

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

**Knochenregeneration chronischer Knochendefekte
der porcinen *Maxilla* unter kombinierter
Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ aus
PDLLA/CaCO₃-*composite*-Granula**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dr. med. David Raschke

aus

Magdeburg

Göttingen 2020

Dekan:

Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Referent/in:

.....

Drittreferent/in:

.....

Datum der mündlichen Prüfung:

.....

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Knochenregeneration chronischer Knochendefekte der porcinen *Maxilla* unter kombinierter Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ aus PDLLA/CaCO₃-*composite*-Granula" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis..... | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Knochen | 2 |
| 1.2 Knochenentwicklung..... | 2 |
| 1.3 Anatomie und Embryologie des Schädels | 3 |
| 1.4 Knochenhistologie | 3 |
| 1.5 Knochenstoffwechsel..... | 4 |
| 1.6 Knochenheilung..... | 5 |
| 1.7 <i>Critical size defect</i> | 6 |
| 1.8 Gewebeersatz und Geweberegeneration..... | 6 |
| 1.9 Knochenaugmentation | 7 |
| 1.9.1 Autologe Knochentransplantation | 9 |
| 1.9.2 Allogene Knochentransplantation..... | 10 |
| 1.9.3 Xenogene Knochentransplantation | 11 |
| 1.9.4 Alloplastisches Knochenersatzmaterial | 11 |
| 1.10 <i>Guided bone regeneration (GBR)</i> | 14 |
| 1.11 Trägermaterialien von Wachstumsfaktoren | 14 |
| 1.12 Wachstumsfaktoren | 15 |
| 1.12.1 <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i> | 15 |
| 1.12.2 <i>Bone morphogenetic protein (BMP)</i> | 17 |
| 2 Material und Methoden..... | 21 |
| 2.1 Versuchsaufbau | 21 |
| 2.2 Herstellung und Beladung der PDLLA/ CaCO_3 - <i>composite</i> -Granula mit Wachstumsfaktoren..... | 21 |
| 2.3 Tierversuchsablauf | 22 |
| 2.4 Schliffpräparate und Färbungen..... | 24 |
| 2.4.1 Digitalisierung der Präparate..... | 26 |
| 2.4.2 Histomorphometrie | 26 |
| 2.4.3 Statistische Auswertung..... | 28 |
| 2.4.4 Auswertungsmethoden der Histomorphometrie..... | 28 |
| 3 Ergebnisse | 30 |
| 3.1 Klinische Ergebnisse | 30 |
| 3.2 Deskriptive histologische Untersuchung | 30 |
| 3.3 Auswertung | 41 |
| 4 Diskussion | 42 |
| 4.1 Versuchsaufbau | 42 |

| | | |
|-----|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2 | Histologische Untersuchung und Histomorphometrie | 44 |
| 4.3 | Ergebnisse..... | 45 |
| 4.4 | Verwendung von Wachstumsfaktoren | 47 |
| 4.5 | Trägermaterialien | 50 |
| 4.6 | Ausblick..... | 51 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 52 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 53 |
| 7 | Genehmigungsnachweise | 62 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Knochenaufbau..... | 4 |
| Abb. 2: VEGF Signaltransduktion..... | 17 |
| Abb. 3: TGF- β Signaltransduktionsweg..... | 20 |
| Abb. 4: Operationssitus zum Zeitpunkt der Defektsetzung..... | 23 |
| Abb. 5: Operationssitus zum Zeitpunkt der Augmentation | 24 |
| Abb. 6: Toluidinblaufärbung | 27 |
| Abb. 7: Binärbilder | 28 |
| Abb. 8: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Blank-vier-Wochen-Kohorte..... | 30 |
| Abb. 9: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Blank-13-Wochen-Kohorte | 31 |
| Abb. 10: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Leer-vier-Wochen-Kohorte..... | 31 |
| Abb. 11: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte..... | 32 |
| Abb. 12: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhBMP-2-13-Wochen-Kohorte..... | 32 |
| Abb. 13: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhVEGF- A_{165} & rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte..... | 33 |
| Abb. 14: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhVEGF- A_{165} & rhBMP-2-13-Wochen-Kohorte..... | 34 |
| Abb. 15: Detailaufnahme eines Präparates der rhVEGF- A_{165} & rhBMP-2-13 Wochen-Kohorte | 34 |
| Abb. 16: Darstellung des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zum Zeitpunkt t =vier Wochen. | 38 |
| Abb. 17: Darstellung des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zum Zeitpunkt t =13 Wochen..... | 38 |
| Abb. 18: Darstellung der Fläche des neugebildeten Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t_1 = vier Wochen. | 39 |
| Abb. 19: Darstellung der Gesamtfläche des Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t_1 = vier Wochen. | 40 |
| Abb. 20: Darstellung der Fläche des neugebildeten Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t_2 = 13 Wochen. | 40 |
| Abb. 21: Darstellung der Gesamtfläche des Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t_2 = 13 Wochen. | 41 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 1: Übersicht der Knochenersatzmaterialien (nach Fernandez de Grado et al. 2018) | 8 |
| Tab. 2: Übersicht der Transplantateigenschaften autologen Knochengewebes nach Typen (nach Khan et al. 2005) | 8 |
| Tab. 3: Übersicht der alloplastischen Knochenersatzmaterialien (nach Smeets et al. 2014) | 12 |
| Tab. 4: Übersicht der verschiedenen BMPs und ihrer Eigenschaften (nach Xiao et al. 2007) . | 18 |
| Tab. 5: Futtermaterial Göttinger Minischwein..... | 21 |
| Tab. 6: Ablauf Toluidinblau Färbung | 25 |
| Tab. 7: Ablauf Smith-Karagianes Färbung..... | 26 |
| Tab. 8: Deskriptive Statistik der Gesamtfläche und der Fläche neugebildeter Knochen separat für jeden Prüfkörper und Zeitpunkt. | 35 |
| Tab. 9: ANOVA-Ergebnisse des Vergleichs der Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens zwischen den Prüfkörpern zu jedem Zeitpunkt. | 36 |
| Tab. 10: Ergebnisse des paarweisen Prüfkörpervergleichs zum Zeitpunkt 13 Wochen. | 36 |
| Tab. 11: Mann-Whitney-U-Test Ergebnisse des Vergleichs der Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens zwischen Zeitpunkt vier Wochen und 13 Wochen separat für jeden Prüfkörper..... | 37 |
| Tab. 12: Deskriptive Statistik für das Verhältnis der Fläche des neugebildeten Knochens zur Gesamtfläche (%) separat für jeden Prüfkörper und Zeitpunkt..... | 37 |
| Tab. 13: ANOVA-Ergebnisse der Fläche des Vergleichs der Fläche des neugebildeten Knochens/Gesamtfläche (%) - zwischen den Prüfkörpern zu jedem Zeitpunkt..... | 39 |
| Tab. 14: Mann-Whitney-U-Test Ergebnisse des Vergleichs der Fläche des neugebildeten Knochens/Gesamtfläche (%) - zwischen den Zeitpunkten vier Wochen und 13 Wochen separat für jeden Prüfkörper..... | 39 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|------------------------------------------------------|
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| GBR | <i>guided bone regeneration</i> |
| ICBM | <i>insoluble collagenous bone matrix</i> |
| PDLLA | <i>poly-D-L-lactic acid</i> |
| PLLA | <i>poly-L-lactid acid</i> |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| rh | <i>recombinat human</i> |
| ROI | <i>region of interest</i> |
| TGF- β | <i>transforming growth factor-β</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGFR | <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> |

1 Einleitung

Seit Menschengedenken existieren Traumata, Tumore, Fehlbildungen und andere pathologische Zustände, die zum Verlust von Geweben führen. Der Ersatz amputierter Extremitäten ist bereits im alten Ägypten 1550-700 v. Chr. belegt (Nerlich et al. 2000). Gliedmaßen in Grabbeigaben aus Holz, Elfenbein oder Bronze zeugen vom frühen Wunsch der Menschheit funktionelle und ästhetische Defizite Betroffener zu lindern. Über Jahrhunderte war die Gliedmaßenprothese die einzige Möglichkeit fehlende Extremitäten zu ersetzen. Erst die Fortschritte der Chirurgie bei Antiseptik und Anästhesie machten größere Operationen mit Gewebeerhalt und Knochenersatz möglich (Hamilton 1982; Robinson und Toledo 2012). Anfang des 19. Jahrhunderts wurden in der Literatur die ersten autologen Knochentransplantationen beschrieben (de Boer 1988). Heute stellt die knöcherne Rekonstruktion des Gesichtsschädels bei Tumor, Trauma, kongenitaler Fehlbildung und Atrophie eine der zentralen Aufgaben der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie dar. Wie schon vor 3500 Jahren können funktionelle oder ästhetische Einschränkungen für Patienten zu psychosozialen Problemen führen. Die vollständige *restitutio ad integrum* soll daher durch möglichst einfache, schnelle, schonende und kosteneffiziente Verfahren erreicht werden.

Einen möglichen Therapieansatz können alloplastische Trägermaterialien bieten, deren osteokonduktive Eigenschaften durch Zugabe von Wachstumsfaktoren um osteoinduktive Funktionen ergänzt werden. Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass mit Wachstumsfaktoren (rhBMP und rhVEGF) CO₂-begaste Polylactid/Kalziumkarbonat-Granula gute Ergebnisse in Hartgeweberekonstruktion akuter Knochendefekte des Alveolarfortsatzes erzielen können.

Ziel der vorliegenden Pilotstudie im Großtiermodell war es zu untersuchen, ob durch die Kombination von rhBMP-2 mit rhVEGF-A₁₆₅ CO₂-begaster Polylactid/Kalziumkarbonat-Träger bei Reduktion der Dosis der Wachstumsfaktoren ähnliche Ergebnisse in der Regeneration eines kritischen, chronischen Knochendefekts zu erzielen sind, wie bei der alleinigen Hochdosisanwendung von rhBMP-2 CO₂-begasten Polylactid/Kalziumkarbonat-Trägern

1.1 Knochen

Der Knochen ist neben den Zähnen als Hartschubstanz Bestandteil des menschlichen Körpers. Er dient als Skelett der Stützfunktion des Körpers. Als Ansatz für Muskeln und Sehnen macht er Hebelwirkungen und somit Bewegung möglich. Zentrales Nervensystem, Thoraxorgane und Knochenmark werden durch den Knochen vor mechanischem Einfluss geschützt (Pschyrembel 2014).

1.2 Knochenentwicklung

Die Bildung des menschlichen Skeletts, die Knochenheilung nach Frakturen, das Knochenwachstum und die pathologische Verknöcherung wird als Ossifikation bezeichnet und findet desmal oder chondral statt (Drenckhahn und Kugler 2003). Der desmalen Ossifikation unterliegen das Schädeldach, die Clavicula und Teile des Gesichtsschädels (Drenckhahn und Kugler 2003). Hierbei entsteht der primäre Geflechtknochen direkt aus mesenchymalem Bindegewebe. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Gewebeerdichtung die Differenzierung von Osteoblasten aus Mesenchymzellen induziert wird. Durch Ausschüttung von Tropokollagen, Proteoglykanen und Ca^{2+} und PO^{4-} Ionen kommt es zur Verkalkung des Bindegewebes und schließlich zur Ausbildung von Kalziumhydroxylapatit. Mehrere parallel entstehende Ossifikationszentren bilden Knochenbälkchen die sich zur Spongiosa vereinigen (Welsch und Deller 2010a).

Die chondrale Ossifikation läuft über einen Zwischenschritt ab. Zunächst wird aus mesenchymalem Bindegewebe ein Primordialskelett aus hyalinem Knorpel gebildet. Chondroklasten bauen im weiteren Verlauf das Knorpelgerüst ab, einwandernde Osteoblasten ersetzen dieses durch Knochenmatrix. Es werden zwei Arten der chondralen Knochenbildung unterschieden: die enchondrale und die perichondrale Ossifikation (Drenckhahn und Kugler 2003). Im Rahmen der enchondralen Ossifikation ermöglicht das Einsprossen von Blutgefäßen in die Epiphysenfugen, dass Mesenchymzellen einwandern und sich zu Chondroklasten zu differenzieren. Die durch deren Aktivität entstehenden Lakunen werden von einwandernden Osteoblasten mit Osteoid aufgefüllt, wodurch beispielsweise das Längenwachstum der Röhrenknochen im Bereich der Epiphysenfugen erreicht wird. Bei der perichondralen Ossifikation lagern sich im Bereich der Diaphyse Osteoblasten am Perichondrium an und bilden zentrifugal Knochenmatrix, wodurch es zum Dickenwachstum des Knochens kommt.

Sowohl desmale als auch chondrale Ossifikation bringen zunächst Geflechtknochen hervor, der im Rahmen der folgenden Umbauprozesse in Lamellenknochen umgewandelt wird (Drenckhahn und Kugler 2003).

Diese fortwährenden Umbauvorgänge des Skeletts werden als *turnover* bezeichnet und sind durch physikalische und biochemische Einflüsse gesteuert. Während der Kindheit und Adoleszenz kommt es durch Modellierung zum Aufbau des Skelettsystems. Auch beim Erwachsenen kommen die Umbauprozesse nicht zum Erliegen, sondern passen durch Remodellierung den Knochen zeitlebens an physikalische Anforderungen und die Stoffwechsellage an.

1.3 Anatomie und Embryologie des Schädels

Der menschliche Schädel besteht aus etwa 22 funktions- und formgebenden Knochen, die, bis auf Mandibula und Zungenbein, miteinander verbunden sind. Cranial der Schädelbasis liegt das Neurokranium, caudal das Viszerokranium. Das Neurokranium dient dem Schutz des zentralen Nervensystems. Das Viszerokranium bildet den Gesichtsschädel und dient unter anderem der Mastikation (Fanghänel et al. 2003).

In der Embryonalphase bildet sich durch Kondensation mesenchymaler Zellen und Umwandlung in chondrales Gewebe ein Stützgerüst, dessen Form dem späteren Skelett entspricht. Die Mehrzahl der Knochen wird durch diese chondrale, indirekte Ossifikation gebildet, wohin gegen der Gesichtsschädel überwiegend durch desmale Ossifikation entsteht (Drenckhahn und Kugler 2003).

Es wird davon ausgegangen, dass die rasche Expansion des Cerebrums für eine Krümmung des embryonalen Schädels verantwortlich ist, wodurch ventral die Gesichtswülste entstehen. Embryologisch entsteht das Viszerokranium aus der Neuralleiste, woraus der unpaarige Stirnwulst und die paarigen Ober- und Unterkieferwülste hervorgehen. Diese bilden in der weiteren Entwicklung die Mundhöhle. Infolge der Interaktion von Ektomesenchym und ektodermalem Epithel entstehen durch desmale Ossifikation die Gesichtsknochen. Die Ossifikationzentren der *Maxilla* liegen paarig und korrelieren mit den Foramina der *Nervi infraorbitales, palatini* und *incisivi* (Fröhlich und Nagel 2015).

1.4 Knochenhistologie

Der Knochen besteht aus einer anorganischen und organischen Matrix, deren Wechselwirkung ihm seine Eigenschaften wie Stabilität, Stützfunktion, Schutz innerer Organe aber auch Stoffwechselaktivität verleihen. Er dient als Speicher für Kalzium und Phosphationen und ist so entscheidend an der Kalziumhomöostase beteiligt. Circa 55 % des Knochens sind anorganische Mineralien, hauptsächlich Kalzium-Hydroxylapatit. 25 % der Knochenmasse werden durch organische Substanzen wie Kollagen, vor allem Kollagen Typ 1, Proteoglykane, Glykoproteine beispielsweise Osteonektin, Osteopontin und spezifischen Zellen, wie

Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten gebildet, etwa 10-20 % macht der Wasseranteil aus (Drenckhahn und Kugler 2003).

Histologisch kann Lamellen- und Geflechtknochen unterschieden werden. Bei der desmalen Ossifikation und Frakturheilung über Kallusbildung entsteht Geflechtknochen. Er ist zellreich, wenig mineralisiert und die Kollagenfasern liegen ungeordnet in der Matrix. Durch Osteoklastenaktivität entsteht ein Resorptionskanal an dessen Wand sich Osteoprogenitorzellen anlagern und zu Osteoblasten differenzieren. Das von den Osteoblasten gebildete Osteoid mineralisiert und bildet konzentrische Knochenlamellen, bis der Resorptionskanal auf Kapillarengöße, dem sogenannten Haverskanal, eingengt ist. Die räumliche Anordnung dieser Osteone gibt dem Lamellenknochen seinen Namen und mechanische Festigkeit.

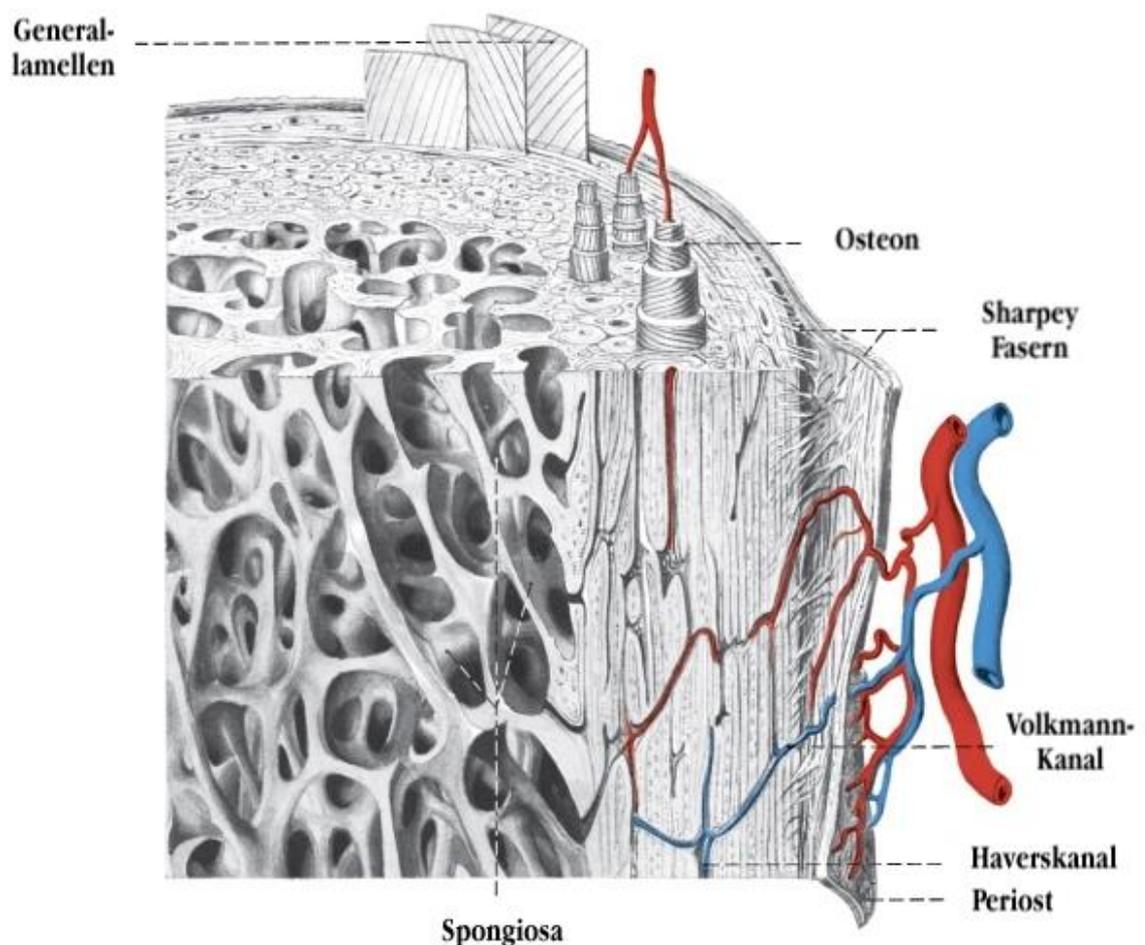


Abb. 1: Knochenaufbau

(modifiziert nach Welsch und Deller 2010b, mit freundlicher Genehmigung der Elsevier GmbH, Urban & Fischer)

1.5 Knochenstoffwechsel

Der Knochen ist komplexen hormonellen und physikalischen Steuerungsmechanismen unterworfen. Unter dem Einfluss von Parathormon, Calcitonin, Vitamin D und

Wachstumsfaktoren kommt es zur Mineralisierung und zum Knochenaufbau. Mikrotrauma und mechanische Beanspruchung sorgen für Resorption und Umbau der Knochenstruktur. Als Speichermedium von Kalzium und Phosphationen trägt das Skelett entscheidend zur Kalzium/Phosphat Homöostase bei. 99 % des Kalziums sind im Knochen gebunden, nur 1 % liegt im Serum in löslicher Form vor. Bei Bedarf kann Kalzium aus dem Knochen herausgelöst und so dem Organismus zur Verfügung gestellt werden. Der physiologische Zustand des Knochenauf- und Knochenabbaus wird als *coupling* bezeichnet und beträgt circa 2-10 % der Knochenmasse pro Jahr. Störungen dieses Geschehens führen zu pathologischen Veränderungen, wie Osteopenie, Osteoporose oder Osteodystrophien.

1.6 Knochenheilung

Durch die Mechanismen des oben beschriebenen *coupling* erklärt sich die besondere Eigenschaft des Knochens, im Gegensatz zu anderen Geweben, nach Verletzung eine vollständige Heilung ohne Bildung von Ersatzgewebe, wie zum Beispiel Narben, zu erreichen. Physiologisch folgt die Knochenheilung den Gesetzmäßigkeiten der desmalen Ossifikation und läuft wie folgt in vier Phasen ab (Carano und Filvaroff 2003):

Phase der Inflammation: Die frakturbedingte Gewebeerstörung mit Schädigung von Knochen, Periost und Weichgewebe löst durch Zerreißen der Gefäße eine Blutung und Nekrose im Bereich der Frakturrenden aus (McKibbin 1978). In der initialen Entzündungsphase wird dieser Frakturspalt innerhalb von einigen Minuten von einem Hämatom umgeben. Das Weichgewebe zeigt die Zeichen einer Entzündungsreaktion mit Vasodilatation und Exsudation von Plasmazellen und Leukozyten. Mastzellen und Makrophagen beginnen die Phagozytose des Debris (McKibbin 1978). Aus dem Knochenmark stammende Thrombozyten, Makrophagen, Monozyten und mesenchymale Stammzellen fördern unter Ausschüttung von Zytokinen, wie *bone morphogenetic protein* (BMP) und Interleukinen, die Zellmigration, -proliferation und -differenzierung, sodass aus dem Frakturhämatom nach einigen Tagen der sogenannte zelluläre Kallus entsteht.

Phase der Granulation: Das sich bildende Granulationsgewebe unter Einfluss von VEGF vaskularisiert, einwandernde mesenchymale Stammzellen differenzieren sich zu Chondroblasten oder Osteoblasten und bilden Knorpel und Osteoid.

Phase der Kallushärtung: Durch zunehmende Verkalkung entwickelt sich innerhalb von Wochen der mineralisierte Kallus und der Knochen gewinnt an Stabilität. Die Phase der Aushärtung und Vermehrung des Osteoids zu Geflechtknochen erfolgt nach drei bis sechs Monaten. Die Frakturüberbrückung und Stabilität ist erreicht. Morphologisch unterscheidet

sich der Knochen jedoch noch vom ortständigen Knochen durch die ungeordnete Struktur (Remedios 1999).

