

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Rekonstruktion des Unterkiefers bei Knochendefekten mit  
einer Kombination aus rhBMP-2, einer synthetischen  
Polyethylenglycol-Matrix und Calciumphosphat  
- Eine Pilotstudie am Göttinger Minipig**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Sebastian Krohn**

aus

Marburg

Göttingen 2015

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichterstatter:** PD Dr. med. Dr. med. dent. R. M. Gruber

**II. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. dent. N. Gersdorff

**III. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung :** 28.04.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Therapie von Knochendefekten.....	2
1.2.1	Autogener Knochen.....	3
1.2.2	Allogener Knochen.....	4
1.2.3	Xenogener Knochen.....	5
1.3	Regulation der Knochenregeneration.....	6
1.3.1	Osteogenität.....	7
1.3.2	Osteokonduktion.....	7
1.3.3	Osteoinduktion.....	7
1.4	Synthetische und halbsynthetische Knochenersatzmaterialien.....	8
1.4.1	Hydroxylapatit.....	9
1.4.2	Tricalciumphosphat.....	11
1.5	Wachstumsfaktoren.....	12
1.5.1	Bone morphogenetic proteins.....	13
1.6	Trägermaterial für Wachstumsfaktoren.....	15
1.6.1	Eigenschaften von BMP-Trägersystemen.....	15
1.6.2	Polyethylenglycol in der Knochenregeneration.....	17
1.7	Histomorphometrie.....	19
1.8	Ziel der Studie.....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Versuchstiere.....	21

2.1.1	Einteilung der Versuchstiere und Einteilung der Versuchsgruppen.....	22
2.2	Augmentationsmaterialien.....	24
2.2.1	Hydroxylapatit/ Tricalciumphosphat.....	24
2.2.2	Polyethylenglycol.....	24
2.3	Operation der Versuchstiere .....	25
2.3.1	Vorbereitende Zahnextraktion.....	26
2.3.2	Präparation des Knochendefektes und Augmentation.....	27
2.3.3	Euthanasie der Versuchstiere und Entnahme der Kiefersegmente.....	29
2.4	Herstellung der Dünnschliff-Präparate.....	30
2.4.1	Histologische Färbung der Präparate.....	31
2.4.2	Präparatauswahl.....	32
2.4.3	Digitalisierung der Präparate.....	32
2.5	Histomorphometrische Knochenmessung.....	33
2.6	Statistische Auswertung.....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Klinische Auswertung.....	37
3.2	Lichtmikroskopische Evaluation der Augmentatregionen.....	38
3.2.1	Lichtmikroskopische Evaluation der medialen rein osteokonduktiven Materialien (Augmentationsgruppen A1, B1).....	38
3.2.2	Lichtmikroskopische Evaluation der medialen kombiniert osteokonduktiven / osteoinduktiven Materialien (Augmentationsgruppen A2, B2).....	41

3.2.3	Lichtmikroskopische Evaluation der lateralen Augmentatregion.....	44
3.3	Histomorphometrische Evaluation.....	51
3.3.1	Histomorphometrische Evaluation der medialen Augmentatregion.....	51
3.3.2	Histomorphometrische Evaluation der lateralen Augmentatregion.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Diskussion des Tiermodells.....	57
4.2	Diskussion des Defektmodells.....	59
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	61
4.4	Diskussion des Augmentationsmaterials.....	65
4.5	Diskussion der Untersuchungsmethode.....	68
4.6	Schlussfolgerungen.....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Publikation</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Tabellen- und Diagrammverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>
10.1	Histomorphometrische Daten.....	97

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung/Abbildungen
ACS	<i>absorbable collagen sponge</i>
AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
β-TCP	β-Tricalciumphosphat
BMPs	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BMP-4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
BMP-7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
BMP-9	<i>bone morphogenetic protein 9</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
GDF-5	<i>growth and differentiation factor 5</i>
HA	Hydroxylapatit
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
m	Meter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polylactid
P-Wert	<i>probability value</i>
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin und Asparaginsäure
rhBMP-2	<i>recombinant human bone morphogenetic protein 2</i>
rhBMP-7	<i>recombinant human bone morphogenetic protein 7</i>
rhGDF-5	<i>recombinant human growth and differentiation factor 5</i>
ROI	<i>region of interest</i>
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
UK	Unterkiefer

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorwort

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie spielen Operationen zur Wiederherstellung der Ästhetik des Gesichtsschädels sowie die Restitution des Kauapparates eine wichtige Rolle. Anteile der Gesichtsschädelknochen zu rekonstruieren kann durch verschiedene physiologische oder pathologische Prozesse indiziert sein. Im Rahmen der physiologischen Altersatrophie kann es durch Knochenabbau zu einem Defizit an Knochen kommen und so beispielsweise eine nachfolgende dentale Implantation erschweren oder unmöglich machen (Mordenfeld et al. 2010). Die wesentlichen pathologischen Ursachen für Knochendefekte sind unter anderem Traumata, Tumoren, Entzündungen sowie kongenitale Fehlbildungen und Nichtanlagen (Hausamen et al. 2003). Ohne entsprechende rekonstruktive Maßnahmen würde das nicht mehr suffizient knöchern unterstützte Weichgewebe des Gesichtes kollabieren und zu funktionellen, ästhetischen sowie psychosozialen Beeinträchtigungen des betroffenen Patienten führen (Hausamen et al. 2003). Im Gegensatz zu anderen Organen des Körpers kann Knochen nach einer Verletzung regenerieren und ohne Narbenbildung heilen. Um das angestrebte Ziel der *Restitutio ad integrum* zu erreichen, wird derzeit überwiegend körpereigener Knochen zur Rekonstruktion größerer ossärer Defekte transplantiert. Die biologischen Vorteile dieser Transplantate machen die Methode im Rahmen der chirurgischen Therapie von Knochendefekten zum Standardverfahren (Stützle et al. 1998). Bei körpereigenem Knochen ist das Risiko einer Abstoßungsreaktion sehr gering. Das Transplantat wird in den ortsständigen Knochen integriert, im Rahmen der Regeneration und des Remodellings resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt. Der Hauptvorteil wird jedoch darin gesehen, dass mit dem Knochengewebe auch knochenbildende Zellen in die Defektregion überführt

werden (Bauer und Muschler 2000, Khan et al. 2005). Dabei überleben die Knochenzellen anscheinend nicht vollständig (Rogers und Greene 2012). Es wird aber vermutet, dass verbliebene knochenbildende Zellen die Knochenneubildung fördern können (Albrektsson und Johansson 2001). Diese Vorzüge machen die Anwendung von körpereigenem Knochen klinisch praktikabel. Es kommt jedoch im Rahmen der Entnahmeoperation zur Entnahmemorbidity (Lutolf et al. 2003). Hierzu zählen Hämatome, Schmerzen, Sensibilitätsverlust oder Wundinfektion (Younger und Chapman 1989). Fehlendes Einwachsen des Knochens in das Transplantatlager sowie eine verlängerte Behandlungsdauer sind weitere Risiken, die auch nach Transplantation von körpereigenem Knochen auftreten können (Rueger 1998). Während des Einheilungsprozesses kann es innerhalb des ersten postoperativen Jahres zur unerwünschten Abnahme des Transplantatvolumens (Maiorana et al. 2005, Phillips und Rahn 1988) oder sogar zum Verlust der Transplantatstruktur kommen (Adeyemo et al. 2008). Neben der Entnahmemorbidity stellt die begrenzte Verfügbarkeit des körpereigenen Knochens einen wesentlichen, limitierenden Faktor dar. Verschiedene Arbeitsgruppen bemühen sich, angesichts dieser Problematik seit langem, klinisch anwendbare Biomaterialien als Alternative zu körpereigenen Knochentransplantaten zu entwickeln (Rueger 1998).

## **1.2 Therapie von Knochendefekten**

Unter dem Begriff Biomaterial werden nichtkörpereigene Substanzen zusammengefasst, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus strukturelle Elemente und Gewebe sowie deren Funktionen ersetzen und mit dem Körper interagieren (Rueger 1998).

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Stoffe, die für die Knochenaugmentation und Knochenrekonstruktion in gewissem Ausmaß geeignet sind. Da jedes dieser Materialien Vor- und Nachteile besitzt, sollte die Anwendung nach der klinischen Situation abgewogen werden (Rogers und Greene 2012). Im Kopf-Hals-Bereich werden die bereits erwähnten körpereigenen (autogenen) Knochentransplantate,

aber auch biologische sowie synthetische Knochenersatzmaterialien eingesetzt (Sailer und Weber 2000). Zu der Gruppe der biologischen Materialien gehört der allogene sowie der xenogene Knochen.

### **1.2.1 Autogener Knochen**

Die Technik der Transplantation von Knochen innerhalb desselben Individuums wurde erstmals im Jahre 1821 durch Dr. Philip von Walter beschrieben (Kahnberg 2008). Da Spender und Empfänger des Knochenmaterials identisch sind, wird das gewonnene Material als autogener Knochen bezeichnet. Mangels äquivalenter Alternativen wird die Transplantation von körpereigenem Knochen bei einigen Indikationen als Goldstandard für die chirurgische Therapie ossärer Defekte eingesetzt. Je nach Indikation, Lokalisation und Ausdehnung des Knochendefekts stehen avaskuläre oder vaskulär reanastomosierte, autogene Knochentransplantate zur Verfügung, die in ihrer chirurgischen Anwendung unterschiedlich aufwendig sind (Rueger 1998).

Avaskuläre autogene Transplantate werden ohne die versorgenden Blutgefäße entnommen. Entnahmeregionen sind vordere und hintere Beckenschaufel, die Rippen, die Außenseite der Schädelkalotte, das Schienbein, das Wadenbein sowie enorale Spenderregionen am Kinn oder Kieferwinkel (Hausamen et al. 2003). Während der Einheilung avaskulärer Knochentransplantate finden komplexe Knochenabbau- und Knochenaufbauprozesse statt. Durch Einsprossung von Gefäßen aus dem umgebenden Gewebe wird der transplantierte Knochen revaskularisiert, resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt. Dieser Vorgang wird als *creeping substitution* bezeichnet (Hahn et al. 2008). Die Knochensynthese folgt dabei den sich intertrabekulär ausbreitenden Gefäßen von peripher nach zentral. Eine Voraussetzung für die Einheilung des autogenen nicht vaskularisierten Knochentransplantates ist daher eine ausreichende Gefäßversorgung des Empfängerlagers (Hausamen et al. 2003). Das Einwachsen von Gefäßen aus dem ortsständigen Knochen in die zentrale Region des Transplantats schreitet nur sehr langsam fort. Daher werden in der frühen Einheilungsphase nur die Zellen des peripheren

Knochentransplantates, vom Empfängerlager aus, mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Kommt es jedoch zu einer Ischämiedauer von mehr als 24 Stunden, gehen Zellen, welche für Knochenumbauprozesse von Bedeutung sind, zugrunde (Rogers und Greene 2012). Es wird diskutiert, dass der Untergang einiger dieser Zellen weitere Knochenabbauprozesse aktiviert und damit die mechanische Belastbarkeit der Defektregion herabsetzt (Heino et al. 2009). Um diese resorptiven Prozesse im Rahmen der Transplantatischämie zu vermeiden, werden so genannte vaskularisierte Knochentransplantate zusammen mit ihren versorgenden Blutgefäßen entnommen. Bei der Implantation in die Defektregion werden die Gefäße dann an das Gefäßsystem der Empfängerregion reanastomosiert, um die Versorgung des Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Im Vergleich zu avaskulären Knochentransplantaten sind vaskularisierte Transplantate somit weniger stark abhängig von der Gefäßversorgung und Wertigkeit des Transplantatlagers.

Die Entnahme von körpereigenen Transplantaten - ohne ästhetische oder funktionelle Beeinträchtigung der Entnahmeregion - ist an nur wenigen Körperpartien möglich. Daher ist die klinische Anwendung des autogenen Knochens durch das geringe Angebot stark limitiert (Rogers und Greene 2012).

### **1.2.2 Allogener Knochen**

Aufgrund der limitierenden Faktoren beim autogenen Knochen wurde der Mensch-zu-Mensch-Transfer von Knochengewebe erprobt (Hofmann et al. 1997, Mayer 1910). Das dabei transplantierte Knochengewebe steht in großer Menge zur Verfügung und wird als allogener Knochen bezeichnet (Ollier 1867). Als Ausgangsmaterial für die Herstellung humaner Knochentransplantate dienen neben Oberschenkelköpfen auch Schienbeine und der Beckenkamm (Pruss et al. 2005). Die Transplantation von allogenem Gewebe ist jedoch auch mit erheblichen Risiken für den Empfänger verbunden, da die Übertragung von Infektionskrankheiten wie Hepatitis und HIV vom Spender auf den Empfänger möglich ist. Auch die potenzielle bakterielle Kontamination oder die Antigenität des Gewebes stellen Gefährdungen des Empfängers dar (Stützle et al. 1998).

Um diese Risiken zu reduzieren, ist ein großer Aufwand bezüglich der Spenderselektion und des Knochenbankmanagements notwendig. Auf Basis dieser Gegebenheiten werden allogene Knochentransplantate in Deutschland als Arzneimittel im Sinne des Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) angesehen. Die Richtlinie 2004/23/EG wurde vom Europäischen Parlament in Zusammenarbeit mit dem Rat zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards abgefasst. Diese Richtlinie dient der Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und die Verteilung der menschlichen Gewebe und Zellen (Pruss et al. 2005).

Vor der klinischen Anwendung wird das gewonnene allogene Knochenmaterial speziellen Vorbehandlungen unterzogen, um das Infektionsrisiko sowie die Antigenität zu reduzieren (Stützle et al. 1998). Im Rahmen aktueller Entwicklungen wird allogener Knochen demineralisiert und gefriergetrocknet oder autolysiert und antigenextrahiert (Keating und McQueen 2001, Kübler et al. 1999). Meist beeinflussen die physikalischen oder chemischen Verfahren in unterschiedlichem Ausmaß auch die Eigenschaften des Knochens. Trotz großer Bemühungen kann das Infektionsrisiko, auch unter Zuhilfenahme von Aufbereitungstechniken, nicht vollständig ausgeschlossen werden (Hahn et al. 2008). Aus diesem Grund wurde der Einsatz von Spenderknochen aus Gewebebanken vor allem für die Bereiche des Gesichtsskeletts in Deutschland mehr und mehr in den Hintergrund gedrängt.

### **1.2.3 Xenogener Knochen**

Der xenogene Knochen wird ebenfalls als mögliche Alternative zum autogenen Knochen angesehen (Moore et al. 2001). Der Begriff Xenotransplantation umfasst Verfahren, bei denen Organe, Gewebe, lebende Zellen sowie azelluläre Biomaterialien aus nicht humanen Spezies in den menschlichen Körper eingebracht werden (Fishman et al. 2012). Rind, Schwein, Pferd oder Meereskorallen stellen potenzielle Spenderspezies dar (Hahn et al. 2008, Nasr et al. 1999). Generell besteht - wie auch bei den allogenen Knochenersatz-

materialien - bei jeder Form der Xenotransplantation das potentielle Risiko der Übertragung von Viren- oder Prionenerkrankungen auf den Empfänger. Analog zu den Aufbereitungsmethoden für allogenen Knochen werden auch die xenogenen Materialien daher speziellen Vorbehandlungsverfahren unterzogen (Hahn et al. 2008). Organische Anteile und antigen wirkende Proteine werden dabei durch chemische Verfahren mit anschließender Sterilisation entfernt. Zurück bleibt, in Abhängigkeit von der Aufbereitungsmethode, ein poröses Gerüst aus anorganischem Hydroxylapatit (Kübler et al. 2004), dessen Zusammensetzung und Struktur dem menschlichen Knochen ähnelt (Benke et al. 2001). In der dentoalveolären Chirurgie hat sich die Anwendung des xenogenen Knochengranulats mit dem Handelsnamen Bio-Oss® etabliert (Baldini et al. 2011, Cho et al. 2011). Dieses Material wird von der Firma Geistlich aus denaturiertem Rinderknochen hergestellt und ist nach Herstellerangaben frei von Proteinen und Nukleinsäuren. Zwar handelt es sich bei azellulären xenogenen Biomaterialien um nicht lebensfähiges Gewebe, dennoch kann eine Immunantwort nicht vollständig ausgeschlossen werden (Bach et al. 1998). Auf der Suche nach innovativen, knochenähnlichen Biomaterialien ohne Infektionspotenzial wurden auch Meereskorallen auf ihre Verwendbarkeit als Knochenersatzmaterial untersucht. Aus Porites- und Goniopora-Korallen kann natürliches anorganisches Calciumcarbonat gewonnen werden, welches eine ähnliche Porenstruktur wie der natürliche Knochen aufweist (Hahn et al. 2008). Nach Implantation bietet es knochenbildenden Zellen eine adäquate Anlagerungsfläche und dient somit als Leitschiene für die Knochenregeneration (Callan und Rohrer 1993). Nach chronischer Osteomyelitis oder Radiatio sowie degenerativen Erkrankungen, die mit starken Durchblutungs- oder Knochenstoffwechselstörungen einhergehen, ist dieses Material jedoch kontraindiziert (Soost et al. 1998).

### **1.3 Regulation der Knochenregeneration**

Bei der Transplantation organischer Knochenextrakte finden komplexe biologische Interaktionen zwischen dem Knochen- und dem Knochen-

empfänger statt. Hierzu zählen osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Prozesse (Stütze et al. 1998).

### **1.3.1 Osteogenität**

Im Rahmen der Transplantation können vitale knochenbildende Zellen, wie zum Beispiel Osteoblasten und Präosteoblasten, mit dem Transplantat in das Empfängerlager überführt werden (Rogers und Greene 2012). Dabei wird diskutiert, inwieweit Zellen die Transplantation überleben und ob sie danach in der Lage sind, Knochen bilden zu können (Albrektsson und Johansson 2001). Sofern die Zellen während der Transplantation nicht zugrunde gegangen sind, werden sie in der Wirkung als osteogen beschrieben (Kübler et al. 2004).

### **1.3.2 Osteokonduktion**

Ein osteokonduktives Material dient im Rahmen der Osteoneogenese als Leitstruktur, in welche das umgebende Knochengewebe einwachsen kann (Kübler 1997). Im Rahmen der zellvermittelten Knochensynthese ermöglicht es knochenbildenden Zellen die Anlagerung auf der Oberfläche, in Poren oder Kanälen (Albrektsson und Johansson 2001, Terheyden et al. 1999). Die Existenz interkonnektierender Poren erlaubt die Einsprossung von Gefäßen aus dem Empfängerlager und die damit einhergehende Knochenneubildung (Kübler 1997). Für eine rasche Knochensynthese an osteokonduktiven Oberflächen ist daher eine ausreichende Vaskularisation des Empfängerlagers von großer Bedeutung (Albrektsson 1980). Diese regenerativen Prozesse verlaufen über eine längere Zeitspanne und können durch osteoinduktive Signalmoleküle beeinflusst werden (Albrektsson und Johansson 2001).

### **1.3.3 Osteoinduktion**

Die Osteoinduktion beschreibt einen Prozess, bei dem Osteoneogenese durch einen Reiz stimuliert wird (Albrektsson und Johansson 2001). Dieser Reiz geht

von osteoinduktiven Signalmolekülen aus (Schliephake 2010), welche mesenchymale Stammzellen aus der Umgebung des Knochenlagers rekrutieren und die Differenzierung dieser Zellen zu knochenbildenden Zellen einleiten (Urist 1965). Es wird angenommen, dass die knöcherne Auffüllung oder die Knochenheilung hauptsächlich von den rekrutierten Osteoprogenitorzellen ausgeht, während ortsständige Osteoblasten einen eher geringen Anteil zur Knochenregeneration beitragen (Frost 1989). Dieser Regenerationsprozess findet im Rahmen der physiologischen Heilung einer Knochenfraktur im orthotopen Knochenlager statt (Albrektsson und Johansson 2001). Im Jahre 1965 konnte Marshall Urist mit Hilfe demineralisierter Knochenmatrix eine heterotope Knochenbildung außerhalb des orthotopen Knochenlagers herbeiführen. Dadurch konnte er den Einfluss osteoinduktiver Moleküle auf die Knochensynthese nachweisen (Urist 1965). Es ist bekannt, dass autogene Knochentransplantate osteoinduktiv wirken, während allogener Knochen je nach Denaturierungsgrad der Proteine eine geringere Osteoinduktivität zeigt. Es wird vermutet, dass durch die verschiedenen Aufbereitungsmethoden die biologische Wirksamkeit der Signalmoleküle in erheblichem Maße herabgesetzt wird (Stützle et al. 1998). Einige Untersuchungen konnten diesbezüglich jedoch nachweisen, dass selbst temperaturbehandelte deproteinierte, xenogene Knochenersatzmaterialien osteokonduktives und osteoinduktives Potenzial besitzen (Kübler 1997). Die Eigenschaften autogener, allogener und xenogener Knochentransplantate sind daher Gegenstand kontroverser Diskussionen (Schwartz et al. 2000).

## **1.4 Synthetische und halbsynthetische Knochenersatzmaterialien**

Die bisher beschriebenen autogenen, allogenen und xenogenen Knochentransplantate sind biologischen Ursprungs. Die Limitationen bei der Anwendung dieser Transplantate führten zu intensiver Forschung an optimalen synthetischen Knochenersatzmaterialien. So genannte alloplastische Materialien sind vollsynthetischer Herkunft und können als Alternative zu den oben genannten Trans-

plantaten in der klinischen Anwendung eingesetzt werden. Das Ziel ist die Entwicklung eines mechanisch stabilen, vollsynthetischen und damit unbegrenzt zur Verfügung stehenden Knochenersatzmaterials. Dieses Material sollte dabei im Optimalfall in Bezug auf seine biologische, chemische und physikalische Beschaffenheit autogenem Knochen überlegen sein. Durch osteogenetische, osteokonduktive sowie osteoinduktive Eigenschaften des Materials soll die Quantität und die Qualität des neu gebildeten Knochens erhöht werden. Wenn diese Anforderungen erfüllt werden, ist dieses synthetische Material autogenen Transplantaten vorzuziehen, da die Entnahme körpereigenen Knochens überflüssig wäre. Derzeit stehen synthetische Knochenersatzmaterialien im Mittelpunkt der Forschung, die in ihrer Stöchiometrie der anorganischen Knochengrundsubstanz des natürlichen Knochens ähneln.

### **1.4.1 Hydroxylapatit**

Die häufigste anorganische Verbindung ist das Hydroxylapatit (HA), das etwa 50% des menschlichen Knochens ausmacht. Es ist daher naheliegend, ein synthetisches Knochenersatzmaterial auf HA-Basis zu entwickeln (Jensen et al. 1996). HA ist ein hydroxyliertes Calciumphosphatsalz von hohem Härtegrad. Im natürlichen Knochen wird es von Osteoblasten aus Phosphat- und Calciumionen gebildet (Kübler et al. 2004). Biologisches HA kann durch das Erhitzen von natürlichem Knochen gewonnen werden. Die Hoch-Temperatur-Variante wird bei über 450°C hergestellt, die Niedrig-Temperatur-Variante unter 450°C (Kübler et al. 2004). HA, das bei niedrigen Temperaturen hergestellt wird, zeigt einen hohen Porositätsgrad. Durch einen Brennvorgang bei hohen Temperaturen wird die Materialdichte erhöht und der Porositätsgrad reduziert. Dadurch kommt es innerhalb des Materials zum Verlust von interkonnektierenden Poren (Henkel et al. 2004). Das unter hohem Druck und unter hoher Temperatur aus Meereskorallen gewonnene Material wird als halbsynthetisches HA bezeichnet. In einem hydrothermalen Prozess wird Karbonat gegen Phosphat ersetzt (Roy und Linnehan 1974). Dadurch macht die synthetische Komponente einen großen Anteil dieses Werkstoffes aus. In einem ähnlichen Prozess wird halbsynthe-

tisches HA aus Meeresalgen gewonnen. Dieses phykogene Material enthält Fluorhydroxylapatit und besitzt mit 5-10  $\mu\text{m}$  verhältnismäßig kleine Poren. Vertrieben wird das Material unter dem Handelsnamen Algipore® (Kübler et al. 2004). Vollsynthetisches HA für die dentale Anwendung wird in der Regel durch das Sintern von gepresstem HA-Pulver hergestellt (Malina et al. 2013) und kann in der Partikelgröße zwischen 18 nm und 500  $\mu\text{m}$  variieren (Kübler et al. 2004). Es wird angenommen, dass synthetisches und natürliches HA strukturell ähnlich aufgebaut sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass synthetisch hergestelltes HA die kristalline Struktur des natürlichen Knochens nicht exakt widerspiegelt (Spector 1994). Zusätzlich zu Calcium und Phosphat enthält natürlicher Knochen Karbonat-Ionen, Magnesium, Natrium, Hydrogenphosphat-Ionen und weitere Spurenelemente. Darüber hinaus weist natürlicher Knochen im Vergleich zu synthetischem HA einen geringeren Kristallisationsgrad und eine geringere Kristallit-Größe auf, was im Empfängerlager zu Unterschieden in der biologischen Wirkung führen kann (Spector 1994).

Trotz einiger Erfolge in der Herstellung synthetischer Knochenreplikate ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die Knochenstruktur in ihrer Komplexität vollständig nachzubilden. Hieraus ergeben sich Unterschiede in der biologischen Anwendbarkeit synthetischer Calciumphosphate. Die synthetische Herkunft garantiert zwar Keim- und Pyrogenfreiheit, aber frühere Generationen des synthetischen HA zeigten im Vergleich zu biologischem HA weniger interkonnektierende Poren und unzureichende Biokompatibilität (Klein et al. 1983, Mercier et al. 1996, Takagi et al. 2001). Synthetische HA-Materialien bestehen häufig aus größeren Partikeln mit geringerem Porositätsgrad. Dadurch ist das Material im Defektbereich häufig zu stark kondensiert. Um dies zu vermeiden, wird dem synthetischen Material oft autogener Knochen oder allogenes Knochenersatzmaterial (*demineralized freeze-dried bone allografts*) beigemischt (Kübler et al. 2004).

In einer Vielzahl von Studien wurde bereits beschrieben, dass die Resorptions-Eigenschaften und damit auch die Knochenregeneration wesentlich von der Kristallstruktur, der Dichte, dem Porositätsgrad und der Oberflächenbeschaffenheit des HA abhängig sind (Artzi et al. 2001, Koshino et al. 2001, Mastrogiacomo et al. 2005). Ein hoher Porositätsgrad des Materials mit inter-

konnektierenden Poren ermöglicht die Adhärenz von Osteoblasten (Kübler et al. 2004, Mastrogiacomo et al. 2005). Die erstmalige Anwendung von HA als Knochenersatzmaterial zur Knochendefektaugmentation wurde im Jahr 1952 beschrieben (Ray und Ward 1951). Im Einheilungsverlauf der HA-Transplantate entstand ein nicht mehr abgrenzbarer Knochen-Hydroxylapatit-Verbund, der als "Verbundosteogenese" bezeichnet wird (Nasr et al. 1999). Es ist bekannt, dass HA nur sehr langsam resorbiert wird. Daher verbleibt das Material längerfristig als Fremdkörper im Knochen (Sailer und Weber 2000). Oft können noch nach Jahren HA-Partikel im Knochen nachgewiesen werden (Piesold et al. 2004). Durch diese persistierenden Partikel werden die mechanischen Eigenschaften des Knochens negativ beeinflusst, und es kann zu chronisch-resorptiven Entzündungen kommen (Günther et al. 1998). Unter den knochenähnlichen Calciumphosphatverbindungen wurde daher ein Material gesucht, welches bessere Resorptionseigenschaften, als Knochenersatzmaterial auf HA-Basis besitzt (Chow 2009).

### **1.4.2 Tricalciumphosphat**

Wie Hydroxylapatit wird auch Tricalciumphosphat (TCP) aus Calciumphosphaten hergestellt. Je nach Sinterungstemperatur wird dieses Material kristallographisch in das unter 1000°C gewonnene sphärische  $\beta$ -TCP sowie das über 1000°C hergestellte polygonale  $\alpha$ -TCP unterschieden (Wiltfang et al. 2002). Sowohl  $\alpha$ -TCP als auch  $\beta$ -TCP verfügen über Makro- und Mikroporen, welche das Einwachsen von Knochen ermöglichen (Sailer und Weber 2000).  $\alpha$ -TCP wird bei höheren Temperaturen gesintert und verfügt dadurch über eine höhere Materialdichte mit geringerer Mikroporosität (Henkel et al. 2004). Aufgrund dessen unterscheiden sich  $\alpha$ -TCP und  $\beta$ -TCP in den Resorptionseigenschaften (Wiltfang et al. 2002).  $\beta$ -TCP wird innerhalb weniger Monate vollständig resorbiert, während  $\alpha$ -TCP noch viele Jahre im Gewebe nachweisbar ist (Kübler et al. 2004). Beide Formen von TCP werden jedoch deutlich schneller resorbiert als HA.

Es herrscht heute weitgehende Einigkeit darüber, dass poröse Keramik auf Calciumphosphatbasis sehr gut als Knochenersatzmaterial geeignet ist (Bessa et al. 2008, Li und Wozney 2001). Die Anwendung dieser porösen Keramiken ist von Vorteil für die Knochenregeneration, da sie osteokonduktive Eigenschaften besitzen, ohne entzündliche Reaktionen im Knochenlager des Wirts hervorzurufen (Mastrogiacomo et al. 2005). Dennoch wurde bei ausgedehnten Unterkieferdefekten und bei Alveolarkamm-Augmentationen unter Verwendung von autogenen und allogenen Transplantaten mehr neu gebildeter Knochen nachgewiesen, als bei der Anwendung von Calciumphosphatkeramiken (Carter et al. 2008, Cochran et al. 2000). Es wird vermutet, dass die in autogenem sowie in allogem Knochengewebe enthaltenen osteoinduktiven Moleküle die Knochenregeneration beschleunigen. Knochenersatzmaterial auf HA- und TCP-Basis haben keine osteoinduktiven Eigenschaften. Sie dienen lediglich als osteokonduktive Leitstruktur für neu gebildeten Knochen (Glied und Kraut 2010, Groeneveld und Burger 2000), wobei diese Ergebnisse immer wieder diskutiert werden.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wird derzeit versucht, einem ausschließlich osteokonduktiven Knochenersatzmaterial unter Zuhilfenahme von Wachstumsfaktoren zusätzlich osteoinduktives Potenzial zu verleihen.

## **1.5 Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren sind Teil eines Systems von Signalmolekülen, welche die Wundheilung und Geweberegeneration koordinieren (Schliephake 2013). In der Vergangenheit war es nicht möglich, osteoinduktives, vollsynthetisches Knochenersatzmaterial herzustellen (Herford 2009, Herford und Boyne 2008). Es wurde daher versucht, synthetisches Material mit autogenem Knochen oder Extrakten aus autogenem Knochen zu kombinieren. Das Ziel war die Herstellung eines synthetischen Knochenersatzmaterials mit osteoinduktiven Eigenschaften (Hagel et al. 2007, Hashimoto-Uoshima et al. 1995, Misch und Dietsh 1993). Mehrere Untersuchungen führten in den 1960er Jahren zu der Annahme, dass die biologischen Aktivitäten von osteoinduktiven Knochenimplantaten von einzelnen

oder mehreren organischen Molekülen der Knochenmatrix ausgehen könnten (Herford und Cicciu 2010, Herford et al. 2007). In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher einige biologische Signalmoleküle auf ihre Rolle in der Knochenregeneration untersucht, um diese in Kombination mit synthetischen Materialien in der therapeutischen Knochenregeneration einsetzen zu können (Reddi et al. 1987, Urist 1965). Osteoinduktivität konnte vor allem bei *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ -Superfamilie) (Sagawa et al. 2010), *bone morphogenetic protein* (BMP) (Boyne et al. 2005, Urist und Strates 1971, Urist et al. 1983) *platelet derived growth factor* (PDGF) (Boyapati und Wang 2006) sowie *growth and differentiation factor 5* (GDF-5) (Gruber et al. 2008, Gruber et al. 2009, Herberg et al. 2008, Poehling et al. 2006, Weng et al. 2009) nachgewiesen werden.

### 1.5.1 Bone morphogenetic proteins

*Bone morphogenetic proteins* sind Signalmoleküle mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Sie nehmen Einfluss auf Wachstumsprozesse (Shetty und Han 1991) und Zelldifferenzierung (Wozney 1992). Die Entdeckung der BMP-Moleküle gelang Marshall R. Urist im Jahre 1965 (Urist 1965). Urist konnte nachweisen, dass subkutane oder intramuskuläre Implantation von demineralisiertem Knochengewebe zu einer Knochenneubildung im umliegenden Gewebe führt (Urist 1965). Mittlerweile zählen heute deutlich über 30 verschiedene Moleküle mit unterschiedlich starken osteoinduktiven Eigenschaften zur Gruppe der BMPs (Ducy und Karsenty 2000).

