., M.; WEINSTEIN, R.; WALLACE, S.; 2010. *Sinusbodenaugmentation : chirurgische Techniken und alternative Konzepte / Tiziano Testori ... Dt. Übers.: Sibylle Tönjes* Berlin ; Chicago, Ill. ; Peking ; Prag ; São Paulo ; Seoul ; Warschau ; Tokio ; Barcelona ; Istanbul ; London ; Mailand ; Moskau ; Neu Delhi ; Paris : Quintessenz-Verl.-GmbH
- THODE, H. C. 2002. Plots, probability plots and regression tests. *Testing for Normality*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.
- TRAN VAN, P. T., VIGNERY, A. & BARON, R. 1982. Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anat Rec*, 202, 445-51.
- TRISI, P. & MASSEI, G. 2010. Biologische und biomechanische Grundlagen der Knochenheilung und der Osseointegration der Implantate bei der Sinusbodenaugmentation. In: TESTORI, T., DEL FABRO, M., WEINSTEIN, R. & WALLACE, S. (eds.) *Sinusbodenaugmentation: chirurgische Techniken und alternative Konzepte*. Berlin: Quintessenz Verlag GmbH.
- TRISI, P., RAO, W., REBAUDI, A. & FIORE, P. 2003. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 23, 69-77.
- TSIALOGIANNIS, E., POLYZOIS, I., OAK TANG, Q., PAVLOU, G., TSIRIDIS, E., HELIOTIS, M. & TSIRIDIS, E. 2009. Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets*, 13, 123-37.
- URIST, M. R. & STRATES, B. S. 2009. The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*, 467, 3051-62.
- VERDUGO, F. & D'ADDONA, A. 2012. Long-term stable periodontal regeneration by means of autologous bone grafting in patients with severe periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 32, 157-64.
- VERMA, A., YADAV, S. & SINGH, V. 2011. Overgrowth of costochondral graft in temporomandibular joint ankylosis: An unusual case. *Natl J Maxillofac Surg*, 2, 172-4.
- VOS, M. D., RAGHOEBAR, G. M., VAN DER WAL, J. E., KALK, W. W. & VISSINK, A. 2009. Autogenous femoral head as grafting material for mandibular augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38, 1320-3.
- WALLACE, S. C. 2013. Guided bone regeneration for socket preservation in molar extraction sites: histomorphometric and 3D computerized tomography analysis. *J Oral Implantol*, 39, 503-9.
- WALLACE, S. C., PIKOS, M. A. & PRASAD, H. 2014. De novo bone regeneration in human extraction sites using recombinant human bone morphogenetic protein-

- 2/ACS: a clinical, histomorphometric, densitometric, and 3-dimensional cone-beam computerized tomographic scan evaluation. *Implant Dent*, 23, 132-7.
- WALLACE, S. S. 2010. Klinische Indikationen von Transplantatmaterialien. In: TESTORI, T., DEL FABRO, M., WEINSTEIN, R. & WALLACE, S. (eds.) *Sinusbodenaugmentation: chirurgische Techniken und alternative Konzepte*. Berlin: Quintessenz Verlag GmbH.
- WALTENBERGER, J., CLAESSEON-WELSH, L., SIEGBAHN, A., SHIBUYA, M. & HELDIN, C. H. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269, 26988-95.
- WANG, R. E. & LANG, N. P. 2012. Ridge preservation after tooth extraction. *Clin Oral Implants Res*, 23 Suppl 6, 147-56.
- WANNFORS, K., JOHANSSON, C. & DONATH, K. 2009. Augmentation of the mandible via a "tent-pole" procedure and implant treatment in a patient with type III osteogenesis imperfecta: clinical and histologic considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24, 1144-8.
- WATZEK, G., HAIDER, R., MENSENDORFF-POUILLY, N. & HAAS, R. 1995. Immediate and delayed implantation for complete restoration of the jaw following extraction of all residual teeth: a retrospective study comparing different types of serial immediate implantation. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 10, 561-7.
- WEN, B., FREILICH, M. & KUHN, L. 2015. Bone Tissue Engineering Around Dental Implants. In: VISHWAKARMA, A., SHARPE, P., SHI, S. & RAMALINGAM, M. (eds.) *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier.
- WENG, D., POEHLING, S., PIPPIG, S., BELL, M., RICHTER, E. J., ZUHR, O. & HURZELER, M. B. 2009. The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24, 31-7.
- WU, P., MOSCHIDOU, N. & FISK, N. M. 2009. Fetal Tissue Engineering: Regenerative Capacity of Fetal Stem Cells In: MEYER, U., MEYER, T., HANDSCHEL, J. & WIESMANN, H. P. (eds.) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- WURZLER, K. K., EMMERT, J., EICHELSBACHER, F., KUBLER, N. R., SEBALD, W. & REUTHER, J. F. 2004. [Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 8, 83-92.
- ZUR NIEDEN, N. I., KEMPKA, G., RANCOURT, D. E. & AHR, H. J. 2005. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol*, 5, 1.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Dr. R. Depprich für die Idee, die unermüdliche Anleitung, sowie die überaus freundliche und immer hilfsbereite Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. N.R. Kübler bedanke ich mich für die Bereitstellung seines Labors.

PD Dr. Dr. Naujoks danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Operationen und der statistischen Planung.

Herrn Dr. Schüppach danke ich herzlich für die Erstellung und Auswertung der Mikro-CT-Bilder.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Tim Fienitz für die Unterstützung zu Beginn der histomorphometrischen Messungen.

Herrn Dr. Kaisers danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und die Erstellung einiger der statistischen Diagramme.

Herrn Prof. Dr. W. Sebald danke ich für das Bereitstellen der verwendeten Wachstumsfaktoren.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. K. Berr und Frau Marianne Hölbling für die tatkräftige Unterstützung in allen labortechnischen Belangen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Corinna Ansén für die Unterstützung beim Erstellen von Abbildungen und das unermüdliche Korrekturlesen.