Phase des Remodelling: Es folgt die fortwährende Phase der Knochenremodellierung. Hierbei kommt es durch ein komplexes Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten, Interzellulärsubstanzen und durch Zug- und Druckkräfte, dem Wolffschen Gesetz folgend, zur Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen (Webb und Tricker 2000; Hu und Olsen 2016).

1.7 *Critical size defect*

Die Definition eines *critical size defect* ist komplex. Neben der eigentlichen Größe des Defekts, sind für die Heilung das umgebende Gewebe, die Vaskularisation und die mechanischen wie biochemischen Vorgänge entscheidend. Von einem *critical size defect* wird ausgegangen, wenn die körpereigene Regenerationsfähigkeit ein Ausheilen des Defekts zeitlebens nicht möglich macht (Huh et al. 2005).

1.8 **Gewebersatz und Geweberegeneration**

Der Ersatz verlorengewonnenen Gewebes ist schon seit dem Mittelalter Wunsch der Medizin. Bereits im 16. Jahrhundert beschrieb Gaspare Tagliacozzi die Deckung von Defekten der Nase mit vaskulär gestielten Transplantaten (Zimble 2001). Versuche des Gewebestransfers mit ausgedehnten, freien, nicht vaskularisierten Transplantaten waren hingegen über Jahrhunderte erfolglos. Erst Anfang des 20. Jahrhunderts trat mit neuen Erkenntnissen über Antisepsis und immunologische Abwehrreaktionen eine Forschungs- und Entwicklungswelle ein. Die Arbeiten an Knochenersatz und *tissue engineering* sind seit jeher Bestandteil der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Kärcher 2000).

Knöchern Defekte der *Maxilla* führen je nach Lokalisation und Größe zu unterschiedlichen Morbiditäten. Die Extraktion eines Zahns führt zur Zahnlücke und ggf. Atrophie des Kieferkammes mit ggf. fehlender Möglichkeit zur Implantatversorgung. Eine Tumoresektion mit Hemimaxillektomie kann eine Mund-Antrum-Verbindung verursachen. Während für kleinere Knochen Defekte Verfahren der Regeneration wie z. B. Sinuslift und *guided bone regeneration* (GBR) zur Verfügung stehen, kommen für große Rekonstruktionen, z. B. avaskuläre Beckenkammtransplantate aber auch mikrovaskulär reanastomosierte Knochen transplantate in Betracht. Je umfangreicher die Rekonstruktion, desto mehr Komplikationen sind zu erwarten (Reissmann et al. 2013). Limitierungen für die Ausweitung der Operation auf eine zusätzliche Gewebeentnahme und damit einen Zweiteingriff sind Polytraumatisierte, Patienten in schlechtem Allgemeinzustand und Kinder, für die das zusätzliche Gewebetrauma ein nicht zu vertretendes Risiko darstellt (von Garrel und Gotzen 1998). Der Übergang zwischen lokal zu

versorgenden Defekten und aufwendigen Wiederherstellungen ist fließend. Die Anforderungen an knöcherne Rekonstruktionen des Schädels sind hoch und müssen sowohl mechanischen als auch ästhetischen Ansprüchen genügen (Warnke et al. 2006).

1.9 Knochenaugmentation

In der medizinischen Anwendung finden sich eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien. 1821 replantierte von Walther einem Patienten ein zuvor im Rahmen einer neurochirurgischen Kraniektomie entfernten Teil der Schädelkalotte (von Walther 1821). Dieser als einer der ersten autologen Transplantationen zu bezeichnende chirurgische Eingriff legte den Grundstein für weitere Forschungen.

A. Adamkiewicz postulierte 1889:

„Für das grosse Adaptions- und Verwachsungsvermögen eingesetzter Knochen, sei es an denselben Individuen, sei es an Individuen derselben oder einer anderen Species, spricht die untrügliche Sicherheit, mit welcher jeder der bezeichneten Versuche auszuführen und der Einheilungsprozess – bei antiseptischem Verfahren – stets ohne Spur von Eiterung zu erreichen ist.“

und beschrieb damit das Verfahren der allogenen Transplantation (Adamkiewicz 1889). Neben der autologen und allogenen Transplantation wurden Verfahren zum xenogenen und alloplastischen Knochenersatz entwickelt (siehe Tab. 1).

An Knochenersatzmaterialien, die am Menschen unter klinischen Bedingungen Anwendung finden gelten bestimmte Anforderungen. Um eine gesunde Knochenstruktur zu erreichen werden folgende Eigenschaften gefordert: Osteogenität, Osteoinduktion, Osteokonduktion, Angiogenität, Biokompatibilität, Mechanische Eigenschaften ähnlich dem originären Knochen, kontrollierte Resorption mit Ersatz durch neugebildeten Knochen, Nebenwirkungsarmut, Kosteneffizienz, einfache Verarbeitung und Formbarkeit und Anpassung in situ (Günther et al. 1998; Linhart et al. 2004; Sanz et al. 2019).

Tab. 1: Übersicht der Knochenersatzmaterialien (nach Fernandez de Grado et al. 2018)

| Autolog | Xenogen | Allogen | Alloplastisch | |
|-----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Spongiös | bovin | Lebendspender | biologisch | synthetisch |
| Kortikospongiös | porcin | Leichenspender | Hydroxylapatit | <i>calcium phosphate cement</i> |
| vaskulär | equin | | <i>platelet rich plasma</i> | Hydroxylapatit |
| | | | CaSO ₄ | <i>β-tricalcium-phosphate</i> |
| | | | Korallen | Bioaktive Gläser |
| | | | | Polymerbasierte Ersatzmaterialien |

Tab. 2: Übersicht der Transplantateigenschaften autologen Knochengewebes nach Typen (nach Khan et al. 2005)

| Transplantat | Osteogen | Osteo-konduktiv | Osteo-induktiv | Mechanische Stabilität | Gefäß-versorgung |
|---------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Spongiös | ++ | ++ | + | + | - |
| Kortikal | + | + | +/- | ++ | - |
| Vaskulär | ++ | ++ | + | ++ | ++ |

Um ein knöchernes Regenerationsergebnis ausreichender Qualität und Quantität zu erreichen, müssen Knochenersatzmaterialien vorzugsweise die Fähigkeit zur Osteokonduktion, Osteoinduktion und Osteogenese besitzen. Osteokonduktive Eigenschaften ermöglichen über eine geeignete Leitstruktur das Einwachsen des Knochens in das Knochenersatzmaterial aus dem benachbarten Transplantatbett (Bauer 2007). Von Osteoinduktion wird gesprochen, wenn das Knochenersatzmaterial die Knochenneubildung durch Förderung der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten und deren direkte Stimulation zu induzieren vermag (Lind 1996). Der Prozess der Osteogenese beschreibt die Fähigkeit des Knochenersatzmaterials mit Hilfe vitaler Zellen die Knochenbildung anzuregen. Die hierbei transplantierten, vitalen, reifen Zellen, wie Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sterben mehrheitlich ab. Jedoch verbleiben vitale, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks, die sich unter adäquater Stimulation differenzieren und zusammen mit Wachstumsfaktoren die

Migration von Osteonblastenvorläuferzellen initiieren, um so das Knochenwachstum zu fördern (Cypher und Grossman 1996; Yaszemski et al. 1996).

1.9.1 Autologe Knochentransplantation

Die autologe Knochentransplantation gilt als Goldstandard für den Wiederaufbau in knöchernen Defekten (Flören et al. 2007; Kurien et al. 2013). Unterschieden werden können avaskuläre Transplantate, bei denen die Nährstoffversorgung durch Diffusion aus dem Transplantatbett erfolgt, von mikrovaskulär reanastomosierten Transplantaten, die über ihre eigene Blutversorgung verfügen. Das autolog avaskulär transplantierte Knochengewebe enthält Stammzellen und Wachstumsfaktoren, die die direkte Osteogenese ermöglichen. Durch die hohe osteokonduktive und -induktive Potenz der Knochenmatrix lassen sich hervorragende Ergebnisse in Bezug auf Knochenquantität und Qualität erzielen. Dadurch weisen autologe Transplantate die höchste biologische Wertigkeit auf (Bloemers et al. 2003). Immunologische Reaktionen spielen bei Eigentransplantationen keine Rolle und auch die Übertragung von Infektionskrankheiten ist ausgeschlossen. Je nach Größe des Defekts können verschiedene intraorale und extraorale Spenderregionen in Betracht gezogen werden. Die Tuberregion der *Maxilla*, die *crista zygomaticoalveolaris*, die Symphysenregion des Kinns und der Retromolarenbereich der Mandibula bieten intraorale Entnahmemöglichkeiten ohne relevante Schwächung der Strukturen (Kübler et al. 2004). Allerdings ist das Volumen des hier zu gewinnenden Knochenmaterials begrenzt (Sanz et al. 2019). Für größere Volumina bieten sich Rippen, Calvaria, Tibia und Beckenkammtransplantate an (Wiltfang und Gellrich 2002). Durch den zusätzlichen Eingriff am Entnahmeort steigen jedoch die Morbidität des Patienten, der zeitliche Aufwand und die Kosten (Browaeyts et al. 2007). Als autologe Knochentransplantate können Spongiosa, kortikale oder kortikospongiöse Anteile dienen. Während Spongiosa aufgrund ihrer Porosität und des hohen Zellanteils gute osteogenetische, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften besitzt, ist die initiale mechanische Stabilität beschränkt (Khan et al. 2005). Kortikaler Knochen besitzt im Gegensatz hierzu eine hohe primäre mechanische Stabilität. Aufgrund der geringen Anzahl osteogener Zellen und der begrenzten osteokonduktiven Eigenschaften werden große Anteile des kortikalen Knochentransplantats jedoch nekrotisch und im Verlauf resorbiert, sodass die mechanische Belastbarkeit im zeitlichen Verlauf deutlich um bis zu 75 % abnimmt (Khan et al. 2005). Kortikospongiöse Knochentransplantate bilden den Kompromiss beider Varianten. Die Einheilung der Transplantate wurde von Axhausen 1952 beschrieben. Hierbei postulierte er ein zweiphasiges Modell. Initial überleben Osteoblasten an der Transplantatoberfläche durch Nährstoffdiffusion aus dem Transplantatlager, wohingegen die Zellen tiefergelegener Areale absterben. Nach

Ablauf der ersten Phase differenzieren sich durch osteoinduktive Substanzen aus mesenchymalen Stammzellen Osteoblasten, die in das Transplantat einwandern und hier wiederum neuen Knochen bilden. Der Resorption des Transplantats steht der Knochenaufbau gegenüber (Axhausen 1952). Diese Ersatzresorption muss sich für ein erfolgreiches Ergebnis im Gleichgewicht befinden. Bereits 1914 hatte Erich Lexer erkannt, dass die Qualität des Transplantatlagers über das Einwachsverhalten des Knochens entscheidet (Lexer 1914). Hierbei unterschied er drei Transplantatlager: ersatzstarke, ersatzschwache und ersatzunfähige Lager. Das ersatzstarke Lager zeigt eine gute Vaskularisation. Das ersatzunfähige Lager ist avital oder nur mangelhaft vaskularisiert und bedarf vor Transplantation einer Optimierung, sei es durch Debridement, Weichteilrekonstruktion oder Osteosynthese (Eitel et al. 1980). Der Wunsch nach Optimierung der Blutversorgung führte zur Entwicklung der freien, mikrovaskulär anastomosierten Transplantate, die seit den frühen 1980er Jahren im klinischen Alltag zur Verfügung stehen (Hölzle et al. 2008). Zur Anwendung kommen beispielsweise Transplantate der distalen Fibula, des Tibiakopfes, des Beckenkamms und der *scapula* (Reuther und Kübler 1999). Vorteil der vaskularisierten Knochentransplantate ist die eigene Blutversorgung, wodurch zum einem ein Großteil der vitalen Zellen im Transplantat überlebt und zum anderen neben der knöchernen auch eine Weichgeweberekonstruktion möglich wird. Nachteilig wirkt sich die nochmals erhöhte Entnahmemorbidität auf das Verfahren aus. Für das freie Fibulatransplantat, eines der meist verwendeten Rekonstruktionsmethoden bei knöchernen oder osteokutanen Defekte im Kopf/Halsbereich (Anthony et al. 1995), sind Wundheilungsstörungen, Peroneusläsionen, muskuläre Schwäche, Ödeme, Schmerzen und Krämpfe als dauerhafte Komplikationen an der Entnahmestelle in der Literatur beschrieben (Klein et al. 2005).

1.9.2 Allogene Knochentransplantation

Als eine Alternative zur autogenen wird die allogene Knochentransplantation angesehen (Flören et al. 2007). Hierbei wird Spenderknochen eines fremden Individuums derselben Spezies transplantiert. Seine mechanischen Eigenschaften entsprechen weitestgehend dem autologen Transplantat (Sanz et al. 2019). Allogenes Knochenmaterial wird durch Knochenbanken zu Verfügung gestellt und steht somit in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung (Rothamel et al. 2015). Da der Knochen meist aus gespendeten Femurköpfen primärer Hüftprothesenimplantationen (Flören et al. 2007) gewonnen wird, besteht keine zusätzliche Entnahmemorbidität für den Spender und die Eingriffszeit des Donors verkürzt sich. In der Literatur werden jedoch wiederholt Übertragungen infektiöser Erkrankungen beschrieben bzw. das Risiko hierfür diskutiert (Chiu et al. 2004; Winter et al. 2005; Kurien et al. 2013; Zamborsky

2015). Verschiedene Verfahren sollen mittels Sterilisation und Aufbereitung für die sichere Anwendbarkeit am Patienten sorgen. Neben der Kryokonservierung, können chemische oder thermische Maßnahmen und Verfahren mit ionisierender Strahlung zur Sterilisation angewendet werden. Je nach Aufbereitungsprozeß werden jedoch die osteogenen, osteoinduktiven, osteokonduktiven sowie mechanischen Eigenschaften des Allografts reduziert (Günther et al. 1998; Kurien et al. 2013). Neben einer geringen osteoinduktiven Wirkung durch Freisetzung von BMPs aus der Knochenmatrix (Reddi 1998), beruht die Funktionsweise allogener Transplantate hauptsächlich auf osteokonduktiven Eigenschaften (Endres et al. 2005). Trotz Sterilisation bleibt die Restgefahr der Übertragung ansteckender Krankheiten wie z. B. der Creutzfeldt-Jakob Krankheit (Kurien et al. 2013). Das aufwendige Aufbereitungsverfahren macht die klinische Anwendung teuer (Kurien et al. 2013).

1.9.3 Xenogene Knochentransplantation

Als xenogene Transplantation wird die Übertragung von Gewebe von einer auf eine andere Spezies bezeichnet. Das in der Zahnmedizin weltweit am häufigsten eingesetzte xenogene Knochenersatzmaterial ist denaturierter Rinderknochen (Sanz et al. 2019), ein bovines (Rind), durch Autoklavieren und chemische Reinigung hergestelltes, anorganisches Granulat. Das nach Aufbereitung verbleibende mineralische Substrat ist im wesentlichen Hydroxylapatit, dessen osteokonduktive Eigenschaft der knöchernen Regeneration als Leitstruktur dient (Grünberg et al. 2017). Neben bovinem existieren unter anderem porcine (Schwein) und equine (Pferd) Knochenersatzmaterialien. Wie bei der allogenen Knochentransplantation besteht auch für xenogene Gewebeübertragungen die potentielle Gefahr der Übertragung von Viren- oder Prionenerkrankungen auf den Empfänger (Kurien et al. 2013; Singh et al. 2013; Fernandez de Grado et al. 2018).

Auch Materialien pflanzlichen Ursprungs, z. b. aus Algen gewonnenes Hydroxylapatit und das anorganische Kalziumcarbonatskelett aus Korallen kommen zu Anwendung.

1.9.4 Alloplastisches Knochenersatzmaterial

Alloplastischer Knochenersatz ist synthetisch oder biologisch hergestellt. Unterschieden werden alloplastische Knochenersatzmaterialien in Keramiken, Polymere, Zemente und Metalle (Smeets et al. 2014). Kombinationen der Materialien sorgen für eine enorme Anzahl an Produkten (Linhart et al. 2004).

Alloplastische Knochenersatzmaterialien differieren in ihrer biologischen Wirkung und dem Ziel der Implantation. So existieren nahezu bioinerte Ersatzmaterialien, deren biochemische Zusammensetzung und/oder strukturelle Konfiguration eine Reaktion des Organismus mit

Resorption und Ersatz durch Knochen oder Knorpel nicht vorsehen. Verwendung finden diese Materialien z. B. als nichtresorbierbare Keramiken in Endoprothesen.

Bestimmte synthetisch oder biologisch hergestellte alloplastische Ersatzmaterialien können vom Körper resorbiert und durch eigenen Knochen ersetzt werden, sodass eine *restitutio ad integrum* erreicht werden kann (Fernandez de Grado et al. 2018). Die synthetische Herstellung macht das Material nahezu unbegrenzt verfügbar, eine Übertragung von Krankheitserregern ist aufgrund des Herstellungsverfahrens unwahrscheinlich. Durch Nachahmung der originären biologischen Struktur des Knochens sollen alloplastische Materialien als Leitschienen die Regeneration fördern. Entscheidend für die Leitschienenfunktion der Knochenersatzmaterialien ist die Porengröße von 150-600 µm (Klein et al. 2010).

Tab. 3: Übersicht der alloplastischen Knochenersatzmaterialien (nach Smeets et al. 2014)

| Knochenersatzmaterial | Inhaltsstoffe |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Keramik | Trikalziumphosphat, Hydroxylapatit, Biogläser, Glasionomere |
| Polymer | Polymethylmethacrylat, Polylaktide/Polyglykoxide |
| Zement | Kalziumphosphatzemente |
| Metall | Titan |

1.9.4.1 Keramiken

Ausgangsstoffe von keramischen Ersatzmaterialien sind Kalziumphosphatverbindungen wie Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat. Ihr Herstellungsverfahren mit Sinterung durch Druck und Temperaturen von 1000-1500°C führt zu nichtimmunogenen sowie nichttoxischen Eigenschaften und macht Keramiken damit besonders biokompatibel. Durch ihre interkonnektierende Porosität weisen sie osteokonduktive Eigenschaften auf, haben aber eine zu vernachlässigende osteogene oder osteoinduktive Wirkung (Smeets et al. 2014). In Abhängigkeit der Ausgangsstoffe und ihrer Verarbeitung ändert sich das Degradationsverhalten der Keramiken sowie deren mechanische Eigenschaften.

Biogläser basieren zumeist auf Phosphoroxid-Siliciumoxid Verbindungen. Sie weisen ein interkonnektierendes Porensystem auf und sind bioaktiv (Smeets et al. 2014). Dadurch kann umliegendes Knochen- und Bindegewebe in das Knochenersatzmaterial einwachsen.

1.9.4.2 Zemente

Verwendung als Knochenzemente finden vorrangig Kalziumphosphatzemente, die zumeist aus Mehrkomponentensystemen bestehen, wobei Pulverkomponenten mit der wässrigen Lösung vermischt werden. Knochenzemente eignen sich zum Auffüllen von osteosynthetisch

stabilisierten Knochendefekten. Sie weisen eine nur eingeschränkte mechanische Stabilität auf (Smeets et al. 2016).

1.9.4.3 Metall

Implantatmaterialien wie Titan werden vom Organismus nicht resorbiert, gleichwohl kann unter entsprechenden Voraussetzungen auch eine bioaktive Reaktion im Sinne eines Einwachsens des Implantats in den ortsständigen Knochen erreicht werden, dies wird als Osseointegration bezeichnet (Brånemark et al. 1969). Biomimetische Verfahren versuchen alloplastische Trägermaterialien so zu modifizieren, dass die Oberfläche der Knochenstruktur ähnlich und somit eine Osseointegration erleichtert wird (Albrektsson et al. 2008). Erreicht werden kann dies beispielsweise durch anodische Oxidation (Le Guéhennec et al. 2007) oder die Beschichtung mit Kalziumphosphat (Schliephake et al. 2009).

1.9.4.4 Polymere

Zur Gruppe der Polymere gehören die synthetisch hergestellten Stoffe Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyglycolid, Polylactid und verschiedene Kopolymere. PMMA kommt unter anderem als Gelenkpfannenersatz in der Orthopädie zum Einsatz und ist nicht resorbierbar. Resorbierbare Polymere dienen in der Chirurgie als Material für Schrauben, Nahtmaterial, Netze, Stifte und Platten (El-Saadany et al. 2015; Smeets et al. 2016).

1.9.4.5 Polylactide

Ein weiteres biodegradierbares Knochenersatzmaterial ist Polylactid, ein aus Zucker zu Milchsäure fermentierter und schließlich zu Polylactid polymerisierter Polyester. Von der Milchsäure existieren zwei Enantiomere, D und L (Pina und Ferreira 2012). Die Verwendung reiner L-Milchsäure erzeugt *poly-L-lactid acid* (PLLA), ein hochkristallines, hartes, nur eingeschränkt hydrolysierbares und daher nur langsam biodegradierbares Polymer (Pina und Ferreira 2012). Die Mischung von D und L Milchsäurenantiomeren führt zur Bildung von *Poly-D-L-lactid acid* (PDLLA). PDLLA ist amorph, weich, hydrolysier- und damit gut biodegradierbar (Annunziata et al. 2017). Anwendung findet PDLLA in der Zahnmedizin in Form von Platten, Membranen, Pins, Schrauben und als Ersatzmaterial bei der Knochenaugmentation, wenngleich die Zahl der klinischen Untersuchungen für die Knochenaugmentation klein ist und deren Ergebnisse heterogen sind (Annunziata et al. 2017). PDLLA zeigt sich in klinischen Studien als biokompatibel, die vollständige Biodegradation erfolgt nach 36 Monaten (Prokop et al. 2004).

1.10 *Guided bone regeneration (GBR)*

Die Tatsache, dass biochemische und physikalische Prozesse Einfluss auf die Knochenheilung nehmen, macht man sich bei der geführten Knochenregeneration, in der Literatur als *guided bone regeneration* bezeichnet, zu Nutze (Elgali et al. 2017). Um gewünschte Prozesse zu unterstützen und unerwünschte Effekte zu minimieren wird der Knochendefekt durch eine Membran abgedeckt. Einerseits wird so die physikalische Belastung minimiert, andererseits kann das sich ausbildende Hämatom in seiner Form konfiguriert werden. Die Abschirmung ermöglicht es osteogenen Zellen aus dem Knochenbett in den Defekt einzuwandern, ohne dass nicht-osteogene Zellen aus der Peripherie mit dieser Zellmigration konkurrieren und lediglich zu einer Bindegewebeheilung führen. Verwendung finden nicht resorbierbare Membranen aus Titan oder Polytetrafluorethylen, sowie resorbierbare Membranen aus aliphatischen Polyestern oder Kollagen (Lee und Kim 2014). Nicht resorbierbare Membranen ermöglichen eine gute Formstabilität, im Falle von Wundheilungsstörungen mit freiliegendem Material ist das Endergebnis der Augmentation jedoch kompromittiert. Zusätzlich wird zum Ersteingriff eine Materialentfernung nötig. Resorbierbare Materialien wie aliphatische Polyester oder Kollagen sind leicht zu verarbeiten und weniger anfällig für Wundheilungsstörungen, bieten aber aufgrund ihrer schnellen Biodegradation eine weniger gute Barrierefunktion (Annunziata et al. 2017). Durch die Kombination der GBR mit in den Defekt eingebrachten Knochentransplantaten oder -ersatzmaterialien können gute Ergebnisse erzielt werden (Elgali et al. 2017).