BMP-2, BMP-4, BMP-7 und BMP-9 zeigen deutliche osteoinduktive Wirkung (Cheng et al. 2003). Der molekulare Mechanismus des BMP-2 wurde in der Vergangenheit besonders intensiv untersucht (Boyne et al. 1997, Cochran et al. 2000, Gruber et al. 2009, Gruber et al. 2009, Jung et al. 2003, Schliephake 2013, Schliephake et al. 2008). Im menschlichen Körper sind BMPs in nur sehr geringer Konzentration von etwa 1 bis 2 Mikrogramm pro Kilogramm Knochengewebe innerhalb der Knochenmatrix enthalten (Luyten et al. 1989, Wang et al. 1988). Studien konnten beweisen, dass bereits geringe *In-vitro*-Konzentrationen dieses Wachstumsfaktors zur Chemotaxis von knochen-

bildenden Zellen führt (Schuckert und Osadnik 2011). Die Extraktion dieser Moleküle aus Knochengewebe für die Anwendung in der Knochenregeneration erforderte jedoch große Mengen an natürlichem Knochen, wodurch sich dieses Verfahren äußerst kostenintensiv gestalten würde. Daher wurde rekombinantes humanes BMP-2 biotechnologisch hergestellt (Strub et al. 1979). Rekombinantes humanes BMP-2 wurde erstmals 1991 von Toriumi und Mitarbeitern zur Rekonstruktion von mandibulären Kontinuitätsdefekten bei Hunden verwendet (Toriumi et al. 1991). Die Autoren dieser Studie konnten nach 6 Monaten bei allen Versuchstieren, bei denen BMP-2 zum Einsatz kam, stabilen, mineralisierten Knochen nachweisen, während bei den Tieren ohne BMP-2 wenig bis keine Knochenregeneration stattgefunden hat. Als Trägermaterial für das BMP-2 kam inaktive Knochenmatrix vom Hund zum Einsatz. Bei allen Tieren der BMP-Gruppe waren die Knochendefekte bereits nach 10 Wochen stabil verheilt, während die Regeneration bei den Kontrollgruppen länger andauerte.

In der Literatur werden verschiedene Abhängigkeiten der BMP-Wirkung auf die Knochenregeneration diskutiert. Es wird vermutet, dass die Spezies, die Größe und Lokalisation des Knochendefekts, Allgemeinerkrankungen, Geschlecht und Alter des Empfängerindividuums die osteoinduktive Wirkung beeinflussen (Li und Wozney 2001). Die Vermutung, dass die osteoinduktive Wirkung der BMPs altersabhängig sei, wurde im Jahr 2006 von Boyne und Mitarbeitern widerlegt (Boyne et al. 2006). In dieser Studie wurde bei Primaten unterschiedlichen Alters nach Hemimandibulektomie der entstandene knöcherne Defekt unter Verwendung eines Kollagenschwammes (ACS = *absorbable collagen sponge*) mit 0,75 mg rhBMP-2 rekonstruiert. Es gab keine Unterschiede zwischen Tieren der höheren Altersklasse und den Tieren der mittleren Altersklasse.

1997 wurde die erste Open-Label-Studie zur technischen Anwendbarkeit von Kollagenschwämmen (ACS) mit rhBMP-2 für Sinusbodenaugmentationen an 12 Patienten durchgeführt (Boyne et al. 1997). Mit Hilfe von Computertomogrammen konnten Boyne und Mitarbeiter durch die BMP-Anwendung ein signifikantes Knochenwachstum nachweisen. Nach vollständiger Abheilung erhielten 11 der 12 Patienten in einem weiteren operativen Schritt dentale Implantate in der augmentierten Region. Die histologisch untersuchten Bohrspäne waren von hoher Knochenqualität (Boyne et al. 1997). Diese Ergebnisse geben Hinweis darauf,

dass rhBMP-2/ACS eine akzeptable Alternative zu herkömmlichen autogenen Knochentransplantaten sein kann. In einer vergleichbaren Studie an 12 Patienten konnten Cochran und Mitarbeiter ähnliche Ergebnisse beschreiben (Cochran et al. 2000). Auch in dieser Studie wurde die Wirkung von rhBMP-2 in Verbindung mit resorbierbaren Kollagenschwämmen untersucht. Zwei Jahre nach der chirurgischen Implantation von rhBMP-2/ACS traten keine unerwarteten Nebenwirkungen auf. Darüber hinaus hatten die Autoren keine Sicherheitsbedenken in Bezug auf die Anwendbarkeit rhBMP-2/ACS-Implantate (Boyne et al. 1997, Cochran et al. 2000)

## 1.6 Trägermaterial für Wachstumsfaktoren

Die Knochenregeneration ist ein längerer Prozess, der sich über mehrere Wochen erstreckt. Die Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren ist jedoch selbst unter physiologischen Bedingungen nach Freisetzung im Empfängerlager sehr kurz (Takaoka et al. 1991). Nach der Transplantation unterliegen sie aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit der Diffusion innerhalb der Körperflüssigkeit (Wei et al. 2007) und werden innerhalb weniger Minuten enzymatisch abgebaut (Poynton und Lane 2002). Dadurch wird die lokale biologische Wirksamkeit herabgesetzt (Allori et al. 2008, Kübler et al. 2000). Es wird daher vermutet, dass die Freisetzungseigenschaften des Trägermaterials von entscheidender Bedeutung für die Knochenregeneration sind (Haidar et al. 2009b, Schliephake 2010).

### 1.6.1 Eigenschaften von BMP-Trägersystemen

Seit März 2007 ist die kombinierte Anwendung von rhBMP-2 mit Kollagen als Trägermaterial von der FDA als Alternative zu autogenem Knochen bei Sinusbodenaugmentation und lokalisierten Alveolarkammdefekten zugelassen. Zugelassene Präparate, die rhBMP-2 enthalten, sind unter den Handelsnamen InductOs®, oder InFUSE® bekannt. Seit der Zulassung durch die FDA wurde in weiteren 7 Studien von der zulassungsüberschreitenden *Off-label*-Anwendung

der rhBMP-2 / Kollagen-Kombination (ACS) berichtet (Herford et al. 2011, Hogan 1996, Kingsley 1994, Kinoshita und Maeda 2013, Moy et al. 1993, Razzouk und Sarkis 2012). In diesen 7 Studien wurde die Rekonstruktion von mandibulären Defekten (zwischen 3 und 9 cm) mit einer Patientenanzahl zwischen 1 (Moy et al. 1993) und 17 (Hogan 1996) durchgeführt. Bei allen Studien erfolgte die Auswertung mittels CT über einen Beobachtungszeitraum zwischen 2 (Moy et al. 1993) und 22 Monaten (Herford et al. 2011). Unter den Autoren besteht Einigkeit, dass osteoinduktives Knochenersatzmaterial den Patienten weniger stark belastet, da die Dauer des operativen Eingriffs maßgeblich reduziert wird. Leider lassen die Studien nicht die Schlussfolgerung zu, dass Wachstumsfaktoren autogene Knochentransplantate zum jetzigen Zeitpunkt vollständig ersetzen können. Die ACS ist zwar als Trägermaterial für BMP-Moleküle hilfreich. Es ist jedoch nicht formstabil und erfordert daher häufig die Zugabe anderer formstabiler Materialien (Yildirim et al. 2001).

Hydroxylapatit (HA) könnte als formstabiles Knochenersatzmaterial in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Rolle spielen. HA wurde seit den 1970er Jahren klinisch in großem Umfang als Knochenersatzmaterial eingesetzt (Li und Wozney 2001). Vor allem poröses Hydroxylapatit wurde bereits häufig als Trägermaterial für BMP in der Knochenregeneration evaluiert (Urist et al. 1977). In vielen Studien wurde bewiesen, dass diese Materialkombination erfolgversprechend in der Knochenregeneration eingesetzt werden kann (Horiuchi et al. 1988, Noshi et al. 2000, Ripamonti et al. 1992, Urist et al. 1987). Um die Resorbierbarkeit des Hydroxylapatit-Gerüsts zu verbessern, wird es heute meist als biphasisches Calciumphosphat zusammen mit Tricalciumphosphaten angewendet (Kohri et al. 1993, Mitri et al. 2012). Es ist bekannt, dass diese osteokonduktive Materialkombination als Trägermaterial für rhBMP-2 geeignet ist (Laffargue et al. 1999, Sohier et al. 2010, Yang et al. 2012, Yuan et al. 2001), wobei die Moleküle an der Oberfläche des Materials häufig durch Adsorption gebunden werden (Schliephake 2010). Bei dieser Form der Verankerung kommt es zu einer Freigabe der Signalmoleküle unmittelbar nach der Implantation (Bessa et al. 2008). Dieser Prozess der frühzeitigen Freisetzung des gesamten Molekülkontingents wird als *burst release* bezeichnet (Hänseler et al. 2014). In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob sich dieses Freisetzungsprofil fördernd

oder hemmend auf die Knochensynthese auswirkt (siehe Punkt 4.4). Aus physiologischer Sicht erscheint jedoch eine kontrollierte Freigabe der Signalmoleküle über einen vorgegebenen Zeitraum erforderlich, um eine biologische Wirkung zu erzielen (Schliephake 2010). Unter den verschiedenen Trägersystemen variieren die Freisetzungseigenschaften sehr stark. Sie sind einerseits abhängig von der Art des Trägermaterials und andererseits von der Menge der gebundenen Signalmoleküle (Bessa et al. 2008). Je nach Material können die BMP-Moleküle neben der einfachen Adsorption, wie bei Calciumphosphaten, auch durch Integration verankert werden (Luginbuehl et al. 2004). Zu diesem Zweck wurden resorbierbare, synthetische Trägermatrizes wie zum Beispiel Polyethylenglycol verwendet (Kim et al. 2009).

### **1.6.2 Polyethylenglycol in der Knochenregeneration**

Polyethylenglycol (PEG) ist eine chemische Verbindung, die durch Verkettung von Ethylen-Glycol-Monomeren im Rahmen einer Polymerisationsreaktion hergestellt werden kann. Bei dieser Reaktion entsteht unter alkalischen Bedingungen ein resorbierbares, je nach Kettenlänge flüssiges oder festes Hydrogel (Jeon et al. 1991). Das biokompatible, nicht immunogene PEG ist hydrophil und zeichnet sich durch einen gewebeähnlichen Wassergehalt sowie gute Resorbierbarkeit aus. Die Resorptionseigenschaften werden durch hydrolysierbare Esterbindungen beeinflusst, die bei der Herstellung des PEG-Hydrogels entstehen. Die Synthese erfolgt durch das Reagieren eines mehrarmigen PEG-Akrylats mit einem linearen PEG-Thiol. Durch eine selektive Additionsreaktion verbinden sich die Enden der PEG-Moleküle ohne Abspaltung eines Moleküls und bilden ein elastisches Gel-Netzwerk (Friedman et al. 1965). Innerhalb des PEG-Netzwerkes können Moleküle wie zum Beispiel Proteine verankert werden. Es wird diskutiert, ob diese gebundenen Moleküle durch gesteuerte Hydrolyse der PEG-Matrix gezielt in einem Knochendefekt freigesetzt werden können. Die kontrollierte Bindung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren stellt dabei die wichtigste Funktion eines Trägermaterials im Rahmen der Osteoinduktion dar (Kübler et al. 2000), damit eine Diffusion der Moleküle aus dem Knochendefekt

vermieden wird (Carreira et al. 2014). So könnte eine verzögerte Freisetzung von rhBMP-2 über mehrere Wochen erzielt werden, um die Knochenregeneration zu fördern (Brown et al. 2011). Die frühzeitige Diffusion der Signalmoleküle aus dem Knochendefekt sowie die frühzeitige Degradation des Trägermaterials sollten daher für eine ausreichende Osteoinduktivität im Knochendefekt vermieden werden (Hunt et al. 2001, Kim et al. 2005, Sigurdsson et al. 1996). Es ist bekannt, dass extrem rasche sowie extrem langsame Freisetzungsprofile, wie zum Beispiel eine Bolusinjektion oder die stark verzögerte Niedrigdosierung von Wachstumsfaktoren physiologisch ungeeignet für die Induktion einer Knochenneubildung sind (Geiger et al. 2003). In der Literatur wird nach wie vor kontrovers über den Freisetzungszeitraum und die Dosierung von Wachstumsfaktoren diskutiert (Haidar et al. 2009a). Es wird aber vermutet, dass die Knochenregeneration durch physiologische Mengen von Wachstumsfaktoren über einen kontrollierten, längerfristigen Zeitrahmen gefördert werden kann (Bessa et al. 2008). Mit einem so genannten *slow release*-System wie PEG könnte dies möglich sein.

In der Zahnmedizin wurde PEG zunächst in Form von biodegradierbaren Membranen in der gesteuerten Knochenregeneration (GBR = *guided bone regeneration*) erfolgreich verwendet (Jung et al. 2006). Es wurde jedoch beschrieben, dass PEG die Geweberegeneration durch Hemmung der Zelladhäsion negativ beeinflusst (Hennink und van Nostrum 2002). Nur durch die Modifikation des PEG mit Hilfe von Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenzen (RGD) oder anderen kurzen Peptiden konnte die Anlagerung und die Aktivität von Fibroblasten und Osteoblasten verbessert werden (Lutolf et al. 2003).

In präklinischen Studien wurde die Anwendbarkeit von *in situ* hergestellten PEG-Matrizes als Trägermaterial für bioaktive Proteine untersucht (Herten et al. 2009, Jung et al. 2007). Die Autoren berichteten, dass die rhBMP-2-Moleküle erfolgreich in dem Hydrogel verankert werden konnten und dass PEG ein geeignetes Matrixsystem für die Knochenregeneration darstellt (Jung et al. 2007). Die Ergebnisse der Studien zur Biodegradation und Knochenneubildung unter Verwendung verschiedener PEG-Hydrogele basierten meist auf histomorphometrischen Analysen (Thoma et al. 2014).

## 1.7 Histomorphometrie

Der Begriff Histomorphometrie bezeichnet die quantitative Messung der Morphologie von histologischen Strukturen (Nafe und Schlote 2004). In der Knochenforschung stellt die Histomorphometrie das Standardverfahren zur Analyse der Knochenmikrostruktur im Rahmen von metabolischen Prozessen dar (Vidal et al. 2012). Bis zur Entwicklung spezieller Epoxidharze zur Einbettung von Knochengewebe im Jahre 1982 wurde Knochengewebe aufgrund des Härtegrades vor der histologischen Aufbereitung dekalzifiziert. Durch den Prozess der Demineralisation gingen jedoch wichtige Informationen des Hartgewebes verloren (Linder et al. 1981). Erst die Entwicklung der Trenn-Dünnschlifftechnik durch Donath und Breuner im Jahre 1982, welche sich mittlerweile als Standardverfahren in der histologischen Untersuchungsmethodik etabliert hat, machte die Untersuchung nicht dekalzifizierter Knochenpräparate möglich (Donath und Breuner 1982).

Bei der manuellen histomorphometrischen Analyse werden Gewebetypen vom Untersucher manuell markiert und ausgewertet. Unter Verwendung von Bildanalysesoftware ist heutzutage eine vollautomatische bzw. semi-automatische Auswertung von digitalisierten histologischen Präparaten möglich. Bei der histomorphometrischen Analyse können statische Verfahren sowie dynamische Verfahren angewendet werden. Bei der statischen Histomorphometrie werden Längen und Flächen von Gewebe gemessen sowie Zellarten identifiziert und gezählt. Bei dynamischen Verfahren werden zusätzlich metabolische Vorgänge evaluiert. Dies kann mit Hilfe bestimmter Fluorochrome, wie zum Beispiel Tetrazyklin, ermöglicht werden (Simunek et al. 2005).

## 1.8 Ziel der Studie

In einer Studie aus dem Jahre 2008 verwendeten Jung und Mitarbeiter PEG zusammen mit einem Granulat aus HA und  $\beta$ -TCP als Knochenersatzmaterial, um Titan-Zylinder auf der Kaninchen-Calvaria aufzufüllen (Jung et al. 2008). Bei jedem Versuchstier wurden vier Titanzylinder auf der Schädelkalotte aufgebracht. Drei der vier Zylinder enthielten PEG/HA/TCP-Knochenersatzmaterial, während ein Zylinder als Kontrolle leer blieb. Unter den PEG/HA/TCP-Zylindern wurden zwei verschiedene Konzentrationen des Wachstumsfaktors rhBMP-2 (10  $\mu\text{g/ml}$  und 30  $\mu\text{g/ml}$ ) mit dem PEG/HA/TCP-Trägermaterial ohne rhBMP-2 verglichen. In der histomorphometrischen Analyse stellten die Autoren fest, dass rhBMP-2 die Knochenregeneration im Kaninchenmodell signifikant steigerte.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Übertragung dieses Versuchs vom Kleintiermodell auf das Großtiermodell. Anstelle des granulären Knochenersatzmaterials wie von Jung beschrieben, wurde das Material in dieser Studie in Form von porösen HA/TCP-Blöcken mit den Maßen 20 x 8 x 8 Millimetern (Länge x Breite x Höhe) verwendet. Dieses blockförmige Material diente zur Auffüllung von ossären Defekten der Mandibula im Göttinger Minipig.

Überprüft wurde die Hypothese, dass die rhBMP-2-Freisetzung von einem PEG-haltigen Knochenersatzmaterial die Qualität und Quantität des neu gebildeten Knochens steigert. Hierzu wurde bereits etabliertes HA/TCP-Material als Grundgerüst mit und ohne Wachstumsfaktor mit dem PEG-modifizierten Grundgerüst mit und ohne Wachstumsfaktor verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in dieser Studie weibliche, skelettal ausgewachsene Göttinger Minischweine (Ellegard Goettingen Mini-pigs ApS, Dalmose, Dänemark) ausgewählt. Die Tiere hatten ein Durchschnittsalter von 2,3 Jahren sowie ein durchschnittliches Gewicht von 33,7 kg. Als Nahrung wurde eine kommerziell erhältliche Schweinediät (Hemo, Scheden, Deutschland) und unkontaminiertes Trinkwasser *ad libitum* herangezogen. Jedes Schwein erhielt eine Markierung mit einer Nummerierung im Ohr, um die Identifizierung zu ermöglichen. Die Untersuchungen wurden auf Basis des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Bezirksregierung Braunschweig als Tierversuchsvorhaben genehmigt (Bezirksregierung Braunschweig, AZ: 3314.42502-04-013/09).

Das Göttinger Minischwein wurde in den späten 1960er Jahren als Labortier für medizinische Fragestellungen von Prof. Fritz Haring am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen gezüchtet (McAnulty 2012). Es handelt sich dabei um eine Zuchtkreuzung aus dem Vietnamesischen Hängebauschwein (59%), dem Minnesota Miniature (33%) und der Deutschen Landrasse (8%) (Glodek et al. 1977). Durch die geringe Körpergröße sowie das geringe Körpergewicht von durchschnittlich 35 kg eignen sich diese Tiere gut für die experimentelle Haltung. Der Kauapparat dieser Rasse ähnelt in Funktion und Aufbau stark dem des Menschen. In einer Vielzahl von Studien zur Untersuchung rekonstruktiver chirurgischer Fragestellungen hat sich diese Spezies bereits als Modell etabliert (Elian et al. 2012, Rupprecht et al. 2003, Schliephake und Langner 1997, Terheyden et al. 1999). Auch zur Biokompatibilität von Knochenaufbau- und Knochenersatzmaterialien wurden bereits zahlreiche Studien am Göttinger Minipig durchgeführt (Buser et al. 1998, Gruber et al. 2009, Jensen et al. 2006, Oltramari et al. 2007, Pieri et al. 2008, Schliephake et al. 1995, Thoma et al. 2009).

### 2.1.1 Einteilung der Versuchstiere und Einteilung der Versuchsgruppen

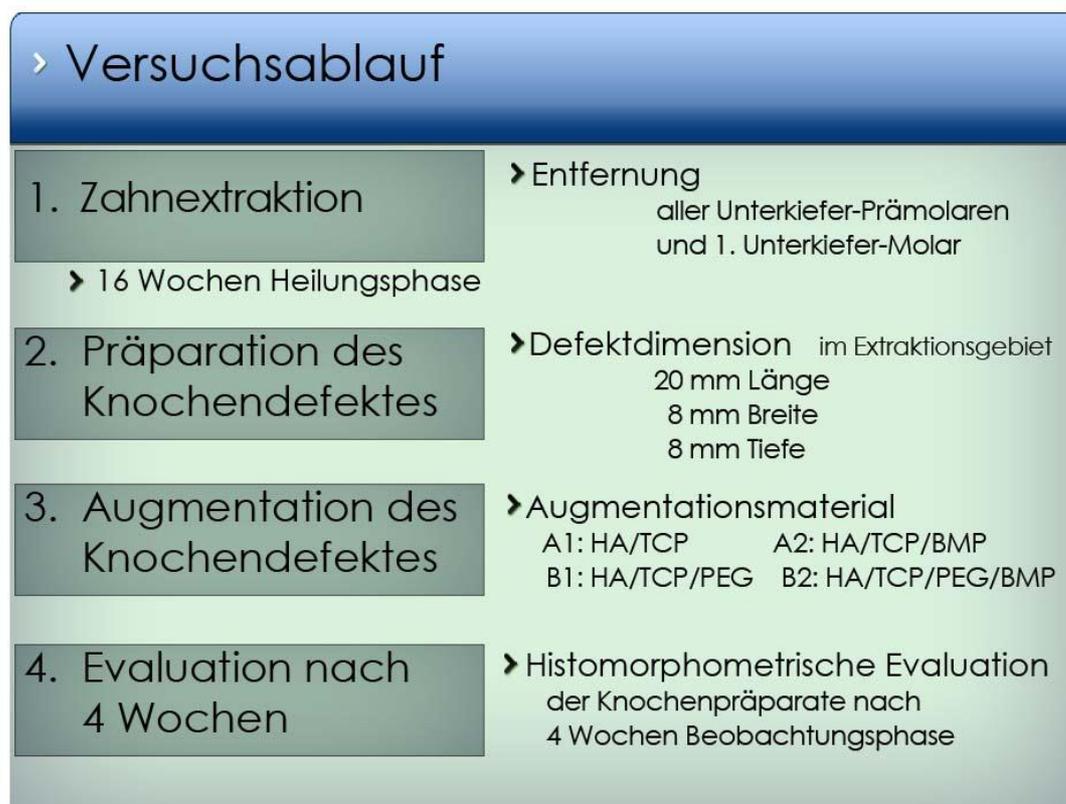
Die Versuchstiere wurden randomisiert in 2 Hauptgruppen mit jeweils 9 Minschweinen aufgeteilt (Gruppe A: Block-Gruppe = HA/TCP und Gruppe B: PEG-Gruppe = HA/TCP/PEG). Innerhalb einer Hauptgruppe wurde randomisiert auf der einen Unterkieferseite ein osteokonduktives Trägermaterial verwendet, während auf der Gegenseite das gleiche osteokonduktive Material mit einem osteoinduktiven Faktor zum Einsatz kam.

		Hauptgruppe A Material = HA / TCP	Hauptgruppe B Material = HA / TCP / PEG
		A1 <i>ohne rhBMP-2</i>	B1 <i>ohne rhBMP-2</i>
		Versuchstier & Unterkieferseite	Versuchstier & Unterkieferseite
osteokonduktiv		102 978 links	77 435 links
		103 072 links	77 641 links
		103 145 rechts	102 712 links *
		103 200 rechts	103 106 rechts *
		103 428 links	103 251 rechts *
		103 468 rechts	103 364 links *
		103 557 rechts	103 475 links
		103 640 links	103 697 links
		103 677 rechts	103 733 links
		A2 <i>mit rhBMP-2</i>	B2 <i>mit rhBMP-2</i>
		Versuchstier & Unterkieferseite	Versuchstier & Unterkieferseite
osteoinduktiv		102 978 rechts	77 435 rechts
		103 072 rechts	77 641 rechts
		103 145 links	102 712 rechts
		103 200 links	103 106 links *
		103 428 rechts	103 251 links
		103 468 links	103 364 rechts
		103 557 links	103 475 rechts
		103 640 rechts	103 697 rechts
		103 677 links	103 733 rechts *
		* Dropout: Aufgrund einer Kieferfraktur von der Auswertung ausgeschlossen	

**Tab. 1:** Randomisierte Zuteilung von Test- und Kontrollseite; Versuchstiere unter Angabe der Tiernummern zur Identifikation

Innerhalb eines Versuchstieres wurden somit die zwei unterschiedlichen Materialien unter gleichen Voraussetzungen im so genannten *split mouth design* miteinander verglichen. Zur Rekonstruktion des Unterkiefers wurde in der HA/TCP-Gruppe (Gruppe A) auf der randomisiert zugeteilten Testseite das blockförmige, osteokonduktive Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat-Trägermaterial mit dem osteoinduktiven Faktor rhBMP-2 in den Knochendefekt implantiert. Auf der entsprechenden Gegenseite wurde der Defekt mit dem gleichen Trägermaterial **ohne** rhBMP-2 augmentiert.

In der PEG-Gruppe (Gruppe B) wurde auf der Testseite ein osteokonduktiver Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat-Block mit einem PEG-Hydrogel und dem Wachstumsfaktor rhBMP-2 implantiert. Auf der Gegenseite wurde das gleiche Material der Testseite **ohne** rhBMP-2 zur Rekonstruktion des Knochendefektes verwendet.



**Tab. 2:** Übersicht über den Versuchsablauf

## 2.2 Augmentationsmaterialien

Der Knochendefekt wurde mit dem formkongruenten Material in Form eines porösen Quaders, Länge 20 mm, Breite 8 mm, Höhe 8 mm, augmentiert.

### 2.2.1 Hydroxylapatit/ Tricalciumphosphat

Das bei den Augmentationen verwendete synthetische Material bestand aus Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP) im Verhältnis 60:40 Prozent (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz). Der Porositätsgrad des Augmentationsmaterials betrug 90 – 94 %. Die interkonnektierenden Poren hatten einen Durchmesser zwischen 100 und 500 µm.

In Gruppe A wurde der Knochendefekt auf der randomisiert zugewiesenen Testseite (A1) mit HA / TCP-Material aufgefüllt. Auf der Gegenseite (A2) wurde das gleiche Augmentationsmaterial in Kombination mit dem Wachstumsfaktor rhBMP-2 zur Augmentation verwendet.

Bei Unterkieferdefekten der Gruppe A2 wurden 105 µg rekombinant hergestelltes humanes BMP-2 (rhBMP-2, Antigenix NY, USA, order No. HC70034) auf das Trägermaterial gegeben und somit durch Adsorption auf dem Trägermaterial oberflächlich fixiert.

### 2.2.2 Polyethylenglycol

In Gruppe B wurde ein PEG-Hydrogel zusätzlich zu dem HA / TCP-Grundgerüst verwendet. Dieses Hydrogel bestand aus vierarmigen PEG-Molekülen mit Acrylatgruppen sowie linearen PEG-Molekülen mit Propyl-Thiol-Gruppen (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz). Es diente auf der Testseite als Trägermatrix für 105 µg des rekombinanten, osteoinduktiven Wachstumsfaktors BMP-2 (rhBMP-2, Antigenix NY, USA, order No. HC70034). Auf der kontralateralen Kontrollseite wurde mit dem gleichen Material (HA/TCP/PEG) ohne den Wachstumsfaktor augmentiert.

Das PEG-basierte Hydrogel wurde durch die Firma Straumann (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) bereitgestellt. Das PEG-Hydrogel wurde in einer Reaktion von vierarmigen PEG-Moleküle mit Akrylatgruppen ( $M_n = 15$  kDa) und linearen PEG-Molekülen mit Propyl-Thiol-Gruppen ( $M_n = 3,5$  kDa) (Institut Straumann AG, Basel, Schweiz) hergestellt. Gepuffert wurde diese Reaktion mit Hilfe eines Triethanolamin-Acetoacetat-Puffer. 686 mg des vierarmigen PEG mit Akrylat-Gruppen (PEG A) wurden in 6,0 ml einer 0,04%igen wässrigen Essigsäure gelöst, und 356 mg des linearen PEG mit Propylthiol-Gruppen (PEG B) wurden in 6,33 ml einer 0,04%igen wässrigen Essigsäure gelöst. Als Aktivatorlösung wurde eine 0,1 M Triethanolaminlösung verwendet.

Für Gruppe B1 wurden 136,5  $\mu$ l PEG-A-Lösung, sowie 136,5  $\mu$ l PEG-B-Lösung mit 672  $\mu$ l sterilem Wasser und 105  $\mu$ l der Aktivatorlösung gemischt. Die Flüssigkeit wurde sofort auf den HA/TCP-Block gegeben, welcher die Flüssigkeit vollständig aufnahm.

Bei Gruppe B2 wurden 136,5  $\mu$ l PEG-A-Lösung, 136,5  $\mu$ l PEG-B-Lösung, 462  $\mu$ l steriles Wasser und 210  $\mu$ l rhBMP-2 (500  $\mu$ g/ml) gemischt und auf den HA/TCP-Block aufgebracht.

Alle Träger wurden in sterile 50 ml-Tubes mit 0,22  $\mu$ m TPFE-Filter, welche den Gasaustausch ermöglichen, überführt (TubeSpin Bioreactor 50, TPP, Trasadingen, Schweiz). Die Tubes wurden nun im Exsikkator schonend auf 5 mbar gebracht und 5 Stunden bei 37° C gelagert. Anschließend wurden die Tubes für weitere 15 Stunden bei 5 mbar und 25°C, dann für 3 Stunden im Vakuum (<0,1 mbar) bei 37° C aufbewahrt. Diese Prozedur diente der Entfernung von Wasser und sollte eine effiziente Vernetzung des Hydrogels ermöglichen. Direkt vor der Implantation wurde das Hydrogel mit sterilem Wasser erneut aktiviert.

## 2.3 Operation der Versuchstiere

Die Tiere wurden mit Azaperon (Stresnil®, Janssen; Neuss, Deutschland; Dosierung: 5 mg/kg KG i.m.) sediert. Zur Narkoseeinleitung erfolgte die intravenöse Applikation von Thiopental (Trapanal®, Byk-Gulden; Konstanz, Deutschland; Dosierung: 7 mg/kg KG i.v.) mit einem venösen Zugang (Braunüle®, Braun,

Melsungen, Deutschland) in die *Vena auricularis caudalis*. Die orotracheale Intubation wurde nach Einsetzen der Wirkung der initial genannten Medikamente durchgeführt. Die Inhalationsnarkose erfolgte mit Isofluran 2%. Zur Schmerzausschaltung wurde den Tieren Dipidolor (Janssen; Neuss, Deutschland; Dosierung: 110 µg/kg KG/h) und Ketamin (WDT; Garbsen, Deutschland; Dosierung: 2,5 mg/kg KG/h) intravenös verabreicht. Zur lokalen Anästhesie wurde Xylocain 2% mit gefäßverengendem Zusatz (Adrenalin 1:200.000) verwendet. Präoperativ wurde den Tieren Carprofen (Rimadyl® Pfizer, Deutschland; Dosierung: 5 mg/kg KG) intravenös und über 3 Tage postoperativ als Kautabletten verabreicht. Die perioperative antibiotische Abschirmung wurde durch Penicillin und Streptomycin (Animedica, Animedica; Senden-Boesensell, Deutschland; Dosierung: 40 mg Penicillin / 60 mg Streptomycin / kg KG/d) gewährleistet. Zur postoperativen Schmerzlinderung erfolgte die Gabe von Temgesic (Essex; München, Deutschland; Dosierung: 0,3 mg/d s.c.) über 3 Tage postoperativ.

### **2.3.1 Vorbereitende Zahnextraktion**

In einer vorbereitenden Zahnextraktion unter Narkose wurden bei den Versuchstieren alle Prämolaren und der erste Molar beider Unterkieferzahnreihen entfernt. Die Extraktionswunden wurden nach Glättung der Knochenkanten mit einer 3/0 Vicryl-Naht (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) primär speicheldicht verschlossen. Im Anschluss an die Zahnextraktion wurde eine Heilungsphase von 16 Wochen eingehalten, um eine vollständige Ausheilung der Extraktionsalveolen zu gewährleisten.