1.11 **Trägermaterialien von Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren in ihrer bioaktiven Form werden üblicherweise in flüssiger Lösung bereitgestellt. Die Applikation in liquider Konsistenz erlaubt keine plastische Formbarkeit, die jedoch für die vorhersagbare Knochenregeneration im Defektbereich erforderlich ist. Da die Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren möglichst dem physiologischen Verhalten entsprechen soll, ist es notwendig, Wachstumsfaktoren an ein Gerüst zu binden, das die Freisetzung der Faktoren gleichmäßig und kontinuierlich über einen langen Zeitraum ermöglicht (*slow release*). Unterschieden werden *slow release* von *burst release* Eigenschaften. In der Literatur lassen sich zahlreiche Trägermaterialien finden. Zur Anwendung kommen beispielsweise Titan, Fibronectin, Chitosan, Glykosaminoglykane, Kollagen, Kalziumhydroxid, Kalziumphosphat und Polylactid (Schliephake 2009; Marques et al. 2016). Die Art der Bindung von Wachstumsfaktoren an das Trägermaterial entscheidet über die Freisetzungskinetik. In der Literatur wird eine zu rasche Freisetzung der Wachstumsfaktoren (*burst release*) mit Misserfolgen bei der Knochenneubildungsrate verbunden (Böhrens et al. 2017). Es sind verschiedene

Verfahren beschrieben, um Wachstumsfaktoren an der Titanoberfläche zu binden (Beutner et al. 2009). Grundsätzlich können bioaktive Moleküle über Adsorption, covalente Bindung, nanomechanische Bindung oder selbstorganisierende Schichten an die Titanoberfläche angeheftet werden (Schliephake und Scharnweber 2008). Nachteil ist, dass die Freigabe der Wachstumsfaktoren unphysiologisch schnell (*burst release*) erfolgt und die Mehrzahl der Faktoren innerhalb von 48 Stunden nach Implantation freigesetzt werden (Schliephake et al. 2007). Eine Resorption des Titangerüsts findet nicht statt. Idealerweise sollten die Trägergerüste biogradierbar sein (Agrawal und Ray 2001). Kollagenschwämme oder anorganischer boviner Knochen sind bereits in der klinischen Anwendung. Die Beladung erfolgt über Tränken des Trägermaterials mit der flüssigen Lösung der Wachstumsfaktoren (El Bialy et al. 2017). Nachteilig erweist sich die schnelle Freisetzung dieser Faktoren. Die Optimierung der Trägermaterialien und der Freisetzungskinetik ist Gegenstand der Forschung (Patel et al. 2008; Schliephake 2009; Ren et al. 2017; Cheng et al. 2019) und soll auch der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

1.12 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Signaltransmitter des Organismus, meist Proteine, die zelluläres Wachstum, Differenzierung, Proliferation und Heilung modulieren.

Die Mehrzahl dieser Proteine binden über Rezeptoren an der Zielzelle und setzen dort intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Für praktisch jedes Organ und Gewebe wurden spezifische und unspezifische Wachstumsfaktoren beschrieben: *nerve growth factor* an Neuronen, Erythropoetin an Erythrozyten, *vascular endothelial growth factor* im Rahmen der Neoangiogenese und *fibroblast growth factor* (FGF) an Fibroblasten um nur einige wenige beispielhaft zu nennen. Eine Stimulation des Knochenstoffwechsels ist für *insulin-like growth factor*, *fibroblastic growth factor*, *platelet-derived growth factor*, *transforming growth factor- β* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* und *bone morphogenetic proteins* beschrieben (Southwood et al. 2004; Janicki und Schmidmaier 2011).

Die Fülle der in der Literatur beschriebenen Wachstumsfaktoren macht eine vollständige Auflistung an dieser Stelle unmöglich, daher soll im Folgenden speziell auf die in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren VEGF und BMP näher eingegangen werden.

1.12.1 *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Anfang der 1980er Jahre entdeckten Senger et al. ein Protein, den *vascular permeability factor*, der von Tumorzellen produziert wird und den sie für die Permeabilitätserhöhung an Endothelzellen im Rahmen eines Tumoraszites verantwortlich machten (Senger et al. 1983). 1989 beschrieben Ferrara und Henzel ein von folliculären Hypophysenzellen sezerniertes Protein, das die

Proliferation von Endothelzellen anregt und nannten es *vascular endothelial growth factor* – VEGF (Ferrara und Henzel 1989). Seit einiger Zeit ist bekannt, dass es sich um ein und dasselbe Protein handelt. Heute hat sich das Akronym VEGF in der Literatur durchgesetzt. VEGF besteht aus einer Gruppe Glykoproteinen, die die Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese stimulieren (Neufeld et al. 1999). Im menschlichen Organismus haben VEGF-A für die Angiogenese, VEGF-B und der zur Gruppe der VEGF gehörende *Placental growth factor* für die Vaskulogenese und plazentäre Angiogenese sowie VEGF-C und D für die Lymphangiogenese eine besondere Bedeutung (Neufeld et al. 1999). Daneben existieren das viral exprimierte VEGF-E und das im Schlangengift vorkommende VEGF-F (Yamazaki et al. 2009). Die Expression von VEGF wird durch Hypoxie, Hypoglykämie, Onkogene und Zytokine wie z. B. Interleukin 1 β ausgelöst. Durch die lokale Reaktion z. B. auf hypoxische Gewebeverhältnisse wird VEGF am Wirkungsort exprimiert und wirkt parakrin auf die benachbarten Zellen (Neufeld et al. 1999). Zahlreiche maligne Tumoren weisen eine erhöhte Expressionsrate an VEGF auf, dessen angiogeneseinduzierende und antiapoptotische Wirkung dem Tumorwachstum weiteren Progress ermöglicht (Neufeld et al. 1999). Enomoto et al. belegten, dass VEGF bei Patienten mit Osteoarthrose überreguliert ist (Enomoto et al. 2003). Neben der pathologischen Wirkung, kommt VEGF eine zentrale Bedeutung im Rahmen von Heilungsprozessen, wie Verletzungen des zentralen Nervensystems und der Knochenheilung zu (Keramaris et al. 2008; Yang et al. 2012). VEGF wird von Chondrozyten der Wachstumsfuge sezerniert und steuert dort die Angiogenese, das Remodelling der extrazellulären Matrix und die Knochenformation (Jin et al. 2002; Keramaris et al. 2008; Yang et al. 2012).

Durch alternatives Spleißen werden aus der VEGF mRNA (*messenger ribonucleic acid*) verschiedene Isoformen translatiert. Die bedeutendsten sind VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ und VEGF-A₂₀₆ (Keramaris et al. 2008). Aufgrund der Überschneidung seines Vorkommens im humanem und tierischem Organismus, sowie der nachgewiesenen höchsten biologischen Aktivität (Petrova et al. 1999) ist VEGF-A₁₆₅ für wissenschaftliche Untersuchungen von besonderem Interesse (Taktak-BenAmar et al. 2017).

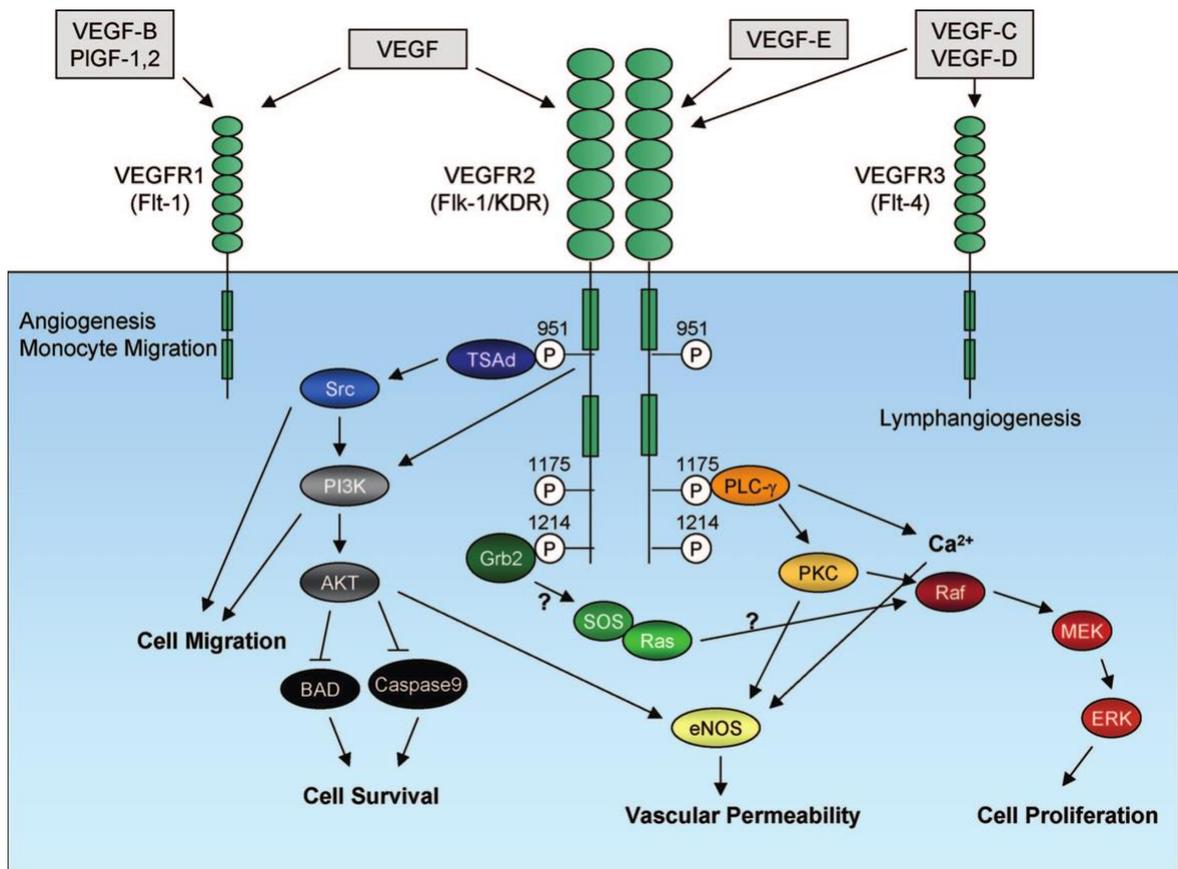


Abb. 2: VEGF Signaltransduktion

(modifiziert nach Nilsson und Heymach 2006, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags)

VEGF bindet im Rahmen der Signaltransduktion an eine Tyrosinkinase, den VEGFR (VEGF-Rezeptor) und leitet so das extrazelluläre Signal in die Zelle. Es existieren drei Subtypen von VEGFR. VEGFR-1 wirkt in Folge einer veränderten Tyrosinkinase als Regulator der Angiogenese, indem VEGF bindet, eine Signaltransduktion nach intrazellulär jedoch ausbleibt (Rahimi 2006). Die Affinität von VEGF-A ist zum VEGFR-1 größer als zum VEGFR-2, somit dient der VEGF -1 Rezeptor als VEGF-Falle (Olsson et al. 2006). In der Lymphangiogenese fungiert VEGFR-3 als Rezeptor für VEGF-C und D (Witmer et al. 2001). VEGFR-2 dimerisiert nach Bindung von VEGF-A und wird durch Phosphorylierung aktiviert. Durch Aktivierung von Bindungsstellen für intrazelluläre Signaltransduktoren wird die Zellmigration, Antiapoptose, vaskuläre Permeabilität und Zellproliferation gesteuert (siehe Abb. 2), (Nilsson und Heymach 2006).

1.12.2 *Bone morphogenetic protein (BMP)*

1965 beschrieb der Amerikaner Marshall R. Urist die durch demineralisierte Knochenmatrix induzierte ektope enchondrale Ossifikation (Urist 1965). 1971 konnten er und seine Mitarbeiter das dafür verantwortliche Glykoprotein identifizieren: *bone morphogenetic protein* – BMP (Urist und

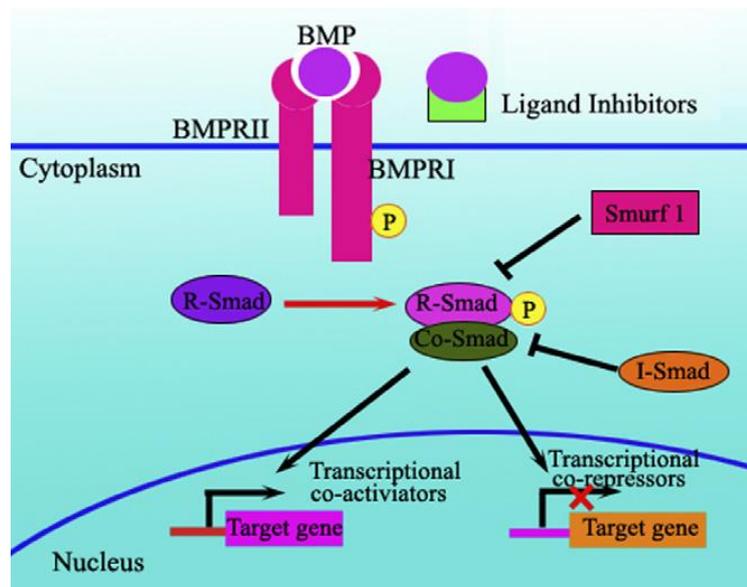
Strates 1971). Die *bone morphogenetic proteins* umfassen eine Gruppe von mehr als 20 Wachstumsfaktoren, die zur Familie der TGF- β gehören und deren Wirkung nicht nur auf den Knochenstoffwechsel beschränkt ist (Xiao et al. 2007). Eine Auswahl der bedeutendsten BMPs zeigt Tab. 4.

Tab. 4: Übersicht der verschiedenen BMPs und ihrer Eigenschaften (nach Xiao et al. 2007)

| <i>Bone morphogenetic protein</i> | Wirkung und Besonderheiten |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BMP-1 | Chrondral, Cholesterinstoffwechsel, Als Metalloprotease einziges BMP das nicht der TGF- β Superfamilie angehört |
| BMP-2 | Differenzierung von Osteoblasten, Chondrozyten und Herzzellen, zusammen mit BMP-4 und BMP-7 Induktion der Apoptose des interdigitalen Mesenchyms im Rahmen der Entwicklung der Finger, Chemotaktische Wirkung im Rahmen von Verletzungen |
| BMP-3 | Inhibition von BMP-2 |
| BMP-4 | Regulation der Entwicklung von Zähnen, Knochen und Extremitäten aus Mesoderm. Schlüsselrolle im Rahmen der Frakturheilung |
| BMP-5 | Regulation der Knorpelentwicklung |
| BMP-6 | Antiproliferativ durch Hemmung der Zellteilung. Einfluss auf die Gelenkstabilität. |
| BMP-7 | Embryonale Entwicklung von Nieren und Augen. Induktion der Osteoblasten Differenzierung. Induktion der Transkription verschiedener osteogenetischer Gene. |
| BMP-8 | Beteiligung an Knochen und Knorpelentwicklung |
| BMP-9 | Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten |
| BMP-10 | Induziert die Trabekelausbildung im embryonalen Herzen |
| BMP-11 | Bildung neuraler Strukturen |
| BMP-12 | Entwicklung von Bändern und Sehnen |

| <i>Bone morphogenetic protein</i> | Wirkung und Besonderheiten |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BMP-13 | Induktion der Expression weiterer BMPs (BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8), Proliferation mesenchymaler Progenitorzellen, Augenentwicklung |
| BMP-14 | Inhibition der Knorpel- und Muskelentwicklung, |
| BMP-15 | Beteiligung an der Entwicklung von Oozyten und Follikeln |
| BMP-16 | Embryonalentwicklung, Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten, analog zu BMP-2 und BMP-4 |
| BMP-17 | Embryonalentwicklung |
| BMP-18 | Embryonalentwicklung |

Wie in Tab. 4 gezeigt sind BMPs an einer Vielzahl von biologischen Regelkreisen beteiligt. Über den TGF- β Signalweg steuern BMPs die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose im Zielgewebe (Heldin et al. 1997). Die TGF- β Signaltransduktion erfolgt über transmembranöse Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Es sind zwei TGF- β -Rezeptoren beschrieben: TGF- β Typ I Rezeptor und TGF- β Typ II Rezeptor. Liganden, wie BMP, bilden mit den Rezeptoren Komplexe. Es kommt zur Formation eines Heterotetramers von Typ I und Typ II Rezeptor wodurch der Typ II Rezeptor aktiviert wird, der den Typ I Rezeptor phosphoryliert. Die so aktivierte Kinase des TGF- β Typ I Rezeptors phosphoryliert *R-Smad* (*receptor-regulated Smad*) Proteine, die mit *Smad* 1, 5 und 8 Oligomere bilden und als Komplexe in den Zellkern eindringen, wo sie als Transkriptionsfaktoren agieren und die Genexpression steuern. Die Regulation dieser Kaskade erfolgt über die parallele Aktivierung von *Co-Smads* (*common-partner-Smads*) und *I-Smads* (*inhibitory Smad*). **Error! Reference source not found.** zeigt den kanonischen Weg der TGF- β Signaltransduktion.

Abb. 3: TGF- β Signaltransduktionsweg

(modifiziert nach Xiao 2007, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.)

BMPs werden in nahezu allen Organen exprimiert und sind über komplexe Regelkreise an der Zellproliferation, Morphogenese, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt (Hogan 1996; Goumans und Mummery 2002). Defekte im für BMP-2 kodierenden Gen können eine *fibrodysplasia ossificans progressiva* auslösen, bei der es nach Mikrotraumata zur Verknöcherung in Bindegewebe und Muskulatur kommt (Kaplan et al. 1990). Faktoren wie Konzentration, zeitliche und räumliche Verteilung, genetische Ausstattung der Zielzellen bestimmen das Ausmaß und die Art der biologischen Wirkung. So beschrieb Hogan 1996, dass niedrige Konzentrationen an BMP die Zellproliferation induzieren und hohe Konzentrationen für die Zelldifferenzierung verantwortlich sind (Hogan 1996). BMPs sind die einzigen aktuell bekannten Signalmoleküle, die in der Lage sind ektop die enchondrale Ossifikation zu induzieren (Xiao et al. 2007), wobei das größte Potential den BMPs 2, 6, 9 und in geringerem Maße BMP-4 und BMP-7 zugeschrieben wird (Cheng et al. 2003). Nach erfolgreichen Tierversuchen wird BMP-2 seit einigen Jahren in der Behandlung von Schienbeinfrakturen und Wirbelkörperfusionen eingesetzt. Eine Anwendungszulassung im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie besteht seit 2007 für Sinusbodenaugmentationen sowie lokale Kieferkammaugmentationen (Gonzalez et al. 2011). Die Gewinnung von BMP aus humanen oder tierischen Knochen ist aufwendig und teuer. 1 kg Knochenmaterial enthält circa 1 μg BMP-2 (Kübler 2000). Aufgrund immunologischer Risiken durch Fremdknochen hat sich die Verwendung von rekombinant hergestelltem BMP durchgesetzt. Hierbei wird die entsprechende DNA (*desoxyribonuclein acid*) in eine prokaryotische Zelle (z. B. *E.coli*) eingeschleust, die dann die Genexpression und Proteinsekretion übernimmt (Kübler 2000).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Der Beginn der Tierversuche erfolgte im Mai 2013 nach Genehmigung durch das Tierschutzdezernat der Bezirksregierung Braunschweig. Geführt wird der Tierversuchsantrag unter der Nummer 33.9-42502-04-13/1088. Im Februar 2014 wurde die Versuchsphase mit Euthanasie der letzten Tiere abgeschlossen. Für die Studie wurden 18 weibliche Schweine der Rasse Göttinger Minischwein aus der Zuchtanstalt Eußenheim/Oberfeld herangezogen. Das Alter der Tiere betrug zum Studienbeginn zwei bis vier Jahre. Die Tierhaltung und Betreuung erfolgte im Tierversuchslabor der Universitätsmedizin Göttingen durch qualifizierte Tierärzte und Tierpfleger. Die nationalen Tierschutzbestimmungen wurden konsequent eingehalten. Durch die Markierung mit einer Ohrmarke konnten die Tiere sicher unterschieden werden. Nahrungsgrundlage war eine restriktive Schweinediät bei freier Trinkwasserverfügung. Tab. 5 gibt Aufschluss über das verwendete Futtermaterial.

Tab. 5: Futtermaterial Göttinger Minischwein

| Grundfutter | Zusatzstoffe je kg |
|----------------------------------------------|---------------------|
| 450-500 g pro Tier pro Tag | Vitamin A: 15000 IE |
| zusammengesetzt aus: | Vitamin D3 1100 IE |
| Getreideprodukten, Ölsaatenprodukten, | Vitamin E 100 mg |
| Luzernmehl, Knollenprodukten, | Kupfer 5 mg |
| Mineralstoffen, Bierhefe, Pflanzlichen Ölen, | Eisen 100 mg |
| Rohproteinen, Rohfett, Rohfaser, Rohasche, | Zink 50 mg |
| Kalzium, Phosphor, Natrium, Lysin | Mangan 30 mg |
| Met+Cys, Me(Pig) 10,8 MJ/kg | Selen 0,1 mg |

Im Anschluss an die Tierversuchsphase wurden die gewonnenen Präparate im abteilungseigenen Forschungslabor aufbereitet, histologisch untersucht und histomorphometrisch ausgewertet.

2.2 Herstellung und Beladung der PDLLA/ CaCO_3 -*composite*-Granula mit Wachstumsfaktoren

Die verwendeten Granula wurden aus PDLLA-Granulat und CaCO_3 -Nanokristallen hergestellt und von der Firma KLS Martin bezogen. Die im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzten Wachstumsfaktoren (rhBMP-2 und rhVEFG- A_{165}) waren rekombinant mittels Transfektion

und Kultivierung von *E.coli* Bakterien durch die Firma Reliatech, Wolfenbüttel hergestellt worden. Im hauseigenen Labor erfolgte die Vorverdünnung mit Essigsäure anschließend wurde mit PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) bis zur gewünschten Konzentration weiterverdünnt. So standen für den Versuch rhBMP-2 in einer Konzentration von 890 µg/ml und rhVEGF-A₁₆₅ in 50 µg/ml zur Verfügung. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C. Zur Herstellung des Trägermaterials wurde das PDLLA/CaCO₃-Granulat mit der jeweiligen von Lösung rhBMP-2 oder rhVEGF-A₁₆₅ auf dem Rotorschüttler durchmischt. Es folgten Schockfrierung und Gefriertrocknung mittels Stickstoff. Die Lyophilisierung wurde bei -20 °C in einer Vakuumkammer durchgeführt. In Dosen von 0,06 g wurde das mit Wachstumsfaktoren beladene Granulat in eine konfektionierte Form eingebracht und zur Pressung und CO₂-Begasung an die Firma KLS Martin übergeben. Das in Form gebrachte und mit Wachstumsfaktoren beladene Granulat wurde dort unter CO₂-Begasung für 2 Stunden bei 100 bar im Autoklaven zwischen 35 °C und 55 °C behandelt. Die Dekompression erfolgte linear über einen Zeitraum vom 20 Minuten. Die *composite* Träger trafen auf diese Weise behandelt in Tablettenform zurück in unserem Labor ein und wurden hier bei -20 °C gelagert. Die so hergestellten *composite* Träger enthielten 400 µg rhBMP-2 kombiniert mit 50 µg rhVEGF-A₁₆₅ oder 800 µg rhBMP-2 in Tabletten zu 0,06 g. Vor der Applikation wurden die Träger mit der Knochenmühle zerspant.

2.3 Tierversuchsablauf

Zunächst wurde bei allen Tieren in jedem Kieferquadranten ein knöcherner Defekt durch Extraktion der Prämolaren und des ersten Molaren gesetzt. Die Operation erfolgte unter Narkose durch eine qualifizierte Tierärztin. Hierzu erhielten die Tiere 0,5 mg/kg KG (Körpergewicht) Diazepam oral und nach einer Latenzzeit von 20 Minuten 10 mg/kg KG Ketamin und 2 mg/kg KG Azaperon intramuskulär. Nach ausreichender Sedierungstiefe erfolgte die Anlage eines Venenverweilkatheters, die Gabe von Thiopental zur Narkoseeinleitung und die orotracheale Intubation. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde 2 bis 4 %ige Isoflurane verwendet. Die analgetische Abschirmung erfolgte mit Ketamin und Piritramid. Die lokale Schleimhautdesinfektion erfolgte mit Povidon-Jodlösung, Octenidinhydrochlorid und Phenoxyethanol. Anschließend wurde zur weiteren Analgesie 2%iges Articain in das OP-Gebiet infiltriert. Die Schnittführung erfolgte marginal mit anteriorer vestibulärer Entlastung. Nach Extraktion der Prämolaren und des ersten Molaren, sowie Defektsetzung und Prüfung der Defektgröße, erfolgte der Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 2-0).

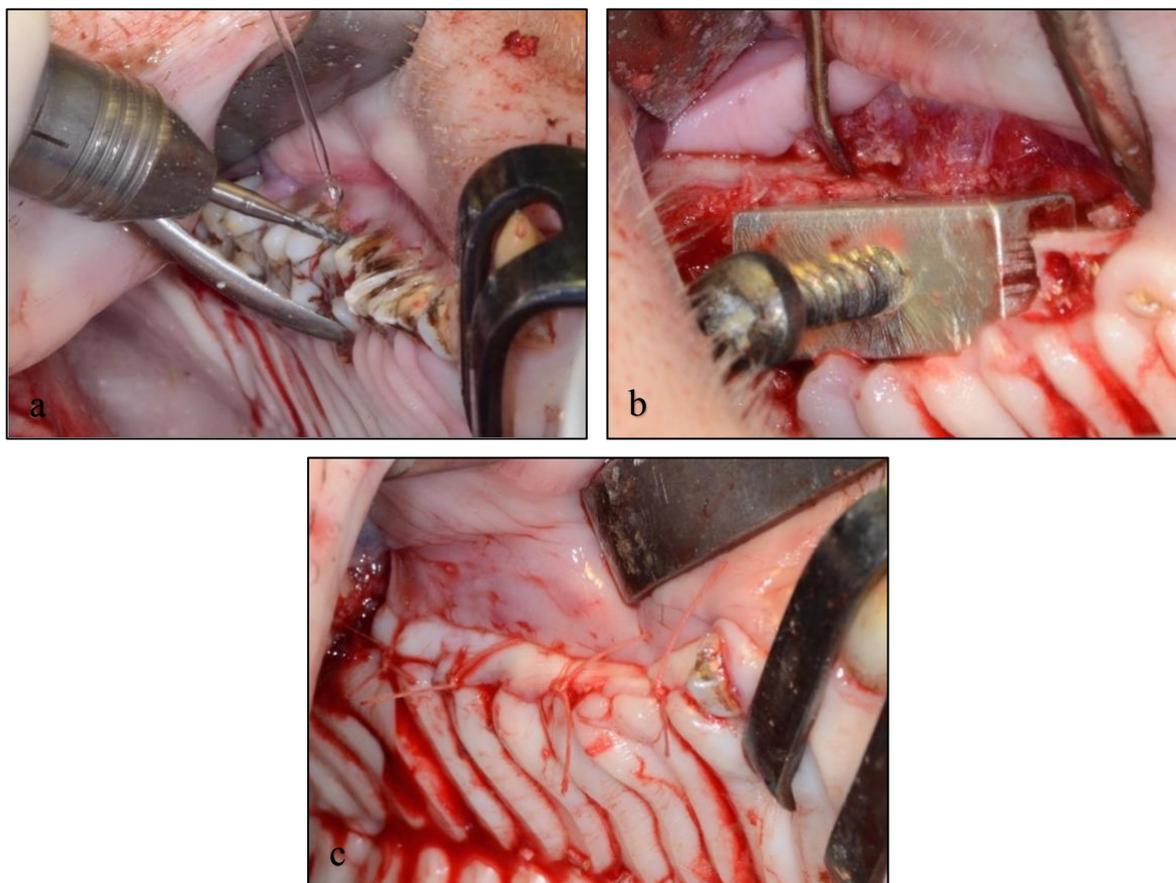


Abb. 4: Operationssitus zum Zeitpunkt der Defektsetzung

a) Extraktion der Prämolaren und des ersten Molaren b) Defektsetzung und Kontrolle mit einem Prüfkörper c) Wundverschluss

Postoperativ erhielten die Tiere für drei Tage Buprenorphin 0,6 mg zweimal täglich und Carprofen 5 mg/kg KG intravenös, bei Bedarf erfolgte die Gabe von 5-7,5 mg/kg KG Carprofen oral. Nach zwölfwöchigem Intervall erfolgte die zweite Operation zur Auffüllung des chronifizierten Defekts. Die hierzu durchgeführte Narkose erfolgte in analoger Art und Weise zur Erstoperation. Einzig Thiopental wurde durch 1 %iges Propofol ersetzt. Die Schnittführung erfolgte anterior des Defektbereichs vertikal. Die Präparation des Defekts wurde in Tunnelierungstechnik durchgeführt. In der Kontrollgruppe erfolgte auf einer Kieferhälfte die Implantation von 0,5 g PDLLA/CaCO₃ in den Defekt, der Defekt der kontralaterale Kieferhälfte wurde Leer belassen. Die Defekte der Experimentalgruppe wurde auf einer Kieferhälfte mit 0,5 g PDLLA/CaCO₃ – 800 µg rhBMP-2 und auf der kontralateralen Kieferhälfte mit 0,5 g PDLLA/CaCO₃ – 400 µg rhBMP-2 und 50 µg rhVEGF₁₆₅ befüllt. Es erfolgte der Wundverschluss mit Vicryl.

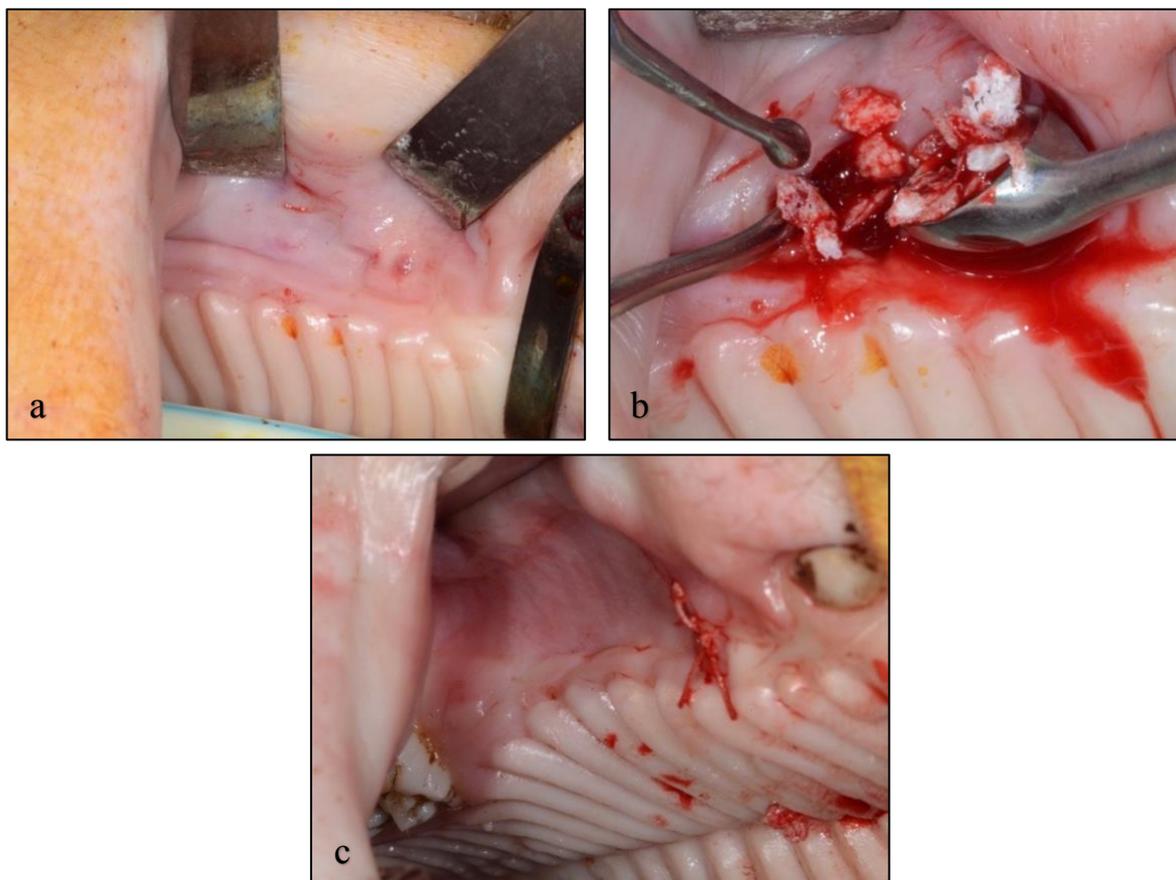


Abb. 5: Operationssitus zum Zeitpunkt der Augmentation

a) Ausgangsbefund vor Augmentation b) minimalinvasiver Zugang durch Tunnelierung und Einbringen der *composite*-Granula c) Wundverschluss

Die postoperative Analgesie erfolgte analog zur Erstoperation. Ein Tier der 4-Wochen-Versuchs-Kohorte verstarb einen Tag nach der zweiten Operation an postoperativen Narkosekomplikationen. Die Nachuntersuchung erfolgte nach vier beziehungsweise 13 Wochen. Die Tiere wurden durch Injektion einer Überdosis Azperon in Kombination mit T61 euthanasiert. Nach Feststellung des Todes durch einen Veterinärmediziner erfolgte anschließend die Entnahme der Präparate und Fixierung in 4 %iger Formaldehydlösung.

2.4 Schliffpräparate und Färbungen

Zur Histologischen Untersuchung wurden die Defektareale mittels Diamantbandsäge herausgesägt, zur Trocknung in aufsteigenden Konzentrationen Ethanol dehydriert und in Technovit 9100 fixiert. Mittig durch den Defekt erfolgte die Durchtrennung der Präparate und anschließende Herstellung von jeweils mindestens fünf Schliffpräparaten in coronaler Richtung nach mesial und distal. Die gewonnenen Präparate wurden mittels Toluidinblau gefärbt und zur ergänzenden deskriptiven Auswertung jeweils ein Schliffpräparat zusätzlich mittels Smith Karagianes Färbung gefärbt.

Die produzierten Blöcke wurden zunächst rechtwinkelig zur Alveolarkammachse mittels Haftkleber (Locit, Henkel, Düsseldorf) auf einen Objektträger geklebt. Jeweils vom Nichtarbeitsende wurde ein Parallelschnitt mit der Bandsäge (Exakt 300, Norderstedt) durchgeführt und ein zweiter Objektträger geklebt. Anschließend erfolgte ein Dünnschnitt von circa 300µm am Arbeitsende. Das so gewonnene Dünnschnittpräparat wurde an der Schleifmaschine (Exakt 400CS, Norderstedt) zunächst mittels 800er Körnung auf 130-140 µm geschliffen. Es folgte der Schliff bis auf 30 µm mit Schleifpapierscheibe der Körnung 1200. Abschließend wurden die Präparate mit einer Silikonscheibe poliert.

Zur Darstellung der Knochenapposition wurden die Präparate mit Toluidinblau gefärbt (Varela und Jollette 2018). Hierbei werden metachromatische Farbeffekte zur Differenzierung genutzt. Hartgewebe wie Knochen bleiben farblos bis blassblau, Zellkerne, Osteoidsäume, Kollagenfasern und Zellen werden blau, Knorpel und Wundheilungsareale rot-violett eingefärbt. Die Färbung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (siehe Tab. 6)

Reagenzien: Toluidinblau O (Merck 1273), Pyronin G (Merck 7518), di-Natriumtetraborat-10-hydrat (Borax), Essigsäure, 15 % H₂O₂, H₂O, destilliertes Wasser, Aceton, Alkohol

Tab. 6: Ablauf Toluidinblau Färbung

| Reagenz | Arbeitsschritt |
|-------------------------------|-------------------|
| Essigsäure 3 % | 3 min Tauchbad |
| H ₂ O | 2 min Spülen |
| H ₂ O ₂ | 10 min Tauchbad |
| H ₂ O | 2 min Spülen |
| Toluidinblaulösung | 5-10 min Tauchbad |
| Destilliertes Wasser | 2 min Spülen |
| - | Trocknen |
| Aceton/Alkohol 1:1 | Differenzieren |
| Eukitt | Eindecken |

Für die deskriptive histologische Untersuchung wurden die gewonnenen Schliffpräparate mittels Smith-Karagianes Färbung nach folgendem Protokoll (siehe Tab. 7) gefärbt.

Reagenzien: Löfflers Methylenblaulösung (Merck 1287), Alizarinrot S (Merck 5229), bi-distilliertes Aqua, HCl, H₂O

Tab. 7: Ablauf Smith-Karagianes Färbung

| Reagenz | Arbeitsschritt |
|--------------|--------------------------------------------|
| Methylenblau | Eintauchen des Schliffpräparates bei 80 °C |
| Aqua dest. | Spülung |
| - | Lufttrocknung über Nacht |
| Alizarinrot | Tauchbad für 90 Sekunden |
| - | Lufttrocknung über Nacht |
| Eukitt | Eindecken |

2.4.1 Digitalisierung der Präparate

Zur Auswertung der Präparate wurden die gewonnenen Dünnschliffe digitalisiert. Die Digitalisierung unter zwei bis zehnfacher Vergrößerung erfolgte am MOLCI (*Molecular Optical and Live Cell Imaging*) der UMG (Universitätsmedizin Göttingen) mit Hilfe des Dotslide[®] (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg). Das Gerät ermöglicht es 50 Schliffe automatisiert zu erfassen. Es wurde eine Übersichtsaufnahme unter zweifacher Vergrößerung und eine Detailaufnahme unter zehnfacher Vergrößerung aufgenommen. Die Histologische Untersuchung der Präparate wurde am Axioskop 2 plus[®] Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) unter zehnfacher Vergrößerung durchgeführt. Zur Veranschaulichung der beobachteten Merkmale der Präparate wurden Aufnahmen mit der Mikroskopkamera AxioCam MRc 5[®] (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) abgelichtet und die Bilder digitalisiert.

2.4.2 Histomorphometrie

Das Grundprinzip der Histomorphometrie basiert auf den von H.M. Frost eingeführten Methoden, hierbei werden histologische Schnitte z. B. Knochenstrukturen quantitativ beurteilt. Zur histomorphometrischen Auswertung werden in Kunststoff eingebettete Präparate verwendet (Varela und Jollette 2018). Die in oben beschriebener Weise digitalisierten Schliffe wurden mittels Photoshop CS5 (Adobe systems incorporated, San José, USA) dargestellt. Hiermit wurden die ROIs händisch markiert und anschließend durch die Software vermessen. Zur Messung der Knochendichte wurden die Bilder binarisiert. Bei Überschreiten eines

Farbintensitätsschwellenwertes innerhalb der zuvor markierten Fläche wurde eine zweite Messung ausgelöst, die den neu gebildeten Knochen vermaß. Die Ergebnisse wurden in Pixel ausgegeben. Für die Kantenlänge eines Pixels $3,2248 \mu\text{m}$ und für die Fläche eines Pixels die Größe von $10,399 \mu\text{m}^2$. Zur Umrechnung der Fläche in mm^2 wurde dieser Wert mit der Anzahl der Pixel multipliziert und um den Faktor 10^{-5} vervielfacht. Abb. 6 und Abb. 7 zeigen den Ablauf der histomorphometrischen Auswertung.

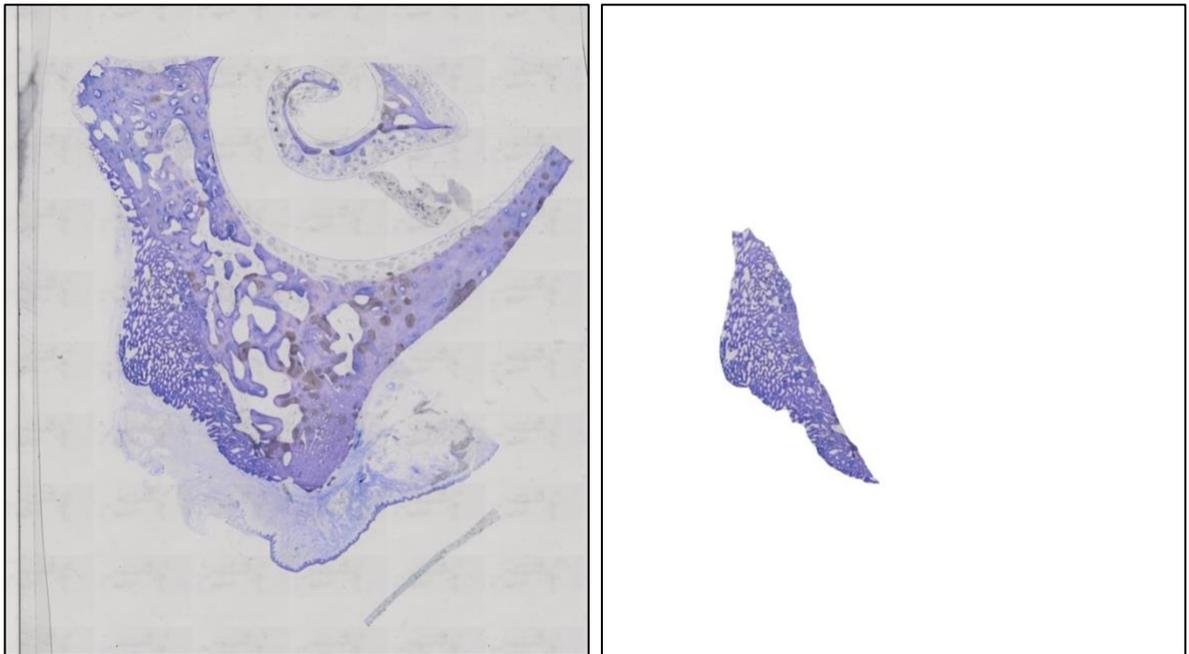


Abb. 6: Toluidinblaufärbung

Links: Übersicht eines histologischen Präparates in Toluidinblaufärbung. Rechts: Segmentierte ROI zur histomorphometrischen Berechnung.

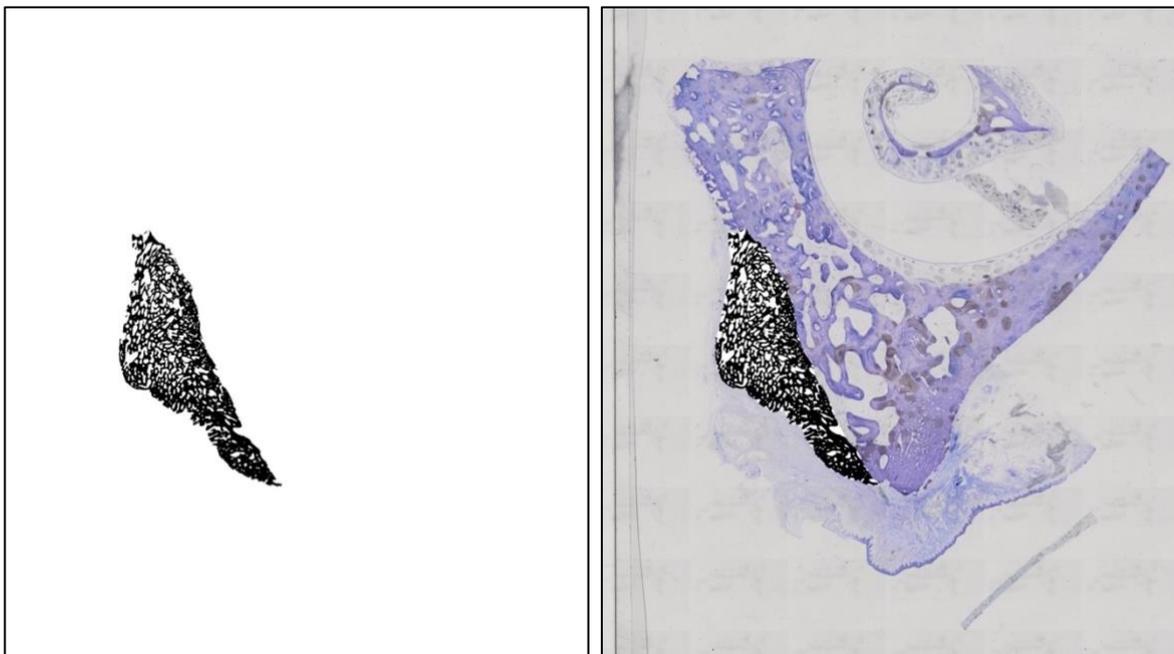


Abb. 7: Binärbilder

Links: Binärbild der zuvor segmentierten ROI. Rechts: Übersichtsaufnahme mit Binärdarstellung der ROI.

2.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Hilfestellung des Instituts für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen (Leiter Prof. Dr. Tim Friede). Zur Ermittlung des p-Wertes wurde bei linear gemischtem Modell unter Berücksichtigung der Messwiederholungen eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die Verteilung der Variablen wurde mit Hilfe von Boxplots grafisch dargestellt (Excel®, Microsoft Corporation, Redmond USA).