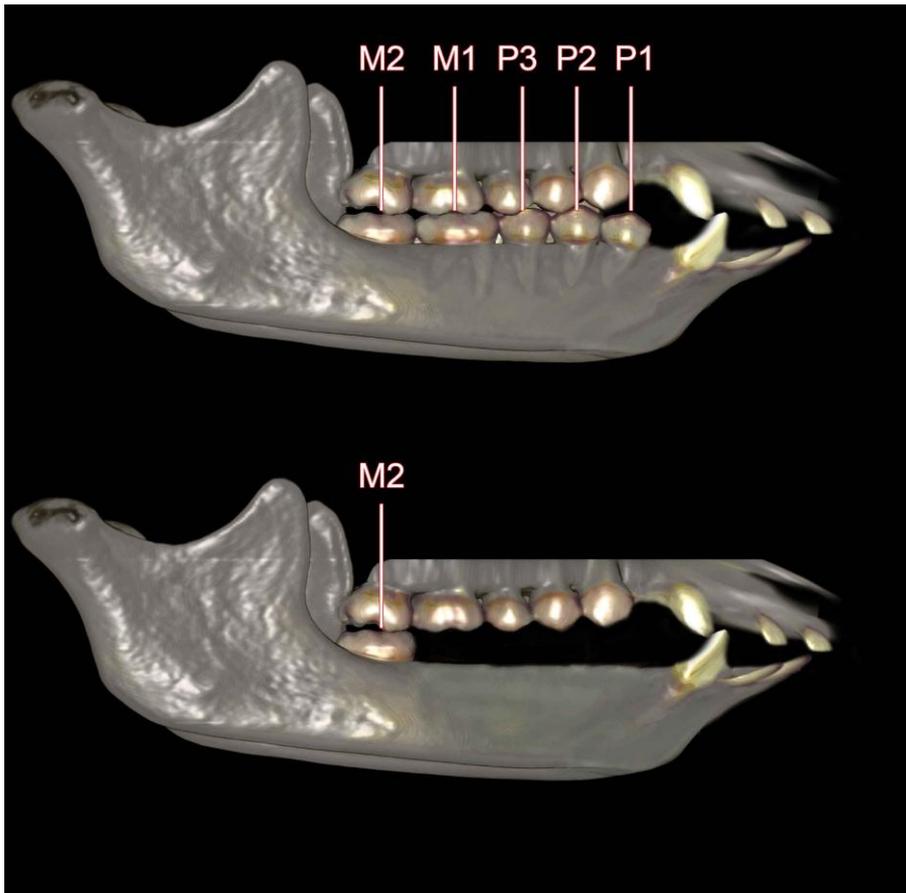


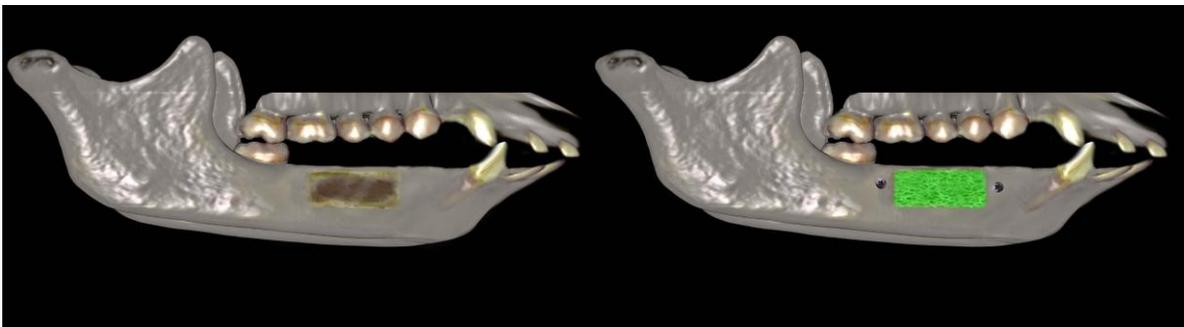
Abb. 1: Modell des Kauapparates (oben: Zustand vor Extraktion; unten: Zustand nach Extraktion)

### 2.3.2 Präparation des Knochendefektes und Augmentation

Nach der Zahnentfernung wurden nach vollständiger Ausheilung der Operationsregion die Knochendefekte mit definierter Größe präpariert und anschließend je nach Versuchsgruppe und Unterkieferseite mit dem vorgesehenen Knochenersatzmaterial sofort augmentiert. Die Einleitung der Intubationsnarkose wurde, wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde das Operationsgebiet intra- und extraoral desinfiziert (Braunol®; B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland). In der zahnlosen Region wurde vor dem letzten Molaren ein lingual gestielter trapezförmiger Mukoperiostlappen präpariert. Nun wurde bei den Tieren ein Knochendefekt von 20 x 8 x 8 mm mit einer Lindemannfräse und einem Rosenbohrer unter Wasserkühlung angelegt.

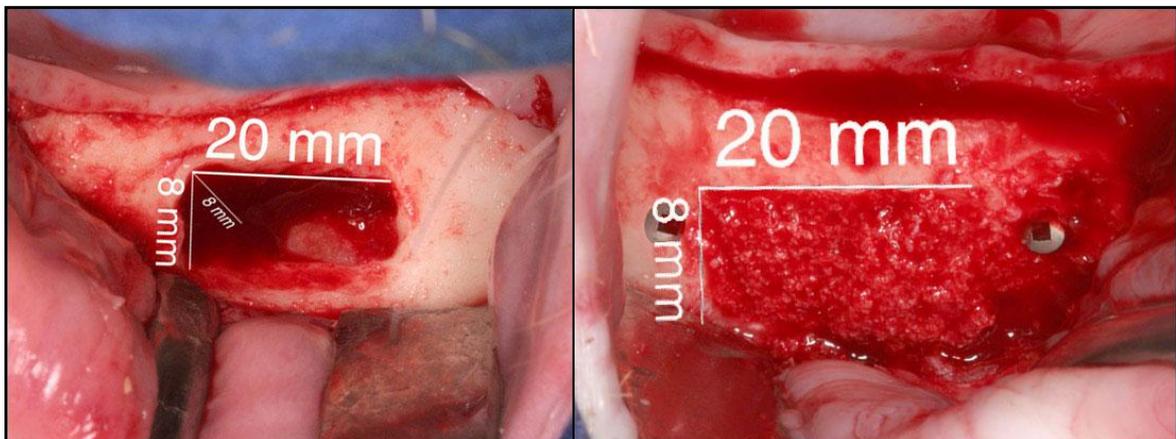


**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Knochendefektpräparation



**Abb. 3:** Unterkiefer nach Präparation des Knochendefektes      **Abb. 4:** Unterkiefer nach Augmentation

Anschließend wurde das jeweilige randomisiert zugewiesene Knochenersatzmaterial (siehe Abschnitt 2.2) in den zuvor angelegten Knochendefekt eingebracht. Einen Millimeter vor und hinter dem Augmentat wurde die Augmentatregion mit Hilfe von Mikro-Titanschrauben markiert. Abschließend wurde die Mukosa mit einer 3/0 Vicryl-Naht (Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) speicheldicht vernäht.



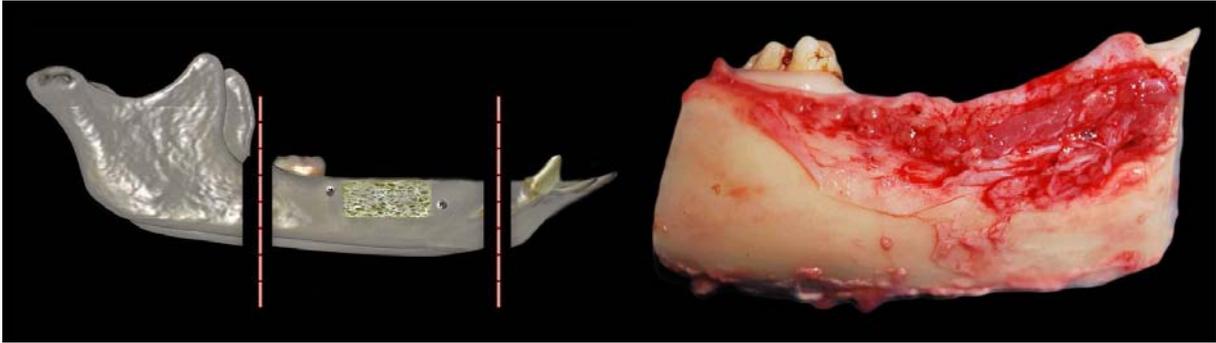
**Abb. 4:** Unterkieferdefekt in situ

**Abb. 5:** Aufgefüllter Unterkieferdefekt in situ

Innerhalb der ersten postoperativen Woche zeigten sich bei den Tieren Wundheilungsstörungen. Daraufhin wurde das Knochenersatzmaterial unverzüglich vollständig entfernt und eine erneute Heilungsphase von 16 Wochen eingehalten. 16 Wochen nach der Entfernung der Augmentate wurde erneut ein identischer Defekt mit den Maßen 20 x 8 x 8 mm (Länge x Breite x Tiefe) in der gleichen Region präpariert. Die Augmentation wurde dann mit den identischen Materialien wie bei der initialen Operation durchgeführt. Eine Beeinflussung der nachfolgenden Ergebnisse durch biologischen Effekt des BMP-2 des ersten Versuchs kann aufgrund der geringen Halbwertszeit des rhBMP-2 ( $t_{1/2} = 10$  min) nach der vorangegangenen Heilungsphase nahezu ausgeschlossen werden (Winn et al. 1999). Im Rahmen der zweiten Augmentation erfolgte die Präparation des Schleimhautlappens ohne posterioren Entlastungsschnitt. Ausgehend von der vestibulären Fläche des endständigen Molars erfolgte eine crestale Schnittführung nach anterior. Einige Millimeter vor dem verbliebenen Eckzahn wurde dann ein anteriorer Entlastungsschnitt in das Vestibulum durchgeführt. Im Anschluss daran wurde der Mukoperiostlappen präpariert. Das vestibuläre Weichgewebe wurde mit zwei tief eingestellten Haken nach Langenbeck abgehalten, um den Knochendefekt erneut präparieren zu können.

### **2.3.3 Euthanasie der Versuchstiere und Entnahme der Kiefersegmente**

Nachdem das Beobachtungs- und Heilungsintervall von vier Wochen abgelaufen war, wurden die Tiere durch Injektion von 6 ml T61 (1g Embutramid mit 0,25g Mebenzoniumjodid, Fa. Hoechst, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert. Durch den Veterinärmediziner wurde der Tod des jeweiligen Versuchstieres festgestellt. Im Anschluss an die Feststellung des Todes wurden die Kiefersegmente entnommen.

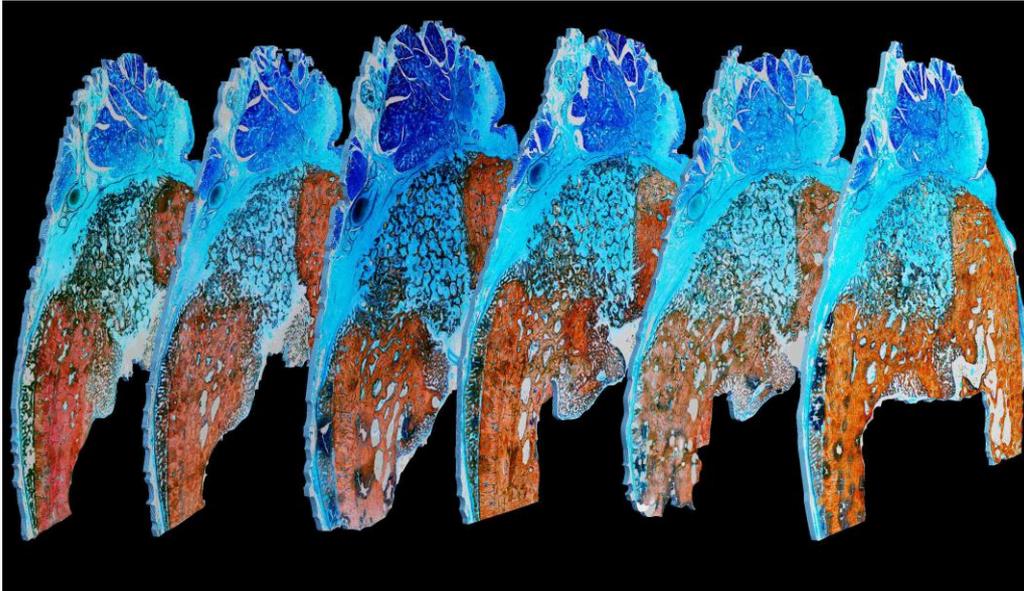


*Abb. 6: Schematische Darstellung der Kieferentnahme*

*Abb. 7: Darstellung des entnommenen Knochensegmentes*

## 2.4 Herstellung der Dünnschliff-Präparate

Die histologischen Schliffpräparate wurden nach der von Donath und Breuner im Jahre 1982 vorgestellten Trenn-Dünnschlifftechnik hergestellt (Donath und Breuner 1982). Nach Fixierung in 4-prozentigem, phosphatgepuffertem Formalin wurden die Knochensegmente mit Hilfe aufsteigender Alkoholreihen unter Vakuumumgebung dehydriert. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Proben in der Basislösung Technovit 9100 (Fa. Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland) für 48 Stunden. Abschließend wurden die Unterkieferresektate in der Polymerisationsflüssigkeit Technovit 9100 eingebettet und bei  $-4^{\circ}\text{C}$  polymerisiert. Mit einer Bandsäge (Fa. Exakt, Nordstedt, Deutschland) wurden die in Technovit eingebetteten Gewebeselemente durch ein diamantiertes Schleifband bis zu den Markierungsschrauben gekürzt. Nun wurden in der Frontalebene von anterior nach posterior Präparate mit einer Dicke von  $200\ \mu\text{m}$  hergestellt. Danach erfolgte das von Donath und Breuner beschriebene planparallele Schleifen der Präparate mit einem Mikroschleifsystem (Fa. Exakt, Nordstedt, Deutschland). Dabei wurden die auf dem Objektträger befindlichen Knochenpräparate mit einem rotierenden Schleifteller und Sandpapiertellern unter Wasserkühlung in aufsteigender Reihenfolge mit den Körnungen 800 und 1200 auf etwa  $40\ \mu\text{m}$  geschliffen. Mit der 4000er Körnung erfolgte die Politur der Präparate für 5 Minuten.



*Abb. 8: Darstellung der histologischen Präparate*

### **2.4.1 Histologische Färbung der Präparate**

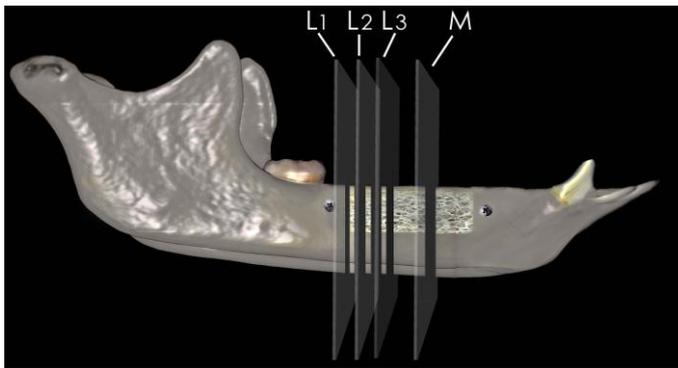
Nach der Politur wurden die Präparate unter Verwendung des Färbepinzips nach Smith und Karagianes (Smith und Karagianes 1974) angefärbt.

Zunächst wurden zwei Stammlösungen angesetzt. Die Methylenblaulösung setzte sich aus 0,5 g Methylenblau, 10 ml NaOH (1 N) und 100 ml destilliertem Wasser zusammen. Die Alizarinrot-Lösung bestand aus 1 g Alizarinrot, 10 ml 0,1-prozentigem Ammoniumhydroxid und 100 ml destilliertem Wasser. Die Alizarinrot-Färbelösung wurde mit Hilfe von Natronlauge bzw. Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,2 titriert.

Zunächst wurden die zu färbenden Präparate für 15 Sekunden in eine auf 80°C erhitzte Methylenblau-Lösung getaucht und anschließend unter fließendem Wasser gespült. Bei Raumtemperatur wurden die Präparate dann für etwa 3-4 Stunden getrocknet. Anschließend wurden sie für 2 Minuten in die Alizarinrot-Lösung getaucht, mit Leitungswasser gespült und erneut bei Raumtemperatur getrocknet.

## 2.4.2 Präparatauswahl

Ein Ziel der vorliegenden histomorphometrischen Untersuchung war es, die Knochenneubildung in der gesamten Augmentatregion zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden für jede Unterkieferseite jeweils drei Präparate (L1, L2, L3) aus der posterioren Augmentatregion mit einem maximalen Abstand von 1 mm zur posterioren Wand des Knochendefekts und ein Präparat aus der Mitte des Augmentats (M1) ausgewertet. Die Messwerte wurden innerhalb einer Augmentationsgruppe zu Mittelwerten zusammengefasst. Ergebnisse der posterioren und der medialen Präparate wurde unabhängig voneinander bewertet.



**Abb. 9:** Darstellung der analysierten Präparate (L=lateral; M=medial); L1-L3 Abstand < 1mm von der posterioren Wand des Knochendefekts

## 2.4.3 Digitalisierung der Präparate

Zur Digitalisierung wurden die ausgewählten Präparate zunächst mit dem Olympus Dotslide Mikroskopsystem (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit 100-facher Vergrößerung fotografiert. Dieses computerunterstützte Mikroskop ist mit einer Digitalkamera ausgestattet und verfügt über einen vollautomatisierten Objektträgerstisch. Der Aufnahmevorgang wurde durch die Dotslide-Software (Olympus, Hamburg, Deutschland) gesteuert. Die erstellten Digitalfotos wurden im *Tagged Image File Format* (TIFF) ohne Komprimierung exportiert und gespeichert.

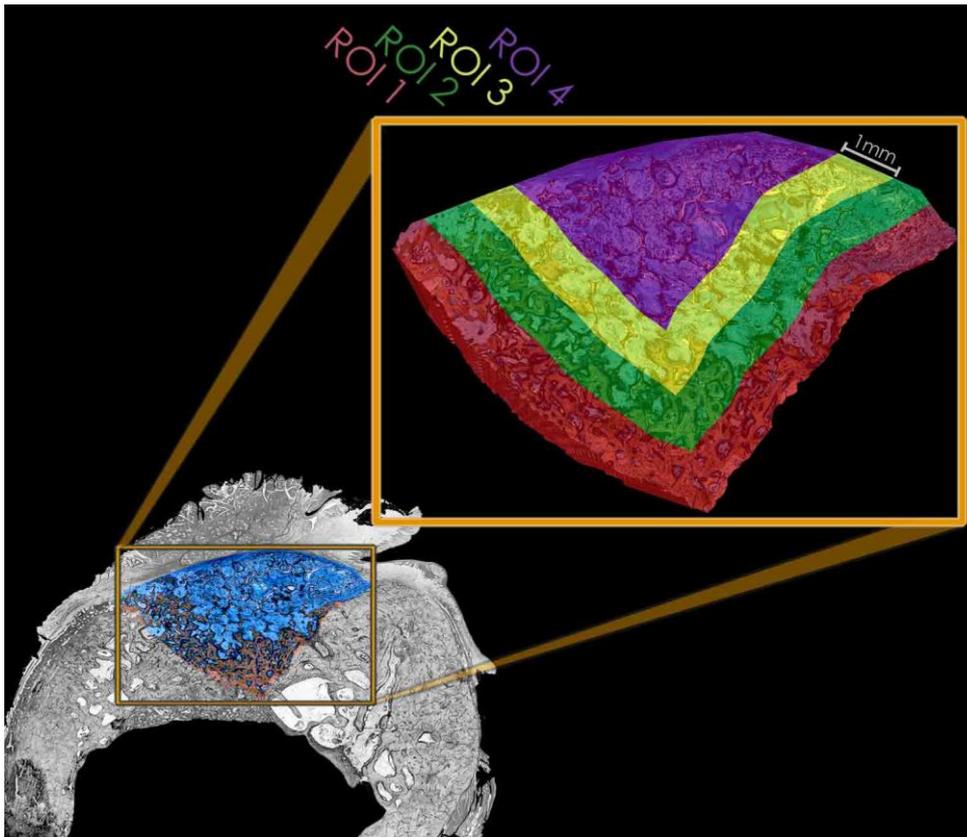
## 2.5 Histomorphometrische Knochenmessung

Ziel der vorliegenden Studie war es die Knochenneubildung unter der Wirkung eines osteoinduktiven Wachstumsfaktors unter Verwendung verschiedener Trägermaterialien zu evaluieren.

Bei jedem digitalisierten Präparat wurden *regions of interest* (ROI) definiert, um den Gradienten der Knochenneubildung in Abhängigkeit von der Distanz zum ortsständigen Knochen wiederzugeben. Innerhalb der Augmentatregion wurden 4 ROI festgelegt. ROI 1, ROI 2 und ROI 3 hatten eine Breite von einem Millimeter. ROI 4 war die Region, die mehr als drei Millimeter vom ortsständigen Knochen entfernt war.

› Regions of interest (ROI)	
ROI 1	› Region des Augmentats basal an Knochenlager angrenzend
ROI 2	› An ROI 1 angrenzend ≥ 1 Millimeter Distanz zum Knochenlager
ROI 3	› An ROI 2 angrenzend ≥ 2 Millimeter Distanz zum Knochenlager
ROI 4	› An ROI 3 angrenzend ≥ 3 Millimeter Distanz zum Knochenlager

**Tab. 3:** Erläuterungen zur Einteilung der *regions of interest*



**Abb. 10:** Darstellung der regions of interest

Innerhalb jeder ROI wurde der gesamte Knochen histomorphometrisch mit Hilfe der Bildanalysesoftware AxioVision (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert. Zu Beginn jeder Messung wurde die Gesamtpixelfläche der ROI gemessen. Dann wurde die Knochenfläche anhand der Oberflächenfärbung gemessen. Die Knochendichte einer ROI wurde als Quotient aus Knochenfläche und Gesamtfläche berechnet und in Prozent angegeben. Aus den erhobenen Werten wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung für jede der vier Gruppen mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) berechnet.

Weil sich Keramikfragmente des Knochenersatzmaterials und Knochengewebe nach Oberflächenfärbung histologisch sehr ähnlich dargestellt hatten, wurden die Keramikfragmente manuell umzeichnet und aus der Messung ausgeschlossen.



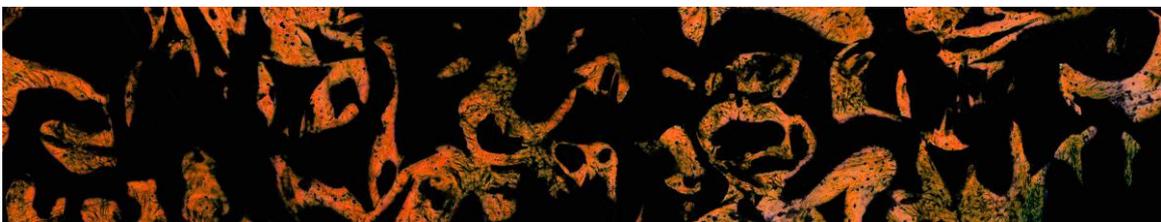
**Abb. 11:** Ausschnitt aus einem histologischen Präparat



**Abb. 12:** Keramikfragmente (rot) innerhalb desselben Präparates



**Abb. 13:** Keramikfragmente (rot), Knochengewebe (grün) innerhalb desselben Präparates



**Abb. 14:** Darstellung des Knochens nach Ausblendung von Keramik, und Geweben, welche nicht in die Messung einbezogen wurden

Zur exakten Flächenmessung wurden die digitalen Bilder mit Hilfe eines Mikroskopie-Maßstabs kalibriert. Dieser Maßstab wurde mit der gleichen Vergrößerung unter gleichen Gegebenheiten wie die histologischen Präparate eingescannt. Anhand der Skalierung des Maßstabs konnte die Umrechnung der Pixelflächen in Quadratmillimeter durchgeführt werden.

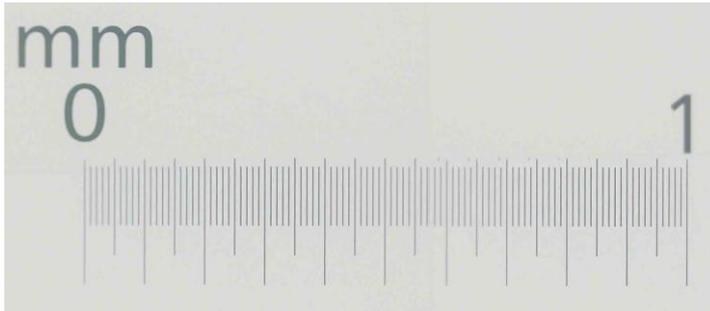


Abb. 15: Darstellung des histologischen Maßstabs

## 2.6 Statistische Auswertung

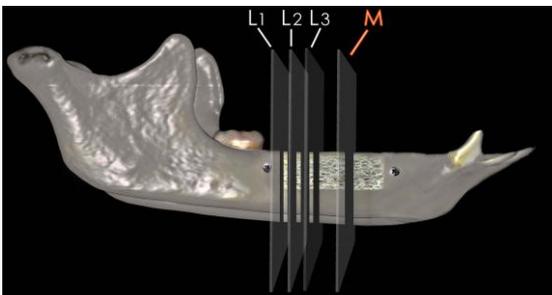
Da die erhobenen Daten nicht parametrisch verteilt waren, wurde die statistische Auswertung von Frau Dr. Katharina Kramer aus dem Institut für Medizinische Statistik mit Hilfe eines nichtparametrischen Verfahrens, wie von Brunner und Langer 1999 beschrieben (Brunner und Langer 1999), durchgeführt. Um den Einfluss von rhBMP-2 in Abhängigkeit von dem verwendeten Trägermaterial (Gruppe 1: HA/TCP, Gruppe 2: HA/TCP/PEG) auf die Knochendichte festzustellen, wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse (ANOVA = *analysis of variance*) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine mögliche Interaktion zwischen dem Trägermaterial und der rhBMP-2-Applikation überprüft. Die histomorphometrisch erhobenen Daten wurden mit den Makros F1\_LD\_F2 und F1\_LD\_F1 in der Statistik Software SAS (SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) untersucht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Auswertung

Nach der Extraktion aller Prämolaren und des ersten Molars erfolgte die Heilung der Extraktionswunden ohne Zwischenfälle. 16 Wochen nach der Extraktion wurde die Augmentation, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach der zweiten Augmentation, die mit einem geänderten Lappendesign durchgeführt wurde, zeigte sich postoperativ eine kurz anhaltende, lokale Schwellung. Allerdings traten im zweiten Versuchsablauf keine Wunddehiszenzen mehr auf.

### 3.2 Lichtmikroskopische Evaluation der Augmentatregionen



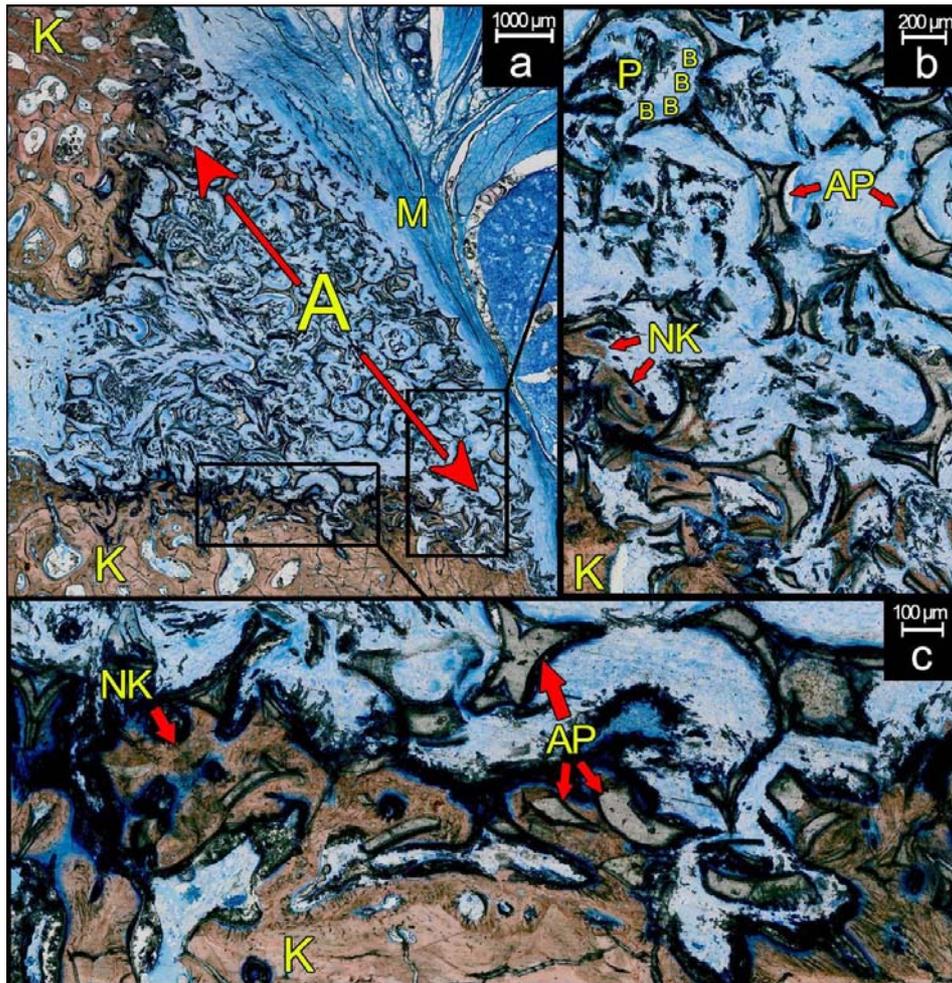
*Abb. 16: Darstellung der analysierten Präparate ( L=lateral; M=mediale Augmentatregion)*

Zunächst wurden die histologischen Ergebnisse der medialen Dünnschliffe („M“ auf Abb. 16) evaluiert. Jeweils ein histologisches Präparat wird im Folgenden stellvertretend für eine Augmentationsgruppe beschrieben. In keiner der verschiedenen Gruppen wurden Anzeichen für Entzündungsreaktionen festgestellt.

### **3.2.1 Lichtmikroskopische Evaluation der medialen rein osteokonduktiven Materialien (Augmentationsgruppen A1, B1)**

Bei den Augmentationsgruppen A1 und B1 handelte es sich um rein osteokonduktive Augmentationsmaterialien, da keine Wachstumsfaktoren in diesen Gruppen zugesetzt wurden.

Abb. 17 zeigt ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe A1 (HA/TCP). In (a) ist die gesamte Region des augmentierten Unterkiefers dargestellt, während es sich bei (b) und (c) um Ausschnitte aus (a) handelt. Als dunkelblaue äußere Begrenzungslinie ist das Epithel der Alveolarkamm-Mukosa (M) zu erkennen. Unterhalb der Mukosa liegt der L-förmige, augmentierte Defektbereich (A). Die Augmentatregion ist von natürlichem Alveolarknochen (K) eingerahmt. Innerhalb des Defektbereichs stellen sich zahlreiche lichtundurchlässige, dunkle Augmentatpartikel (AP) dar. Die Poren (P) des unvollständig resorbierten Knochenersatzmaterials sind mit hellblau angefärbtem Bindegewebe (B) ausgekleidet. Der Übergang vom Augmentat zum ortständigen Knochen ist durch dunkelbraunen, neu gebildeten Knochen konturiert, welcher sich durch seine etwas dunklere Färbung vom ortständigen Knochen unterscheiden lässt. Vom lateralen Rand der Augmentatregion nimmt der neu gebildete Knochen zum Zentrum des Augmentats ab. Die histologischen Präparate dieser Gruppe zeigen eine nur spärliche Resorption des Trägermaterials über alle Untersuchungs-zonen. Die Poren des augmentierten Materials sind noch deutlich zu erkennen und nicht bzw. in geringem Maße knöchern ausgekleidet. Einige der Präparate weisen im Bereich des ortständigen Knochens (ROI 1) einen schmalen knöchernen Saum auf, welcher auf die osteokonduktiven Eigenschaften des Materials hindeuten. In den Zonen direkt unterhalb der Mukosa (ROI 3, ROI 4) konnte keine Knochenneubildung nachgewiesen werden.



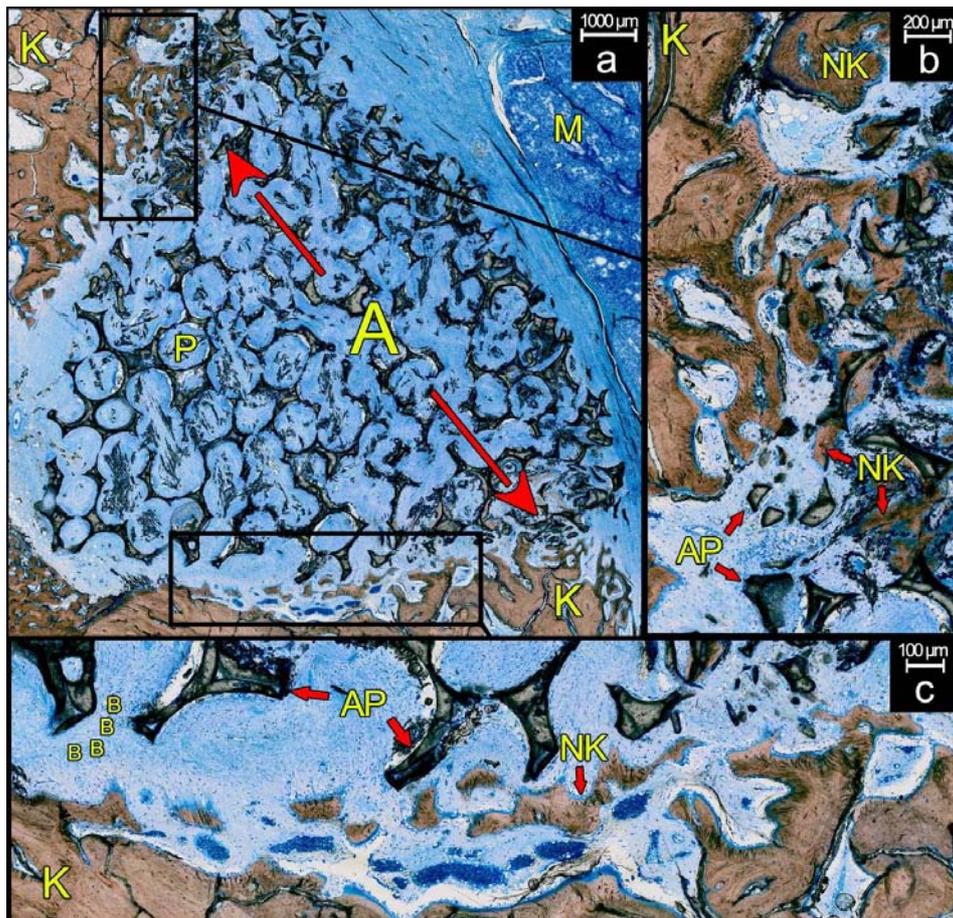
**Abb. 17:** Histologisches Präparat (Schwein 103 145 rechte UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe A1 (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40%); nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

In Abb. 18 ist ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe B1 (HA/TCP/PEG) dargestellt. Die mikroskopische Betrachtung zeigt einen geringen Resorptionsgrad des Knochenersatzmaterials (A). Die Poren (P) des Materials sind überwiegend als kreisförmige Gebilde zu erkennen. Innerhalb der Poren

stellt sich reichlich Bindegewebe (B) dar. Am Übergang vom ortsständigen Knochen (K) zum Augmentat (A) liegt eine dünne Knochenregenerationsfront (NK). Abgesehen von diesem schmalen Saum aus unreifem, trabekulärem Knochen überwiegt die bindegewebige Auskleidung des Augmentats. Reifer, neu gebildeter Knochen kann nicht gefunden werden.



**Abb. 18:** Histologisches Präparat (Minipig 103 697 linke UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe **B1** (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit PEG); nach **4 Wochen** Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

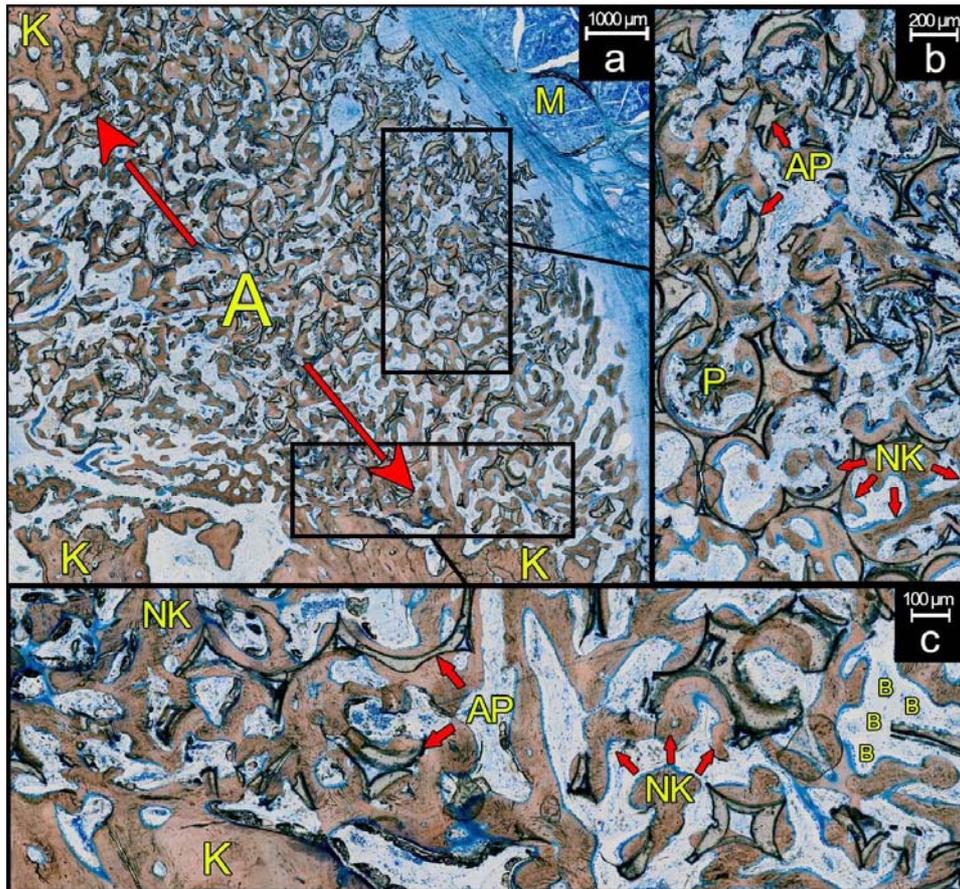
- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

Zusammenfassend lässt sich über die osteokonduktiven Augmentationsgruppen (A1 und B1) sagen, dass neu gebildeter Knochen nur in direkter Nähe zum ortsständigen Knochen gefunden werden kann. Das Knochenersatzmaterial ist noch deutlich zu erkennen, und die Porenstruktur des augmentierten Materials ist nahezu ausschließlich mit Bindegewebe ausgekleidet.

### **3.2.2 Lichtmikroskopische Evaluation der medialen kombiniert osteokonduktiven / osteoinduktiven Materialien (Augmentationsgruppen A2, B2)**

Bei den Augmentationsgruppen A2 und B2 kam das gleiche osteokonduktive Knochenersatzmaterial wie bei den Augmentationsgruppen A1 bzw. B1 als Trägermaterial für den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor BMP-2 zum Einsatz. Durch die biologisch wirksamen BMP-Moleküle handelte es sich hierbei um kombiniert osteokonduktives / osteoinduktives Augmentationsmaterial.

Bereits die Übersichtsaufnahme in Abb. 19 der Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/BMP) zeigt eine Vielzahl von neu gebildeten Knocheninseln (NK) über das gesamte Augmentationsvolumen (A). Die Resorption des Knochenersatzmaterials ist auch hier noch nicht abgeschlossen, die Poren (P) des Materials sind jedoch überwiegend knöchern ausgekleidet. Nicht resorbierte Anteile des Knochenersatzmaterials (AP) sind in den neu gebildeten Knochen (NK) integriert und gut zu erkennen. Neuer Knochen kann sowohl im Zentrum des Augmentats (A) als auch direkt unter der Mukosa (M) nachgewiesen werden.



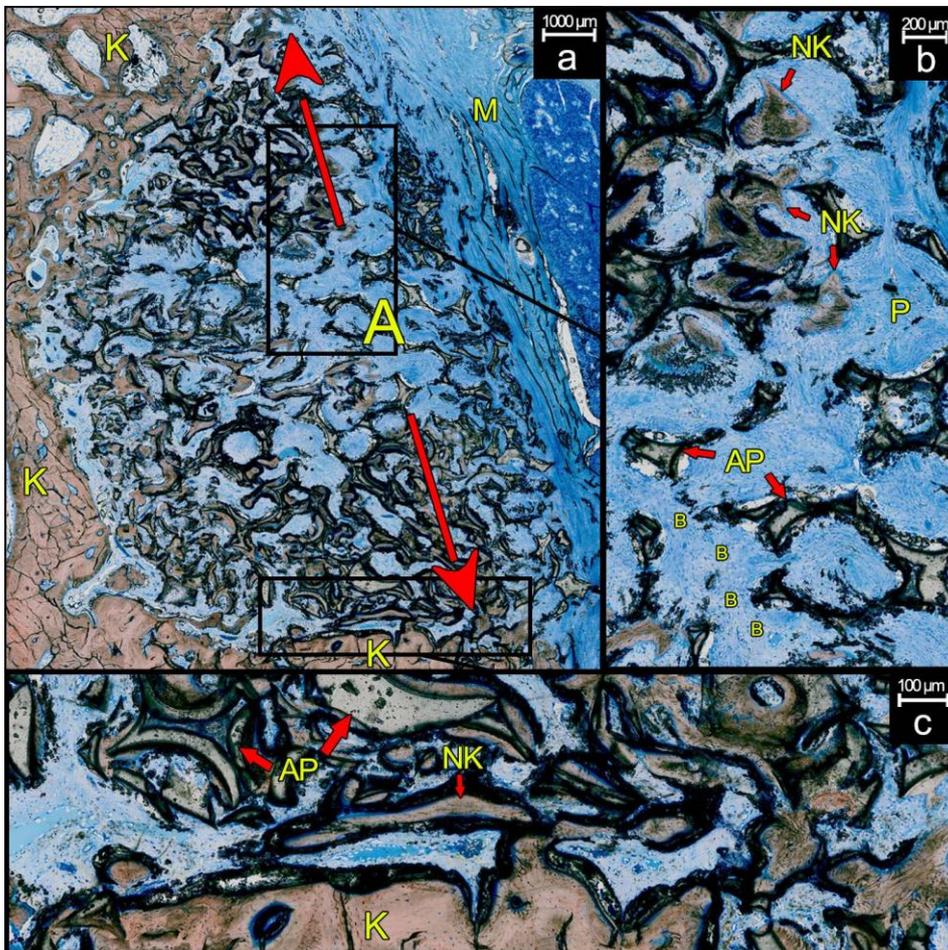
**Abb. 19:** Histologisches Präparat (Schwein 103 145 linke UK-Seite); osteoinduktive Augmentationsgruppe A2 (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit 105 µg rhBMP-2); nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

Abb. 20 zeigt ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG/BMP). Neu gebildete Knochenbälkchen (NK) lassen sich im Wesentlichen im Grenzbereich zum ortsständigen Knochen (K) erkennen. Im Zentrum des Augmentats (A) ist die Knochensynthese weniger stark ausgeprägt. Der Gradient der Knochenneubildung sinkt von der peripheren Augmentatgrenze nach zentral sehr stark ab. In der zentralen sowie der submukösen Region des

Augmentats überwiegt lockeres Bindegewebe (B). Das augmentierte Material (AP) ist in nur sehr geringem Ausmaß resorbiert, Poren (P) lassen sich noch sehr gut ausmachen.



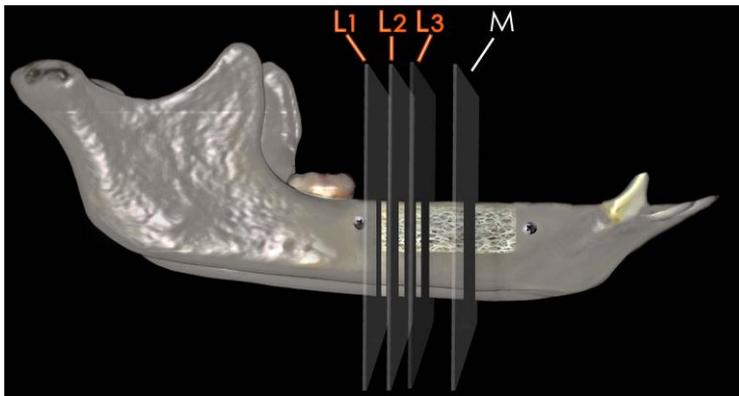
**Abb. 20:** Histologisches Präparat (Minipig 103 697 rechte UK-Seite); osteoinduktive Augmentationsgruppe **B2** (Material: **HA/TCP** im Verhältnis 60%:40% mit **PEG** und  $105 \mu\text{g}$  **rhBMP-2**); nach **4 Wochen** Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

Die Augmentationsgruppen A2 und B2 (mit rhBMP-2) zeigen im Vergleich zu den Augmentationsgruppen A1 und B1 (ohne rh-BMP-2) deutlich mehr neu gebildeten Knochen. Bei den kombiniert osteokonduktiven / osteoinduktiven Materialien können neu gebildete Knochenbälkchen deutlich weiter zentral innerhalb des Augmentats ausgemacht werden als bei den rein osteokonduktiven Knochenersatzstoffen. Bei vergleichender Betrachtung der Präparate der Augmentationsgruppen A2 (HA/TCP/rhBMP-2) und B2 (HA/TCP/PEG/rhBMP-2) fällt auf, dass die Porenstruktur bei Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/rhBMP-2) hauptsächlich knöchern gefüllt ist, während zentrale Poren der Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG/rhBMP-2) vermehrt bindegewebig ausgekleidet sind.

### 3.2.3 Lichtmikroskopische Evaluation der lateralen Augmentatregion

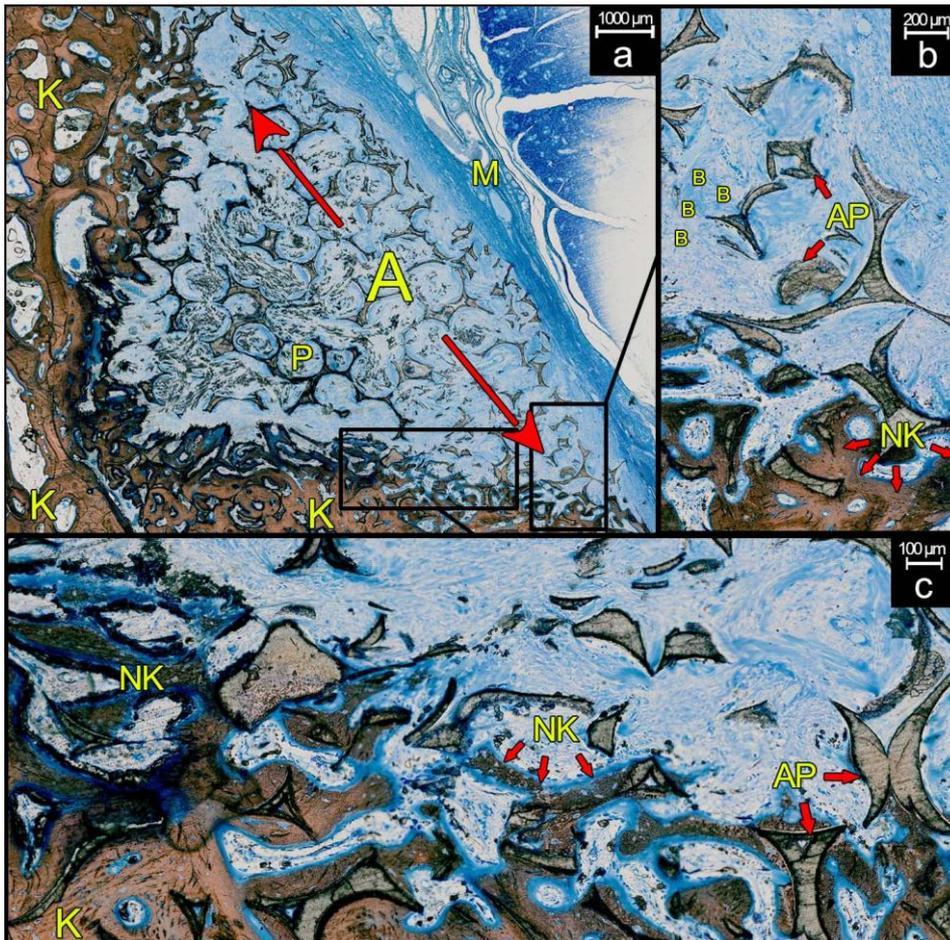


**Abb. 21:** Darstellung der analysierten Präparate (L=lateral; M=medial)

Von den histologischen Dünnschliffen der lateralen Augmentatregion wurden aus jeder Versuchsgruppe die drei dorsalen Präparate (L1, L2, L3) für die histologische Evaluation ausgewählt. Wie bereits oben beschrieben, handelte es sich bei den Augmentationsgruppen A1 und B1 um rein osteokonduktives Augmentationsmaterial, bei den Augmentationsgruppen A2 und B2 wurde zusätzlich rhBMP-2 appliziert. Da sich die ausgewählten Präparate in Bezug auf die Knochenhistologie nur marginal unterscheiden, wird im Folgenden jeweils ein Präparat stellvertretend für die gesamte Gruppe erläutert.

Auch bei den lateralen Präparaten wurden in den verschiedenen Augmentationsgruppen weder bei den osteokonduktiven noch bei den osteoinduktiven Knochenersatzmaterialien Anzeichen für Entzündungsreaktionen festgestellt. Bei lichtmikroskopischer Inspektion wurde deutlich, dass sich die Knochenregeneration in der lateralen Region des Augmentats analog zur Regeneration in der medialen Region (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) verhielt.

Abb. 22 zeigt ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe A1 (HA/TCP). Das Epithel der Alveolarkamm-Mukosa (M) ist hier als dunkelblaue äußere Begrenzungslinie zu erkennen. Darunter liegt der L-förmige Knochendefektbereich mit dem Augmentationsmaterial (A), eingerahmt vom natürlichen Alveolarknochen (K) des Defektlagers. Innerhalb des Augmentats stellen sich zahlreiche lichtundurchlässige, dunkle Augmentatpartikel (AP) des unvollständig resorbierten Knochenersatzmaterials dar. Die Poren (P) sind mit hellblau angefärbtem Bindegewebe (B) ausgekleidet, der Übergang vom Augmentat zum ortständigen Knochen ist durch dunkelbraunen, neu gebildeten Knochen konturiert. Vom lateralen Rand der Augmentatregion nimmt der neu gebildete Knochen zum Zentrum des Augmentats hin ab. Die histologischen Präparate dieser Gruppe zeigen eine nur spärliche Resorption des Trägermaterials über alle Untersuchungszone. Die Poren des augmentierten Materials sind noch deutlich zu erkennen und nicht bzw. in geringem Maße knöchern ausgekleidet. Einige der Präparate weisen im Bereich des ortständigen Knochens (ROI 1) einen schmalen knöchernen Saum auf, welcher auf die osteokonduktiven Eigenschaften des Materials hindeutet. In den Zonen direkt unterhalb der Mukosa (ROI 3, ROI 4) konnte keine Knochenneubildung nachgewiesen werden.



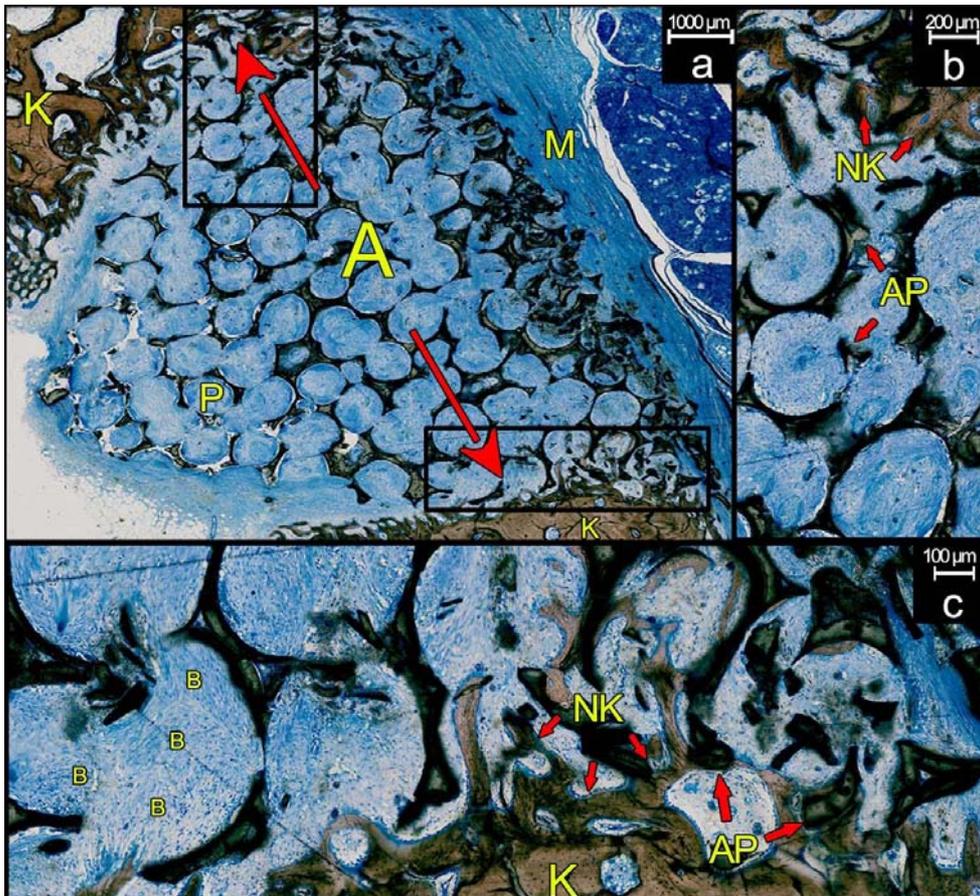
**Abb. 22:** Histologisches Präparat (Schwein 103 145 rechte UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe A1 (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40%); nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

In Abb. 23 ist ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe B1 (HA/TCP/PEG) dargestellt. Unter mikroskopischer Inspektion des Präparates stellt sich, ähnlich wie in Abb. 22, ein geringer Resorptionsgrad des Knochenersatzmaterials dar. Die Poren (P) des Materials sind überwiegend als kreisförmige Gebilde zu erkennen, welche mit reichlich Bindegewebe (B) ausgekleidet

sind. Am Übergang vom L-förmigen Augmentat (A) zum ortständigen Knochen (K) liegt eine dünne Knochenregenerationsfront (NK) aus unreifem, trabekulärem Knochen. Insgesamt überwiegt die bindegewebige Auskleidung des Augmentats. Reifer Knochen kann nicht gefunden werden.

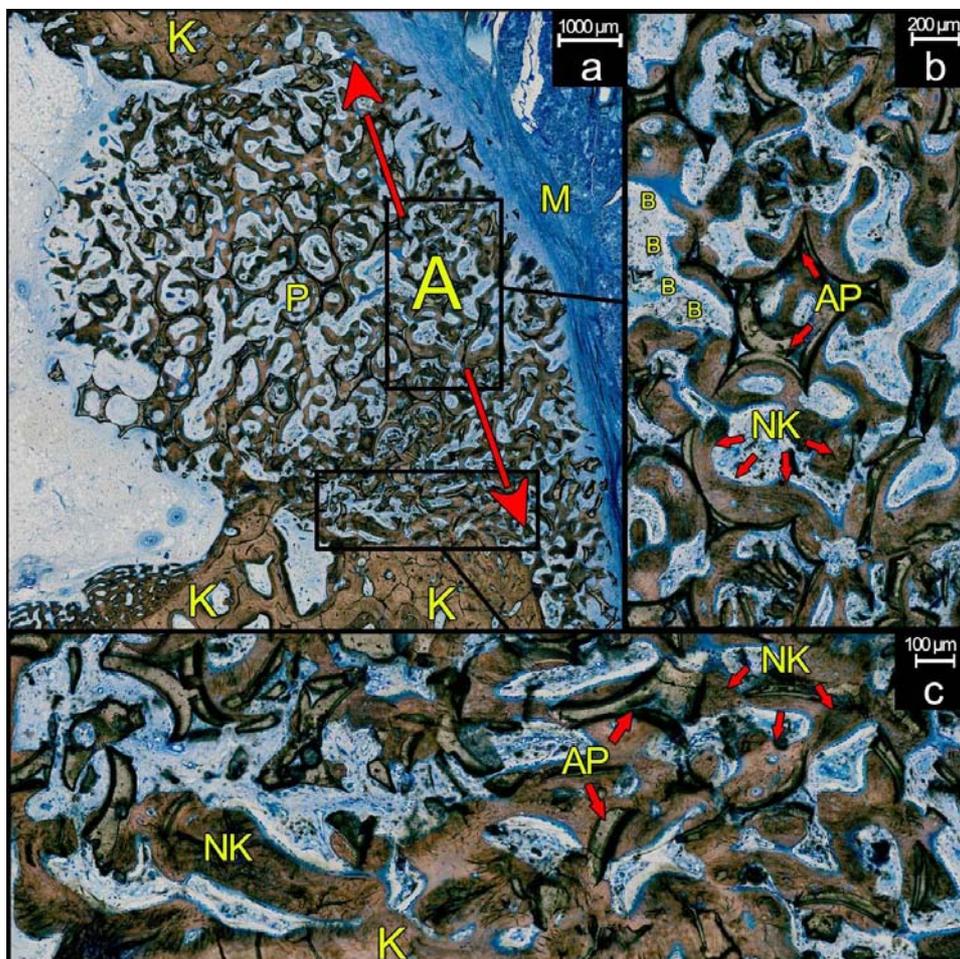


**Abb. 23:** Histologisches Präparat (Minipig 103 697 linke UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe **B1** (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit PEG); nach **4 Wochen** Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

Die Übersichtsaufnahme in Abb. 24 der Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/BMP) zeigt eine überwiegend knöcherne Auskleidung der Augmentatporen (P). Eine Vielzahl von neu gebildeten Knocheninseln (NK) lässt sich über das gesamte Augmentationsvolumen (A) erkennen, während innerhalb der Poren (P) deutlich weniger Bindegewebe (B) vorliegt als bei den übrigen Augmentationsgruppen. Die Resorption des Knochenersatzmaterials (AP) ist auch hier noch nicht abgeschlossen, die Partikel des Knochenersatzmaterials (AP) sind jedoch in den neu gebildeten Knochen (NK) integriert. Neuer Knochen (NK) kann sowohl im Zentrum des Augmentats als auch direkt unter der Mukosa (M) nachgewiesen werden.

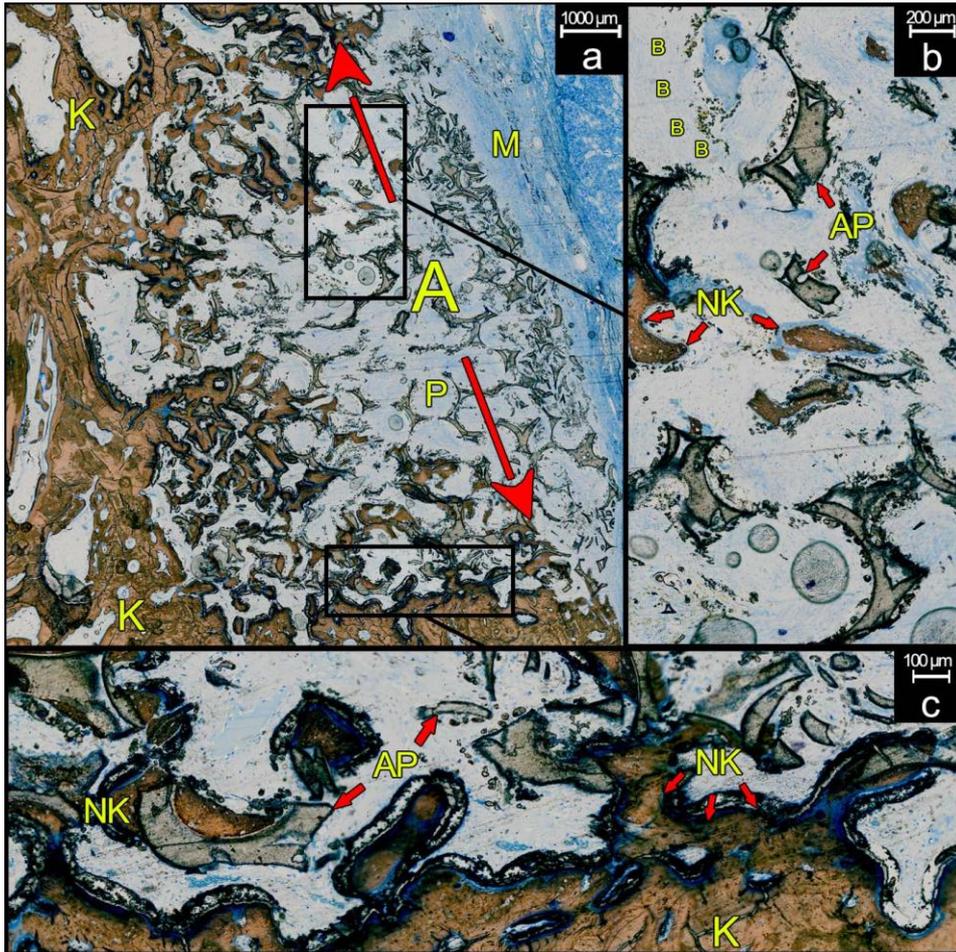


**Abb. 24:** Histologisches Präparat (Schwein 103 145 linke UK-Seite); osteoinduktive Augmentationsgruppe A2 (Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit 105 µg rhBMP-2); nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

Abb. 25 zeigt ein histologisches Präparat der Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG/BMP). Neu gebildete Knochenbälkchen (NK) lassen sich im Wesentlichen im Grenzbereich zum ortsständigen Knochen (K) erkennen. Der Gradient der Knochenneubildung sinkt von der äußeren, peripheren Augmentatgrenze nach zentral sehr stark ab. Im Zentrum des Augmentats (A) und in der submukösen Region ist die Knochensynthese weniger stark ausgeprägt. Hier überwiegt lockeres Bindegewebe (B). Das augmentierte Material (AP) ist in nur sehr geringem Ausmaß resorbiert, Poren (P) lassen sich noch sehr gut ausmachen.



**Abb. 25:** Histologisches Präparat (Minipig 103 697 rechte UK-Seite); osteoinduktive Augmentationsgruppe **B2** (Material: **HA/TCP** im Verhältnis 60%:40% mit **PEG** und 105 µg **rhBMP-2**); nach **4 Wochen** Beobachtungszeitraum; Vergrößerung: a = 10x, b = 40x, c = 80x

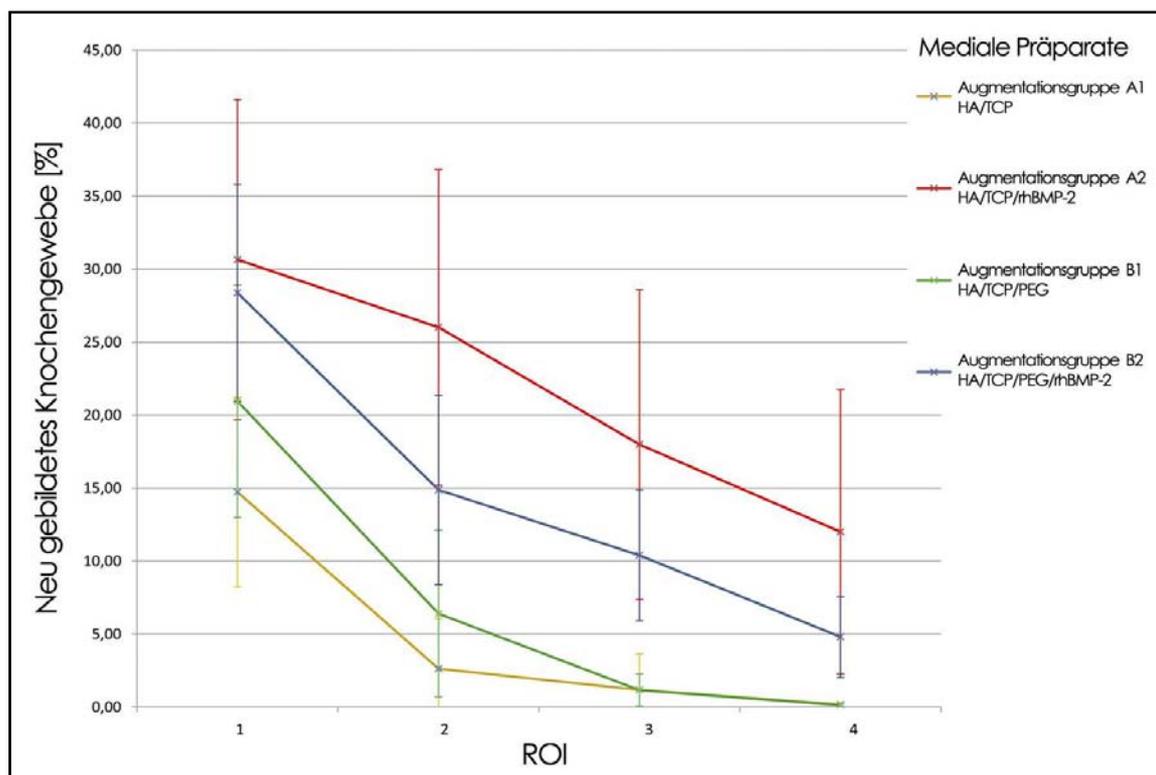
Legende:

- (A) Defektbereich
- (AP) Augmentatpartikel
- (B) Bindegewebe
- (K) ortsständiger Knochen
- (M) Mukosa
- (NK) neu gebildeter Knochen
- (P) Poren

### 3.3 Histomorphometrische Evaluation

Die Bewertung erfolgte nach vierwöchigem Beobachtungszeitraum und wurde für jede *region of interest* (ROI) separat durchgeführt. Dadurch konnte der Gradient der Knochenneubildung über die gesamte Augmentatregion analysiert werden. Für die statistische Analyse wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus der prozentualen Knochenneubildung für jede der vier Gruppen separat berechnet.

#### 3.3.1 Histomorphometrische Evaluation der medialen Augmentatregion



**Diagramm 1:** Prozentuale Knochenneubildung nach 4 Wochen; mediale Augmentatregion; HA/TCP (gelb); HA/TCP/BMP (rot); HA/TCP/PEG (grün); HA/TCP/PEG/BMP (blau)

Das in Diagramm 1 dargestellte Liniendiagramm gibt Auskunft über die histomorphometrisch ermittelte Knochenmenge in der zentralen Augmentatregion

nach vier Wochen Einheilungszeit. Auf der y-Achse ist der jeweilige Mittelwert der Knochenmenge einer Augmentationsgruppe in Prozent aufgetragen, während auf der x-Achse die jeweilige beobachtete ROI zugeordnet ist. Die vertikalen Linien zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte für jede beobachtete ROI.