2.4.4 Auswertungsmethoden der Histomorphometrie

Zur Erstellung der grafischen Boxplots wurde die Verteilung der Variablen Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens für jeden Prüfkörper separat zu jedem der zwei Zeitpunkte $t_1 =$ vier Wochen und $t_2 = 13$ Wochen beschrieben. Durch die Anwendung des *split-mouth* Modells mit Testung von zwei Prüfkörpern pro Kiefer wurde der Einfluss des Prüfkörpers (Blank, Leer, rhBMP-2, rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2) zu den jeweiligen Zeitpunkten auf die Parameter Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens mit einem linear gemischten Modell unter Berücksichtigung der Messwiederholungen untersucht und der p-Wert mittels Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Für Ergebnisse, die sich signifikant zeigten, wurden mit

linearen Hypothesentests für gemischte Modelle paarweise Prüfkörpervergleiche durchgeführt. Der Unterschied zwischen den Zeitpunkten t_1 = vier Wochen und t_2 = 13 Wochen wurde für jeden Prüfkörper mit dem Mann-Whitney-Test untersucht. Als Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests $\alpha = 5\%$ festgelegt. Für die Fälle des multiplen Testens wurden die p-Werte mittels Bonferroni-Holm-Methode angepasst. Die Durchführung der statistischen Berechnungen erfolgte mit der Statistiksoftware R (Version 3.1.2, www.r-project.org). Für die Modellierung der linear gemischten Modelle wurde das R-Paket „lme4“, zur Analyse multipler Vergleiche das R-Paket „multcomp“, bei dem eine p-Wertanpassung bereits implementiert ist, herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

Von 18 Versuchstieren erlag ein Schwein der 13-Wochen-Versuchsgruppe postoperativ nach einem Tag Narkosekomplikationen. Bei den verbliebenen Tieren verlief die Versuchsdurchführung wie zuvor geplant. Spätestens fünf Tage postoperativ war bei keinem der Tiere eine analgetische Therapie mehr notwendig. Alle Wunden konnten zur Ausheilung gebracht werden. Offensichtliche Wunddehiszenzen waren nicht zu vermerken. Eine intraorale Inspektion zur umfangreichen Wundkontrolle konnte am nicht sedierten Tier jedoch nicht durchgeführt werden. Klinische Anzeichen für systemische Infektionen traten nicht auf.

3.2 Deskriptive histologische Untersuchung

Zur histologischen Untersuchung wurde zusätzlich zu den Toluidin-Blaufärbungen je ein Präparat nach Smith-Karagianes gefärbt. Exemplarisch werden im Folgenden einige histologische Präparate beschrieben.

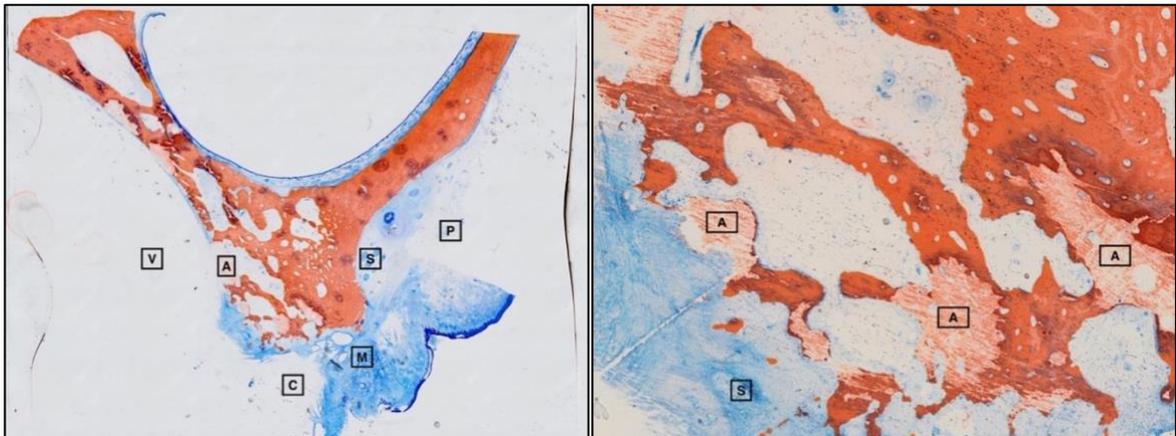


Abb. 8: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Blank-vier-Wochen-Kohorte (v=vestibulär, p=palatinal, M= Mukosa, S=Speicheldrüsen, A=Artefakte)

Die Übersichtsaufnahme eines Präparates aus der Blank-vier-Wochen-Kohorte erscheint stark spongiös. Ein Defekt lässt sich nicht crestal/vestibulär nicht ausmachen. Der Alveolarkamm wirkt im Vergleich zu Präparaten anderer Gruppen atroph. Palatinal (P) erscheint der Knochen kompakter als vestibulär (V). Im teilweise erhaltenen blau gefärbten Bindegewebe der Mukosa (M) finden sich Speicheldrüsen (S). Die hellrosa gefärbten Anteile stellen sich in der Vergrößerung als Artefakte (A) dar. Deutlich zu erkennen sind Schliiffacetten durch das Dünnschliffverfahren.

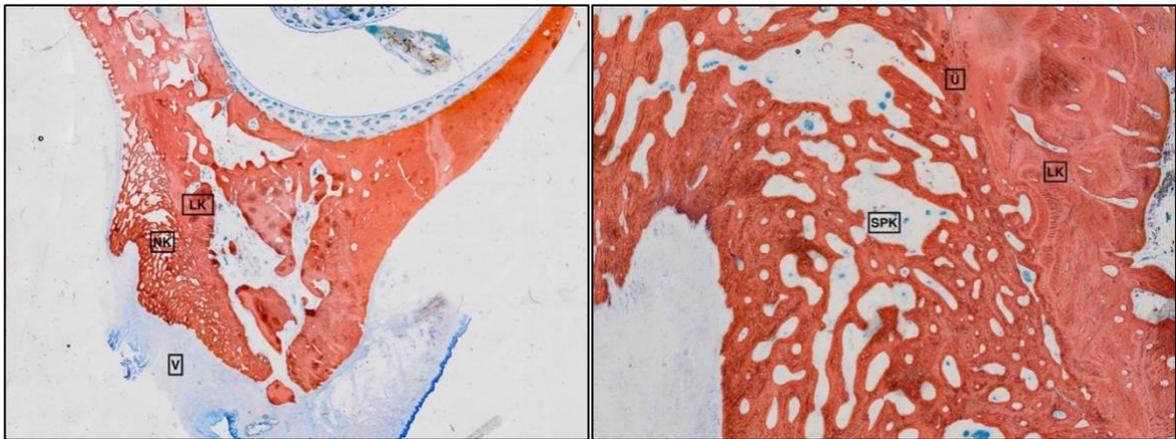


Abb. 9: Übersicht- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Blank-13-Wochen-Kohorte

V=vestibulär, Ü=Übergang Knochenlager zu neugebildetem Knochen, LK Knochenlager, NK=neugebildeter Knochen, SPK=spongioser Knochen)

In der Übersichtsaufnahme der Blank-13-Wochen-Kohorte finden sich deutliche Zeichen der Knochenneubildung vestibulär (V). Sowohl Quantität als auch Qualität erscheinen hoch. Der Übergang (Ü) von Knochenlager (LK) zu neugebildetem Knochen (NK) lässt sich deutlich abgrenzen. Die Zone des neugebildeten Knochens zeigt eine feinporige spongiöse Struktur (SPK). Der ortsständige Knochen erscheint kompakter mit deutlich größerer spongiöser Struktur und größerem mineralisiertem Hartgewebsanteilen.

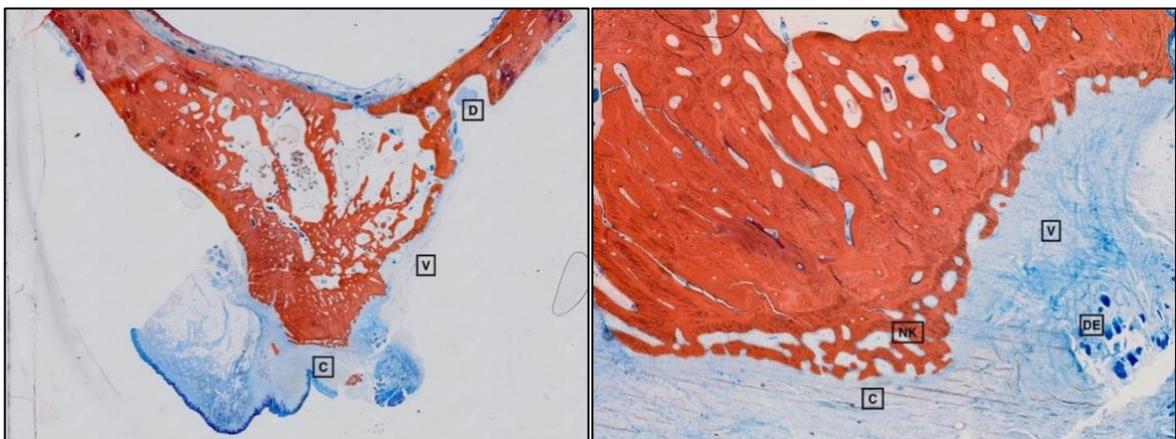


Abb. 10: Übersicht- und Detailaufnahme eines Präparates aus der Leer-vier-Wochen-Kohorte

(D=Defekt, C=crestal, NK=neugebildeter Knochen, DE=Drüsenepithel)

Die Übersichtsaufnahme eines Präparats der Leer-vier-Wochen-Kohorte zeigt kaum Knochenneubildung. Vestibulär zeigt sich ein knöcherner Defekt (D), ohne Anzeichen für eine Knochenneubildung. Diese lässt sich im crestalen Bereich (C) des Präparats finden. Die Vergrößerung gibt einen Ausschnitt der spärlichen Knochenneubildung (NK) crestal wider. Im dargestellten Bindegewebe findet sich Drüsenepithel (DE).

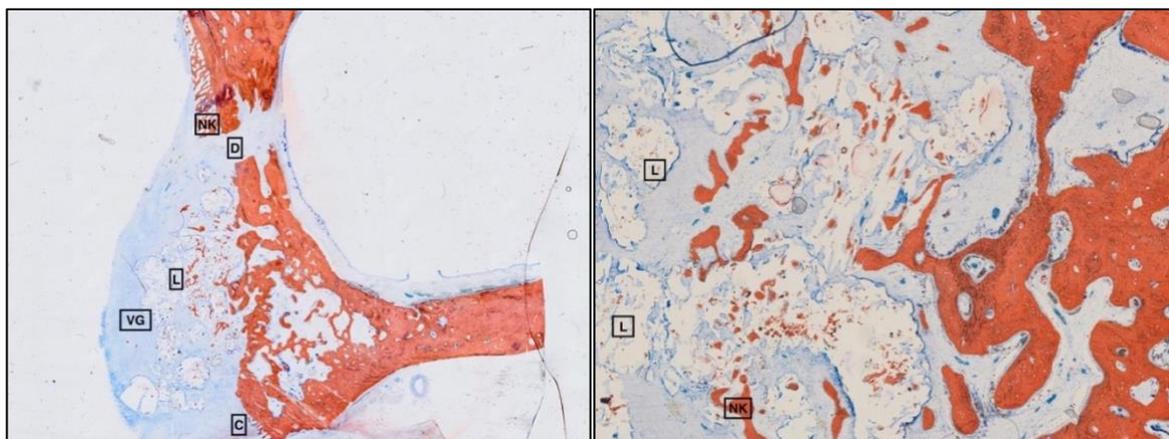


Abb. 11: Übersicht- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte (VG=vestibuläre Gingiva, L=Lakunen, NK=neugebildeter Knochen, C=Crestal, D=Defekt)

Die Übersicht eines Präparats der rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte zeigt eine Auftreibung der vestibulären Gingiva (VG). Es finden sich zahlreiche Lakunen (L), die den ehemaligen, durch den Färbeprozess ausgewaschenen Augmentatpartikeln entsprechen. Hochvestibulär zeigt sich eine geordnete Knochenneubildung (NK), crestalwärts (C) endet diese abrupt auf Höhe eines Knochendefekts (D). Die Knochenneubildung vestibulär/crestal erscheint weniger geordnet und deutlich spärlicher. In der Vergrößerung lässt sich jedoch auch peripher Knochenneubildung (NK) nachweisen.

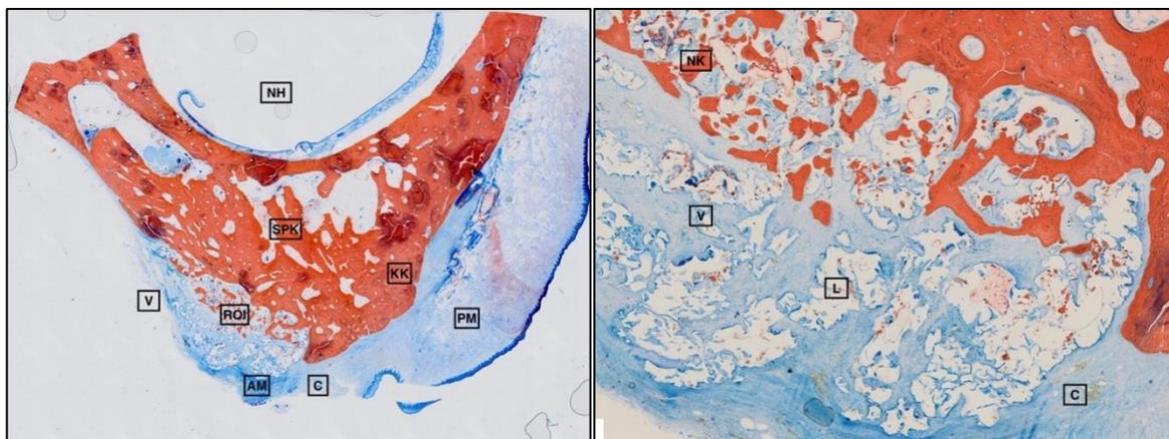


Abb. 12: Übersicht- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhBMP-2-13-Wochen-Kohorte (NH=Nasenhöhle, AM=Alveolarmukosa, KK=kompakter Knochen, SPK=spongioser Knochen, PM=palatinale Mukosa, ROI=*region of interest*, C=crestal, V=vestibulär, L=Lakunen)

Im linken oberen Bildanteil kommt die Nasenhöhle (NH) zur Darstellung. Die Alveolarmukosa (AM) ist blau gefärbt und umgibt den Alveolarkamm. Der Defekt ist ausgekleidet von Granulationsgewebe und Anteilen neugebildeten Knochens. Die knöchernen Strukturen kommen in der Smith-Karagianes Färbung als rote/orange Matrix zur Darstellung. Der äußeren Zone des kompakten Knochens (KK) schließt sich eine spongiöse Zone (SPK) an. Die

Alveolarmukosa (AM) über dem Augmentatereale erscheint inhomogener im Vergleich zur palatinalen Mukosa (PM). Im rechten Teil der Abbildung ist die Vergrößerung der region of interest (ROI) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Region neu gebildeten Knochens (NK) crestal (C) und vestibulär (V) im ehemaligen Defektareal. Die durch den Färbeprozess ausgewaschenen Augmentatartikel hinterlassen im Bindegewebe Lakunen (L).

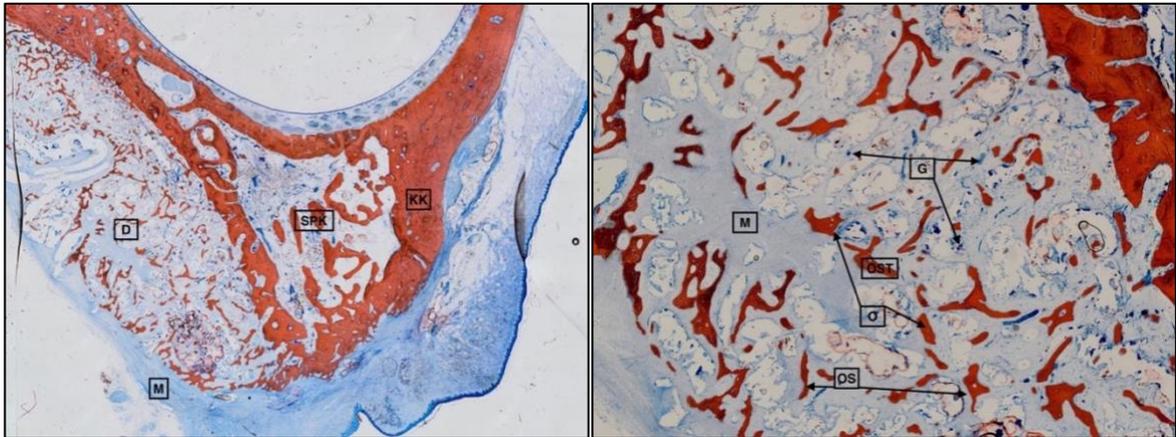


Abb. 13: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte

(D=Defekt, M=Mukosa, SPK=spongöser Knochen, KK=Kompakter Knochen, G=Gefäße, OS=Osteoblasten, OST=Osteoid, O=Osteozyten)

Der Defekt (D) ist großflächig mit neugebildetem, wenig mineralisiertem Knochen aufgefüllt. Im Vergleich zum ortsständigen Knochen fällt ein deutlicher Knochendichteunterschied auf. Die hellblau gefärbte Mukosa (M) enthält Fibrozyten. Deutlich abgrenzbar sind die spongiöse (SPK) und kompakte Zone (KK) des Knochens. In der Vergrößerung finden sich zahlreiche Gefäße (G), zu erkennen an den intraluminalen Erythrozyten. Die Zonen beginnender Mineralisation sind von Osteoblasten (OS) umgeben. Zentral befinden sich bereits vollständig von Osteoid (OST) umgebene Osteozyten (O).

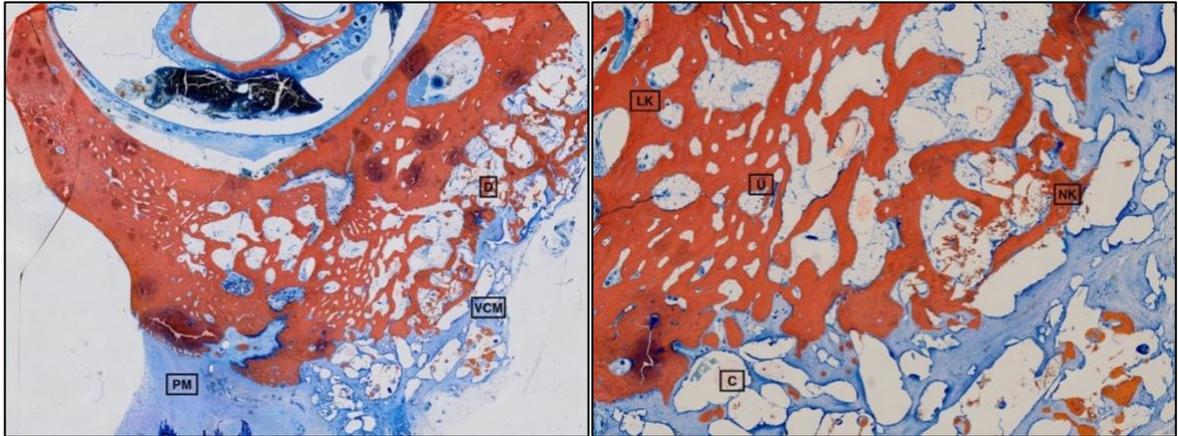


Abb. 14: Übersichts- und Detailaufnahme eines Präparates aus der rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2-13-
Wochen-Kohorte

(D=Defekt, VCM=vestibulär-crestale Mukosa, PM=palatinale Mukosa, NK=neugebildeter Knochen, C=crestal, LK=Lagerknochen)

Der Defektbereich (D) erscheint in der Dimension breiter als tief und ist nur minimal vom ortständigen Knochen eingerahmt. Die vestibulär-crestale Mukosa (VCM) ist im Vergleich zur palatinalen Mukosa (PM) inhomogener und erscheint aufgelockert. Der neugebildete Knochen (NK) ist im Vergleich zur rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2-vier-Wochen-Kohorte deutlich kompakter. Im crestalen Bereich (C) ist der Übergang vom neu gebildeten Knochen (NK) zum Lagerknochen (LK) nur schwer abgrenzbar.

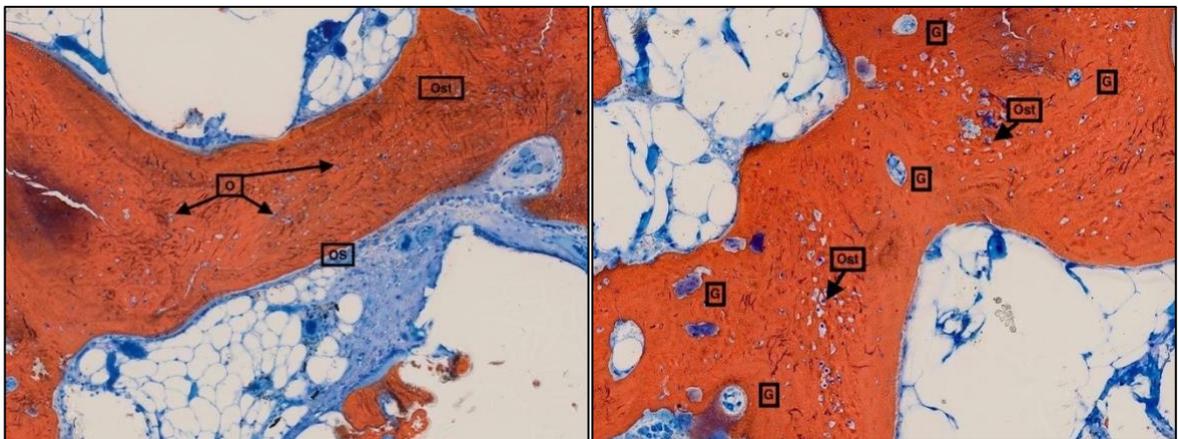


Abb. 15: Detailaufnahme eines Präparates der rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2-13 Wochen-Kohorte
(OS=Osteoblastensaum, OST=Osteoid, O=Osteozyten)

Deutlich zu erkennen der Osteoblastensaum (OS) als Zeichen der Knochenneubildung. Das neugebildete Osteoid (OST) ummauert zahlreiche Osteozyten (O).