Das rote Liniendiagramm stellt die Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/BMP) dar. Hier sind die höchsten Mittelwerte über alle untersuchten ROI zu beobachten. Gleichzeitig sind jedoch auch die Standardabweichungen für diese Gruppe am höchsten. Die Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG/BMP) ist als blaue Linie dargestellt. Hier sind die zweithöchsten Werte für die Knochenneubildung zu erkennen. Augmentationsgruppe B1 (HA/TCP/PEG) ist als grünes Liniendiagramm abgebildet, das gelbe Liniendiagramm gibt die Mittelwerte der Augmentationsgruppe A1 (HA/TCP) wieder.

Aus Diagramm 1 geht hervor, dass die Knochensynthese innerhalb der augmentierten Areale bei den verschiedenen Gruppen unterschiedlich verteilt ist. Unabhängig vom augmentierten Material und der Verwendung von osteoinduktiven Faktoren nahmen die Mittelwerte für die Knochenmenge bei allen Augmentationsgruppen von ROI 1 zu ROI 4 ab.

Bei Augmentationsgruppe A1 (HA/TCP) zeigten die Mittelwerte für die Knochenmenge in ROI 1 14,73 % ( $\pm 6,49$  %), in ROI 2 2,62 % ( $\pm 3,45$  %), in ROI 3 1,17 % ( $\pm 2,46$  %), in ROI 4 war nur noch 0,16 % ( $\pm 0,16$  %) neu gebildeter Knochen vorhanden. Auf der kontralateralen Seite des Unterkiefers (Augmentationsgruppe A2 = HA/TCP/BMP) wurde bei den Versuchstieren das HA/TCP in Kombination mit BMP-2 zur Wiederherstellung des Unterkieferdefektes verwendet. Bei dieser Gruppe zeigte sich der höchste Mittelwert von 30,65 % ( $\pm 10,97$  %) in ROI 1, mit einer kontinuierlichen Abnahme der Knochenmenge auf 26,00 % ( $\pm 10,81$  %) in ROI 2, 17,98 % ( $\pm 10,61$  %) in ROI 3 und 12,0 % ( $\pm 9,74$  %) in ROI 4.

Bei Augmentationsgruppe B1 erfolgte die Augmentation mit HA/TCP und PEG. Der Mittelwert lag hier bei 20,95 % ( $\pm 7,97$ %) in ROI 1, mit einer Abnahme der Knochenmenge auf 6,40 % ( $\pm 5,70$  %) in ROI 2, 1,16 % ( $\pm 1,10$  %) in ROI 3 und 0,12 % ( $\pm 0,09$  %) in ROI 4. Auf der kontralateralen Seite (Augmentationsgruppe B2) wurde der Defekt mit HA/TCP, PEG und BMP-2 aufgefüllt. Für dieses

Knochenersatzmaterial ergab sich, über die Versuchsgruppen gesehen, der zweithöchste Mittelwert von 28,37 % ( $\pm 7,43$  %) in ROI 1, mit einer Abnahme auf 14,87 % ( $\pm 6,47$  %) in ROI 2, 10,40 % ( $\pm 4,48$  %) in ROI 3 und 4,8 % ( $\pm 2,78$  %) in ROI 4.

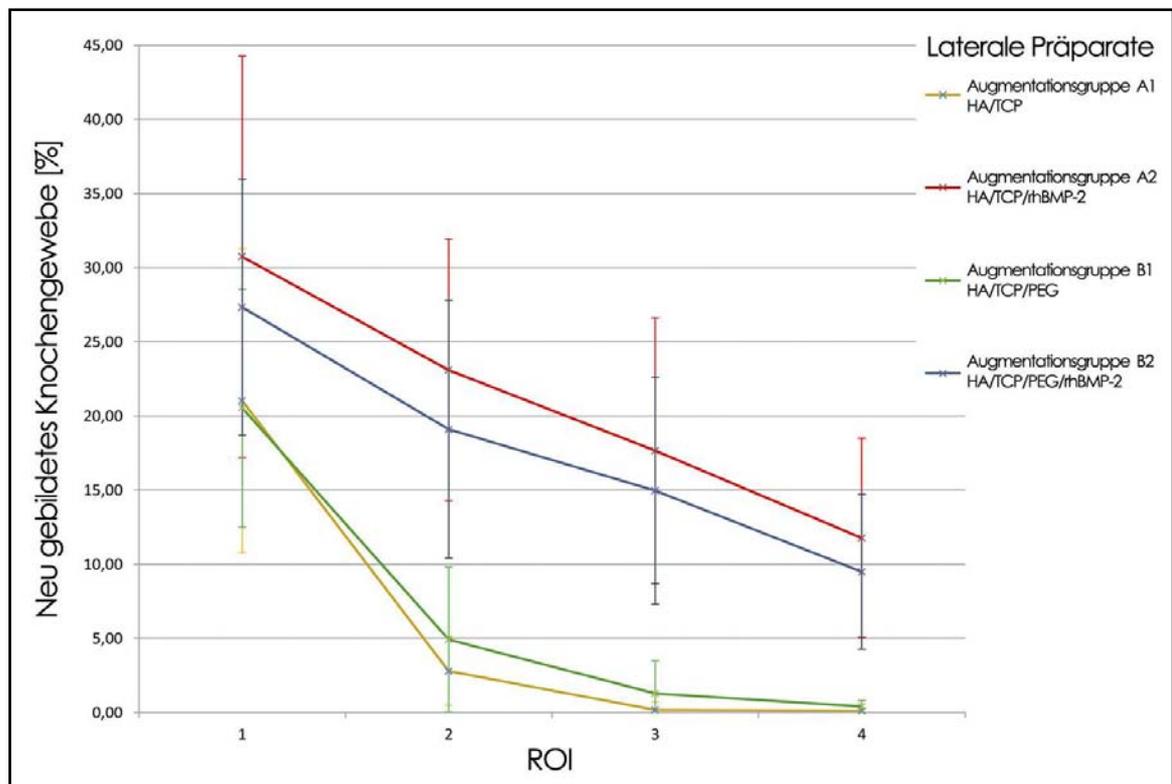
Im Rahmen der statistischen Analyse wurde eine signifikante Interaktion zwischen den drei Faktoren BMP, PEG und *region of interest* ( $p=0,024$ ) deutlich. Bedingt durch die Interaktion wurde für jede ROI eine separate statistische Analyse durchgeführt.

In ROI 1 stellte sich kein signifikanter Einfluss der verschiedenen Trägermaterialien auf die Synthese neuen Knochens dar (HA/TCP vs. HA/TCP/PEG:  $p=0,54$ ). Im Gegensatz hierzu zeigte die Applikation von BMP-2 einen signifikanten Einfluss auf die Knochenneubildung in ROI 1 (BMP-2 vs. kein BMP-2:  $p=0,002$ ).

In ROI 2 und ROI 3, zeigte die statistische Evaluation eine signifikante Interaktion zwischen der BMP-2-Applikation und dem Trägermaterial. In der Augmentationsgruppe B2 wurde dem HA/TCP-Material zusätzlich PEG-Hydrogel zugesetzt. Die Zugabe des PEG führte in dieser Gruppe in ROI 2 und ROI 3 zu weniger neu gebildetem Knochen im Vergleich zur Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/BMP). Das PEG verminderte den Effekt von rhBMP-2 in Bezug auf die Neubildung von Knochen in ROI 2 und 3 (ROI 2:  $p=0,011$ ; ROI 3:  $p=0,046$ ).

In der Region, die am weitesten vom nativen Knochen entfernt ist (ROI 4), wurde ein signifikanter Einfluss von BMP-2 auf die Knochensynthese deutlich. Dieser war unabhängig vom Trägermaterial (BMP-2 vs. kein BMP-2:  $p < 0,0001$ ). Die verschiedenen Trägermaterialien (mit PEG bzw. ohne PEG) zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Knochenneubildung (HA/TCP vs. HA/TCP/PEG:  $p=0,33$ ).

### 3.3.2 Histomorphometrische Evaluation der lateralen Augmentatregion



**Diagramm 2:** Prozentuale Knochenneubildung nach 4 Wochen; laterale Augmentatregion; HA/TCP (gelb); HA/TCP/BMP (rot); HA/TCP/PEG (grün); HA/TCP/PEG/BMP (blau)

Das in Diagramm 2 dargestellte Liniendiagramm gibt Auskunft über die histomorphometrisch ermittelte Knochenmenge in der lateralen Augmentatregion nach vier Wochen Einheilungszeit. Auf der y-Achse ist der jeweilige Mittelwert der Knochenmenge einer Augmentationsgruppe in Prozent aufgetragen, während auf der x-Achse die jeweilige beobachtete ROI zugeordnet ist. Die vertikalen Linien zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte für jede beobachtete ROI. Die Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP/BMP) ist als rotes Liniendiagramm abgebildet. Dieses Liniendiagramm zeigt die höchsten Mittelwerte über alle untersuchten ROI. Gleichzeitig sind jedoch auch die Standardabweichungen für diese Gruppe am höchsten. Die Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG/BMP) ist als blaue Linie dargestellt. Hier sind die zweithöchsten Werte für die Knochenneubildung zu erkennen. Augmentationsgruppe B1 (HA/TCP/PEG) ist als grünes Liniendiagramm abgebildet, das gelbe

Liniendiagramm gibt die Mittelwerte der Augmentationsgruppe A1 (HA/TCP) wieder.

Ähnlich wie bei der zentralen Region zeigen die beiden osteoinduktiven Augmentationsgruppen der lateralen Region höhere Mittelwerte für die Knochenneubildung. Analog zu den histomorphometrischen Ergebnissen der zentralen Region nahmen die Mittelwerte bei der lateralen Region von ROI 1 zu ROI 4 ab. Bei der Augmentation mit HA/TCP (Augmentationsgruppe A1) nahm der Mittelwert für die Knochenmenge von 21,02 % ( $\pm 10,26$  %) in ROI 1 auf 2,79 % ( $\pm 2,31$  %) in ROI 2, 0,17 % ( $\pm 0,54$  %) in ROI 3 und 0,12 % ( $\pm 0,13$  %) in ROI 4 ab. Die kontralaterale Seite, welche mit HA/TCP mit BMP-2 (Augmentationsgruppe A2) augmentiert wurde, wies den höchsten Mittelwert mit 30,74 % ( $\pm 13,53$  %) in ROI 1 auf. Die Knochenmenge nahm in ROI 2 auf 23,09 % ( $\pm 8,82$  %), in ROI 3 auf 17,66 % ( $\pm 8,96$  %) und in ROI 4 auf 11,77 % ( $\pm 6,73$  %) ab. Augmentationen mit HA/TCP und PEG (Augmentationsgruppe B1) führten zu einem Mittelwert von 20,55 % ( $\pm 8,02$  %) in ROI 1, bei einer Abnahme auf 4,92 % ( $\pm 4,89$  %) in ROI 2, 1,28 % ( $\pm 2,19$  %) in ROI 3 und 0,41 % ( $\pm 0,41$  %) in ROI 4. Bei der Kombination dieses Materials mit BMP-2 (Augmentationsgruppe B2) auf der kontralateralen Seite, lag ein Mittelwert von 27,32 % ( $\pm 8,36$  %) in ROI 1, 19,10 % ( $\pm 8,70$  %) in ROI 2, 14,95 % ( $\pm 7,65$  %) in ROI 3 und 9,49 % ( $\pm 5,22$  %) in ROI 4 vor.

Nach statistischer Analyse lässt sich weder ein signifikanter Einfluss des osteoinduktiven Faktors BMP-2 noch ein signifikanter Einfluss des Trägermaterials auf die Knochensynthese in ROI 1 feststellen (BMP-2 vs. kein BMP-2:  $p=0,08$ ; mit PEG vs. ohne PEG:  $p=0,61$ ). In der Augmentationsgruppe B2 wurde HA/TCP und rhBMP-2 mit PEG kombiniert. Im Rahmen der statistischen Analyse konnte eine signifikante Interaktion zwischen der kombinierten Anwendung von PEG mit HA/TCP und rhBMP-2 in den Regionen ROI 2, 3 und 4 festgestellt werden. Die zusätzliche Anwendung von PEG als Trägermaterial für rhBMP-2 führte zu weniger neu gebildetem Knochen im Vergleich zu rhBMP-2 ohne PEG. Das PEG führte zu einer signifikant geringeren Knochensynthese, mit geringeren Mittelwerten der Knochenmenge (ROI 2:  $p=0,012$ ; ROI 3:  $p=0,0009$ ; ROI 4:  $p=0,0012$ ).

Wie in dieser Studie gezeigt, kann durch Einsatz von osteoinduktiven Substanzen in Kombination mit resorbierbaren, osteokonduktiven Trägermaterialien die knöcherne Regeneration positiv beeinflusst werden. Die Versuchsgruppen, bei denen das Trägermaterial mit BMP-2 kombiniert wurde, zeigten vor allem in ROI 1 und 2 eine signifikante Steigerung der Knochenneubildung. Die Versuchsgruppen ohne BMP-2 wiesen hingegen nur kleine, teilweise unvollständige Knochenbrücken auf.

Eine zusätzliche PEG-Anwendung führte zu keiner Steigerung der Knochensynthese, sondern in einigen Regionen zu einer signifikanten Abnahme des neugebildeten Knochens.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion des Tiermodells

Das Ziel der vorliegenden Studie war die histomorphometrische Evaluation der Knochenneubildung nach Augmentation eines ausgedehnten Unterkiefer-Knochendefektes mit Knochenersatzmaterialien. Da die Herstellung histologischer Schnitte beim Menschen aus ethischen Gründen nicht durchführbar ist, wurde zu diesem Zweck ein Tiermodell herangezogen.

Bei einem Tierversuch sollten sowohl die anatomischen Gegebenheiten des Anwendungsgebietes als auch die Knochenphysiologie und das Regenerationspotenzial mit der des Menschen vergleichbar sein. Jede Spezies weist dabei spezifische Vor- und Nachteile bezüglich der Eignung als Versuchstier für die Erforschung von Heilungsvorgängen am Knochen auf. Je nach Anwendungsbereich kommen daher verschiedene Kleintier- oder Großtiermodelle in Frage.

Primaten, Hunde, Schafe, Kaninchen und Schweine wurden bereits als Tiermodelle im Hinblick auf Knochenuntersuchungen in der Literatur beschrieben (Pearce et al. 2007).

Boyne und Mitarbeiter verwendeten in einer Studie von 2006 für die Hemi-mandibulektomie mit nachfolgender Defektversorgung *Macaca fascicularis*-Affen als Versuchstiere (Boyne et al. 2006). Aufgrund sozialer und kognitiver Fähigkeiten nichthumaner Primaten muss die Anwendung dieser Tiere in der medizinischen Forschung aus ethischer Sicht kritisch hinterfragt werden. Zwar erscheint dieses Tiermodell in der Knochenregeneration, aufgrund der guten Übertragbarkeit auf den Menschen, als besonders geeignet (Boyne et al. 2006, Turner 2001, Wang et al. 1998), dennoch sollten Primaten heutzutage nur dann als Versuchstier eingesetzt werden, wenn es keine geeigneten Alternativmöglichkeiten gibt. Neben den ethischen Beweggründen, sollte bedacht werden, dass die Haltung dieser Tiere besonders aufwendig und kostenintensiv ist (Pearce et al. 2007). Unter den Großtieren wird daher häufig auf Hunde

zurückgegriffen, da sich die Haltung dieser Tiere wesentlich einfacher und weniger kostenintensiv gestaltet als bei Primaten. In der 2014 veröffentlichten Pilotstudie zur Knochenaugmentation mit selbsthärtendem, resorbierbarem Knochenersatzmaterial von Schliephake und Mitarbeitern wurden beispielsweise Beagle-Hunde als Versuchstiere verwendet (Schliephake et al. 2014). Der chemische Knochenaufbau des Hundes ist dem des Menschen sehr ähnlich, wie in einer Studie von Aerssens berichtet wurde (Aerssens et al. 1998). Da der Hund als Begleittier des Menschen gilt, wird diese Spezies aufgrund ethischer Bedenken jedoch immer seltener in der medizinischen Forschung eingesetzt (Pearce et al. 2007). Die ethische Abneigung gegenüber Tierversuchen an Schafen ist geringer ausgeprägt als bei Hunden, weil das Fleisch dieser Tiere auch als Nahrungsmittel dient (Pearce et al. 2007). Das Körpergewicht entspricht im Wesentlichen dem Gewicht des Menschen, wodurch ähnliche StoffwechsellLeistungen zu vermuten sind (Newman et al. 1995). Zwischen Schaf und Mensch bestehen zudem große Ähnlichkeiten bezüglich der Mikromorphologie der Knochenstruktur (Rehman et al. 1995). Beim Schaf ist jedoch zu bedenken, dass es sich bei dieser Spezies um Wiederkäuer handelt. Bei der oralen Defektversorgung unterliegt das Operationsgebiet dadurch einer höheren Belastung. Am häufigsten wird das Kaninchenmodell in der medizinischen Forschung angewendet (Neyt et al. 1998). Diese Tiere sind aufgrund ihrer geringen Körpergröße im Vergleich zum Großtiermodell sehr pflegeleicht (Neyt et al. 1998) und die Wachstumsphase des Skelettsystems ist relativ früh abgeschlossen (Gilsanz et al. 1988). Dieses Modell findet auch in der Erforschung von Knochenersatzmaterialien Verwendung, wie von Jung und Mitarbeitern in einer Studie zu PEG modifiziertem Hydroxylapatit mit Tricalciumphosphat an Neuseeland-Kaninchen beschrieben (Jung et al. 2008). Gleichzeitig stellt die Körpergröße dieser Tiere jedoch auch einen limitierenden Faktor in der praktischen Anwendbarkeit bei intraoralen Fragestellungen dar (Pearce et al. 2007). Dentale Knochenersatzmaterialien werden daher beim Kaninchen häufig in extraoralen Defektmodellen untersucht (Jung et al. 2008). In Bezug auf die Anwendbarkeit bei oralchirurgischen Fragestellungen ist das Schwein aufgrund der Unterkiefermorphologie und Körpergröße besonders gut geeignet (Jensen et al. 2005, Thorwarth et al. 2005). Bei speziellen Züchtungen wie dem Göttinger Miniatur-

schwein sind wesentliche biomedizinische Parameter bezüglich des Körpergewichts, der Knochenmikrostruktur, der Knochenzusammensetzung und der Knochenumbaurate mit denen des Menschen vergleichbar (Aerssens et al. 1998, Mosekilde et al. 1987, Mosekilde et al. 1993, Pearce et al. 2007). Daher wurde dieses Tiermodell bereits in Studien zur Regeneration von Unterkieferdefekten (Jensen et al. 2005, Würzler et al. 2004), zur Versorgung von Unterkieferfrakturen (Terheyden et al. 1999) und zu Unterkieferaugmentationen eingesetzt (Buser et al. 1998, Jensen et al. 2006, Pieri et al. 2008, Schliephake et al. 1995). Auch bei Fragestellungen zur intraoralen Applikation von Knochenersatzmaterial bietet sich das Göttinger Minischwein, aufgrund der guten Übertragbarkeit auf den Menschen, an.

Generell sollte bei der Auswahl des Versuchstieres jedoch stets das Defektmodell mit bedacht werden. Zur Untersuchung dentaler Knochenersatzmaterialien können je nach Indikation, Anwendungsform und Tiermodell verschiedene intra- und extraorale Defektmodelle untersucht werden.

## 4.2 Diskussion des Defektmodells

Unter den möglichen Defektmodellen wird in Kleindefektmodelle und Großdefektmodelle unterschieden (Stützle et al. 1998). In einer Studie von Thoma und Mitarbeitern wurde ein Kleindefektmodell am Göttinger Minipig beschrieben (Thoma et al. 2014). Nachdem in einer zuvor durchgeführten Zahnextraktion alle Prämolaren und der erste Molar des Unterkiefers entfernt wurden, konnten dann 3 Bohrlöcher mit einem Durchmesser und einer Tiefe von jeweils 7 mm präpariert werden (Thoma et al. 2014). Durch das definierte Volumen wurden standardisierte Voraussetzungen für den Vergleich der Knochenersatzmaterialien geschaffen. Beim Kleindefektmodell liegt der Vorteil in der geringen mechanischen Belastung des Knochendefekts, aufgrund des geringen Defektausmaßes. Wird der Defekt jedoch zu klein gewählt, kann es während des Beobachtungsintervalls zur spontanen knöchernen Durchbauung des Defektes kommen (Stützle et al. 1998). Überschreitet die Ausdehnung eines Knochendefektes eine kritische Größe (*critical size defect*), wird eine spontane Regene-

ration des Knochens nicht mehr erwartet (Schmitz und Hollinger 1986). Zur Simulation eines solchen so genannten *critical size defect* untersuchten Würzler und Mitarbeiter 2004 in einem Großdefektmodell die Rekonstruktion eines unilateralen, 5 cm langen Unterkieferkontinuitätsdefekts am Göttinger Minipig. Bei allen Tieren wurden bikortikal fixierte Osteosynthesplatten zur Stabilisierung des ausgedehnten Defektes verwendet, um die mechanisch stark beanspruchte Defektregion zu überbrücken. Nach etwa 6 Wochen kam es jedoch bei den Tieren der Kontrollgruppe (ohne BMP-Applikation) zum vollständigen Versagen der Rekonstruktion. Würzler stellte fest, dass die Tiere beständig ihre Kaumuskulatur aktivierten, dadurch den Kiefer unzureichend immobilisierten und somit eine Transplantatlockerung herbeiführten (Würzler et al. 2004). Für die Analyse des Einheilverhaltens neuentwickelter Knochenersatzmaterialien sind ausgedehnte Defektmodelle daher nur bedingt geeignet. Im Rahmen postoperativer Schmerzen, stellt sich beim Menschen eine Schutzfunktion vor übermäßiger Belastung der operierten Region ein. Minischweine kauen hingegen ohne Schonung auf harten Gegenständen, was zu einer zusätzlichen Belastung des Wundgebietes mit sekundärer Wundinfektion und Augmentatlockerung führen kann.

In der vorliegenden Studie wurde ein Defektausmaß von 20 x 8 x 8 mm (Länge x Breite x Tiefe) gewählt. Bei diesem Defekt unterlag der restliche Knochen zwar einem wesentlich geringeren Grad an funktioneller Belastung als bei einem Unterkieferkontinuitätsdefekt, dennoch wirkt eine große mechanische Beanspruchung auf die Augmentatregion. Da in dem hier vorgestellten Versuch die kieferkammbedeckende Schleimhaut bei allen Versuchstieren nekrotisch wurde, musste die Schnittführung bei der Präparation des Schleimhautlappens kritisch hinterfragt werden. Wie von Würzler beschrieben, sollte binnen der ersten postoperativen Woche ein biomechanisch belastbares Knochenregenerat angestrebt werden (Würzler et al. 2004). Zu diesem Zweck sollte eine speicheldichte Wundabdeckung gewährleistet sein, und die Gefäßversorgung des Mukoperiostlappens sollte intakt bleiben. Das ursprüngliche Lappendesign für die Präparation des Knochendefektes war ein lingual gestielter Trapezlappen mit anteriorem und posteriorem Entlastungsschnitt. Der Mukoperiostlappen wurde jedoch eine Woche postoperativ nekrotisch, was darauf hindeutete, dass die

vaskuläre Versorgung des Lappens unterbrochen wurde. Beim Menschen erfolgt die Versorgung der Mukosa des Alveolarknochens im Unterkiefer von posterior durch Gefäße, die parallel zum Kieferkamm verlaufen (Kleinheinz et al. 2005). Da beim Göttinger Minipig eine ähnliche Gefäßanatomie vermutet wird, wurde daher bei der Präparation des Mukoperiostlappens bei der Zweitoperation auf den posterioren Entlastungsschnitt verzichtet, um die Blutversorgung des Gewebes zu erhalten. Bei allen Tieren heilte das Augmentat nach Modifikation des Lappendesigns ohne Anzeichen von Wund-Dehiszenzen vollständig ein, und es gab keine weiteren Komplikationen in der Wundheilung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Auswahl eines Defektmodells zur Untersuchung von Knochenersatzmaterial keine allgemeingültige Empfehlung in der Literatur zu finden ist. Das Defektmodell sollte sich vor allem nach dem gewählten Tiermodell und nach dem zu untersuchenden Augmentationsmaterial richten.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

Die grundsätzlichen Ergebnisse der BMP-Applikation in der vorliegenden Studie am Göttinger Minischwein bestätigten die Erkenntnisse der Literatur. Wie bereits in einer Vielzahl von Tierstudien und humanen Versuchsreihen nachgewiesen, führte die Anwendung des osteoinduktiven Wachstumsfaktors rhBMP-2 in Kombination mit dem jeweiligen Trägermaterial auch in der vorliegenden Studie zu einer signifikant gesteigerten Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrolle.

Die Osteoinduktion durch rhBMP-2 wurde in diesem Zusammenhang bei Unterkiefer-Kontinuitätsdefekten (Boyne et al. 1999, Toriumi et al. 1991), bei Alveolar-kammdefekten (Barboza et al. 2000, Cochran et al. 1999, Jung et al. 2003) und bei Sinusboden-Augmentationen nachgewiesen (Boyne et al. 1997, Nevins et al. 1996). Daher war in dieser Studie bei den kombiniert osteokonduktiven / osteoinduktiven Augmentationsgruppen mit rhBMP-2 mit einer stärkeren knöchernen Integration des Augmentates zu rechnen, als bei den rein osteokonduktiven Augmentationsmaterialien. Es ist bekannt, dass rein osteokonduktives Knochenersatzmaterial (Augmentationsgruppen HA/TCP und HA/TCP/PEG) lediglich die

Anlagerung und das Wachstum von Osteoblasten entlang des Materials fördert. In dieser Studie diente ein Gemisch aus Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat als Grundgerüst für das Trägermaterial. Es ermöglicht die volumenstabile Überbrückung des Knochendefektes. Die oberflächliche Adsorption der BMP-Moleküle auf diesem Material ist gekennzeichnet durch die frühzeitige Freigabe des Wachstumsfaktors (Arrabal et al. 2013, Uludag et al. 1999). Die pharmakokinetischen Eigenschaften der BMP-Freisetzung und das zeitliche Zusammenspiel in der Knochenregeneration wurden in der Literatur kontrovers diskutiert, da es möglicherweise eine Vielzahl von spezifischen Abhängigkeiten in der Wirkung eines Wachstumsfaktors gibt (Kirker-Head 2000). In diesem Zusammenhang werden auch Nebenwirkungen des Wachstumsfaktors BMP-2 diskutiert (Chrastil et al. 2013). Derzeit werden BMPs in supraphysiologischer Dosierung angewandt, um eine hinreichende knöchernen Überbrückung ausgedehnter Defekte zu erreichen (Luginbuehl et al. 2004). Dabei können Ödeme des Weichgewebes (Haidar et al. 2009a), Schwellungen (Shields et al. 2006, Smucker et al. 2006), Serome (Benglis et al. 2008, Leknes et al. 2008, Tumialan et al. 2008), heterotope Knochenbildung (Baskin et al. 2003, Boakye et al. 2005), Entzündungs- und Immunreaktionen auftreten (Haidar et al. 2009a, Ritting et al. 2012). Ein wesentlicher Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der bioaktiven Moleküle wird dem Trägermaterial zugesprochen (Bessa et al. 2008, Carreira et al. 2014, Haidar et al. 2009a, Kinoshita und Maeda 2013, Schliephake 2010). Um die benötigte Wachstumsfaktor-Dosis zu reduzieren, die Wirkung der Moleküle effektiv zu steuern und somit Nebenwirkungen zu vermeiden, sollte ein geeignetes Trägersystem eine adäquate Bindung und eine kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors ermöglichen (Bell und Gregoire 2009, Haidar et al. 2009a).

Unter dieser Maßgabe wurden biodegradierbare, synthetische Polymere, wie zum Beispiel PEG, entwickelt (Lutolf et al. 2003). In der vorliegenden Studie wurde das PEG-Hydrogel, ähnlich wie in einer Studie von Jung und Mitarbeitern, mit HA/TCP-Trägermaterial kombiniert (Jung et al. 2008). Die Hypothese, dass die gemeinsame Anwendung dieser Materialien in Verbindung mit rhBMP-2 zu einer signifikant gesteigerten Knochenneubildung führt, wie von Jung beschrieben (Jung et al. 2008), konnte nicht bestätigt werden. Allerdings wurde

in der Studie von Jung eine andere Kontrollgruppe verwendet (siehe Punkt 1.8). Die Einlagerung von BMP-2 in das PEG-Hydrogel führte in Kombination mit dem gleichen Keramik-Trägermaterial zu einer statistisch signifikanten Wechselwirkung zwischen BMP und PEG. Vergleicht man die Augmentationsgruppe A2 (HA/TCP mit BMP-2) mit der Augmentationsgruppe B2 (HA/TCP/PEG mit BMP-2) wird deutlich, dass die zusätzliche Anwendung von PEG zu einer geringeren Knochenneubildung führt. In der Studie von Jung und Mitarbeitern wurde in zwei der vier untersuchten Gruppen rhBMP-2, in den Konzentrationen von 10 µg/ml (Gruppe 3) oder 30 µg/ml (Gruppe 4), in die Trägermatrix integriert (Jung et al. 2008). Diese beiden Gruppen wurden mit der leeren Kontrolle und mit dem Trägermaterial ohne Wachstumsfaktor verglichen. Die Autoren dieser Studie berichteten in den Versuchsgruppen, die rhBMP-2, PEG und HA/TCP enthielten über eine signifikant gesteigerte Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne rhBMP-2). Dabei gab es jedoch keine Kontrollgruppe, bei der lediglich HA/TCP als Trägermaterial für rhBMP-2 verwendet wurde, um die Knochenneubildung mit der Versuchsgruppe HA/TCP/PEG zu vergleichen. Möglicherweise ist die einfache, oberflächliche Adsorption des Wachstumsfaktors auf dem HA/TCP-Trägermaterial förderlicher für die Knochensynthese, als die dreidimensionale Verankerung in einem *slow release*-System wie PEG. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass PEG die osteoinduktive Wirkung von BMP-2 vermindert.

PEG wurde in der Zahnmedizin zunächst als resorbierbare Membran in der gesteuerten Knochenregeneration (GBR) verwendet (Thoma et al. 2014). Dabei stellte die PEG-Membran eine Gewebebarriere mit Platzhalterfunktion für den neu gebildeten Knochen dar, um das Einwachsen von Weichgewebe in den Knochendefekt zu verhindern. Möglicherweise hemmt PEG die Adhäsion und Invasion von Zellen und anderen Produkten der extrazellulären Matrix und reduziert somit die Knochenregeneration (Lutolf et al. 2003). Vielleicht ist die geringere Knochenmenge in den Augmentationsgruppen mit PEG (B1 und B2) auf eine zu langsame Freisetzung der BMP-Moleküle zurückzuführen, bei der keine ausreichende biologisch wirksame Konzentration des Wachstumsfaktors über die Dauer der Knochenregeneration ermöglicht wird. Voruntersuchungen, welche die Freisetzung von 100 µg BMP-2 aus einem HA/TCP/PEG-Träger-

material untersuchten, zeigten kumuliert eine Freisetzungsrates von 55,7 % nach 6 Tagen und 63,0 % nach 16 Tagen. Rückstände des PEG/BMP-2-Präzipitates könnten innerhalb der Poren des keramischen Trägers verblieben sein. Durch konventionelle Mikroskopie konnten zwar keine PEG-Rückstände nachgewiesen werden, die eine vollständige Freisetzung des BMP-2 verhindert haben könnten. Aus mehreren Studien ist jedoch bekannt, dass BMP durch PEG in einer kristallinen, biologisch unwirksamen Form gebunden wird, bis das PEG-Hydrogel vollständig abgebaut ist, was letztendlich die Knochenneubildung hemmen könnte (Lutolf et al. 2003, Ruppert et al. 1996, Uludag et al. 1999).

In der vorliegenden Studie wurde nach 4-wöchigem Beobachtungszeitraum bei allen Augmentationsgruppen festgestellt, dass die Menge an neu gebildetem Knochen von ROI 1 zu ROI 4 abnahm. Dieses Ergebnis wurde bereits mehrfach, sowohl für rein osteokonduktive wie auch für osteoinduktive Knochenersatzmaterialien in der Literatur beschrieben (Fürst et al. 2003, Terheyden et al. 1999). Es wird diskutiert, ob dieses Ergebnis auf der Tatsache basiert, dass für die Resorption des Augmentationsmaterials und die Synthese von Knochen eine ausreichende biologische Infrastruktur im Defektlager nötig ist. Im Rahmen der *creeping substitution* wird das Transplantatlager unmittelbar nach der Implantation des Knochenersatzmaterials vaskulär erschlossen. Dabei wird zunächst nur das äußere Augmentat mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Knochenneubildung wird sich daher vorerst auf die Randbereiche des Augmentats konzentrieren. Der innere Bereich des Transplantates kann hingegen erst unter zeitlicher Verzögerung erschlossen werden, was die reduzierte Knochenmenge erklären könnte. Ein weiterer Grund für die erhöhte Knochenregeneration in ROI 1 könnte die Einblutung um das Augmentat im Rahmen der Defekt-Präparation und Augmentation sein. Durch diese Einblutungen könnten Mesenchymzellen, die im Blutkreislauf zirkulieren, in den Defektbereich eingeschleppt werden und den Ursprung der Knochenregeneration darstellen. Friedmann und Mitarbeiter berichteten in einer klinischen Studie zur Augmentation von Parodontaldefekten mit HA/TCP-Material über ähnliche Ergebnisse. Auch in dieser Untersuchung war die Knochenneubildung in direktem Kontakt zum ortständigen Knochen stärker ausgeprägt (Friedmann et al. 2009). Busenlechner und Mitarbeiter analysierten den Verlauf der Knochensynthese im

Rahmen einer Sinusbodenaugmentation am Göttinger Minipig unter Verwendung von synthetisch hergestelltem, osteokonduktivem Knochenersatzmaterial. Die Autoren der Studie stellten nach histomorphometrischer Untersuchung der Augmentate fest, dass in allen Untersuchungsgruppen sowohl nach sechs als auch nach zwölf Wochen Beobachtungszeitraum, bei einem Abstand von 0-1 mm um den ortsständigen Knochen, die größte Knochenmenge zu finden war. In den weiteren Untersuchungsregionen, die 2-3 mm bzw. 4-5 mm vom ortsständigen Knochen entfernt waren, nahm die Knochenmenge kontinuierlich ab (Busenlechner et al. 2009).

#### **4.4 Diskussion des Augmentationsmaterials**

Körpereigene Knochentransplantate stellen derzeit den Goldstandard in der chirurgischen Therapie von *critical size defects* dar (Arrabal et al. 2013). Um die bereits erwähnten Limitationen dieser autogenen Knochentransplantate zu überwinden, wurden unterschiedliche Knochenersatzmaterialien als Alternativen zu autogenem Knochen untersucht (Kinoshita und Maeda 2013). Dabei stellte die Entdeckung der osteoinduktiven BMP-Moleküle durch Marshall Urist einen ersten Meilenstein für die Entwicklung vielversprechender Knochenersatzmaterialien dar (Urist 1965). Nachdem sich das Potenzial rekombinant hergestellter Wachstumsfaktoren zur Therapie von Knochendefekten abzeichnete (Wozney und Rosen 1998, Wozney et al. 1988), war es von größter Bedeutung ein geeignetes Trägermaterial für die bioaktiven Moleküle zu finden (Schliephake 2010). Die Bindung und die kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren, geeignete Resorbierbarkeit sowie adäquate mechanische Stabilität, sind die wesentlichen Anforderungen an ein optimales Knochenersatzmaterial (Lee und Shin 2007). Aus der Literatur geht jedoch auch hervor, dass es bisher kein ideales Trägersystem für alle vorausgesetzten Anforderungen gibt (Haidar et al. 2009a). Die kombinierte Anwendung von rhBMP-2 mit einem resorbierbaren, bovinen Kollagenschwamm (ACS) wurde im März 2007 für die Sinusaugmentation und für die Augmentation von Alveolarkammdefekten von der FDA zugelassen (McKay et al. 2007). Ergebnisse klinischer Studien zeigten zwar, dass die Anwendung

von ACS mit rhBMP-2 die erfolgreiche Rekonstruktion ausgedehnter mandibulärer Knochendefekte ermöglicht (Carter et al. 2008, Glied und Kraut 2010, Herford 2009, Herford und Boyne 2008, Herford und Cicciu 2010, Herford et al. 2007). ACS bietet jedoch für viele Anwendungen keine ausreichende mechanische Stabilität (Bessa et al. 2008). Daher wurde Kollagen unter anderem mit Calciumphosphaten kombiniert, um die mechanischen Eigenschaften zu verbessern (Liu et al. 2003). Hydroxylapatit wurde bereits in Studien als alleiniges Trägermaterial für rhBMP-2 eingesetzt (Noshi et al. 2001). Aufgrund der geringen Resorbierbarkeit (Zambuzzi et al. 2012) wird es jedoch meist als biphasisches Calciumphosphat zusammen mit Tricalciumphosphaten verwendet (Kamitakahara et al. 2008, Kohri et al. 1993, Mitri et al. 2012, Piattelli et al. 1996). Aufgrund der Tatsache, dass die Wachstumsfaktoren nur oberflächlich auf Calciumphosphaten gebunden werden können, erfolgt die Freisetzung in einem *burst release* innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Implantation (Hänseler et al. 2014). Obwohl die ideale Dosierung von Wachstumsfaktoren für eine osteoinduktive Wirkung noch nicht definiert ist, gibt es eine breite Übereinstimmung, dass die Freisetzung kontrolliert erfolgen sollte (Schliephake 2010). Dabei ist anscheinend weder die stark verzögerte Freisetzung (*slow release*) noch die sofortige Freisetzung (*burst release*) für die Osteoinduktion förderlich (Geiger et al. 2003). Stattdessen sollte die kritische Mindestkonzentration von rhBMP-2 im Knochendefekt über den notwendigen Zeitraum aufrecht gehalten werden (Haidar et al. 2009a). Die erforderliche Mindestkonzentration und die Dauer der Freisetzung variiert dabei je nach Spezies und Körpergewicht des Individuums (Kirker-Head 2000). Aus diesem Grund gibt es vermutlich kein allgemeingültiges Freisetzungsprofil, welches eine erfolgreiche Knochenregeneration ermöglicht (Geiger et al. 2003). Das Freisetzungsprofil von einer Trägermatrix wird im Wesentlichen durch die Resorbierbarkeit, Löslichkeit, Zusammensetzung und Geometrie des verwendeten Trägermaterials beeinflusst (Kirker-Head 2000). Werden Signalmoleküle im Rahmen der Polymerisationsreaktion von natürlichen oder synthetischen Polymeren beigemischt, können diese in die Trägermatrix integriert werden. Mit Hilfe dieser *slow release*-Systeme kann die Freigabe von rhBMP-2 im Rahmen der Resorption des Trägermaterials über einen längeren Zeitraum innerhalb der Defektregion gewährleistet werden (Hänseler et al. 2012,

Schliephake et al. 2008, Schliephake et al. 2010). Zu den *slow release*-Systemen zählen auch rein synthetische, organische Polymere, wie zum Beispiel Polylactide (PLA) und Polyglykolsäuren (PGA) (Kinoshita und Maeda 2013). Im Vergleich zu bovinem Kollagen, sind bei vollsynthetisch hergestellten PLA und PGA keine Infektionen durch pathogene Kontaminationen zu erwarten (Polimeni et al. 2008), die Zellaffinität ist jedoch im Vergleich zu Kollagen weniger stark ausgeprägt (Kinoshita und Maeda 2013). Um BMP-Moleküle unter Erhaltung der biologischen Aktivität steril in das Polymergefüge einzubringen, ist zusätzlicher, hoher technischer Aufwand notwendig, wie zum Beispiel die Verflüssigung des Polymers mit Hilfe organischer Lösungsmittel (Schliephake 2010). In diesem Zusammenhang wird die Theorie diskutiert, dass bei der hydrolytischen Spaltung auch Überreste dieses Lösungsmittels oder pH-senkende Reaktionsprodukte in den Knochendefekt gelangen, welche dann zu ungewolltem Knochenabbau im Empfängergewebe führen (Saito und Takaoka 2003, Schliephake 2010). Innerhalb eines PEG-Hydrogels können rhBMP-2-Moleküle integriert werden und über einen längeren Zeitraum gezielt freigesetzt werden (Lutolf et al. 2003), wobei PEG die Vorteile von synthetischen und natürlichen Materialien vereinen soll (Lutolf et al. 2003). Das PEG-Hydrogel verfügt jedoch als alleiniges Knochenersatzmaterial über unzureichende mechanische Stabilität, welche bei einigen ausgedehnten Knochendefekten erforderlich ist (Kinoshita und Maeda 2013). Daher wurde PEG in einer Tierstudie von Jung und Mitarbeitern zusätzlich mit Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat kombiniert und auf der Kaninchenkalvaria untersucht (Jung et al. 2008). Die Applikation dieses Materials erfolgte in Form von Granulat, welches mit dem noch flüssigen PEG vermennt wurde. Das *in situ* erhärtende PEG-Gel stabilisierte dabei die mechanisch stabilen HA/TCP-Granula. Aufbauend auf den vielversprechenden Ergebnissen von Jung, wurde in der vorliegenden Studie die intraorale Anwendung eines blockförmigen porösen HA/TCP-Trägers mit einer PEG-Matrix in einem ausgedehnten Unterkieferdefekt untersucht. Diese Materialkombination konnte die positiven Ergebnisse von Jung, wie bereits beschrieben, jedoch nicht bestätigen.

## 4.5 Diskussion der Untersuchungsmethode

Im Rahmen der Auswertung wurde in der vorliegenden Studie eine semi-automatische, histomorphometrische Analyse der Knochenneubildung durchgeführt. Mit Hilfe des Bildanalyse-Systems wurde der neu gebildete Knochen automatisch über die Farbauswahl markiert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der standardisierten, reproduzierbaren Markierung des zu messenden Gewebes. Das Knochenersatzmaterial konnte dabei aufgrund seiner knochenähnlichen Färbung nur unzureichend durch die Bildanalyse-Software vom ortsständigen Knochen abgegrenzt werden. Aus diesem Grund wurden die Knochenflächen sowie die HA/TCP-Partikel manuell umzeichnet. Diese Methode wurde von einem einzigen Untersucher durchgeführt. In diesem Zusammenhang stellt die untersucherabhängige Ungenauigkeit der semiautomatischen Analyse eine Fehlerquelle dar (Kulak und Dempster 2010). Es ist bekannt, dass Einflussfaktoren wie zum Beispiel Tageszeit, Lichteinfall oder die Erfahrung des Auswerters zu den genannten Ungenauigkeiten führen (Podenphant et al. 1986). Um diese zu vermeiden, wurde der Untersucher im Vorfeld darauf trainiert, neu gebildetes Knochengewebe in den histologischen Präparaten möglichst objektiv zu evaluieren und von den verbliebenen Augmentatpartikeln zu differenzieren. Podenphant und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass stets mehrere Präparate des zu untersuchenden Gewebes analysiert werden sollten, um die untersucherabhängige Ungenauigkeit zu reduzieren und somit die Präzision der histomorphometrischen Daten zu erhöhen (Podenphant et al. 1986).

Neben den untersucherspezifischen Schwierigkeiten einer Evaluation ist ein wesentlicher Nachteil, dass die Histomorphometrie lediglich eine Momentaufnahme eines dynamischen Prozesses im Rahmen der Knochenregeneration ermöglicht (Vidal et al. 2012). Daher sollte der Beobachtungszeitraum von der Regenerationsrate des Individuums abhängig gemacht werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu gewährleisten, könnten mehrere histomorphometrische Analysen nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen durchgeführt werden. Dadurch könnte der dynamische Prozess der Knochenregeneration präziser abgebildet werden.

Im Gegensatz zur Histomorphometrie können nicht-invasive Untersuchungsmethoden eine zeitlich kontinuierliche Beurteilung der Parameter ermöglichen. Jedoch ist hier eine exakte histologische Beurteilung derzeit noch nicht vollständig möglich. Mit Hilfe nicht-invasiver Auswertungstechniken könnten Messergebnisse über den gesamten Verlauf der Knochenregeneration erhoben werden. Zu den nicht invasiven bildgebenden Verfahren zählt die quantitative Computertomographie oder die Ultraschallmessung (Dalle Carbonare et al. 2005). Bei der Auswertung komplexer räumlicher Strukturen liefert die Extrapolation stereologischer Verfahren im Rahmen der Histomorphometrie nur Näherungswerte (Parfitt et al. 1987). Als Alternative zu diesen Näherungswerten wurden in den letzten Jahren lichtmikroskopische Verfahren entwickelt, mit deren Hilfe eine verbesserte dreidimensionale Darstellung der untersuchten Gewebe möglich ist. Hierzu zählt die 3D-SIM-Mikroskopie (*structured illumination microscopy*) und die Konfokalmikroskopie. Aufgrund der geringen Eindringtiefe von wenigen Millimetern ist die Untersuchung komplexer Gewebe mit dieser Technik jedoch nur begrenzt möglich (Weigel et al. 2009). Mit Hilfe der Computertomographie können hingegen Schichtebenen innerhalb des Augmentats dreidimensional *in vivo* dargestellt werden. Die Verfügbarkeit von Computertomographen mit ausreichendem Auflösungsvermögen ist jedoch stark begrenzt. Mit dieser Technik kann Knochenvolumen gemessen werden, die Positionierung von Implantaten geplant werden sowie eine mikrostrukturelle Analyse von Knochengewebe durchgeführt werden (Kämmerer et al. 2013). Diese Verfahren sind beispielsweise für die Diagnose der Osteoporose von Nutzen, metabolische Veränderungen der Knochenstruktur können jedoch nicht evaluiert werden (Vidal et al. 2012). Es kann vermutet werden, dass bei diesem Verfahren Ungenauigkeiten in der Differenzierung von neu gebildetem Knochen, Osteoid und Knochenersatzmaterial zu erwarten sind (Tamminen et al. 2011), da diese Strukturen ähnliche Dichteverhältnisse aufweisen. Die Ergebnisse radiologischer Auswertungen sind daher nur als Annäherungswerte zu verstehen und könnten zur Ergänzung der Knochenhistologie durchgeführt werden.

Die strahlungsfreie Ultraschallmessung stellt zwar eine kostengünstige Alternative zur Computertomographie dar, Auswertungen zur Knochenregeneration sind jedoch aufgrund der geringen Präzision nur bedingt möglich

(Chappard et al. 1999). Die histomorphometrische Analyse von Gewebeproben wird, trotz untersucherabhängiger Ungenauigkeiten, in der Literatur als Standardverfahren beschrieben (Busenlechner et al. 2009, Fürst et al. 2003, Vidal et al. 2012). Nicht-invasive Verfahren können zum gegenwärtigen Stand der Technik lediglich ergänzend neben histomorphometrischen Analyseverfahren angewendet werden (Tamminen et al. 2011). Eine ideale nicht-invasive und kostengünstige Methode zur präzisen Messung der Knochenmenge über den gesamten Knochenheilungsprozess wäre sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung vorteilhaft (Kämmerer et al. 2013). Möglicherweise kann dieses Ziel in naher Zukunft durch die Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik und der Computertechnologie erreicht werden.

## 4.6 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Versuchsgruppen dieser Studie bestätigten die aus der Literatur bekannte osteoinduktive Wirkung des rhBMP-2. Darüber hinaus bestätigte sich auch die bereits beschriebene Abnahme der Knochenneubildung mit zunehmendem Abstand zum Empfängerlager in allen Augmentationsgruppen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die PEG-Matrix mit dem rhBMP-2 interagiert und die Aktivität der Moleküle statistisch signifikant reduziert. Basierend auf diesen Ergebnissen muss die Anwendung des PEG-Hydrogels als Matrix für rhBMP-2 in Kombination mit HA/TCP-Trägermaterial kritisch hinterfragt werden. Die adsorptiv gebundenen BMP-Moleküle führten in Kombination mit HA/TCP ohne PEG zu einer stärkeren Knochenneubildung. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass sich die adsorptive Bindung der BMP-Moleküle förderlicher auf die Knochensynthese auswirkte als die Inkorporation der Moleküle in ein langsam resorbiertes PEG-Hydrogel.

## 5 Zusammenfassung

Die Knochenaugmentation gewinnt in der Zahnmedizin - im Rahmen prä-implantologischer sowie rekonstruktiver Verfahren - zunehmend an Bedeutung. Dabei wird häufig die Insertion von dentalen Implantaten bzw. ein suffizienter Prothesenerhalt erst durch den knöchernen Aufbau der Kiefer mittels körpereigener Transplantate oder Knochenersatzmaterial ermöglicht. Um die Entnahmemorbidity im Rahmen der Entnahme autogener Knochentransplantate zu umgehen, wurden unterschiedliche synthetische Knochenersatzmaterialien als Alternativen zu autogenem Knochen untersucht. Besondere Aufmerksamkeit wird derzeit osteokonduktiven synthetischen Materialien und Materialkombinationen geschenkt, die durch Zugabe von osteoinduktiven Molekülen die Knochenneubildung fördern sollen.

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, zu untersuchen, ob eine synthetische Matrix aus Polyethylenglycol mit rhBMP-2 in Kombination mit einem Calciumphosphat-Trägermaterial die Knochenregeneration im Vergleich zu dem identischen Material ohne PEG fördert. Die Durchführung der Studie erfolgte in einer randomisierten Tierstudie an 18 Göttinger Minipigs. Die zu untersuchenden Knochenersatzmaterialien wurden randomisiert im *split mouth design* in Unterkieferdefekte mit definiertem Ausmaß von 20 x 8 x 8 mm (Länge x Breite x Tiefe) eingebracht. In Versuchsgruppe A wurde auf der einen Kieferseite HA/TCP mit rhBMP-2 zur Augmentation verwendet, auf der kontralateralen Seite wurde der Knochendefekt mit dem gleichen Material ohne den Wachstumsfaktor augmentiert. In Versuchsgruppe B wurde der Knochendefekt auf der einen Kieferseite mit einem PEG-Hydrogel mit rhBMP-2 in Kombination mit HA/TCP augmentiert, auf der kontralateralen Seite wurde der Knochendefekt mit dem gleichen Material ohne den Wachstumsfaktor aufgefüllt. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die histologischen Schliffpräparate angefertigt. Im Rahmen der histomorphometrischen Analyse wurde das neu gebildete Knochengewebe manuell markiert und mit Hilfe der Analysesoftware computerassistent metrisch ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie am Göttinger Minischwein zeigen, dass der osteoinduktive Wachstumsfaktor rhBMP-2 in Kombination mit dem osteokonduktiven HA/TCP-Trägermaterial im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant gesteigerten Knochenregeneration führt. Die Ergänzung des osteokonduktiven Trägermaterials mit einem resorbierbaren PEG-Hydrogel führte zu keinem positiven Einfluss in Bezug auf die knöchernen Regeneration. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass PEG die Aktivität von BMP reduziert und sich somit hemmend auf die Knochensynthese auswirkt. Das HA/TCP, welches lediglich die adsorptive Oberflächenbindung von BMP ermöglicht, führte in dieser Untersuchung zu mehr Knochenneubildung als die integrative Verankerung des Wachstumsfaktors innerhalb der PEG-Matrix. In weiteren Studien sollte untersucht werden, über welchen Zeitraum und mit welcher Freisetzungsrate die BMP-Applikation idealerweise erfolgen sollte. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die PEG-Matrix die Zelladhäsion hemmt bzw. ob PEG im Knochendefekt eine Barriere für die Diffusion und Zellmigration darstellt und dadurch möglicherweise das Einwandern knochenbildender Zellen behindert.

## 6 Publikation

*J Clin Periodontol* 2014; 41: 820–826 doi: 10.1111/jcpe.12264

*Journal of*  
Clinical  
Periodontology

# Mandibular reconstruction using a calcium phosphate/polyethylene glycol hydrogel carrier with BMP-2

Rudolf M. Gruber<sup>1</sup>, Sebastian Krohn<sup>1</sup>, Corinna Mauth<sup>2</sup>, Michel Dard<sup>2,3</sup>, Aart Molenberg<sup>2</sup>, Katharina Lange<sup>4</sup>, Christina Perske<sup>5</sup> and Henning Schliephake<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Georgia Augusta University, Goettingen, Germany; <sup>2</sup>Institut Straumann, Basel, Switzerland; <sup>3</sup>Department of Periodontology and Implant Dentistry, College of Dentistry, New York University, New York, NY, USA; <sup>4</sup>Department of Medical Statistics, Georgia Augusta University, Goettingen, Germany; <sup>5</sup>Department of Pathology, Georgia Augusta University, Goettingen, Germany

Gruber RM, Krohn S, Mauth C, Dard M, Molenberg A, Lange K, Perske C, Schliephake H. Mandibular reconstruction using a calcium phosphate/polyethylene glycol hydrogel carrier with BMP-2. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 820–826. doi: 10.1111/jcpe.12264.

### Abstract

**Aim:** To test the hypothesis that a synthetic hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate (HA/TCP) construct combined with polyethylene glycol (PEG) hydrogel including recombinant human bone morphogenetic proteins-2 (rhBMP-2) enhances new bone formation compared with bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2) delivered using the HA/TCP construct alone.

**Material and Methods:** Bilateral mandibular partial thickness  $20 \times 8 \times 8$  mm (L  $\times$  W  $\times$  H) alveolar defects were surgically created in the edentulated posterior mandible in 18 female minipigs. Randomized into two groups of nine animals each, the alveolar defects either received HA/TCP or HA/TCP/PEG with or without BMP-2 (105  $\mu$ g/defect) in contra-lateral sites using a split-mouth design. Primary outcome, bone density (%) within four regions of interest, was evaluated following a 4-week healing interval when the animals were killed for histometric analysis.

**Results:** Bone morphogenetic proteins-2 loaded onto HA/TCP constructs significantly enhanced new bone formation compared with HA/TCP controls. Adding PEG apparently obstructed BMP-2 induced bone formation.

**Conclusion:** Polyethylene glycol compromises the osteogenic effect of BMP-2.

R.M. Gruber and S. Krohn contributed equally to this work.

**Key words:** bone morphogenetic protein 2; jawbone defects; maxillomandibular reconstruction; polyethylene glycol hydrogel

Accepted for publication 13 April 2014

The combination of synthetic carriers with osteoinductive bone morphogenetic proteins (BMPs) might be used as an alternative to autogenous bone in reconstructive surgery. Recombinant human BMP-2 (RhBMP-2) with an

absorbable collagen sponge (ACS) holds FDA approval (McKay et al. 2007, Thoma et al. 2010, de Freitas et al. 2013) and has promoted successful safe bone formation in pivotal studies (Howell et al. 1997, Cochran et al. 2000, Boyne et al. 2005, Fiorellini et al. 2005). Reported drawbacks include high loading of BMP factors compared to natural concentrations and a lack of mechanical strength (Barboza et al. 2000, Govender et al. 2002, Rengachary 2002, Schliephake 2010).

### Conflict of interest and source of funding statement

R. Gruber, S. Krohn, K. Lange, C. Perske, H. Schliephake declare that they have no conflict of interests. M. Dard is an employee of Institute Staumann AG, Basel, Switzerland. C. Mauth, A. Molenberg were employees of Institute Staumann AG, Basel, Switzerland.

The study has been funded by the Institut Straumann AG, Basel Switzerland. The study has been supported by the Commission for Technology and Innovation CTI of Switzerland No. 9201.1 PFLS-LS.

To overcome burst-release, BMP factors can be incorporated into mechanically stable, resorbable carriers; this slows release and retains bioactive factors, thereby preserving augmented volume (Valentin-Opran et al. 2002). RhBMP-2 has been used in concentrations of 0.5–1.5 mg/ml delivered on an ACS or demineralized bovine bone matrix (DBBM) for human alveolar ridge preservation (Thoma et al. 2010). In animal studies, carriers such as ACS, hydrogels, calcium phosphate or polylactide/polyglycolide were loaded with rhBMP-2 at a concentration >0.2 mg/ml (Jung et al. 2008a). In preclinical studies, hydrogel polyethylene glycol (PEG) in situ formed a relatively inert matrix that retains bioactive proteins. The authors pointed out that rhBMP-2 release could be controlled by its entrapment into the hydrogel and that rhBMP-2 was unlikely covalently bound to PEG (Lutolf et al. 2003, Jung et al. 2007a, Herten et al. 2009). To improve the mechanical stability of PEG, Jung et al. combined rhBMP-2 and PEG with a biphasic particulate carrier of hydroxyapatite (HA) and  $\beta$ -tricalcium phosphate (TCP) to fill titanium cylinders on the calvaria of rabbits (Jung et al. 2007b, 2008b).

This study aimed to transfer the combination of rhBMP-2 and PEG/ceramics from small defects in rabbits to jawbone defects in a large animal model and test the hypothesis that a synthetic block-shaped HA/TCP carrier (block) loaded with a reduced amount of rhBMP-2 (105  $\mu$ g per block) entrapped in a PEG hydrogel results in increased new bone formation compared to rhBMP-2 delivered on the HA/TCP carrier alone.

## Material and Methods

### Ethical statement

The animal study was approved by the Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety (LAVES; registration no.: 3314.42502-04-013/09). Animals were held in accordance with international and federal regulations governing animal husbandry (German Animal Welfare Act and Directive 2010/63/EU). The animal study was also approved by the committee on

animal welfare of the University of Goettingen. All the animals were observed throughout the study by two veterinaries for signs of pain or no-go criteria.

### Study design

Bilateral mandibular partial thickness  $20 \times 8 \times 8$  mm (L  $\times$  W  $\times$  H) alveolar defects were surgically created in the edentulated posterior mandible in 18 female adult Goettingen minipigs (Ellegard Goettingen minipigs ApS, Dalmose, Denmark; age: 2.3 years, SD 0.1; body weight (bw): 33.7 kg, SD 7.3; 6/2009–4/2010, University of Goettingen, Germany). Goettingen minipigs have proven to be a suitable model for experimental surgery (Rupprecht et al. 2003, Wang et al. 2007, Schliephake et al. 2010, Herring et al. 2012).

Randomized into two groups of nine animals each, the alveolar defects either received HA/TCP or HA/TCP/PEG with or without BMP-2 (105  $\mu$ g/defect) in contra-lateral sites using a split-mouth design. Primary outcome, bone density (%) within four regions of interest, was evaluated following a 4-week healing interval when the animals were euthanized for histometric analysis. The primary outcome variable was volume density of osteogenic tissue (VD) [%] within the four regions of interest (ROI). VD was defined as percentage of osteogenic bone within the ROIs.

### Sample size calculation

After two previous studies failed to show significance throughout the studies with a sample size ( $n = 6$ ; Gruber et al. 2008, 2009), the lowest sample size needed for statistical significance was estimated to be >6 (non-parametric, paired and unpaired samples). Therefore, to account for drop-outs, while minimizing the number of experimental animals, the sample size per main group was calculated to be  $n = 9$ , i.e. 18 animals in total.

### Synthetic block graft/PEG combination

Synthetic HA/TCP (60/40%) block material with dimensions of  $20 \times 8 \times 8$  mm (L  $\times$  W  $\times$  H) and a poros-

ity of 90–94% with interconnected pores of 100–500  $\mu$ m in diameter served as carriers. A PEG hydrogel was applied as carrier for the osteo-inductive rhBMP-2 (Antigenix, NY, USA, order no. HC70034). The PEG-based hydrogel formed by reaction of a 4-arm PEG with acrylate end groups (PEG A,  $M_n = 15$  kDa) and a linear PEG with propyl-thiol end groups (PEG B,  $M_n = 3.5$  kDa; Institut Straumann AG, Basel, Switzerland) in a triethanolamine-acetic acid buffer (Elbert et al. 2001, Jung et al. 2008b).

Four different implant materials were prepared using sterile equipment:

- (A1) Block: (HA/TCP);
- (A2) Block/BMP: (HA/TCP with 105  $\mu$ g rhBMP-2);
- (B1) Block/PEG: (HA/TCP filled with hydrogel);
- (B2) Block/PEG/BMP: (HA/TCP filled with hydrogel and 105  $\mu$ g rhBMP-2).

### Handling and preparation of the polyethylene glycol PEG hydrogel

Hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate carrier and PEG hydrogel were combined by dissolving 686 mg of PEG A in 6.00 ml of 0.04% (w/v) aqueous acetic acid and dissolving 356 mg of PEG B in 6.33 ml of 0.04% (w/v) aqueous acetic acid. Triethanolamine (0.10 M) served as activator solution.

For group B1, 136.5  $\mu$ l of each PEG A and PEG B solution per block, 672  $\mu$ l of sterile water and 105  $\mu$ l of activator solution were gently mixed and immediately added to the block which completely absorbed the liquid. To prepare group B2, 136.5  $\mu$ l each of PEG A and PEG B solution, 462  $\mu$ l of sterile water, 210  $\mu$ l of rhBMP-2 solution (500  $\mu$ g/ml) and 105  $\mu$ l of activator solution were mixed and added per block. For group A2, rhBMP-2 (105  $\mu$ g) was reconstituted in 1050  $\mu$ l sterile water and transferred to the block.

The carriers were transferred to sterile 50-ml test tubes with a 0.22  $\mu$ m TPFE filter in the cap allowing gas exchange (TubeSpin<sup>®</sup> Bioreactor 50; TPP, Trasadingen, Switzerland). The test tubes were

822 Gruber et al.

placed in an exsiccator which was heated to 37°C and depressurized gradually to 5 mbar over the course of 5 h, after which the blocks were left at 5 mbar and 25°C for another 15 h and, finally, were kept at 37°C once more under high vacuum conditions (<0.1 mbar) for 3 h. This procedure almost completely removed water without foaming and, in the process, enabled efficient gelation.

### Surgery

General anaesthesia was induced by intramuscular administration of azepalone (Stresnil®, Jansen; Neuss, Germany; 5 mg/kg bw) and intravenous injection of thiopental (Trapanal®, Byk-Gulden; Konstanz, Germany; 7 mg/kg bw). Inhalation anaesthesia was maintained with isoflurane (2%). Dipidolor (Janssen; 110 µg/kg bw per h) and ketamine (WDT; Garbsen, Germany; 2.5 mg/kg bw per h) were administered by intravenous injection. Carporfen (Rimadyl®, Pfizer, Berlin, Germany; 5 mg/kg bw) was administered intravenously pre-operatively and orally for 3 days postoperatively to alleviate post-operative pain. Perioperative antibiotic protection was provided by penicillin and streptomycin (Animedico®, Animedica; Senden-Boesensell, Germany; 40 mg penicillin/60 mg streptomycin/kg bw per day).

In an initial surgical procedure, all pre-molars and first molars were extracted on both sides of the mandible. All the minipigs were randomly assigned to one of the two main groups receiving different carrier materials: Group Block (A1, A2;  $n = 9$ ) and Group Block/PEG (B1, B2;  $n = 9$ ). Sixteen weeks after extraction, bilateral defects (20 × 8 × 8 mm) were created in the laterocranial part of the jawbone (Fig. 1). The mandible of each animal was then randomly divided into a test and control site (left or right) of these split-mouth augmentations. The surgeons implanted the blocks into the defects as randomly assigned before. Blocks were shaped by scalpels exactly according to the created defects.

Group "Block", test site: synthetic block graft HA/TCP loaded with rhBMP-2 (A2); contra-lateral control site: synthetic block graft HA/TCP alone (A1). Group "Block/PEG", test site: HA/TCP soaked with PEG and

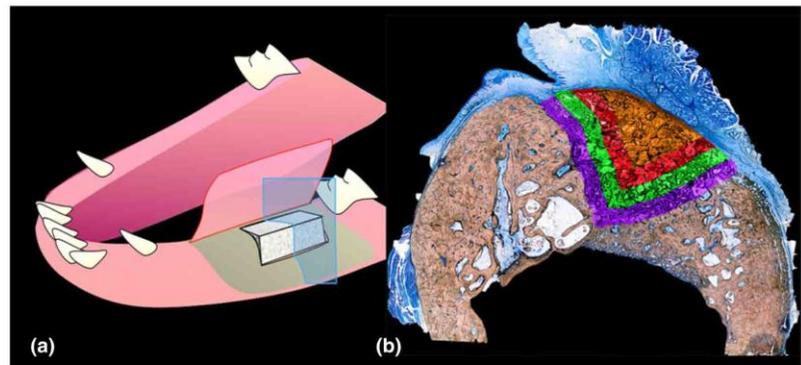


Fig. 1. (a) Defects measuring 20 × 8 × 8 mm were bilaterally created in the laterocranial part of the mandible. Orientation of the histological section in the central area is displayed as a blue plane. (b) Model of histological cross section of the augmented area. Regions of interests (ROIs) are displayed in different colours. ROI1 (blue): Region within 1 mm distance from defect walls (border native bone; 0 mm <  $x$  ≤ 1 mm); ROI2 (green): Region between ROI 1 and 2 mm distance to the defect walls (1 mm <  $x$  ≤ 2 mm); ROI3 (red): Region between ROI 2 and 3 mm distance to the defect walls (2 mm <  $x$  ≤ 3 mm); ROI4 (orange): Region at more than 3 mm distance to the two defect walls ( $x$  > 3 mm).

rhBMP-2 (B2), contra-lateral control site: HA/TCP soaked with PEG without osteoinductive factors (B1). Then, wound closure was performed (Vicryl R, 3x0; Ethicon, Norderstedt, Germany). The initial mucosa flap design unfortunately resulted in wound failure within 1 week. Therefore, all carriers were immediately and completely removed and, after a healing period of 4 months, the defects were re-created with identical dimensions (20 × 8 × 8 mm) and the augmentation was repeated with identical materials. Due to the long healing period and the short half-life of released rhBMP-2 ( $t_{1/2}$ : 10 min.), a biological effect of released BMP-2 factors of the first implantation can be excluded (Winn et al. 1999). The new mucosal flap design avoided posterior releasing incisions and wound healing was uneventful in the following course.