Tab. 8: Deskriptive Statistik der Gesamtfläche und der Fläche neugebildeter Knochen separat für jeden Prüfkörper und Zeitpunkt.

| Variable | Zeitpunkt | Parameter | Blank | rhBMP-2 | Leer | rhVEGF- A ₁₆₅ & rhBMP-2 |
|-------------------------------|-------------|-----------|-------|---------|-------|------------------------------------------|
| Fläche neu gebildeter Knochen | vier Wochen | Min. | 11.90 | 2.76 | 6.22 | 2.10 |
| | | 1st Qu. | 12.57 | 2.85 | 11.94 | 8.18 |
| | | Median | 13.23 | 21.35 | 17.67 | 20.09 |
| | | Mean | 19.10 | 21.50 | 15.87 | 14.90 |
| | | 3rd Qu. | 22.69 | 25.65 | 20.69 | 20.44 |
| | | Max. | 32.16 | 54.88 | 23.71 | 23.72 |
| | 13 Wochen | Min. | 3.26 | 1.93 | 7.90 | 37.94 |
| | | 1st Qu. | 6.38 | 14.32 | 11.72 | 43.12 |
| | | Median | 9.50 | 40.05 | 15.53 | 50.34 |
| | | Mean | 8.11 | 35.56 | 16.23 | 54.13 |
| | | 3rd Qu. | 10.53 | 44.53 | 20.39 | 63.91 |
| | | Max. | 11.56 | 79.57 | 25.26 | 77.00 |
| Gesamtfläche | vier Wochen | Min. | 19.10 | 5.39 | 10.68 | 9.36 |
| | | 1st Qu. | 25.43 | 8.02 | 21.83 | 15.60 |
| | | Median | 31.76 | 26.60 | 32.98 | 33.79 |
| | | Mean | 32.66 | 29.34 | 29.71 | 42.73 |
| | | 3rd Qu. | 39.44 | 34.37 | 39.23 | 35.10 |
| | | Max. | 47.11 | 72.32 | 45.47 | 119.82 |
| | 13 Wochen | Min. | 9.97 | 2.36 | 25.74 | 63.22 |
| | | 1st Qu. | 16.50 | 21.99 | 27.16 | 75.47 |
| | | Median | 23.03 | 65.49 | 28.59 | 81.57 |
| | | Mean | 23.53 | 58.07 | 30.62 | 82.68 |
| | | 3rd Qu. | 30.31 | 84.77 | 33.06 | 84.49 |
| | | Max. | 37.59 | 116.39 | 37.53 | 110.83 |

Tab. 9: ANOVA-Ergebnisse des Vergleichs der Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens zwischen den Prüfkörpern zu jedem Zeitpunkt.

| Zeitpunkt | Variable | Faktor | p | p.holm |
|-------------|------------------------------|------------|--------|--------|
| vier Wochen | Gesamtfläche | Prüfkörper | 0.8707 | 1 |
| | Fläche neugebildeter Knochen | Prüfkörper | 0.6588 | 1 |
| 13 Wochen | Gesamtfläche | Prüfkörper | 0.0165 | 0.0495 |
| | Fläche neugebildeter Knochen | Prüfkörper | 0.0052 | 0.0208 |

Tab. 10: Ergebnisse des paarweisen Prüfkörpervergleichs zum Zeitpunkt 13 Wochen.

| Zeitpunkt | Variable | Vergleich | Schätzwert | p |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|--------|
| 13 Wochen | Gesamtfläche | rhBMP-2 vs. Blank | 34.53793148 | 0.3295 |
| | | Leer vs. Blank | 7.087802877 | 0.9873 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. Blank | 59.14922943 | 0.0203 |
| | | Leer vs. rhBMP-2 | -27.4501286 | 0.5354 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. rhBMP-2 | 24.61129795 | 0.3617 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. Leer | 52.06142655 | 0.0539 |
| | Fläche neugebildeter Knochen | rhBMP-2 vs. Blank | 27.45352829 | 0.1933 |
| | | Leer vs. Blank | 8.122866646 | 0.9359 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. Blank | 46.0210074 | 0.0048 |
| | | Leer vs. rhBMP-2 | -19.3306616 | 0.4991 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. rhBMP-2 | 18.56747912 | 0.2306 |
| | | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 vs. Leer | 37.89814076 | 0.0312 |

Tab. 11: Mann-Whitney-U-Test Ergebnisse des Vergleichs der Gesamtfläche und Fläche des neugebildeten Knochens zwischen Zeitpunkt vier Wochen und 13 Wochen separat für jeden Prüfkörper.

| Variable | Prüfkörper | p | p.Holm |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|
| Fläche neugebildeter Knochens | Blank | 0.1 | 0.3 |
| | rhBMP-2 | 0.5368 | 1 |
| | Leer | 1 | 1 |
| | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 | 0.0043 | 0.0172 |
| Gesamtfläche | Blank | 0.7 | 1 |
| | rhBMP-2 | 0.4286 | 1 |
| | Leer | 1 | 1 |
| | rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 | 0.1255 | 0.502 |

Tab. 12: Deskriptive Statistik für das Verhältnis der Fläche des neugebildeten Knochens zur Gesamtfläche (%) separat für jeden Prüfkörper und Zeitpunkt.

| Prüfkörper | Zeitpunkt | Min. | 1st Qu. | Median | Mean | 3rd Qu. | Max. |
|-----------------------------------|-------------|-------|---------|--------|-------|---------|-------|
| Blank | vier Wochen | 41 | 51.84 | 62.67 | 57.56 | 65.84 | 69 |
| Blank | 13 Wochen | 33 | 41.66 | 50.33 | 44.89 | 50.83 | 51.33 |
| rhBMP-2 | vier Wochen | 39.33 | 52.33 | 76 | 64.87 | 76 | 80.67 |
| rhBMP-2 | 13 Wochen | 41.67 | 67.17 | 68.17 | 67.34 | 75.17 | 81.67 |
| Leer | vier Wochen | 53.33 | 53.5 | 53.67 | 54.67 | 55.34 | 57 |
| Leer | 13 Wochen | 35.33 | 48.5 | 61.67 | 55.56 | 65.67 | 69.67 |
| rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 | vier Wochen | 16.67 | 22.67 | 50 | 43.4 | 57.33 | 70.33 |
| rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 | 13 Wochen | 54 | 60.42 | 61.67 | 64.5 | 67.67 | 80 |

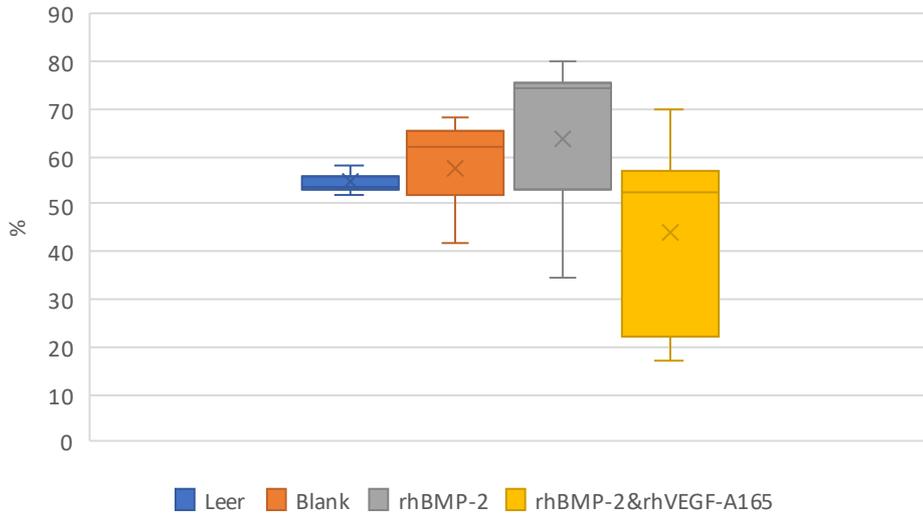


Abb. 16: Darstellung des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zum Zeitpunkt t=vier Wochen.

Die Boxplots des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zeigen keine massiven Abweichungen voneinander. Für rhBMP-2&rhVEGF-A₁₆₅ erscheinen die Werte geringfügig niedriger. Es besteht kein signifikanter Unterschied für die vier Wochen Kohorte.

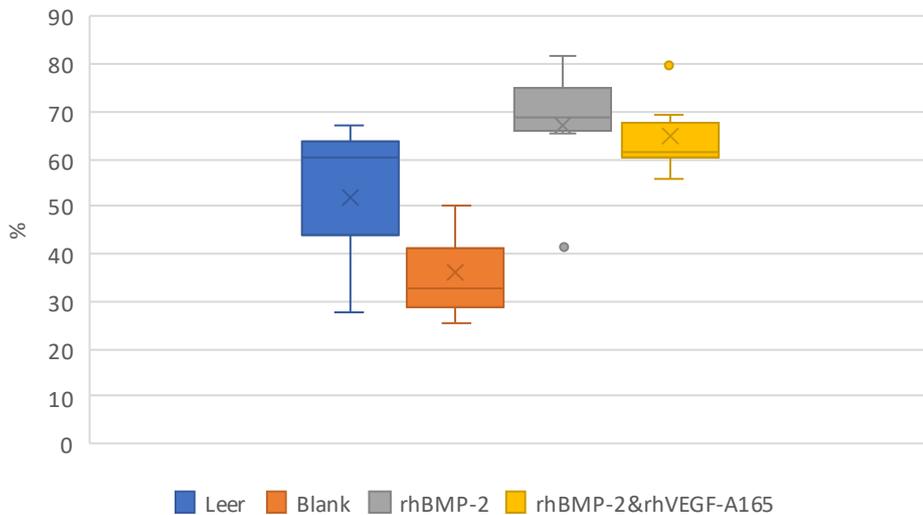


Abb. 17: Darstellung des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zum Zeitpunkt t=13 Wochen.

Die Boxplots des Verhältnisses der neugebildeten Knochenfläche zur Gesamtfläche zeigen keine massiven Abweichungen voneinander. Für rhBMP-2 sowie rhBMP-2&rhVEGF-A₁₆₅ erscheinen die Werte geringfügig größer. Es besteht kein signifikanter Unterschied für die 13 Wochen Kohorte.

Tab. 13: ANOVA-Ergebnisse der Fläche des Vergleichs der Fläche des neugebildeten Knochens/Gesamtfläche (%) - zwischen den Prüfkörpern zu jedem Zeitpunkt.

| Zeitpunkt | Faktor | p |
|-------------|------------|--------|
| vier Wochen | Prüfkörper | 0.2388 |
| 13 Wochen | Prüfkörper | 0.0602 |

Ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses zwischen der Gesamtfläche des neugebildeten Knochens und der isolierten neugebildeten Knochenfläche lässt sich für die unterschiedlichen Zeitpunkte vier Wochen und 13 Wochen nicht nachweisen.

Tab. 14: Mann-Whitney-U-Test Ergebnisse des Vergleichs der Fläche des neugebildeten Knochens/Gesamtfläche (%) - zwischen den Zeitpunkten vier Wochen und 13 Wochen separat für jeden Prüfkörper.

| Prüfkörper | p |
|-----------------------------------|--------|
| Blank | 0.4 |
| rhBMP-2 | 0.9271 |
| Leer | 0.7 |
| rhVEGF-A ₁₆₅ & rhBMP-2 | 0.1255 |

Der Mann-Whitney-U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied des Verhältnisses zwischen der Gesamtfläche des neugebildeten Knochens und der isolierten neugebildeten Knochenfläche für die einzelnen Prüfkörper

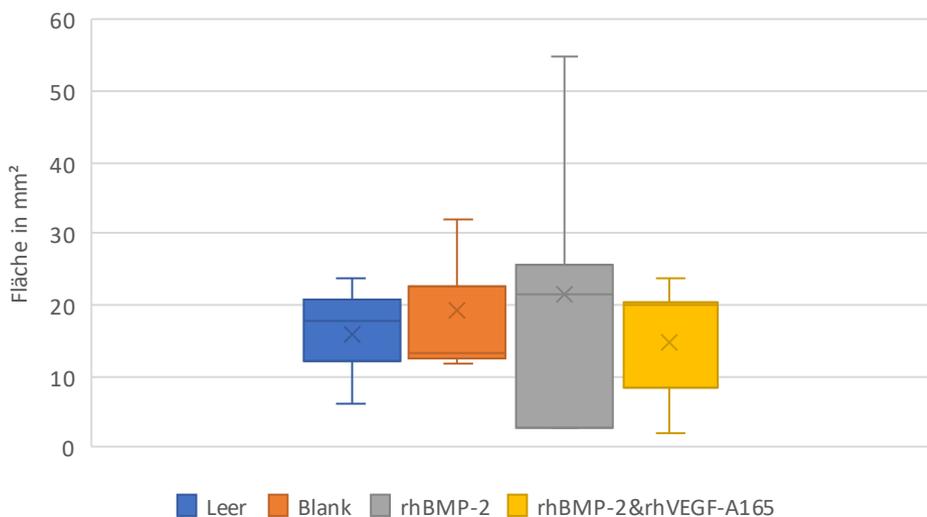


Abb. 18: Darstellung der Fläche des neugebildeten Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt $t_1 =$ vier Wochen.

Abb. 18 zeigt eine homogene Verteilung für alle vier Gruppen Blank/rhBMP-2/Leer/rhBMP-2/VEGF-A₁₆₅

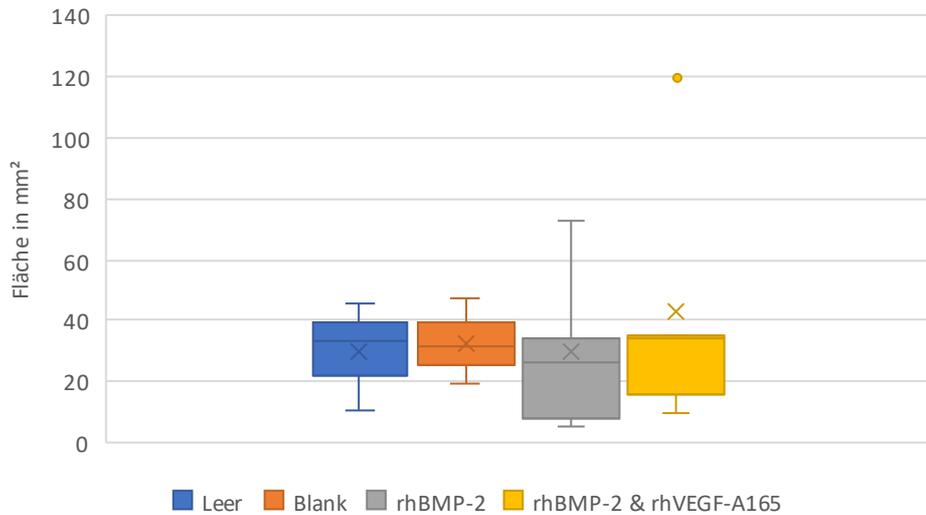


Abb. 19: Darstellung der Gesamtfläche des Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t₁ = vier Wochen.

Es zeigt sich eine homogene Verteilung für alle vier Gruppen Blank/rhBMP-2/Leer/rhBMP-2/VEGF-A₁₆₅

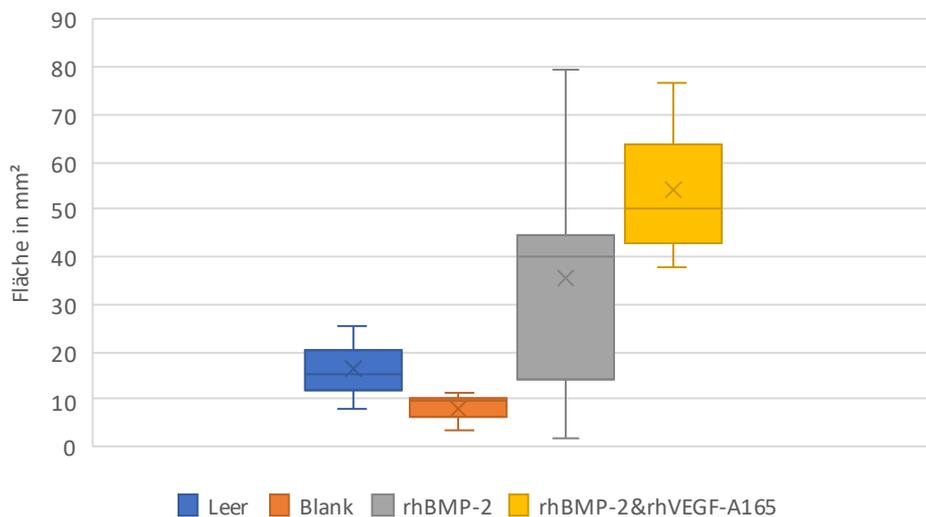


Abb. 20: Darstellung der Fläche des neugebildeten Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt t₂ = 13 Wochen.

Die vorliegenden Boxplots zeigen höhere Werte für rhBMP-2&VEGF-A₁₆₅ und rhBMP-2 im Vergleich zu Leer und Blank.

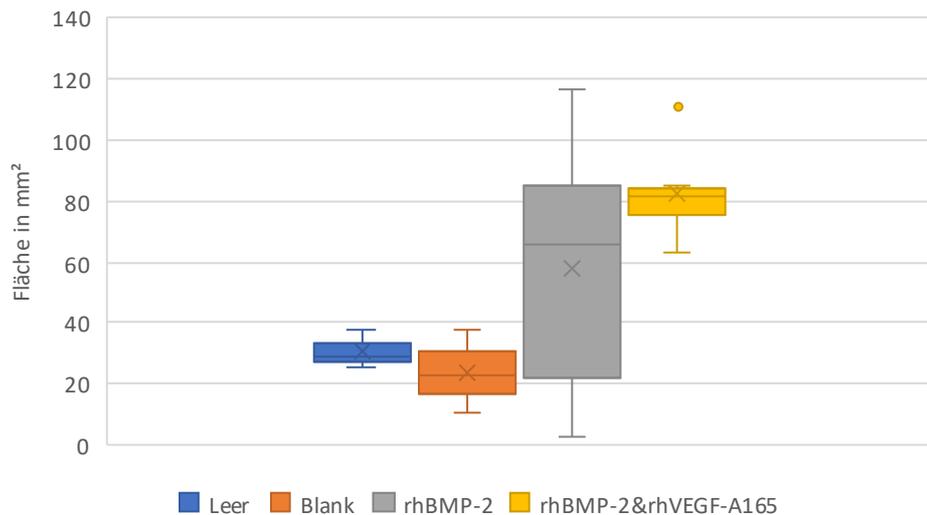


Abb. 21: Darstellung der Gesamtfläche des Knochens im Vergleich der jeweiligen Prüfkörper/Leerproben zum Zeitpunkt $t_2 = 13$ Wochen.

Die vorliegenden Boxplots zeigen höhere Werte für rhBMP-2 im Vergleich und insbesondere rhBMP-2&VEGF- A_{165} zu Leer und Blank.

3.3 Auswertung

Sowohl für die Gesamtfläche des Knochens, als auch für die Fläche des neugebildeten Knochens konnte zwischen den Prüfkörpern ein signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt $t_2 = 13$ Wochen festgestellt werden (siehe Tab. 9). Die paarweise durchgeführten Vergleiche zwischen rhBMP-2/rhVEGF- A_{165} und Blank als auch zwischen rhBMP-2/rhVEGF- A_{165} und Leer belegten, dass ein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen zu den Kontrollgruppen besteht (siehe Tab. 10). Die rhBMP-2/rhVEGF- A_{165} -Kohorte weist zum Zeitpunkt $t_2 = 13$ Wochen deutlich größere Werte für die Gesamtfläche und die Fläche des neugebildeten Knochens als die Kontrollgruppen Leer und Blank (siehe Abb. 20 und Abb. 21). Die Fläche des neugebildeten Knochens ist für die rhBMP-2/rhVEGF- A_{165} -Kohorte signifikant höher (Siehe Tab. 11).

4 Diskussion

Die funktionell ästhetische Rekonstruktion verlorengangenen Gewebes ist seit Jahrhunderten im Fokus der Medizin (Nerlich et al. 2000). Die zunächst rein prothetischen Verfahren wurden im Laufe der Zeit um immer neue operative Verfahren ergänzt. Das wachsende Verständnis für Anatomie, Gewebemanagement, Antisepsis und Analgesie ermöglichte immer aufwendigere Operationen, über lokalplastische Versorgungen, Regionallappen, bis hin zu freien mikrovaskulär anastomosierten Transplantaten. Die Zunahme der Therapieoptionen für Gesichtsversehrte, führt einerseits zu guten funktionellen und ästhetischen Ergebnissen, andererseits, mit steigender Invasivität der Eingriffe, auch zu einer erhöhten peri- und postoperativen Morbidität. Mit dem demografischen Wandel erhöht sich die Anzahl immer älterer und multimorbider Patienten, die bei Frakturen, Tumoren oder anderen Läsionen des Kopf-Halsbereichs aufwendigen Rekonstruktionen zugeführt werden. Deren peri- und postoperative Morbidität erweist sich naturgemäß als erhöht (Morgan et al. 1982) und führt durch die umfangreichere Behandlung zu zusätzlichen Kosten für das Gesundheitssystem. Knochenregenerative Maßnahmen der Kiefer sind weit verbreitet etabliert und werden häufig im Rahmen von zahnärztlichen Implantationen angewandt (Sanz et al. 2019). Das Ergebnis dieser Eingriffe hängt im Wesentlichen von der korrekten Auswahl der zur Verfügung stehenden Techniken ab (Sanz et al. 2019). Sozioökonomische und psychosoziale Faktoren spornen die Forschung an immer schonendere und effizientere Verfahren der Rekonstruktion zu entwickeln (Rueger 1998). Ein möglicher Ansatz hierzu kann die Entwicklung alloplastischer Implantate sein, die durch vollständige Biodegradation, osteoinduktive und -konduktive Eigenschaften eine *restitutio ad integrum* ermöglichen. Vorangegangene Studien konnte zeigen, dass mit Wachstumsfaktoren beladene Polylactid Träger vielversprechende Ergebnisse liefern können (Lohse et al. 2015).

Aufgabe dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Kombination von rhBMP-2 mit rhVEGF-A₁₆₅ es ermöglicht die Konzentration der verwendeten Wachstumsfaktoren im Vergleich zum singulären Gebrauch von rhBMP-2 in hoher Dosierung zu verringern und in wieweit sich die erfolgreiche Anwendung im Großtiermodell bestätigen lässt.

4.1 Versuchsaufbau

Der Nachweis, dass die Kombination von Wachstumsfaktoren mit osteokonduktivem Trägermaterial *in vitro* und im Kleintiermodell signifikant mehr Knochenwachstum als die alleinige Verwendung alloplastischen Materials bewirkt, ist in der Literatur beschrieben (Kübler et al. 2004; Lohse et al. 2015). Bevor sie jedoch im klinischen Alltag Anwendung finden kann, gilt es weitere Aspekte untersuchen. So ist die Frage zu klären, ob die *in vitro* Ergebnisse und

Erfolge aus vorangegangenen Versuchen im extraoralen Mausmodell auch bei einer realitätsnahen Anwendung durch intraorale Defektsetzung und Versorgung im Großtiermodell zu bestätigen sind. Die Verwendung von Tiermodellen ist gesellschaftlich umstritten (Exner et al. 2004; Gothard et al. 2014; Franco 2016). Vor Anwendung von neuen Wirkstoffen am Menschen, sind Versuchsreihen an Tieren jedoch gesetzlich vorgeschrieben (Exner et al. 2004). Um die größtmögliche Aussagekraft zu erzielen, sollte das Tiermodell der menschlichen Physiologie nahekommen (Ruehe et al. 2009). Die Notwendigkeit multiple Tierversuche mit unterschiedlichen Modellen durchzuführen ist belegt, denn erst die Kombination verschiedener Versuchsergebnisse macht die Anwendung am Menschen sicher (Horner et al. 2010). Für die in dieser Arbeit zu untersuchende Fragestellung eignet sich das Göttinger Minischwein in besonderer Weise, da der porcine Knochen dem humanen in Struktur, Mineralisation und Stoffwechsel ähnelt (Ruehe et al. 2009). Anders als beim Menschen ist die Mundhygiene beim Schwein nicht kontrollierbar. Die damit einhergehende zusätzliche Belastung wurde in dieser Studie bedacht und akzeptiert. Da der Knochenmetabolismus der Kiefer sich maßgeblich von dem peripherer Knochen, wie zum Beispiel der Tibia unterscheidet (Huja et al. 2006), kamen alternative Knochenregionen nicht in Betracht. Im Gegensatz zur klinischen Anwendung von Knochenersatzmaterialien, die häufig in Kombination mit Biomembranen eingesetzt werden, wurde in dieser Pilotstudie bewusst auf die Methode der GBR verzichtet um die Zahl der Einflussfaktoren auf die Ergebnisse zu minimieren. Die Anwendung zusätzlichen Fremdmaterials erhöht die Gefahr von Wundinfektionen (Krinko 2018), die die Wirkung von Wachstumsfaktoren und damit die Knochenregeneration reduzieren (Alt et al. 2011).