At the end of the 4-week observation period, the augmented segments of the jawbones were retrieved and fixated in 10% phosphate buffered, neutral formalin solution.

### Histology

Tissue blocks were infiltrated with composite resin (Technovit 9100; Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany) and cut to a thickness of 200 µm perpendicular to the axis of the jaw bone (Exakt, Norderstedt, Germany). Specimens were ground and polished to approximately 25 µm of thickness

(Donath & Breuner 1982). Up to 15 specimens of the central and lateral regions were obtained, two of each were used for histomorphometrical evaluation. Central regions were located in the middle of the two pins (Figs 1 and 2), whereas lateral sections (data not shown) were located at a maximum distance of 2 mm to the respective pins. Smith–Karagianes staining (methylene blue/alizarin red S) was performed for histological (Zeiss, Oberkochen, Germany) and histomorphometrical evaluation of new bone formation (Smith & Karagianes 1974).

### Histomorphometry

A Olympus dotSlide microscope with motorized X-Y table and digital camera controlled by the software dotSlide (Olympus, Hamburg, Germany) was used to generate digital coloured image at 20× magnification. AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany) was used for the histomorphometrical analysis, calibrated at a pre-defined distance.

To evaluate any increase or decrease VD as a percentage of new bone formation, depending on the distance to the native mandibular bone, four L-shaped ROI were defined (Fig. 1). The cross sections of the central and lateral augmentation ROIs were analysed. Each ROI was evaluated for VD [%] of newly formed bone tissue.

### Statistical analysis

As the distribution of the data was skewed, a normal distribution could not be assumed. Therefore, the data were evaluated using a non-parametric analysis of variance, as described by (Brunner & Langer 1999). The data were analysed with the macros F1\_LD\_F2 and F1\_LD\_F1, in the SAS software (SAS 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). To determine whether the influence of rhBMP-2 was homogenous in the two carriers (Block and Block/PEG), we analysed the data by a factorial non-parametric ANOVA and investigated a possible interaction between the carriers and the application of rhBMP-2. The data are presented as medians and 25% and 75% quartiles.

### Results

#### Handling and preparation

The combination of PEG/ceramics proved easy to handle and suitable for in situ application; the surgeon was able to shape the bone block post-reconstitution and achieve an optimal fit in the defect.

#### Clinical evaluation

Wound healing after teeth extraction was uneventful. Complete and normal healing without dehiscence was observed after the second augmentation with a different flap design avoiding posterior releasing cuts. During the entire study period, no adverse events affected the animals' health status.

#### Histological evaluation

Light microscopy clearly visualized the augmentation material (HA/TCP) with sparse signs of resorption. In some pores near the border to local bone (ROI1), a lining of new bone could be seen. In ROI3 and ROI4, no bone formation was observed, but pores were filled with fibrous soft tissue (Fig. 3a–c).

Histological staining in group A2 (Block/rhBMP-2) showed new bone formation across the whole augmentation volume, but no clear signs of carrier resorption. Native and newly formed bone were distinguishable. The pore surfaces were covered with trabecular bone. New bone formation was noted deep into the augmentation

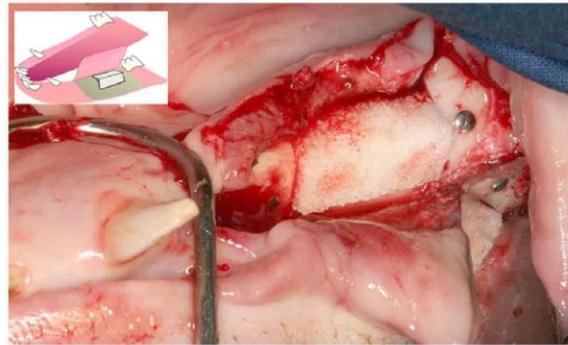


Fig. 2. Intraoperative image, the two pins were used to indicate the border of the augmentation (distance 1 mm). Block material was infiltrated with polyethylene glycol (PEG).

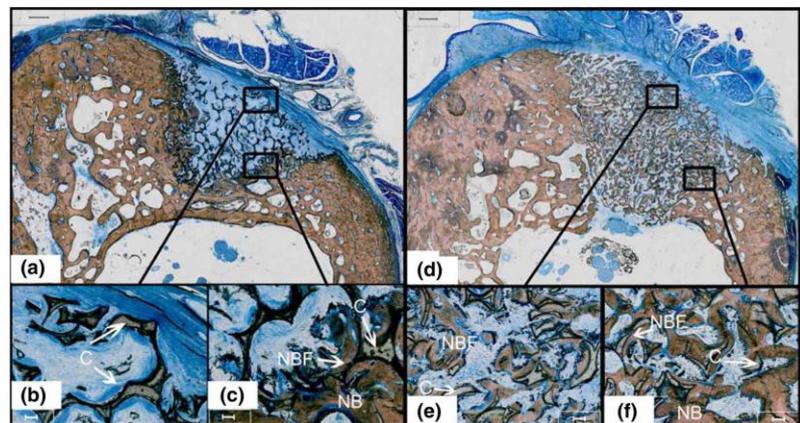


Fig. 3. (a) Histological cross section of central area of the carrier (HA/TCP). Scale bar: 1000  $\mu$ m, Smith–Karagianes staining. (b) Detail of ROI1: Osteoconductive new bone formation (NBF) adjacent to natural bone (NB) growing into the pores of the carrier material (C). Scale bar: 100  $\mu$ m. (c) Detail of ROI4: New bone formation is absent in ROI4 beneath the soft tissue. Scale bar 100  $\mu$ m. (d) Histological cross section of central area of the carrier (HA/TCP/BMP-2). Scale bar: 1000  $\mu$ m, Smith–Karagianes staining. (e) Detail of ROI4: New bone formation also in ROI4 beneath the mucosa (NBF) covering the pores of the carrier (C). Scale bar 100  $\mu$ m. (f) Detail of ROI1: New bone formation (NBF) covering the pores and almost sealing the whole the carrier material (C). Natural bone (NB) Scale bar: 100  $\mu$ m.

volume and extended into submucosa (ROI4; Fig. 3d–f).

Light microscopy of group B1 (Block/PEG) displayed native bone and carrier material. The material's framework appeared intact with no signs of resorption. In ROI1, a formation of cancellous immature bone within the pores of the augmentation material was seen (Fig. 4a–c). No submucosal new bone formation was identified.

In group B2 (Block/PEG/rhBMP-2), the augmentation material exhibited intact pores and hardly any resorption. New bone formation was predominantly located in ROI1 and 2

(Fig. 4d–f). Bone density within the carrier decreased from native bone to the augmentation surface. Newly formed bone in the outer regions, ROI3 and ROI4, appeared to have a lower density than group A2 (Block/rhBMP-2). No inflammatory reactions were identified in the different groups.

#### Histomorphometrical evaluation

##### Central region

Independent of augmentation material and presence of osteoinductive factor, the medians for bone volume density decreased from ROI1 to

ROI4 (Fig. 5). The medians in the Block group (A1, HA/TCP) decreased from 14% (12.8%; 16.7%) in ROI1 to 0% (0%; 0.3%) in ROI4. In the Block/rhBMP-2 augmentations (A2) volume density exhibited the highest median of 33% (20.2%; 39.7%) in ROI1, with a decrease to 13.6% (1.4%; 19.6%) in ROI4. Augmentations with Block/PEG (B1) showed medians decreasing from 21% (13.2%; 27.8%) in ROI1 to 0% (0%; 0.3%) in ROI4. The combination of this carrier with rhBMP-2 (B2) resulted in median values decreasing from 29% (19.7%; 36.2%) in ROI1 to 3.3% (2.1%; 5.7%) in ROI4. Statistical analysis revealed a significant interaction between the three statistical factors rhBMP-2, PEG and ROI ( $p = 0.024$ ).

In ROI1, statistics revealed no significant influence of the different carrier materials on the extent of bone formation (Block versus Block/PEG;  $p = 0.54$ ). In contrast to this finding, the application of rhBMP-2 showed a significant influence on the bone volume density in ROI1 (rhBMP-2 versus no rhBMP-2;  $p = 0.002$ ). In ROI2 and ROI3, the statistical evaluation showed a significant interaction. The addition of PEG significantly reduced the effect of rhBMP-2 on bone formation (ROI2:  $p = 0.011$ ; ROI3:  $p = 0.046$ ). In ROI4, statistics revealed a significant influence of rhBMP-2 addition on bone density, regardless of carrier material (rhBMP-2 versus no rhBMP-2;  $p < 0.0001$ ). Different carriers showed no significant differences with regard to bone formation (Block versus Block/PEG;  $p = 0.33$ ).

As the central and lateral region appear to generate closely similar results the data of the lateral evaluation were not shown.

## Discussion

This study aimed to assess bone formation in lateral and vertical augmentation procedures in the mandible of Göttingen minipigs using a combination of HA/TCP, PEG hydrogel and rhBMP-2. This same combination had been studied by Jung et al. (Jung et al. 2008b). Whereas Jung et al. applied HA/TCP granules, this study applied HA/TCP in block form, offering mechanical stability providing larger scaffolds with 3D

stable volumes compared to the granular form.

Our results of the histological and histomorphometrical evaluation confirmed those reported before (Jung et al. 2008b) and showed that

osteoconductive materials alone produce a decreasing gradient of bone formation with increasing distance to the native bone (Terheyden et al. 1999, Furst et al. 2003). With regard to gradient analysis, results were

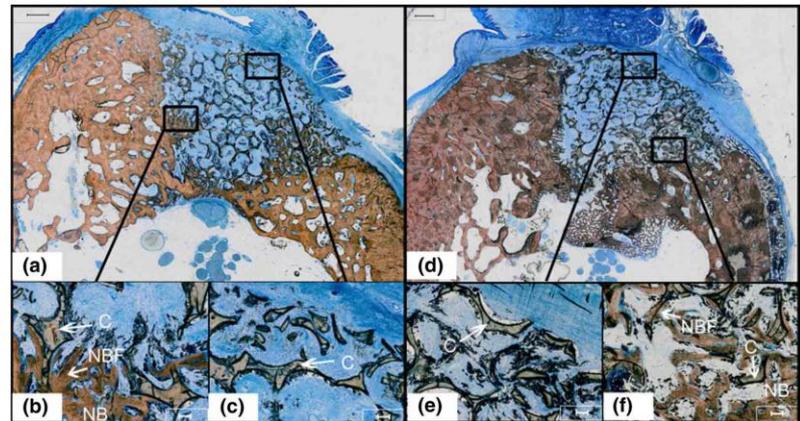


Fig 4. (a) Cross section of central area of the carrier (HA/TCP/PEG). Scale bar: 1000  $\mu\text{m}$ , Smith–Karagianes staining. (b) Detail of ROI1: Osteoconductive new bone formation (NBF) growth into the pores of the carrier (C) in contact with natural bone (NB). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (c) Detail of ROI4: In ROI4 beneath the soft tissue, new bone formation was not found. The carrier material appeared intact (C). No PEG remnants were identified. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . (d) Histological cross-section of the carrier (HA/TCP/PEG/BMP-2). Scale bar: 1000  $\mu\text{m}$ , Smith–Karagianes staining. (e) Detail of ROI4: Intact carrier material (C), but no new bone formation detectable. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . (f) Detail of ROI1: New bone formation (NBF) was found within the pores of carrier material (C). Newly formed bone is adjacent to native bone (NB). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

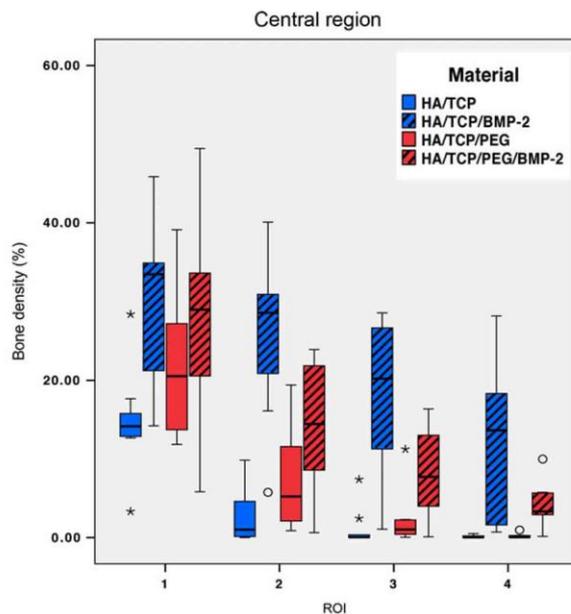


Fig. 5. Boxplots of the bone density (percent) of the central region of augmentation. Different materials are displayed in different colours.

comparable to those found in the curve-based evaluation of sinus lift procedures (Busenlechner et al. 2009). After 4 weeks, ingrowth of newly formed bone could only be found in ROI1 and sparsely in ROI2 in both central and lateral regions. Friedmann et al. reported comparable bone formation rates between 28.9% and 47.8% by using a particulate form of HA/TCP in a periodontal defect study in humans, also showing higher new bone formation closer to the native bone (Friedmann et al. 2009).

Several publications have reported the use of PEG hydrogel as degradable synthetic membrane in guided bone regeneration. Autogenous bone chips or HA/TCP granules were covered with a PEG hydrogel *versus* collagen membranes. Results showed a comparable vertical bone gain with no statistically significant differences between different groups (Jung et al. 2009). Although PEG was used as a co-delivery system with HA/TCP and not as a membrane, comparable results were found in this study: The histomorphometrical evaluation revealed comparable median new bone formation when HA/TCP was co-delivered with PEG (group B) or HA/TCP alone (group A).

Much research has focused on co-delivery of carrier with osteoinductive rhBMP-2 to promote bone formation (Nevins et al. 1996, Jung et al. 2008b, Wikesjo et al. 2008, Schliephake 2010). Now, rhBMP-2 appears to have the greatest osteoinductive properties in humans (Jung et al. 2008a, de Freitas et al. 2013). Entrapping rhBMP-2 in a PEG hydrogel in combination with a ceramic carrier might overcome the disadvantage of burst-released superficially adsorbed factors. In this study, the adsorption of rhBMP-2 onto the carrier impressively affected bone formation. The incorporation of rhBMP-2 within PEG combined with ceramic carrier significantly reduced bone formation. RhBMP-2 and PEG showed inferior bone formation compared to rhBMP-2 without PEG.

One possible explanation for PEG's effect on bone formation is that PEG hydrogels demonstrate lower degrees of cell attachment (Thoma et al. 2011). To improve cell and matrix adherence of PEG hydrogels, Lutolf et al. (2003) used an arginine-glycine-aspartate (RGD)

sequence motif mediating cell attachment, reporting an invasion rate of fibroblasts at 7  $\mu\text{m}/\text{h}$ , whereas no cell invasion was observed when the RGD-motif was absent. The release of BMP-2 from the PEG hydrogels by matrix degradation through MMP sensitivity was promoted *in vitro* by adding MMP-2. Critical size defects in the rabbit calvaria healed with PEG-RGD and BMP-2, but not with PEG and BMP-2 without RGD-motifs (Lutolf et al. 2003).

The present results obtained on a hydrolytically degrading PEG hydrogel suggest that the effect of PEG in relation to cell or matrix interference may overrule the osteoinductive effect of rhBMP-2. A modification of PEG with RGD sequences might improve the bioactive properties as reported by Thoma and co-workers and might lead to improved osteoinduction (Thoma et al. 2011).

One ancillary finding was that the combination of PEG/ceramics proved easy to handle and suitable for *in vivo* application. Several authors have appealed for clinical biomaterials to exhibit such properties (Lutolf et al. 2003).

One methodological strength of this study is the use of double-randomization (both into groups and split-mouth augmentations). One limitation was certainly that the defects had to be re-created due to initial wound failure, but which did not affect the results of the second implantation.

In conclusion, PEG compromises the osteogenic effect of BMP-2. The bone block material, as co-delivery with BMP-2 here, offers substantial potential for surgical mandibular augmentation, allowing successful cost-effective treatment without the additional risk associated with autografts.

#### Acknowledgements

Our special thanks are to Ursula Graf-Hausner (Zurich University of Applied Science, ZHAW, Zurich, Switzerland) for the constructive contributions and expertise.

#### References

- Barboza, E. P., Duarte, M. E., Geolas, L., Sorensen, R. G., Riedel, G. E. & Wikesjo, U. M. (2000) Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphoge-

netic protein-2 in the dog. *Journal of Periodontology* **71**, 488–496.

Boyne, P. J., Lilly, L. C., Marx, R. E., Moy, P. K., Nevins, M., Spagnoli, D. B. & Triplett, R. G. (2005) De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **63**, 1693–1707.

Brunner, E. & Langer, F. (1999) *Nichtparametrische analyse longitudinaler daten*. Oldenburg: Verlag Munich.

Busenlechner, D., Huber, C. D., Vasak, C., Dobsak, A., Gruber, R. & Watzek, G. (2005) Sinus augmentation analysis revised: the gradient of graft consolidation. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 1078–1083.

Cochran, D. L., Jones, A. A., Lilly, L. C., Fiorellini, J. P. & Howell, H. (2000) Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *Journal of Periodontology* **71**, 1241–1257.

Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**, 318–326.

Elbert, D. L., Pratt, A. B., Lutolf, M. P., Halstenberg, S. & Hubbell, J. A. (2001) Protein delivery from materials formed by self-selective conjugate addition reactions. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* **76**, 11–25.

Fiorellini, J. P., Howell, T. H., Cochran, D., Malmquist, J., Lilly, L. C., Spagnoli, D., Toljancic, J., Jones, A. & Nevins, M. (2005) Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *Journal of Periodontology* **76**, 605–613.

de Freitas, R. M., Susin, C., Spin-Neto, R., Marcantonio, C., Wikesjo, U. M., Pereira, L. A. & Marcantonio, E. Jr. (2013) Horizontal ridge augmentation of the atrophic anterior maxilla using rhBMP-2/ACS or autogenous bone grafts: a proof-of-concept randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **40**, 968–975.

Friedmann, A., Dard, M., Kleber, B. M., Bernimoulin, J. P. & Bosshardt, D. D. (2009) Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 708–714.

Furst, G., Gruber, R., Tangl, S., Zechner, W., Haas, R., Mailath, G., Sanroman, F. & Watzek, G. (2003) Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* **14**, 500–508.

Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M. G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R. L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reyniers, P., Rommens, P. M., Rondia, J., Rossouw, W. C., Dancel, P. J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T. A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seil-

- er, H., Snowdowne, R. B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A. & Wisniewski, T. (2002) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **84-A**, 2123–2134.
- Gruber, R. M., Ludwig, A., Merten, H. A., Achilles, M., Poehling, S. & Schliephake, H. (2008) Sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5): a histological and histomorphometric study in the Goettingen miniature pig. *Clinical Oral Implants Research* **19**, 522–529.
- Gruber, R. M., Ludwig, A., Merten, H. A., Pip-pig, S., Kramer, F. J. & Schliephake, H. (2009) Sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5): a pilot study in the Goettingen miniature pig comparing autogenous bone and rhGDF-5. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 175–182.
- Herring, S., Li, Y., Liu, Y., Liu, Z. J., Popowicz, T., Rafferty, K. & Wang, S. (2012) Oral biology and dental models. In: McNulty, P., Dayan, A., Ganderup, N. C. & Hastings, K. (eds.). *The minipig in biomedical research*, pp. 487–511. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Herten, M., Jung, R. E., Ferrari, D., Rothamel, D., Golubovic, V., Molenberg, A., Hammerle, C. H., Becker, J. & Schwarz, F. (2009) Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 116–125.
- Howell, T. H., Fiorellini, J., Jones, A., Alder, M., Nummikoski, P., Lazaro, M., Lilly, L. & Cochran, D. (1997) A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **17**, 124–139.
- Jung, R. E., Cochran, D. L., Domken, O., Seibl, R., Jones, A. A., Buser, D. & Hammerle, C. H. (2007a) The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research* **18**, 319–325.
- Jung, R. E., Hammerle, C. H., Kokovic, V. & Weber, F. E. (2007b) Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **22**, 258–266.
- Jung, R. E., Lecloux, G., Rompen, E., Ramel, C. F., Buser, D. & Hammerle, C. H. (2009) A feasibility study evaluating an in situ formed synthetic biodegradable membrane for guided bone regeneration in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **20**, 151–161.
- Jung, R. E., Thoma, D. S. & Hammerle, C. H. (2008a) Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 255–281.
- Jung, R. E., Weber, F. E., Thoma, D. S., Ehrbar, M., Cochran, D. L. & Hammerle, C. H. (2008b) Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clinical Oral Implants Research* **19**, 188–195.
- Lutolf, M. P., Weber, F. E., Schmoekel, H. G., Schense, J. C., Kohler, T., Muller, R. & Hubbell, J. A. (2003) Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature Biotechnology* **21**, 513–518.
- McKay, W. F., Peckham, S. M. & Badura, J. M. (2007) A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *International Orthopaedics* **31**, 729–734.
- Nevins, M., Kirker-Head, C., Nevins, M., Wozney, J. A., Palmer, R. & Graham, D. (1996) Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **16**, 8–19.
- Rengachary, S. S. (2002) Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurgical Focus* **13**, e2.
- Rupperecht, S., Merten, H. A., Kessler, P. & Wiltfang, J. (2003) Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects—an experimental study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* **31**, 149–153.
- Schliephake, H. (2010) Application of bone growth factors—the potential of different carrier systems. *Oral and Maxillofacial Surgery* **14**, 17–22.
- Schliephake, H., Hefli, T., Schlottig, F., Gedet, P. & Staedt, H. (2010) Mechanical anchorage and peri-implant bone formation of surface-modified zirconia in minipigs. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 818–828.
- Smith, L. G. & Karagianes, M. T. (1974) Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcified Tissue Research* **14**, 333–337.
- Terheyden, H., Jepsen, S., Moller, B., Tucker, M. M. & Rueger, D. C. (1999) Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clinical Oral Implants Research* **10**, 510–521.
- Thoma, D. S., Jones, A., Yamashita, M., Edmunds, R., Nevins, M. & Cochran, D. L. (2010) Ridge augmentation using recombinant bone morphogenetic protein-2 techniques: an experimental study in the canine. *Journal of Periodontology* **81**, 1829–1838.
- Thoma, D. S., Subramani, K., Weber, F. E., Luder, H. U., Hammerle, C. H. & Jung, R. E. (2011) Biodegradation, soft and hard tissue integration of various polyethylene glycol hydrogels: a histomorphometric study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **22**, 1247–1254.
- Valentin-Opran, A., Wozney, J., Csima, C., Lilly, L. & Riedel, G. E. (2002) Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **395**, 110–120.
- Wang, S., Liu, Y., Fang, D. & Shi, S. (2007) The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Diseases* **13**, 530–537.
- Wikesjo, U. M., Qahash, M., Polimeni, G., Susin, C., Shanaman, R. H., Rohrer, M. D., Wozney, J. M. & Hall, J. (2008) Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 1001–1010.
- Winn, S. R., Uludag, H. & Hollinger, J. O. (1999) Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (Suppl. 367), S95–S106.

## Address:

Rudolf M. Gruber  
 Department of Oral and Maxillofacial  
 Surgery  
 Georgia Augusta University  
 Robert-Koch-Str. 40, D-37075 Goettingen  
 Germany  
 E-mail: r.gruber@med.uni-goettingen.de

**Clinical Relevance**

*Scientific rationale for the study:* To test the hypothesis that a synthetic HA/TCP carrier with PEG hydrogel loaded with rhBMP-2 promotes new bone formation compared to rhBMP-2 delivered on the HA/TCP carrier alone.

*Principal findings:* The ceramic carrier alone (HA/TCP) or the combination of carrier with PEG-hydrogel (HA/TCP-PEG) does not appear to enhance osteogenic bone formation, whereas HA/TCP-supported BMP-2 induced bone formation, the PEG

formulation obstructed BMP-2-induced bone formation.

*Practical implications:* PEG hydrogel is not suitable for modifying a carrier/BMP combination in bone reconstruction to treat extensive defects in large animal models.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zoller JE, Kuebler AC (2008): Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep. *Oral Maxillofac Surg* 12(1),19-28
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998): Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139(2),663-70
- Albrektsson T (1980): The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br* 62(3),403-10
- Albrektsson T, Johansson C (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2,S96-101
- Allori AC, Sailon AM, Warren SM (2008): Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 14(3),259-73
- Arrabal PM, Visser R, Santos-Ruiz L, Becerra J, Cifuentes M (2013): Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system. *Biol Res* 46(4),421-9
- Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H, Dayan D (2001): Histopathological morphometric evaluation of 2 different hydroxyapatite-bone derivatives in sinus augmentation procedures: a comparative study in humans. *J Periodontol* 72(7),911-20
- Bach FH, Fishman JA, Daniels N, Proimos J, Anderson B, Carpenter CB, Forrow L, Robson SC, Fineberg HV (1998): Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat Med* 4(2),141-4
- Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M (2011): Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater* 27(1),61-70
- Barboza EP, Duarte ME, Geolas L, Sorensen RG, Riedel GE, Wikesjo UM (2000): Ridge augmentation following implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the dog. *J Periodontol* 71(3),488-96
- Baskin DS, Ryan P, Sonntag V, Westmark R, Widmayer MA (2003): A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERSTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate. *Spine (Phila Pa 1976)* 28(12),1219-24; discussion 1225
- Bauer TW, Muschler GF (2000): Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* (371),10-27
- Bell RB, Gregoire C (2009): Reconstruction of mandibular continuity defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2: a note of caution in an atmosphere of exuberance. *J Oral Maxillofac Surg* 67(12),2673-8
- Benglis D, Wang MY, Levi AD (2008): A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 62(5 Suppl 2),ONS423-31; discussion ONS431
- Benke D, Olah A, Mohler H (2001): Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials* 22(9),1005-12

- Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008): Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2(2-3),81-96
- Boakye M, Mummaneni PV, Garrett M, Rodts G, Haid R (2005): Anterior cervical discectomy and fusion involving a polyetheretherketone spacer and bone morphogenetic protein. *J Neurosurg Spine* 2(5),521-5
- Boyapati L, Wang HL (2006): The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant Dent* 15(2),160-70
- Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P (1997): A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 17(1),11-25
- Boyne PJ, Nakamura A, Shabahang S (1999): Evaluation of the long-term effect of function on rhBMP-2 regenerated hemimandibulectomy defects. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37(5),344-52
- Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG (2005): De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 63(12),1693-707
- Boyne PJ, Salina S, Nakamura A, Audia F, Shabahang S (2006): Bone regeneration using rhBMP-2 induction in hemimandibulectomy type defects of elderly sub-human primates. *Cell Tissue Bank* 7(1),1-10
- Brown KV, Li B, Guda T, Perrien DS, Guelcher SA, Wenke JC (2011): Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. *Tissue Eng Part A* 17(13-14),1735-46
- Brunner E, Langer F: Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten. R. Oldenbourg Verlag, München 1999
- Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, Dobsak A, Gruber R, Watzek G (2009): Sinus augmentation analysis revised: the gradient of graft consolidation. *Clin Oral Implants Res* 20(10),1078-83
- Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK (1998): Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 9(3),137-50
- Callan DP, Rohrer MD (1993): Use of bovine-derived hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: a human clinical and histologic case report. *J Periodontol* 64(6),575-82
- Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014): Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93(4),335-45
- Carter TG, Brar PS, Tolas A, Beirne OR (2008): Off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for reconstruction of mandibular bone defects in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 66(7),1417-25
- Chappard C, Berger G, Roux C, Laugier P (1999): Ultrasound measurement on the calcaneus: influence of immersion time and rotation of the foot. *Osteoporos Int* 9(4),318-26
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC (2003): Osteogenic activity of

- the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A(8),1544-52
- Cho YB, Moon SJ, Chung CH, Kim HJ (2011): Resorption of labial bone in maxillary anterior implant. *J Adv Prosthodont* 3(2),85-9
- Chow LC (2009): Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J* 28(1),1-10
- Chrastil J, Low JB, Whang PG, Patel AA (2013): Complications associated with the use of the recombinant human bone morphogenetic proteins for posterior interbody fusions of the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 38(16),E1020-7
- Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA (1999): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol* 70(2),139-50
- Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H (2000): Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 71(8),1241-57
- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005): Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36(7-8),609-16
- Donath K, Breuner G (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11(4),318-26
- Ducy P, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57(6),2207-14
- Elian N, Bloom M, Dard M, Cho SC, Trushkowsky RD, Tarnow D (2012): Radiological and micro-computed tomography analysis of the bone at dental implants inserted 2, 3 and 4 mm apart in a minipig model with platform switching incorporated. *Clin Oral Implants Res*
- Fishman JA, Scobie L, Takeuchi Y (2012): Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation. *Xenotransplantation* 19(2),72-81
- Friedman M, Cavins JF, Wall JS (1965): Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with Alpha Beta-Unsaturated Compounds. *Journal of the American Chemical Society* 87(16),3672-&
- Friedmann A, Dard M, Kleber BM, Bernimoulin JP, Bosshardt DD (2009): Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. *Clin Oral Implants Res* 20(7),708-14
- Frost HM (1989): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* (248),283-93
- Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G (2003): Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 14(4),500-8
- Geiger M, Li RH, Friess W (2003): Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 55(12),1613-29

- Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI (1988): Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* **255**(4 Pt 1),E416-21
- Glied AN, Kraut RA (2010): Off-label use of rhBMP-2 for reconstruction of critical-sized mandibular defects. *N Y State Dent J* **76**(4),32-5
- Glodek P, Bruns E, Oldigs B, Holtz W: Das Göttinger Minischwein - ein Laboriumstier mit weltweiter Bedeutung. *Züchtungskunde* **49**, 21-32 1977
- Groeneveld EH, Burger EH (2000): Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* **142**(1),9-21
- Gruber R, Weich HA, Dullin C, Schliephake H (2009): Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactic acid and rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* **20**(1),24-30
- Gruber RM, Ludwig A, Merten HA, Achilles M, Poehling S, Schliephake H (2008): Sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5): a histological and histomorphometric study in the Goettingen miniature pig. *Clin Oral Implants Res* **19**(5),522-9
- Gruber RM, Ludwig A, Merten HA, Pippig S, Kramer FJ, Schliephake H (2009): Sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5): a pilot study in the Goettingen miniature pig comparing autogenous bone and rhGDF-5. *Clin Oral Implants Res* **20**(2),175-82
- Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W (1998): [Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals]. *Orthopade* **27**(2), 105-17
- Hagel A, Zeh A, Hein W, Held A, Wohlrab D (2007): [Comparison of anterior lumbar fusion rates after circumferential fusion using beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) versus autologous iliac crest spongiosa]. *Z Orthop Unfall* **145**(4),488-92
- Hahn W, Klotz S, Gruber RM: Allgemeine und operative Grundlagen. Spitta, Balingen 2008
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M (2009a): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* **31**(12),1817-24
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M (2009b): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* **31**(12),1825-35
- Hänseler P, Jung UW, Jung RE, Choi KH, Cho KS, Hammerle CH, Weber FE (2012): Analysis of hydrolyzable polyethylene glycol hydrogels and deproteinized bone mineral as delivery systems for glycosylated and non-glycosylated bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater* **8**(1),116-23
- Hänseler P, Ehrbar M, Kruse A, Fischer E, Schibli R, Ghayor C, Weber FE (2014): Delivery of BMP-2 by two clinically available apatite materials: In vitro and in vivo comparison. *J Biomed Mater Res A*
- Hashimoto-Uoshima M, Ishikawa I, Kinoshita A, Weng HT, Oda S (1995): Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent* **15**(2),205-13
- Hausamen J, Reichart P, Becker J, Neukam F, Schliephake H: Curriculum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie präprothetische Chirurgie, orthopädische