Tierschutzbestimmungen und ethische Verantwortung machen es im Rahmen von Tierversuchen erforderlich die Anzahl der zu untersuchenden Tiere so gering wie möglich zu halten. Gleichzeitig sorgt eine geringe Zahl an Versuchstieren für Unsicherheiten bei den Ergebnissen. Interindividuelle Unterschiede des Knochenmetabolismus der Tiere kann zu erheblichen Verzerrungen führen. Ob bei einzelnen Versuchstieren Stoffwechselstörungen vorlagen und dadurch die Ergebnisse beeinflusst wurden, lässt sich nicht mit absoluter Sicherheit sagen. Bei einer deutlich größeren Versuchstieranzahl hätten einzelne Tiere mit Anomalien oder Störungen des Knochenmetabolismus weniger starken Einfluss auf die Ergebnisse. Die Tatsache, dass ein Versuchstier der vier-Wochen-Kohorte in Folge von Narkosekomplikationen verstarb, kann einen Einfluss auf die statistische Auswertung haben. Auch werden physiologische, interindividuelle Unterschiede der Tiere durch den Versuchsaufbau nicht berücksichtigt. Im Sinne des Tierwohls und auch für aussagekräftigere Ergebnisse wären Versuchsaufbauten mit Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten am lebenden Tier wünschenswert. Einerseits, weil der Versuch nicht zwangsläufig mit der

Euthanasie das Leben der Tiere beenden würde, andererseits, weil so interindividuelle Unterschiede weniger Einfluss auf die Ergebnisse hätten und der intraindividuelle Verlauf zuverlässigere Aussagen über die Ergebnisse verschiedener Zeitpunkte erlauben würde. Bisher sind jedoch keine adäquaten Versuchsaufbauten hierzu in der Literatur bekannt.

Die für die Studie gewählten Zeiträume entsprechen den in der Literatur üblicherweise verwendeten Zeitpunkten von vier Wochen und 13 Wochen (Lohse et al. 2015; Schorn et al. 2017). Die Implantation der *composite* Granuala erfolgte in der Phase der frühen Kallushärtung, die Auswertung in der späten Phase der Kallushärtung und in der Phase des frühen Remodelling (siehe Kap. 1.6).

4.2 Histologische Untersuchung und Histomorphometrie

In dieser Studie wurde die Knochenneubildung im Defektbereich mittels deskriptiver Histologie und Histomorphometrie untersucht. Mit Hilfe der deskriptiven Histologie wurde versucht die Qualität des Knochens zu beschreiben. Zur Untersuchung struktureller Veränderungen der Knochengeometrie oder -masse fehlt es ihr jedoch an Sensitivität (Varela und Jolette 2018).

Die Histomorphometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Messung der Quantität von knöchernen Strukturen wie Remodellierungsrate, Knochenformation, -mineralisation und -resorption (Engelke et al. 1999; Varela und Jolette 2018) und ermöglicht insbesondere die Evaluation von neugebildeten Knochenarealen (Compston et al. 2018). Für die histomorphometrische Untersuchung ist die Verwendung nichtentkalkifizierten Knochens erforderlich. Die Aufbereitung der Präparate und Herstellung der Dünnschliffe ist zeit- und kostenintensiv. Dennoch gilt die Histomorphometrie als Goldstandard zur Evaluation des Knochenmetabolismus und der Knochenmineralisation (Vidal et al. 2012). Die Auswertung der Präparate erwies sich zum Teil als anspruchsvoll. Nicht immer eindeutig war die Festlegung zwischen neugebildetem und ortsständigem Knochen, insbesondere die Region des ehemaligen Knochendefekts in den Präparaten der Leer-Gruppe ausfindig zu machen war zeitaufwendig. Grund hierfür waren der lange Zeitraum zwischen Zahnextraktion und Euthanasie von gut sechs Monaten und die damit abgeheilten knöchernen Strukturen. Zur Vermeidung von Fremdkörperreaktionen und -interaktionen wurde im Rahmen der Operationen auf die Insertion eines Markers verzichtet, dies hätte bei der anschließenden Aufarbeitung der Präparate jedoch die Defektregion sicher und einfach abgrenzen können.

Ergänzend hätte die Untersuchung der Kieferpräparate vor der Aufbereitung im Dünnschliffverfahren mittels Mikro-CT erfolgen können. Hierbei wären Aussagen zur Dreidimensionalität möglich geworden. Da entsprechende Geräte für diese Studie zum

Zeitpunkt der Untersuchung nicht zu Verfügung standen, ist dies nicht erfolgt, sollte jedoch bei künftigen Arbeiten berücksichtigt werden.

4.3 Ergebnisse

In der histologischen Untersuchung fiel insbesondere auf, dass in den rhVEGF-A₁₆₅ & rhBMP-2-Kohorten bereits in der vier Wochengruppe eine deutliche Knochenneubildung bestand. Zwar erschienen die Augmentatregionen nur spärlich mineralisiert, die Gesamtfläche des neugebildeten Knochens entsprach im histologischen Eindruck jedoch dem ehemaligen Defektareal. Für die 13-Wochen-Kohorten imponiert der Eindruck einer deutlich vermehrten Mineralisation, mit teilweise nur noch schwer abgrenzbarem Übergang von Knochenlager zu neugebildetem Knochen. Ein kräftiger Osteoblastensaum, zahlreiche Gefäße im Transplantatareal und eine kompakte Knochenstruktur sprechen für eine hohe Regenerationspotenz des Knochens im Defektbereich.

Die histomorphometrische Auswertung der Messungen zeigt für den Zeitraum von vier Wochen keine signifikanten Unterschiede für die einzelnen Versuchsreihen (siehe Abb. 18). Das Ergebnis deckt sich nicht mit vorangegangenen Studien in der Literatur, bei denen zumeist für rhBMP-2-beladene Trägermaterialien eine signifikant bessere Knochenneubildung beschrieben ist (Kessler et al. 2003). Zurückzuführen ist dieses Ergebnis möglicherweise auf die intraorale Anwendung im Schwein. Die Mundhöhle ist eine der am stärksten keimbelasteten Regionen des Organismus. Alt et al. wiesen nach, dass die Wirkung von rhBMP-2 unter Einfluss einer Infektion reduziert ist und im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied liefert (2011). Zwar wurden im Rahmen dieser Studie keine Zeichen einer Infektion wie Fieber oder reduzierter Allgemeinzustand bei den Schweinen festgestellt, eine dezidierte intraorale Untersuchung oder Wundpflege konnte bei den Versuchstieren jedoch nicht durchgeführt werden.

Signifikante Unterschiede zu den Vergleichsgruppen, unbeladene PLDDA/CaCO₃-Träger und Leerdefekt, ergaben sich für die mit rhVEGF-A₁₆₅/rhBMP-2 beladenen Träger nach 3 Monaten. Wie in einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, verbessert die Kombination von Wachstumsfaktoren demnach die Ossifikation, bei gleichzeitiger Reduktion der absoluten Konzentration der verwendeten Wachstumsfaktoren (Lohse et al. 2015). Interessant ist, dass ein signifikanter Unterschied der Knochenneubildung zwischen den mit wachstumsfaktorbeladenen Trägern und den Kontrollgruppen erst nach 13 Wochen eintritt. Auch wenn im Rahmen dieser Studie keine Untersuchung zur Freisetzungskinetik der angewandten *composite* Granula erfolgt ist, lässt sich dadurch eine langfristige Freisetzung der Wachstumsfaktoren auch über vier Wochen hinaus vermuten. Die signifikanten Ergebnisse der

13-Wochen-Kohorte basiert möglicherweise auf vollständig ausgeheilten Wundverhältnissen und der weiterhin vorhandenen Freisetzung der Wachstumsfaktoren. Eine Aussage über die Biodegradation des PLDDA/CaCO₃-Trägermaterials ist nicht möglich, da dieses im Rahmen der histologischen Aufbereitung durch Auswaschung nicht mehr in den Schliffpräparaten zu quantifizieren ist. Demnach ist eine Dichtezunahme des Knochens im Vergleich zwischen vier und 13 Wochen durch Biodegradation des Trägermaterials denkbar. Möglicherweise befinden sich Ossifikation und Biodegradation im späteren zeitlichen Verlauf im Gleichgewicht.

Keine Antwort gibt diese Studie auf langfristige Ergebnisse. Der gewählte Zeitraum von 3 Monaten entspricht der frühen Remodellierungsphase in der Knochenheilung, eine weitere flächenmäßige Zunahme an neugebildetem Knochen wäre mit fortschreitender Zeit nicht zu erwarten, ob eine weitere Dichtezunahme des Knochens stattfindet ist in zukünftigen Arbeiten zu klären.

Die nach Zahnextraktion gesetzten Defekte wurden der Selbstheilung überlassen und waren somit chronifiziert. Das Setzen der zweiten Operationswunde durch Tunnelierung, löste zwar einen erneuten inflammatorischen Reiz aus, eine Anfrischung des Knochenlagers erfolgte nicht. Entsprechend zeigen die Präparate der Gruppe Leerproben ohne Augmentat nur wenig neu gebildeten Knochen, da durch die minimalinvasive Technik nur ein kleiner Reiz, der eine physiologische Heilung unterstützen würde, gesetzt wurde. Auch die Gruppe der wachstumsfaktorfreien Augmentate zeigt nur eine geringe Knochenneubildungsrate. Erklärbar ist das Ausbleiben der Knochenneubildung ebenfalls durch den Mangel an Regenerationspotenz aus dem Implantatlager. In der klinischen Arbeit werden chronische Knochendefekte, wie z. B. Pseudarthrosen vor der Augmentation angefrischt um den physiologischen Heilungsreiz zu triggern. Um den Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Knochenregeneration zu klären, wurde in dieser Arbeit explizit auf das Anfrischen des Implantatlagers verzichtet.

Bei den verwendeten Versuchstieren ist von einer physiologischen Knochenstoffwechsellage auszugehen. Kompromittierende Faktoren wie antiresorptive Medikation, Tumoren oder Osteoporose lagen nicht vor. Im klinischen Alltag sind jedoch genau diese Faktoren häufiger Auslöser peri- und postoperativer Komplikationen und Probleme. Inwiefern pathologische Zustände des Knochens die Knochenregeneration in diesem Versuchsaufbau beeinflussen würden, lässt sich nicht beantworten und muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

4.4 Verwendung von Wachstumsfaktoren

Autologe Transplante, die als Goldstandard in Bezug auf ihre osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften gelten, sind oft in nicht ausreichender Quantität zu gewinnen (Roberts und Rosenbaum 2012) oder müssen im Rahmen eines Zweiteingriffs gewonnen werden und gehen so mit einer erhöhten Entnahmemorbidität einher (Khan et al. 2005). Die osteokonduktiven Eigenschaften lassen sich durch Einsatz xenogenen oder alloplastischen Materials nachbilden. Bei der Knochenregeneration kann die Kombination von Trägermaterialien mit Wachstumsfaktoren ein Therapieansatz sein (Gothard et al. 2014). Aktuell stellt die Ankopplung der Zytokine an das Trägermaterial und die Applikationsform die Herausforderung dar (Ziebart und Al-Nawas 2016). Die Wirkung von Wachstumsfaktoren ist seit ihrer Entdeckung durch Urist 1965 Gegenstand der Forschung. Einzelne Wachstumsfaktoren, wie die am häufigsten angewandten BMP-2 und BMP-7 sind für die Kombination mit Trägermaterialien untersucht und mittlerweile zugelassen (Gothard et al. 2014). Sie finden ihre Anwendung in der Wirbelsäulen Chirurgie, der Traumatologie sowie bei Alveolarkammaugmentationen und Sinusbodenelevationen. Nach anfänglicher Euphorie durch gute Resultate erweiterte sich das Indikationsspektrum und BMPs wurden vermehrt auch im *off-label* Gebrauch eingesetzt. In der Literatur sind jedoch mehrfach postoperative Komplikationen wie ektopes Knochenwachstum, Serome, Hämatome, Antikörperbildung gegen BMP, Radikulitis, pulmonale und neurologische Komplikationen beschrieben (Krishnakumar et al. 2017). Die *food and drug administration* sprach zwischenzeitlich gar eine Warnung vor dem *off-label* Gebrauch von Infuse® (rhBMP-2) aus (Carragee et al. 2011). Aus der Zusammenschau der Literatur ergibt sich aber, dass die Verwendung von BMPs bei korrekter Durchführung und Indikation sicher ist.

VEGF führt durch seine angiogenetischen Eigenschaften zu einer vermehrten Bildung von Gefäßen im Implantat. Durch die damit einhergehende erhöhte Perfusion des Transplantats kann es lokal zu einer Verbesserung des Nährstoff- und Sauerstoffangebots kommen, womit die Knochenregeneration beschleunigt und unterstützt wird. Daneben übt VEGF zusätzlich Einfluss auf Osteoklasten und -blasten und damit auf die Knochenremodellierung aus. So erhöht VEGF bei Bindung an Osteoklasten deren Resorptionsrate. Die Osteoblastenaktivität wird beeinflusst, indem VEGF die Expression der alkalischen Phosphatase erhöht (Ogilvie et al. 2012).

VEGF ist im klinischen Alltag bisher jedoch nicht im Einsatz. Vielmehr basieren aktuelle Behandlungen auf einer Unterdrückung seiner Funktionen. Seine nachgewiesenen antiapoptotischen Eigenschaften (Gerber et al. 1998) sind im Rahmen der Angiogenese von besonderer Bedeutung. Diese haben zur Entwicklung diverser VEGF Antikörper, wie

Bevacizumab für die Behandlung fortgeschrittener Darm-, Lungen-, Nieren-, und gynäkologischer Karzinome und Ranibizumab zur Therapie der feuchten Makuladegeneration geführt. Wong et al. postulieren, dass die Höhe der VEGF Serumkonzentration bei Tumorerkrankungen mit der Letalität korreliert (2001). Es besteht demnach Grund zur Annahme, dass die klinische Anwendung von VEGF problematisch sein könnte. Andererseits konnte in zahlreichen Studien, die bis hin zu klinischen Versuchsphasen reichen, die erfolgreiche Anwendung von VEGF gezeigt werden (Gupta et al. 2009; Ylä-Herttua 2009). Studien wie KAT (Hedman et al. 2003) und EUROINJECT ONE (Kastrup et al. 2005) untersuchten VEGF-A₁₆₅ in seiner Wirkung auf das ischämisch geschädigte Myokard. Fiedler et al. wiesen nach, dass VEGF neben der Neoangiogenese, an der Chemotaxis von mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark im Rahmen der Frakturheilung beteiligt ist (2005). Die positive Wirkung der Kombination von VEGF und BMP in Bezug auf die Knochenheilung konnte durch in vitro Studien nachgewiesen werden (Eğri und Eczacıoğlu 2017; Ren et al. 2017)

Ein in vivo Großtierversuch mit realitätsnaher, intraoraler Defektsetzung, wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben, ist aber Voraussetzung vor der klinischen Anwendung am Patienten und ist im Rahmen dieser Pilotstudie untersucht worden. Die Klärung ob VEGF bei der Applikation im Rahmen der Knochenregeneration langfristig pathogen oder gar kanzerogen wirkt ist unklar und ist durch diese Studie nicht zu klären, da hierfür deutlich längere Untersuchungsintervalle erforderlich wären.

Literaturvergleich:

Kessler et al. kombinierten BMP, VEGF oder FGF mit einer Glaskeramik und implantierten die Träger in den medialen Tibiakopf adulter Merinoschafe. Für BMP konnten sie eine erhöhte Neubildung an Knochensubstanz nachweisen. Für VEGF zeigte sich eine Vermehrung der Kapillaren im Transplantatlager ohne jedoch einen Einfluss auf die Biodegradation und Knochenneubildung zu haben. Eine Kombination beider Wachstumsfaktoren fand nicht statt. Synergistische Effekte konnten die Autoren demnach nicht ausmachen (Kessler et al. 2003). Die von den Autoren beschriebene verzögerte Biodegradation unter VEGF Einfluss könnte für einen prolongierten *slow-release* von Wachstumsfaktoren aus dem Trägermaterial sprechen. Analog ließen sich die fast gleichen Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen Leer/Blank vs. rhVEGF-A₁₆₅/rhBMP-2 im kurzfristigen Intervall und die signifikante Vermehrung der Knochensubstanz im langfristigen Intervall erklären.

Özkan et al. untersuchten in einem in vivo Tiermodell die Knochenneubildung an *critical size* Defekten der Mandibula von 54 Neuseeland Kaninchen (Çakır-Özkan et al. 2017). Hierzu wurde ein mit rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ beladener Poly-L-Lactidsäure-Polyethylenglykol

(PLLA-PEG) Träger in einen frischen Knochendefekt inseriert. Die Defektsetzung erfolgte extraoral. Der Versuchsaufbau sah eine schnelle Freisetzung von rhVEGF-A₁₆₅ aus einer oberflächlichen Gelmatrix vor. Die Freisetzung des in das Trägermaterial inkorporierten rhBMP-2 sollte im *slow release* erfolgen. Aufgeteilt in vier Gruppen *scaffold*, *scaffold* + rhBMP-2, *scaffold* + rhVEGF-A₁₆₅ und *scaffold* + rhVEGF-A₁₆₅ + rhBMP-2 wurden nach vier und acht Wochen die Tiere euthanasiert. Laut Özkan et al. zeigte sich, dass die höchste Rate an neugebildetem Knochen nach vier Wochen in der Gruppe *scaffold* + rhVEGF-A₁₆₅ + rhBMP-2 zu verzeichnen war, wohingegen sich nach 8 Wochen für die Gruppe *scaffold* + rhVEGF-A₁₆₅ + rhBMP-2 und *scaffold* + rhBMP-2 kein signifikanter Unterschied ergab. Die Autoren führen dies auf die in beiden Gruppen kontinuierliche Gabe von rhBMP-2 zurück, die sich im zeitlichen Verlauf nach initialer Freisetzung von rhVEGF-A₁₆₅ anglich (Çakır-Özkan et al. 2017). Dass rhBMP-2 osteoinduktive Eigenschaften besitzt ist hinlänglich bekannt (Kübler 2000; Alt et al. 2006; Ayoub und Gillgrass 2019), eine Untersuchung, ob sich in Kombination mit rhVEGF-A₁₆₅ die Konzentration der Wachstumsfaktoren reduzieren lässt, erfolgte in der Arbeit von Özkan nicht und war Teil der hier vorliegenden Studie.

Schorn et al. untersuchten in einer 2017 publizierten Studie den Einfluss von rhBMP-2 und VEGF-A₁₆₅ auf die vertikale Knochenregeneration dentaler Implantate (Schorn et al. 2017). Hierzu wurden auf eine *Insoluble Collagenous Bone Matrix* (ICBM) Wachstumsfaktoren aufgebracht und in zwölf Minischweine aufgeteilt in vier Gruppen (Kontrolle, ICBM, ICBM + rhBMP-2, ICBM + rhBMP-2 + rhVEGF-A₁₆₅) inseriert. Den Tieren wurden in einem Eingriff die Unterkiefermolaren extrahiert, drei Monate später erfolgte die Insertion von dentalen Implantaten bis 5 mm supracrestal sowie extraoral in die Tibia. Abhängig von der Gruppenzugehörigkeit wurden zur Evaluation der Regenerationsfähigkeit des Knochens die ICBM Träger als Scheiben mit Aussparung über die Implantate eingebracht. Die Untersuchung der Tiere erfolgte nach vier, acht und zwölf Wochen. Hierbei konnten Schorn et al. zeigen, dass ICBM + rhBMP-2 + rhVEGF-A₁₆₅ signifikant mehr vertikale Knochenregeneration ermöglicht als die Kontrollgruppe, auch wenn das meiste Knochenwachstum in der frühen Phase bis vier Wochen stattfand (Schorn et al. 2017). Ein direkter Vergleich mit der hier vorliegenden Studie ist nicht möglich, da die Mehrzahl der gesetzten Implantate extraoral inseriert wurden, die Defektgröße mit 5mm nicht der Definition eines *critical size defect* entspricht, vorwiegend knöcherne Strukturen mit einem hohen Anteil an Lamellenknochen (Tibia) untersucht wurden und neben den Trägermaterialien zusätzliches Fremdmaterial (Titanimplantate) zum Einsatz kam.

Die Fülle der möglichen Kombinationsmöglichkeiten der Wachstumsfaktoren mit Trägermaterialien (siehe Tab. 1), Dosierungen und Tiermodellen macht einen Literaturvergleich demnach schwierig.

4.5 Trägermaterialien

Die Wahl des Trägermaterials ist einer der entscheidenden Faktoren für die erfolgreiche Anwendung von Wachstumsfaktoren (El Bialy et al. 2017). Getränkte Kollagenschwämme, die üblicherweise für die Applikation verwendet werden, sind in Ihrer Formstabilität eingeschränkt. Die rasche Freisetzung der Faktoren führt zu einer initialen, lokalen Überdosis, wohingegen nach einigen Tagen nur noch kleine Faktorkonzentrationen nachweisbar sind (Uludag et al. 1999). Bioinerte, mit Wachstumsfaktoren beladene Materialien wie Titan werden osseointegriert, die nur oberflächliche Beladung mit den Faktoren führt ebenfalls zu einem *burst release*. Es wird versucht der Forderung nach Formstabilität, vollständiger Biodegradierbarkeit und kontinuierlicher Abgabe von Wachstumsfaktoren mit Polylactidderivaten, wie z. B. *poly-D-L-lactic acid* (PDLA), als Trägermaterial gerecht zu werden. PDLA wird durch enzymatische Spaltung oder Hydrolyse degradiert, dabei ermöglicht die amorphe Struktur das Eindringen von H₂O in das Trägermaterial. Das Verhältnis von D zu L Lactideinheiten steuert die Abbaugeschwindigkeit (Rasche 2003). Beim Abbau werden die Polymere in Oligomere und schließlich Monomere zerlegt, die renal ausgeschieden oder in den Zitratstoffwechsel eingeschleust werden (Pikul 2015). Der bei der Biodegradation von PDLA entstehende pH Abfall kann durch die Kombination mit Kalziumkarbonat gepuffert und somit eine Übersäuerung des Milieus verhindert werden (Schliephake et al. 2015). Andererseits wird davon ausgegangen, dass ein leichter pH Abfall im Gewebe osteoinduktiv wirken kann (Smeets et al. 2016). Durch die spongiöse Struktur des Oberkiefers ist, aufgrund der höheren Gefäßdichte und damit schnellerem Abtransport saurer Metabolite, von einer im Vergleich zum Unterkiefer geringeren chemischen Schädigung durch die Biodegradation auszugehen. Die Gefäßinduktion durch rhVEGF-A₁₆₅ kann einerseits durch verbesserte Durchblutung im Implantat für den suffizienteren Abtransport lokal toxischer Abbaumetaboliten sorgen und andererseits die Sauer- und Nährstoffversorgung im Implantat verbessern. Möglicherweise ist so die in der 13-Wochen-Kohorte auftretende Knochenregeneration im Vergleich zu den drei anderen Gruppen zu erklären. Die bei der Augmentation häufig eingesetzten GBR-Membranen können das Implantat vor Nährstoff- und Regenerationskonkurrenz durch das umliegende Bindegewebe schützen und verhindern Volumenverluste. Bei einer auftretenden Wunddehiszenz mit konsekutiver Infektion kommt es jedoch zum Verlust dieser Barrierefunktion. Es wird davon ausgegangen, dass die Knochenheilung und -regeneration in erheblichem Maß vom

umgebenden Periost beeinflusst wird. Die Schonung des Periosts ist daher für die Knochenregeneration von besonderer Bedeutung. Auf dieser Grundlage beruht die Technik der Tunnelierung zum Einbringen des Augmentats.