- Chirurgie, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Tumorthherapie, Traumatologie, Distractionsosteogenese, plastische Chirurgie, Chirurgie des Kiefergelenks. Quintessenz-Verl., Berlin 2003
- Heino TJ, Kurata K, Higaki H, Vaananen HK (2009): Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling. *Technol Health Care* 17(1),49-56
- Henkel KO, Gerber T, Dietrich W, Bienengraber V (2004): [Novel calcium phosphate formula for filling bone defects. Initial in vivo long-term results]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(5),277-81
- Hennink WE, van Nostrum CF (2002): Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 54(1),13-36
- Herberg S, Siedler M, Pippig S, Schuetz A, Dony C, Kim CK, Wikesjo UM (2008): Development of an injectable composite as a carrier for growth factor-enhanced periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 35(11),976-84
- Herford AS (2009): RhBMP-2 as an option for reconstructing mandibular continuity defects. *J Oral Maxillofac Surg* 67(12),2679-84
- Herford AS, Boyne PJ (2008): Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg* 66(4),616-24
- Herford AS, Cicciu M (2010): Recombinant human bone morphogenetic protein type 2 jaw reconstruction in patients affected by giant cell tumor. *J Craniofac Surg* 21(6),1970-5
- Herford AS, Boyne PJ, Williams RP (2007): Clinical applications of rhBMP-2 in maxillofacial surgery. *J Calif Dent Assoc* 35(5),335-41
- Herford AS, Stoffella E, Tandon R (2011): Reconstruction of mandibular defects using bone morphogenetic protein: can growth factors replace the need for autologous bone grafts? A systematic review of the literature. *Plast Surg Int* 2011,165824
- Herten M, Jung RE, Ferrari D, Rothamel D, Golubovic V, Molenberg A, Hammerle CH, Becker J, Schwarz F (2009): Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Implants Res* 20(2),116-25
- Hofmann GO, Kirschner MH, Wagner FD, Land W, Bühren V (1997): Allogeneic vascularized grafting of a human knee joint with postoperative immunosuppression. *Arch Orthop Trauma Surg* 116(3),125-8
- Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6(4),432-8
- Horiuchi K, Yoshida S, Shohara E, Sugimura M (1988): Experimental study of xenogeneic osteogenesis using bovine sintered bone "true bone ceramic (TBC)" combined with bovine bone morphogenetic protein (bBMP). *Dtsch Zahnärztl Z* 43(1),93-6
- Hunt DR, Jovanovic SA, Wikesjo UM, Wozney JM, Bernard GW (2001): Hyaluronan supports recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone reconstruction of advanced alveolar ridge defects in dogs. A pilot study. *J Periodontol* 72(5),651-8
- Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE (1996): Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11(1),55-66

- Jensen SS, Broggin N, Weibrich G, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D (2005): Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(5),703-12
- Jensen SS, Broggin N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D (2006): Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 17(3),237-43
- Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, Degennes PG (1991): Protein Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide .1. Simplified Theory. *Journal of Colloid and Interface Science* 142(1),149-158
- Jung RE, Glauser R, Scharer P, Hammerle CH, Sailer HF, Weber FE (2003): Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. *Clin Oral Implants Res* 14(5),556-68
- Jung RE, Zwahlen R, Weber FE, Molenberg A, Van Lenthe GH, Hammerle CH (2006): Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 17(4),426-33
- Jung RE, Cochran DL, Domken O, Seibl R, Jones AA, Buser D, Hammerle CH (2007): The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 18(3),319-25
- Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hammerle CH (2008): Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implants Res* 19(2),188-95
- Kahnberg K-E (2008): Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants. *Journal (Issue)*
- Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T (2008): Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl* 23(3),197-212
- Kämmerer PW, Kumar VV, Brullmann D, Gotz H, Kann PH, Al-Nawas B, Klein MO (2013): Evaluation of ultrasound transmission velocity and 3-dimensional radiology in different bone types for dental implantology: a comparative ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 116(2),e77-84
- Keating JF, McQueen MM (2001): Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br* 83(1),3-8
- Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005): The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13(1),77-86
- Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS (2005): Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 26(15),2501-7
- Kim J, Hefferan TE, Yaszemski MJ, Lu L (2009): Potential of hydrogels based on poly(ethylene glycol) and sebacic acid as orthopedic tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng Part A* 15(8),2299-307
- Kingsley DM (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8(2),133-46

- Kinoshita Y, Maeda H (2013): Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications. *ScientificWorld Journal* **2013**,863157
- Kirker-Head CA (2000): Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **43**(1),65-92
- Klein CP, Driessen AA, De Groot K, Van Den Hooff A (1983): Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* **17**(5),769-84
- Kleinheinz J, Buchter A, Kruse-Losler B, Weingart D, Joos U (2005): Incision design in implant dentistry based on vascularization of the mucosa. *Clin Oral Implants Res* **16**(5),518-23
- Kohri M, Miki K, Waite DE, Nakajima H, Okabe T (1993): In vitro stability of biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **14**(4),299-304
- Koshino T, Murase T, Takagi T, Saito T (2001): New bone formation around porous hydroxyapatite wedge implanted in opening wedge high tibial osteotomy in patients with osteoarthritis. *Biomaterials* **22**(12),1579-82
- Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zoller JE (2004): Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent* **13**(2),171-9
- Kübler NR (1997): [Osteoinduction and -reparation]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **1**(1),2-25
- Kübler NR, Würzler KK, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (2000): [Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **4 Suppl 2**,S465-9
- Kübler NR, Will C, Depprich R, Betz T, Reinhart E, Bill JS, Reuther JF (1999): [Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogeneic bone tissue]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **3 Suppl 1**,S53-60
- Kulak CA, Dempster DW (2010): Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **54**(2),87-98
- Laffargue P, Hildebrand HF, Rtaimate M, Frayssinet P, Amoureux JP, Marchandise X (1999): Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone* **25**(2 Suppl),55S-58S
- Lee SH, Shin H (2007): Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* **59**(4-5),339-59
- Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjo UM (2008): Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: radiographic observations. *Clin Oral Implants Res* **19**(10),1027-33
- Li RH, Wozney JM (2001): Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* **19**(7),255-65
- Linder JE, Longhurst P, Johnson NW (1981): A paraffin-celloidin embedding method for studying soft-hard tissue interfaces. *Arch Oral Biol* **26**(9),753-5
- Liu L, Zhang L, Ren B, Wang F, Zhang Q (2003): Preparation and characterization of collagen-hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **31**(4),435-48
- Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B (2004): Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* **58**(2),197-208

- Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Muller R, Hubbell JA (2003): Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 21(5),513-8
- Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumar N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH (1989): Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264(23),13377-80
- Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F (2005): Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 25(1),19-25
- Malina D, Biernat K, Sobczak-Kupiec A (2013): Studies on sintering process of synthetic hydroxyapatite. *Acta Biochim Pol* 60(4),851-5
- Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R (2005): Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 8(4),277-84
- Mayer E (1910): Orthopädenkongress 1910. *Archiv für Orthopädie, Mechanotherapie und Unfallchirurgie* 8(3),382-394
- McAnulty PA: *The minipig in biomedical research*. CRC Press, Boca Raton 2012
- McKay WF, Peckham SM, Badura JM (2007): A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 31(6),729-34
- Mercier P, Bellavance F, Cholewa J, Djokovic S (1996): Long-term stability of atrophic ridges reconstructed with hydroxylapatite: a prospective study. *J Oral Maxillofac Surg* 54(8),960-8; discussion 968-9
- Misch CE, Dietsch F (1993): Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 2(3),158-67
- Mitri F, Alves G, Fernandes G, König B, Rossi AJ, Granjeiro J (2012): Cytocompatibility of porous biphasic calcium phosphate granules with human mesenchymal cells by a multiparametric assay. *Artif Organs* 36(6), 535-42
- Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001): Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71(6),354-61
- Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T (2010): Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 21(9),961-70
- Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A (1987): Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 40(6),318-22
- Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Sogaard CH, Franks AF, Stevens ML, Et Al. (1993): Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 14(3),379-82
- Moy PK, Lundgren S, Holmes RE (1993): Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 51(8),857-62
- Nafe R, Schlote W (2004): Histomorphometry of brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(4),315-28

- Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA (1999): Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000 19,74-86
- Nevins M, Kirker-Head C, Nevins M, Wozney JA, Palmer R, Graham D (1996): Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Periodontics Restorative Dent* 16(1),8-19
- Newman E, Turner AS, Wark JD (1995): The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16(4 Suppl),277S-284S
- Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC (1998): Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 18,118-23
- Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K (2000): Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 52(4),621-30
- Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, Ikeuchi M, Horiuchi K, Ichijima K, Sugimura M, Yonemasu K, Ohgushi H (2001): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artif Organs* 25(3),201-8
- Ollier L: *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production du tissu osseux*. 2 Partie clinique. Paris 1867
- Oltramari PV, De Lima Navarro R, Henriques JF, Taga R, Cestari TM, Ceolin DS, Janson G, Granjeiro JM (2007): Orthodontic movement in bone defects filled with xenogenic graft: an experimental study in minipigs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 131(3),302 e10-7
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6),595-610
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007): Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13,1-10
- Phillips JH, Rahn BA (1988): Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plast Reconstr Surg* 82(5),872-7
- Piattelli A, Scarano A, Mangano C (1996): Clinical and histologic aspects of biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) used in connection with implant placement. *Biomaterials* 17(18),1767-70
- Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, Bassi M, Donati D, Marchetti C (2008): Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 35(6),539-46
- Piesold JU, Merwald M, Braxein K, Pistner H (2004): [Rapid setting calcium phosphate cement for craniomaxillofacial surgery. 6 years experience]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(1),5-11
- Podenphant J, Gotfredsen A, Nilas L, Norgard H, Braendstrup O, Christiansen C (1986): Iliac crest biopsy: an investigation on certain aspects of precision and accuracy. *Bone Miner* 1(4),279-87
- Poehling S, Pippig SD, Hellerbrand K, Siedler M, Schutz A, Dony C (2006): Superior effect of MD05, beta-tricalcium phosphate coated with recombinant human

- growth/differentiation factor-5, compared to conventional bone substitutes in the rat calvarial defect model. *J Periodontol* 77(9),1582-90
- Polimeni G, Koo KT, Pringle GA, Agelan A, Safadi FF, Wikesjo UM (2008): Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res* 10(2),99-105
- Poynton AR, Lane JM (2002): Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 27(16 Suppl 1),S40-8
- Pruss A, Knaepler H, Katthagen BD, Frommelt L, European U (2005): [Consequence of European Directive 2004/23/EC for bone banks in Germany]. *Orthopade* 34(11),1160, 1162-6, 1168
- Ray RD, Ward AA, Jr. (1951): A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement. *Surg Forum*,429-34
- Razzouk S, Sarkis R (2012): BMP-2: biological challenges to its clinical use. *N Y State Dent J* 78(5),37-9
- Reddi AH, Wientroub S, Muthukumar N (1987): Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18(2),207-12
- Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W (1995): Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy. *J Biomed Mater Res* 29(10),1287-94
- Ripamonti U, Ma S, Reddi AH (1992): The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* 12(3),202-12
- Ritting AW, Weber EW, Lee MC (2012): Exaggerated inflammatory response and bony resorption from BMP-2 use in a pediatric forearm nonunion. *J Hand Surg Am* 37(2),316-21
- Rogers GF, Greene AK (2012): Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg* 23(1),323-7
- Roy DM, Linnehan SK (1974): Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature* 247(5438),220-2
- Rueger JM (1998): [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade* 27(2),72-9
- Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W (1996): Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem* 237(1),295-302
- Rupprecht S, Merten HA, Kessler P, Wiltfang J (2003): Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 31(3),149-53
- Sagawa H, Itoh S, Wang W, Yamashita K (2010): Enhanced bone bonding of the hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate composite by electrical polarization in rabbit long bone. *Artif Organs* 34(6),491-7
- Sailer HF, Weber FE (2000): [Bone substitutes]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 1,S384-91
- Saito N, Takaoka K (2003): New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24(13),2287-93
- Schliephake H (2010): Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14(1),17-22

- Schliephake H (2013): Clinical Efficacy of Growth Factors to Enhance Tissue Repair in Oral and Maxillofacial Reconstruction: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res*
- Schliephake H, Langner M (1997): Reconstruction of the mandible by prefabricated autogenous bone grafts. An experimental study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26(4),244-52
- Schliephake H, Neukam FW, Hutmacher D, Wustenfeld H (1995): Experimental transplantation of hydroxylapatite-bone composite grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 53(1),46-51; discussion 52
- Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S (2008): Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid-an experimental study in rats. *Biomaterials* 29(1),103-10
- Schliephake H, Hefti T, Schlottig F, Gedet P, Staedt H (2010): Mechanical anchorage and peri-implant bone formation of surface-modified zirconia in minipigs. *J Clin Periodontol* 37(9),818-28
- Schliephake H, Drewes M, Mihatovic I, Schwarz F, Becker J, Iglhaut G (2014): Use of a self-curing resorbable polymer in vertical ridge augmentations - a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 25(4),435-40
- Schmitz JP, Hollinger JO (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (205),299-308
- Schuckert KH, Osadnik M (2011): Bone tissue engineering in oral surgery: a new method of bone development in periodontal surgery. *Tissue Eng Part C Methods* 17(12),1179-87
- Schwartz Z, Weesner T, Van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, Carnes DL, Goldstein M, Dean DD, Boyan BD (2000): Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 71(8),1258-69
- Shetty V, Han TJ (1991): Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am* 35(3),521-30
- Shields LB, Raque GH, Glassman SD, Campbell M, Vitaz T, Harpring J, Shields CB (2006): Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 31(5),542-7
- Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, Fu E, Turek TJ, Jin L, Wozney JM, Wikesjo UM (1996): Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restorative Dent* 16(6),524-37
- Simunek A, Cierny M, Kopecka D, Kohout A, Bukac J, Vahalova D (2005): The sinus lift with phycogenic bone substitute. A histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 16(3),342-8
- Smith LG, Karagianes MT (1974): Histological Preparation of Bone to Study Ingrowth into Implanted Materials. *Calcified Tissue Research* 14(4),333-337
- Smucker JD, Rhee JM, Singh K, Yoon ST, Heller JG (2006): Increased swelling complications associated with off-label usage of rhBMP-2 in the anterior cervical spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 31(24),2813-9
- Sohier J, Daculsi G, Sourice S, De Groot K, Layrolle P (2010): Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 92(3),1105-14

- Soost F, Reissbauer B, Herrmann A, Neumann HJ (1998): [Natural coral calcium carbonate as alternative substitute in bone defects of the skull]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2(2),96-100
- Spector M (1994): Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. *Clin Plast Surg* 21(3),437-44
- Strub JR, Gaberthuel TW, Firestone AR (1979): Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J Periodontol* 50(12),624-9
- Stützle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L (1998): [Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]. *Orthopade* 27(2),118-25
- Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD (2001): Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res* 58(1),36-41
- Takaoka K, Koezuka M, Nakahara H (1991): Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9(6),902-7
- Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H (2011): Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J Bone Miner Metab* 29(4),442-8
- Terheyden H, Jepsen S, Rueger DR (1999): Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28(6),461-3
- Thoma DS, Halg GA, Dard MM, Seibl R, Hammerle CH, Jung RE (2009): Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 20(1),7-16
- Thoma DS, Schneider D, Mir-Mari J, Hammerle CH, Gemperli AC, Molenberg A, Dard M, Jung RE (2014): Biodegradation and bone formation of various polyethylene glycol hydrogels in acute and chronic sites in mini-pigs. *Clin Oral Implants Res* 25(4),511-21
- Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA (2005): Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 63(11),1626-33
- Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA (1991): Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117(10),1101-12
- Tumialan LM, Pan J, Rodts GE, Mummaneni PV (2008): The safety and efficacy of anterior cervical discectomy and fusion with polyetheretherketone spacer and recombinant human bone morphogenetic protein-2: a review of 200 patients. *J Neurosurg Spine* 8(6),529-35
- Turner AS (2001): Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1,66-81
- Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J (1999): Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46(2),193-202
- Urist MR (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(3698),893-9

- Urist MR, Strates BS (1971): Bone Morphogenetic Protein. *Journal of Dental Research* 50(6),1392-&
- Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R (1977): Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. *Arch Surg* 112(5),612-9
- Urist MR, Delange RJ, Finerman GAM (1983): Bone Cell-Differentiation and Growth-Factors. *Science* 220(4598),680-686
- Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, Hirota W, Lovell T, Schmalzreid T, Finerman GA (1987): Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop Relat Res* (214),295-304
- Vidal B, Pinto A, Galvao MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascao R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, Canhao H (2012): Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port* 37(4),294-300
- Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM (1988): Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24),9484-8
- Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM (1998): An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 8(1),1-9
- Wei G, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX (2007): The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 28(12),2087-96
- Weigel A, Schild D, Zeug A (2009): Resolution in the ApoTome and the confocal laser scanning microscope: comparison. *J Biomed Opt* 14(1),014022
- Weng D, Poehling S, Pippig S, Bell M, Richter EJ, Zuhr O, Hurzeler MB (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(1),31-7
- Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P (2002): Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* 63(2),115-21
- Winn SR, Uludag H, Hollinger JO (1999): Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl),S95-106
- Wozney JM (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32(2),160-7
- Wozney JM, Rosen V (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* (346),26-37
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885),1528-34
- Würzler KK, Heisterkamp M, Bohm H, Kubler NR, Sebald W, Reuther JF (2004): [Mandibular reconstruction with autologous bone and osseoinductive implant in the Gottingen minipig]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(2),75-82
- Yang JH, Kim HJ, Kim SE, Yun YP, Bae JH, Kim SJ, Choi KH, Song HR (2012): The effect of bone morphogenic protein-2-coated tri-calcium phosphate/hydroxy-

- apatite on new bone formation in a rat model of femoral distraction osteogenesis. *Cytotherapy* 14(3),315-26
- Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D (2001): Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16(1),23-33
- Younger EM, Chapman MW (1989): Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3(3),192-5
- Yuan H, De Bruijn JD, Zhang X, Van Blitterswijk CA, De Groot K (2001): Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J Mater Sci Mater Med* 12(9),761-6
- Zambuzzi WF, Fernandes GV, Iano FG, Fernandes Mda S, Granjeiro JM, Oliveira RC (2012): Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. *Braz Dent J* 23(4),315-21

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	<i>Modell des Kauapparates</i>	S.27
<b>Abb. 2:</b>	<i>Schematische Darstellung der Knochendefektpräparation</i>	S.28
<b>Abb. 3:</b>	<i>Unterkiefer nach Präparation des Knochendefektes</i>	S.28
<b>Abb. 4:</b>	<i>Unterkiefer nach Augmentation</i>	S.28
<b>Abb. 4:</b>	<i>Unterkieferdefekt in situ</i>	S.28
<b>Abb. 5:</b>	<i>Aufgefüllter Unterkieferdefekt in situ</i>	S.28
<b>Abb. 6:</b>	<i>Schematische Darstellung der Kieferentnahme</i>	S.30
<b>Abb. 7:</b>	<i>Darstellung des entnommenen Knochensegmentes</i>	S.30
<b>Abb. 8:</b>	<i>Darstellung der histologischen Präparate</i>	S.31
<b>Abb. 9:</b>	<i>Darstellung der analysierten Präparate</i>	S.32
<b>Abb. 10:</b>	<i>Darstellung der regions of interest</i>	S.34
<b>Abb. 11:</b>	<i>Ausschnitt aus einem histologischen Präparat</i>	S.35
<b>Abb. 12:</b>	<i>Keramikfragmente (rot) innerhalb desselben Präparates</i>	S.35
<b>Abb. 13:</b>	<i>Keramikfragmente (rot), Knochengewebe (grün) innerhalb desselben Präparates</i>	S.35
<b>Abb. 14:</b>	<i>Darstellung des Knochens nach Ausblendung von Keramik und Geweben, welche nicht in die Messung einbezogen wurden</i>	S.35
<b>Abb. 15:</b>	<i>Darstellung des histologischen Maßstabs</i>	S.36
<b>Abb. 16:</b>	<i>Darstellung der analysierten Präparate</i>	S.37
<b>Abb. 17:</b>	<i>Histologisches Präparat (Schwein 103 145 rechte UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe <b>A1</b> (Material: <b>HA/TCP</b> im Verhältnis 60%:40%); nach <b>4 Wochen</b> Beobachtungszeitraum</i>	S.39
<b>Abb. 18:</b>	<i>Histologisches Präparat (Minipig 103 697 linke UK-Seite); rein osteokonduktive Augmentationsgruppe <b>B1</b> (Material: <b>HA/TCP</b> im Verhältnis 60%:40% mit <b>PEG</b>); nach <b>4 Wochen</b> Beobachtungszeitraum</i>	S.40

- Abb. 19:** *Histologisches Präparat (Schwein 103 145 linke UK-Seite);* S.42  
*osteoinduktive Augmentationsgruppe A2*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit 105 µg rhBMP-2);*  
*nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum*
- Abb. 20:** *Histologisches Präparat (Minipig 103 697 rechte UK-Seite);* S.43  
*osteoinduktive Augmentationsgruppe B2*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40%*  
*mit PEG und 105 µg rhBMP-2); nach 4 Wochen*  
*Beobachtungszeitraum*
- Abb. 21:** *Darstellung der analysierten Präparate* S.44
- Abb. 22:** *Histologisches Präparat (Schwein 103 145 rechte UK-Seite);* S.46  
*rein osteokonduktive Augmentationsgruppe A1*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40%); nach 4 Wochen*  
*Beobachtungszeitraum*
- Abb. 23:** *Histologisches Präparat (Minipig 103 697 linke UK-Seite);* S.47  
*rein osteokonduktive Augmentationsgruppe B1*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit PEG);*  
*nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum*
- Abb. 24:** *Histologisches Präparat (Schwein 103 145 linke UK-Seite);* S.48  
*osteoinduktive Augmentationsgruppe A2*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40% mit 105 µg rhBMP-2);*  
*nach 4 Wochen Beobachtungszeitraum*
- Abb. 25:** *Histologisches Präparat (Minipig 103 697 rechte UK-Seite);* S.50  
*osteoinduktive Augmentationsgruppe B2*  
*(Material: HA/TCP im Verhältnis 60%:40%*  
*mit PEG und 105 µg rhBMP-2); nach 4 Wochen*  
*Beobachtungszeitraum;*

## 9 Tabellen- und Diagrammverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	<i>Randomisierte Zuteilung von Test- und Kontrollseite</i>	S.22
<b>Tab. 2:</b>	<i>Übersicht über den Versuchsablauf</i>	S.23
<b>Tab. 3:</b>	<i>Erläuterungen zur Einteilung der regions of interest</i>	S.33
<b>Diagramm 1:</b>	<i>Prozentuale Knochenneubildung nach 4 Wochen; mediale Augmentatregion;</i>	S.51
<b>Diagramm 2:</b>	<i>Prozentuale Knochenneubildung nach 4 Wochen; laterale Augmentatregion;</i>	S.54

# 10 Anhang

## 10.1 Histomorphometrische Daten

	Gruppe A1 102 978 li	Gruppe A1 103 072 li	Gruppe A1 103 145 re	Gruppe A1 103 200 re	Gruppe A1 103 428 li	Gruppe A1 103 468 re	Gruppe A1 103 557 re	Gruppe A1 103 640 li	Gruppe A1 103 677 re	Mittelwert	Standardabweichung
Zone 1	3,32	12,88	14,16	12,95	28,36	12,68	15,79	17,67	14,73	14,73	6,49
Zone 2	0,13	0,00	0,46	5,94	1,00	4,61	0,07	9,85	1,53	2,62	3,45
Zone 3	0,00	0,00	0,04	2,44	0,00	0,32	0,03	7,40	0,34	1,17	2,46
Zone 4	0,08	0,18	0,00	0,49	0,09	0,30	0,03	0,01	0,21	0,16	0,16

	Gruppe A2 102 978 re	Gruppe A2 103 072 re	Gruppe A2 103 145 li	Gruppe A2 103 200 li	Gruppe A2 103 428 re	Gruppe A2 103 468 li	Gruppe A2 103 557 li	Gruppe A2 103 640 re	Gruppe A2 103 677 li	Mittelwert	Standardabweichung
Zone 1	34,88	34,79	33,44	14,22	44,43	19,18	21,23	45,86	27,83	30,65	10,97
Zone 2	28,71	24,24	30,90	5,76	38,75	16,12	20,88	40,08	28,54	26,00	10,81
Zone 3	26,68	20,22	28,53	1,07	11,28	3,79	15,82	28,05	26,33	17,98	10,61
Zone 4	28,14	8,34	20,89	1,61	0,70	1,17	15,19	13,64	18,33	12,00	9,74

	Gruppe B1 77 435 li	Gruppe B1 77 641 li 6	Gruppe B1 103 475 li	Gruppe B1 103 697 li	Gruppe B1 103 733 li	Mittelwert	Standardabweichung
Zone 1	26,11	11,85	28,33	12,73	25,71	20,95	7,97
Zone 2	5,67	0,88	15,36	2,31	7,80	6,40	5,70
Zone 3	1,21	0,05	2,30	0,04	2,19	1,16	1,10
Zone 4	0,08	0,09	0,05	0,09	0,28	0,12	0,09

	Gruppe B2 77 435 re	Gruppe B2 77 641 re	Gruppe B2 102 712 re	Gruppe B2 103 251 li	Gruppe B2 103 364 re	Gruppe B2 103 475 re	Gruppe B2 103 697 re	Mittelwert	Standardabweichung
Zone 1	24,50	38,84	33,60	18,75	28,95	33,42	20,56	28,37	7,43
Zone 2	14,45	22,40	23,93	7,07	8,58	16,01	11,61	14,87	6,47
Zone 3	13,01	9,87	16,38	3,99	7,13	14,70	7,73	10,40	4,48
Zone 4	4,60	2,91	5,67	9,99	1,37	5,76	3,32	4,80	2,78

*Auflistung der Messwerte der medialen Präparate zur prozentualen Knochenneubildung nach 4 Wochen mit Mittelwerten und Standardabweichung*

	Gruppe A1 102 978 LI 0	Gruppe A1 102 978 LI 1	Gruppe A1 102 978 LI -1	Gruppe A1 103 072 LI 1	Gruppe A1 103 072 LI 2	Gruppe A1 103 072 LI 3	Gruppe A1 103 145 RE 1	Gruppe A1 103 145 RE 2	Gruppe A1 103 145 RE 3	Gruppe A1 103 200 RE 2	Gruppe A1 103 200 RE 3	Gruppe A1 103 200 RE 4	Gruppe A1 103 428 LI 0	Gruppe A1 103 428 LI -1	Gruppe A1 103 428 LI 2
Zone 1	15,58	16,50	17,89	18,75	9,89	9,07	44,40	33,18	33,42	14,25	10,59	9,46	39,64	27,81	31,40
Zone 2	0,32	1,13	0,73	0,41	0,29	0,32	5,88	6,96	2,70	5,48	2,90	1,99	5,01	4,08	0,81
Zone 3	0,00	0,00	0,00	0,07	0,31	0,14	0,66	0,00	0,00	2,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Zone 4	0,00	0,00	0,00	0,06	0,13	0,26	0,24	0,05	0,24	0,13	0,20	0,24	0,00	0,00	0,00
	Gruppe A1 103 468 RE 8	Gruppe A1 103 468 RE 9	Gruppe A1 103 468 LI -10	Gruppe A1 103 557 RE 5	Gruppe A1 103 557 RE 6	Gruppe A1 103 557 RE 7	Gruppe A1 103 640 LI 7	Gruppe A1 103 640 LI 8	Gruppe A1 103 640 LI 9	Gruppe A1 103 677 RE 1	Gruppe A1 103 677 RE 2	Gruppe A1 103 677 RE 3			
Zone 1	24,67	14,32	19,35	13,29	13,17	25,85	30,80	33,12	27,21	11,48	11,49	11,01			
Zone 2	6,62	1,15	2,11	0,10	0,12	1,42	6,56	5,88	4,13	3,79	2,69	1,75			
Zone 3	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,26	0,06	0,07			
Zone 4	0,14	0,00	0,08	0,00	0,15	0,00	0,46	0,31	0,21	0,07	0,06	0,29			
	Gruppe A1 Mittelwert	Gruppe A1 StabW													
Zone 1	21,02	10,26													
Zone 2	2,79	2,31													
Zone 3	0,17	0,54													
Zone 4	0,12	0,13													
	Gruppe A2 102 978 RE 0	Gruppe A2 102 978 RE 1	Gruppe A2 102 978 RE -1	Gruppe A2 103 072 RE 4	Gruppe A2 103 072 RE 5	Gruppe A2 103 072 RE 6	Gruppe A2 103 145 LI 1	Gruppe A2 103 145 LI 2	Gruppe A2 103 145 LI 3	Gruppe A2 103 200 LI 2	Gruppe A2 103 200 LI 3	Gruppe A2 103 200 LI 4	Gruppe A2 103 428 RE 7	Gruppe A2 103 428 RE 8	Gruppe A2 103 428 RE 9
Zone 1	42,33	52,22	44,27	53,34	53,48	46,46	22,50	21,32	22,99	21,31	15,29	14,16	37,16	39,04	39,23
Zone 2	26,28	28,36	28,13	34,30	33,75	32,22	20,31	24,95	24,09	9,96	10,03	7,24	24,68	32,67	38,75
Zone 3	21,59	26,80	24,46	21,06	28,17	28,40	20,54	24,93	23,77	4,98	1,02	0,10	11,01	19,15	21,91
Zone 4	20,27	22,51	11,87	4,12	7,89	16,78	14,50	23,03	25,29	5,94	0,70	0,00	8,19	9,04	9,92
	Gruppe A2 103 468 LI 13	Gruppe A2 103 468 LI 14	Gruppe A2 103 468 LI 15	Gruppe A2 103 557 LI 3	Gruppe A2 103 557 LI 4	Gruppe A2 103 557 LI 5	Gruppe A2 103 640 RE 1	Gruppe A2 103 640 RE 2	Gruppe A2 103 640 RE 3	Gruppe A2 103 677 LI 1	Gruppe A2 103 677 LI A 1	Gruppe A2 103 677 LI 3			
Zone 1	20,65	22,09	21,09	18,11	15,90	17,75	51,32	42,26	33,30	25,11	17,95	19,28			
Zone 2	19,18	13,58	13,01	12,78	13,61	15,42	34,02	30,71	23,15	27,60	18,46	26,32			
Zone 3	13,78	10,47	7,14	9,38	8,32	6,85	23,99	30,77	19,99	27,25	17,23	23,65			
Zone 4	11,64	5,56	1,56	10,81	9,38	12,90	12,63	16,94	9,82	18,62	11,02	16,86			
	Gruppe A2 Mittelwert	Gruppe A2 StabW													
Zone 1	30,74	13,53													
Zone 2	23,09	8,82													
Zone 3	17,66	8,96													
Zone 4	11,77	6,73													
	Gruppe B1 77 435 LI 7	Gruppe B1 77 435 LI 8	Gruppe B1 77 435 LI 9	Gruppe B1 77 641 LI 6	Gruppe B1 77 641 LI 7	Gruppe B1 77 641 LI 8	Gruppe B1 103 475 LI 5	Gruppe B1 103 475 LI 6	Gruppe B1 103 475 LI 7	Gruppe B1 103 697 LI -1	Gruppe B1 103 697 LI 2	Gruppe B1 103 697 LI -2	Gruppe B1 103 733 LI 5	Gruppe B1 103 733 LI 6	Gruppe B1 103 733 LI 7
Zone 1	32,21	37,66	23,10	16,12	15,58	20,63	17,86	19,57	12,59	9,98	10,64	14,01	27,15	24,28	26,83
Zone 2	8,42	7,98	3,10	0,13	0,36	0,32	6,45	6,21	3,09	1,49	1,71	1,16	17,71	11,01	4,68
Zone 3	2,65	1,27	0,02	0,00	0,02	0,07	5,70	0,53	0,77	0,00	0,15	0,00	0,70	6,99	0,38
Zone 4	1,05	0,35	0,12	0,09	0,00	0,29	0,75	0,20	0,13	0,90	0,57	0,30	0,00	1,27	0,09
	Gruppe B1 Mittelwert	Gruppe B1 StabW													
Zone 1	20,55	8,02													
Zone 2	4,92	4,89													
Zone 3	1,28	2,19													
Zone 4	0,41	0,41													
	Gruppe B2 77 435 RE 6	Gruppe B2 77 435 RE 8	Gruppe B2 77 435 RE 9	Gruppe B2 77 641 RE 0	Gruppe B2 77 641 RE 1	Gruppe B2 77 641 RE 2	Gruppe B2 102 712 RE -5	Gruppe B2 102 712 RE -5A	Gruppe B2 102 712 RE -6	Gruppe B2 103 251 LI 2	Gruppe B2 103 251 LI 3	Gruppe B2 103 251 LI 4	Gruppe B2 103 364 RE 1	Gruppe B2 103 364 RE -1	Gruppe B2 103 364 RE 2
Zone 1	30,87	19,57	30,30	42,12	35,03	40,03	32,48	18,41	34,07	15,43	17,29	17,00	28,70	24,55	23,98
Zone 2	19,56	13,24	16,00	30,23	31,48	31,95	29,26	24,12	23,14	13,58	10,66	10,14	16,24	10,67	6,20
Zone 3	13,67	16,15	15,58	19,18	19,63	18,93	17,25	25,58	31,13	7,57	4,98	6,26	12,52	12,78	3,08
Zone 4	8,56	4,67	5,43	19,03	9,76	8,12	6,86	16,14	17,70	13,57	9,41	11,70	5,74	4,45	1,24
	Gruppe B2 103 475 RE 3	Gruppe B2 103 475 RE 4	Gruppe B2 103 475 RE 5	Gruppe B2 103 697 RE 1	Gruppe B2 103 697 RE 2	Gruppe B2 103 697 RE 3									
Zone 1	23,68	24,31	25,00	23,95	21,89	18,68									
Zone 2	14,03	10,15	9,25	13,36	11,54	16,36									
Zone 3	9,99	11,81	8,05	8,98	6,54	4,18									
Zone 4	0,00	6,78	4,43	4,42	2,25	0,69									
	Gruppe B2 Mittelwert	Gruppe B2 StabW													
Zone 1	27,32	8,63													
Zone 2	19,10	8,70													
Zone 3	14,95	7,65													
Zone 4	9,49	5,22													

*Auflistung der Messwerte der lateralen Präparate zur prozentualen Knochenneubildung nach 4 Wochen mit Mittelwerten und Standardabweichung*