4.6 Ausblick

Die Kombination von rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ ermöglicht die Reduzierung der eingesetzten Konzentration von rhBMP-2. Somit lassen sich die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe an Kleintiermodellen auch im Großtiermodell belegen. Jedoch findet die VEGF in der humanmedizinischen Therapie als Wachstumsfaktor bisher keine klinische Anwendung. Die vorliegende Studie legt nahe, dass die Kombination von rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ im *slow release* Verfahren zu einer verbesserten Knochenbildung in chronischen Defekten führen kann. Die Ergebnisse lassen weiterhin vermuten, dass PLDDA/CaCO₃ ein geeignetes Trägermaterial ist.

Fraglich bleibt, ob Kombinationen mehrerer Wachstumsfaktoren mit möglicherweise kanzerogenem Potenzial die Zulassung zur medizinischen Anwendung im Menschen finden werden. Die Durchführung weiterer Langzeitbeobachtungen kann helfen die Zusammenhänge der Knochenregeneration zu verstehen und die Chancen aber auch Gefahren in der Anwendung von Wachstumsfaktoren zu detektieren.

5 Zusammenfassung

Die funktionell ästhetische Rekonstruktion bei Knochendefekten des Gesichts ist eines der Kerngebiete der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Neben lokalen Plastiken, freien avaskulären oder anantomosierten Knochentransplantaten wird an alloplastischen Knochenersatzmaterialien geforscht, die analog zu autologen Transplantaten osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Eigenschaften aufweisen. Mit Wachstumsfaktoren beladene Trägermaterialien könnten diese Anforderungen erfüllen und sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ziel der vorliegenden Pilotstudie war es, zu ermitteln, ob die reduzierte Dosierung von *recombinat human bone morphogenetic protein-2* (rhBMP-2) in Kombination mit *recombinat human vascular endothelial growth factor -A₁₆₅* (rhVEGF-A₁₆₅) in einem *Slow-release*-Trägermaterial eine ähnliche Knochenbildung zeigt wie die hochdosierte Anwendung von rhBMP-2 vorangegangener Studien. Für die Untersuchung wurde ein Großtierversuch mit 18 Göttinger Minischweinen durchgeführt, denen bei der Extraktion von Oberkieferseitenzähnen *Critical-size*-Defekte gesetzt wurden. Nach Chronifizierung der Knochendefekte wurden *poly-D-L-lactic acid*/CaCO₃-*composite*-Granula die mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren im Druckbegasungsverfahren beladen worden waren, implantiert. Es erfolgte eine histologische und histomorphometrische Auswertung der zwei Versuchs- (rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅) und zwei Kontrollgruppen (Leerdefekt und unbeladene *composite*-Granula) nach einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen und 13 Wochen. Die histologische Untersuchung zeigte für die Kombination rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ zahlreiche Gefäße im Augmentat. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen erschien im neugebildeten Knochen die Knochenstruktur kompakter und als Zeichen des erhöhten Knochenmetabolismus ließen sich Osteoblasten und -klasten finden.

Histomorphometrisch ergab sich eine höhere Knochenneubildung für die beiden Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen. Statistisch waren diese Ergebnisse signifikant für die rhBMP-2 und rhVEGF-A₁₆₅ 13 Wochen Versuchsgruppe.

Es lässt sich schlussfolgern, dass sich durch die Kombination von rhVEGF-A₁₆₅ und rhBMP-2 bei kontinuierlicher Freisetzung der Faktoren eine suffiziente Knochenregeneration bei kritischen Knochendefekten erzielen lässt.

6 Literaturverzeichnis

Adamkiewicz AW (1889): Über Knochentransplantate. Anz Akad Wiss Wien Math Naturwiss Kl XXVI, 123–125

Agrawal CM, Ray RB (2001): Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J Biomed Mater Res 55, 141–150

Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A (2008): State of the art of oral implants. Periodontol 2000 47, 15–26

Alt V, Eicher A, Bitschnau A, Schnettler R (2006): Kosten-Nutzen-Betrachtung des Einsatzes von rhBMP-2 bei offenen Tibiafrakturen. Unfallchirurg 109, 463–470

Alt V, Lips KS, Henkenbehrens C, Muhrer D, Cavalcanti-Garcia M, Sommer U, Thormann U, Szalay G, Heiss C, Pavlidis T et al. (2011): A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection. Bone 48, 1146–1153

Annunziata M, Natri L, Cecoro G, Guida L (2017): The use of poly-d,l-lactic acid (PDLLA) devices for bone augmentation techniques: A Systematic Review. Molecules 22, 1–14

Anthony JP, Rawnsley JD, Benhaim P, Ritter EF, Sadowsky SH, Singer MI (1995): Donor leg morbidity and function after fibula free flap mandible reconstruction. Plast Reconstr Surg 96, 146–152

Axhausen W (1952): Die Knochenregeneration, ein zweiphasisches Geschehen. Zentralbl Chir 77, 435–42

Ayoub A, Gillgrass T (2019): The clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein 7 for reconstruction of alveolar cleft: 10 years' follow-up. J Oral Maxillofac Surg 77, 571–581

Bauer TW (2007): Bone graft substitutes. Skeletal Radiol 36, 1105–1107

Beutner R, Michael J, Förster A, Schwenzer B, Scharnweber D (2009): Immobilization of oligonucleotides on titanium based materials by partial incorporation in anodic oxide layers. Biomaterials 30, 2774–2781

Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJTM (2003): Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 66B, 526–531

Böhrnsen F, Rublack J, Aeckerle N, Foerster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D, Schliephake H (2017): Bone Morphogenetic Protein-2 Hybridized with Nano-Anchored Oligonucleotides on Titanium Implants Enhances Osteogenic Differentiation In Vivo. Int J Oral Maxillofac Implants 32, e175–e182

Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson Å (1969): Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses: Experimental Studies. Scand J Plast Reconstr Surg 3, 81–100

Browaeys H, Bouvry P, Bruyn HD (2007): A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. Clin Implant Dent Relat Res 9, 166–177

Çakır-Özkan N, Eğri S, Bekar E, Altunkaynak BZ, Kabak YB, Kivrak EG (2017): The use of sequential VEGF- and BMP2-releasing biodegradable scaffolds in rabbit mandibular defects. *J Oral Maxillofac Surg* 75, 221.e1-221.e14

Carano RAD, Filvaroff EH (2003): Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8, 980–989

Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK (2011): A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11, 471–491

Cheng G, Yin C, Tu H, Jiang S, Wang Q, Zhou X, Xing X, Xie C, Shi X, Du Y et al. (2019): Controlled co-delivery of growth factors through layer-by-layer assembly of core-shell nanofibers for improving bone regeneration. *ACS Nano* 13, 6372–6382

Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P et al. (2003): Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85, 1544–1552

Chiu C, Lau P, Chan S, Fong C, Sun L (2004): Microbial contamination of femoral head allografts. *Hong Kong Med J* 10, 401–405

Compston J, Skingle L, Dempster DW: Chapter 53 - Bone Histomorphometry. In: Feldman D, Pike JW, Bouillon R, Giovannucci E, Goltzman D, Hewison M (Hrsg.): *Vitamin D*. 4. Auflage; Academic Press, Cambridge 2018, 959–973

Cypher TJ, Grossman JP (1996): Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35, 413–417

de Boer HH (1988): The history of bone grafts. *Clin Orthop* 226, 292–298

Drenckhahn D, Kugler P: 3.6 Knochenentwicklung, Knochenwachstum. In: Drenckhahn D (Hrsg.): *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1, 16. Auflage; Urban & Fischer, München 2003, 133–149

Eğri S, Eczacıoğlu N (2017): Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 45, 321–329

Eitel F, Schweiberer L, Saur K, Dambe L, Klapp F: I. Die Bedeutung des Transplantatlagers für Knochen- und Knorpelgewebe, Theoretische Grundlagen der Knochen transplantation: Osteogenese und Revascularisation als Leistung des Wirtslagers. In: Hierholzer G, Zilich H (Hrsg.): *Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren*. 1. Auflage; Berlin 1980, 1–12

El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M (2017): Formulation, delivery and stability of bone morphogenetic proteins for effective bone regeneration. *Pharm Res* 34, 1152–1170

Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P (2017): Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci* 125, 315–337

El-Saadany WH, Sadakah AA, Hussein MM, Saad KA (2015): Evaluation of using ultrasound welding process of biodegradable plates for fixation of pediatric mandibular fractures. *Tanta Dent J* 12, S22–S29

- Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, Garrel T von, Gotzen L, Wilke A (2005): Biokompatibilitätstestung unterschiedlich sterilisierter bzw. desinfizierter allogener Knochentransplantate im Vergleich zum Goldstandard der autologen Knochen spende - Eine „In-vitro“-Analyse der Immunmodulation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 143, 660–668
- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999): Mikro-CT Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. *Radiologe* 39, 203–212
- Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y (2003): Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Their Receptors Are Expressed in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol* 162, 171–181
- Exner C, Bode HJ, Blumer KR, Giese C, Winnacker EL, Gruss P: Tierversuche: Definition und Zahlen. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.): *Tierversuche in der Forschung*. Lemmens Verlags- & Mediengesellschaft, Bonn 2004, 4–7
- Fanghänel J, Giebel J, Koppe T, Miehe B, Splieth C, Kocher T, Weingärtner J, Kubein-Meesenburg D: Kopf, Cranium, und Hals, Collum. In: Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R (Hrsg.): *Waldeyer – Anatomie des Menschen*. 17. völlig überarbeitete Auflage; De Gruyter, Berlin 2003, 177–353
- Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A-M, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D (2018): Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng* 9, 1–18
- Ferrara N, Henzel WJ (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851–858
- Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE (2005): VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 561–568
- Flören M, Kappe T, Reichel H (2007): Effektivitätsanalyse einer klinikinternen allogenen Knochenbank. *Orthopade* 36, 667–672
- Franco NH: Killing of animals in science – is it always inevitable? In: Olsson AS, Araújo SM, Vieira MF (Hrsg.): *Food futures: ethics, science and culture*. Wageningen Academic Publishers, Porto 2016, 499–504
- Fröhlich M, Nagel F (2015): Implantatprothetische Rehabilitationen im Oberkiefer. *Zahnmed Update* 9, 509–533
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/akt signal transduction pathway. *J Biol Chem* 273, 30336–30343
- Gonzalez M, Fuentes R, Triplett R, Triplett S (2011): BMP-2 Used for maxillary sinus augmentation and implant placement: 15 years follow-up after final restorations. *J Oral Maxillofac Surg* 69, e51

Gothard D, Smith E, Kanczler J, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff K, Oreffo R (2014): Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 28, 166–208

Goumans MJ, Mummery C (2002): Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44, 253–265

Grünberg C, Kaiser E, Bauer F (2017): Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien. *Bayrisches Zahnärztebl* 54, 58–63

Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W (1998): Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. *Orthopade* 27, 105–117

Gupta R, Tongers J, Losordo DW (2009): Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res* 105, 724–736

Hamilton D (1982): The nineteenth-century surgical revolution – antiseptics or better nutrition? *Bull Hist Med* 56, 30–40

Hedman M, Juha H, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, Vanninen E, Mussalo H, Esa K, Sakari S et al. (2003): Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia. *Circulation* 107, 2677–2683

Heldin CH, Miyazono K, Dijke P (1997): TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471

Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580–1594

Hölzle F, Mohr C, Wolff KD (2008): Reconstructive oral and maxillofacial surgery. *Dtsch Ärztebl Int* 105, 815–822

Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, Yang XB (2010): Long bone defect models for tissue engineering applications: Criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 263–271

Hu K, Olsen BR (2016): The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 91, 30–38

Huh JY, Choi BH, Kim BY, Lee SH, Zhu SJ, Jung JH (2005): Critical size defect in the canine mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100, 296–301

Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, Li Y (2006): Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288, 1243–1249

Janicki P, Schmidmaier G (2011): What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 42, 77–81

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002): Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946–11950

Kaplan FS, Tabas JA, Zasloff MA (1990): Fibrodysplasia ossificans progressiva: A clue from the fly? *Calcif Tissue Int* 47, 117–125

Kärcher H (2000): Mikrochirurgischer Knochenersatz. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4, 322–330

Kastrup J, Jørgensen E, Rück A, Tägil K, Glogar D, Ruzylo W, Bøtker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B et al. (2005): Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165gene therapy in patients with stable severe angina pectoris: A randomized double-blind placebo-controlled study: The Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 45, 982–988

Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV (2008): Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 39, 45–57

Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Günther KP (2003): Der Einfluss von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (b-FGF) auf Osteointegration, Degradation und biomechanische Eigenschaften eines synthetischen Knochenersatzstoffes. *Z Orthop Grenzgeb* 141, 472–480

Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005): The biology of bone grafting: *J Am Acad Orthop Surg* 13, 77–86

Klein MO, Götz H, Duschner H, Wagner W (2010): Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien: Eine Übersicht. *MKG-Chirurg* 3, 274–281

Klein S, Hage JJ, Woerdeman LAE (2005): Donor-site necrosis following fibula free-flap transplantation: A report of three cases. *Microsurgery* 25, 538–542

Krinko (2018): Prävention postoperativer Wundinfektionen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsbl* 61, 448–473

Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G (2017): Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop* 41, 1073–1083

Kübler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zöller J (2004): Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes An in vitro study. *Implant Dent* 13, 171–179

Kübler NR (2000): Herstellung und Biologie der bone morphogenetic proteins. *BIOmaterialien* 1, 12–18

Kurien T, Pearson RG, Scammell BE (2013): Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice. *Bone Jt J* 95-B, 583–597

Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007): Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 23, 844–854

Lee SW, Kim SG (2014): Membranes for the guided bone regeneration. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 36, 239–246

Lexer E (1914): Free transplantation. *Ann Surg* 60, 166–194

Lind M (1996): Growth factors: Possible new clinical tools: A review. *Acta Orthop Scand* 67, 407–417

Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger JM (2004): Resorbierbare Kalziumphosphatzemente. *Trauma Berufskrankh* 4, 277–284

Lohse N, Moser N, Backhaus S, Annen T, Epple M, Schliephake H (2015): Continuous delivery of rhBMP2 and rhVEGF165 at a certain ratio enhances bone formation in mandibular defects over the delivery of rhBMP2 alone — An experimental study in rats. *J Control Release* 220, 201–209

Marques LARV, Júnior EA da C, Lotif MAL, Neto EMR, Silva FFC, Martiniano CR de Q (2016): Application of BMP-2 for bone graft in Dentistry. *Rev Sul-Bras Odontol* 12, 88–93

McKibbin B (1978): The Biology of fracture healing in long bones. *J Bone Jt Surg Br* 60, 150–162

Morgan RF, Hirata RM, Jaques DA, Hoopes JE (1982): Head and neck surgery in the aged. *Am J Surg* 144, 449–451

Nerlich AG, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG (2000): Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. *Lancet* 356, 2176–2179

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9–22

Nilsson M, Heymach JV (2006): Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. *J Thorac Oncol* 1, 768–770

Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, Lee M, Thompson Z, Hu D, Helms JA, Miclau T (2012): Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model. *Iowa Orthop J* 32, 90–94

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006): VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359–371

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG (2008): Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *bone* 43, 931–940

Petrova TV, Makinen T, Alitalo K (1999): Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 253, 117–130

Pikul I: Übersicht über toxikologische Informationen von Polylactiden, Polylactid-co-Glycoliden, Polycaprolactonen und Polydioxanonen für Medizinprodukte und pharmazeutische Anwendungen. Abschl. Postgradualstud. Toxikol. Leipzig 2015

Pina S, Ferreira J (2012): Bioresorbable plates and screws for clinical applications: A review. *J Healthc Eng* 3, 243–260

Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Eibach T, Peters C, Baldus SE, Rehm KE (2004): Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *Biomaterials* 25, 259–267

Pschyrembel Redaktion: Knochengewebe. In: Pschyrembel Redaktion (Hrsg.): *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 266. Auflage; De Gruyter, Berlin 2014, 1108

Rahimi N (2006): VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 11, 818–829

Rasche C: Entwicklung einer Biokompatibilitätsuntersuchung nach ISO 10993-5 für biodegradierbare Implantatmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Med. Diss. Bochum 2003

Reddi AH (1998): Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16, 247–252

Reissmann DR, Dietze B, Vogeler M, Schmelzeisen R, Heydecke G (2013): Impact of donor site for bone graft harvesting for dental implants on health-related and oral health-related quality of life. *Clin Oral Implants Res* 24, 698–705

Remedios A (1999): Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1029–1044

Ren Q, Cai M, Zhang K, Ren W, Su Z, Yang T, Sun T, Wang J (2017): Effects of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) release from polylactide-poly (ethylene glycol)-polylactide (PELA) microcapsule-based scaffolds on bone. *Braz J Med Biol Res* 51, 1–8

Reuther J, Kübler NR (1999): Die Wiederherstellung des Unterkiefers Therapeutisches Vorgehen nach Kontinuitätsverlust durch Entzündung, Trauma oder Tumor. *Dtsch Arztebl* 96, 1054–1061

Roberts TT, Rosenbaum AJ (2012): Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. *Organogenesis* 8, 114–124

Robinson DH, Toledo AH (2012): Historical development of modern anesthesia. *J Invest Surg* 25, 141–149

Rothamel D, Fienitz T, Kielhorn J, Jelusic D, Schlee M, Smeets R, Giesenhagen B, Happe A, Zöller JE (2015): Neue augmentative Möglichkeiten durch allogene Knochenersatzmaterialien – Chance oder Risiko? *Quintessenz* 66, 1167–1177

Rueger JM (1998): Bone replacement materials – state of the art and the way ahead. *Orthopade* 27, 72–79

Ruehe B, Niehues S, Heberer S, Nelson K (2009): Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108, 699–706

Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, Bruyn HD, Dommisch H, Donos N, Eickholz P et al. (2019): Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol* 46, 82–91

Schliephake H (2009): Application of bone growth factors—the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14, 17–22

Schliephake H, Scharnweber D (2008): Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J Mater Chem* 18, 2404–2414

- Schliephake H, Weich HA, Schulz J, Gruber R (2007): In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *J Biomed Mater Res A* 83A, 455–462
- Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Rößler S, Sewing A (2009): Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on periimplant bone formation. Part II: calcium phosphate coatings. *Clin Oral Implants Res* 20, 38–44
- Schliephake H, Vucak M, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M (2015): Solvent free production of porous PDLA/calcium carbonate composite scaffolds improves the release of bone growth factors. *Oral Maxillofac Surg* 19, 133–141
- Schorn L, Sproll C, Ommerborn M, Naujoks C, Kübler NR, Depprich R (2017): Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med* 13, 1–11
- Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V, Dvorak H (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985
- Singh R, Mahesh L, Shukla SSS (2013): Infections Resulting from Bone Grafting Biomaterials. *Int J Oral Implant Clin Res* 4, 68–71
- Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M, Kolk A (2014): Knochenersatzmaterialien. *MKG-Chirurg* 7, 53–67
- Smeets R, Hanken H, Beck-Broichsitter B, Gröbe A, Precht C, Heiland M, Jung O (2016): Knochenersatzmaterialien: Übersicht und aktuelle Empfehlungen. *MKG-Chirurg* 9, 2–11
- Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW (2004): Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg* 33, 565–578
- Taktak-BenAmar A, Morjen M, Ben Mabrouk H, Abdelmaksoud-Dammak R, Guerfali M, Fourati-Masmoudi N, Marrakchi N, Gargouri A (2017): Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *E. coli*. *AMB Express* 7, 1–11
- 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, 193–202
- Urist MR (1965): Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150, 893–899
- Urist MR, Strates BS (1971): Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50, 1392–1406
- Varela A, Jolette J (2018): Bone Toolbox: Biomarkers, imaging tools, biomechanics, and histomorphometry. *Toxicol Pathol* 46, 511–529
- Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, Canhao H (2012): Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port* 37, 294–300
- von Garrel T, Gotzen L (1998): Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg* 101, 713–727
- von Walther P (1821): Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgeborhten Knochenscheibe. *J Chir Augenheilkd* 2, 571–583

Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PAJ, Sherry E, Sivananthan S, Hedderich J, Terheyden H (2006): The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials* 27, 1081–1087

Webb JCJ, Tricker J (2000): A review of fracture healing. *Curr Orthop* 14, 457–463

Welsch U, Deller T: 3.2.12 Knochengewebe. In: Welsch U (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie*. 3. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2010a, 108–121

Welsch U, Deller T: Abb. 3.2.44 Lamellenknochen. In: Welsch U (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie*, 3. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2010b, 114

Wiltfang J, Gellrich NC: 14.4 Hartgeweberekonstruktion. In: Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Reichart P, Schliephake H, Schmelzeisen R (Hrsg.): *Curriculum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. Band 3, 1. Auflage; Quintessenz Verlag GmbH, Berlin 2002, 503–513

Winter JM, Cowie AI, Wood DJ, Zheng MH (2005): Musculoskeletal tissue banking in Western Australia: review of the first ten years. *ANZ J Surg* 75, 665–671

Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, Schlingemann RO (2001): VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol* 195, 490–497

Wong AK, Alfert M, Castrillon DH, Shen Q, Holash J, Yancopoulos GD, Chin L (2001): Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7481–7486

Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ (2007): Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 550–553

Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, Obayashi S, Saito M, Morita T (2009): Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J Biol Chem* 284, 9885–9891

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie ABM (2012): The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 4, 64–68

Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG (1996): Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17, 175–185

Ylä-Herttua S (2009): Gene therapy with vascular endothelial growth factors. *Biochem Soc Trans* 37, 1198–1200

Zamborsky R (2015): Infection in bone allograft transplants. *Exp Clin Transplant* 14, 484–490

Ziebart T, Al-Nawas B (2016): Indikationsbereich zur Leitlinie Knochenersatz. *Implantologie* 24, 25–31

Zimble MS (2001): Gaspare Tagliacozzi (1545-1599): Renaissance Surgeon. *Arch Facial Plast Surg* 3, 283–288

7 Genehmigungsnachweise

Nilsson M, Heymach JV (2006): Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. J Thorac Oncol 1, 768–770, ©2007 2006 International Association for the Study of Lung Cancer. Published by Elsevier Inc. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)30404-4](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)30404-4)
Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ (2007): Bone morphogenetic protein. Biochem Biophys Res Commun 362, 550–553, ©2007 published by Elsevier Inc.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045> Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Welsch U, Deller T: Abb. 3.2.44 Lamellenknochen. In: Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie, 3. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2010b, 114 Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung aus Welsch, Histologie © Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Förderung meiner klinischen Ausbildung.

Des Weiteren danke ich Dr. med. Dr. med. dent. M. Trötzsch und PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann für die Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung dieser Arbeit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen, insbesondere bei Frau Ute Kant, für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.