

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 von akuten *Critical-size*-Defekten
in der Mandibula des Göttinger Minischweins durch die
kombinierte Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅
aus einem PDLA/CaCO₃-Komposit**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jan Alexander Klenke

aus

Kassel

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann
Ko-Referent*in:	Prof. Dr. med. A. Schilling
Drittreferent*in:	Prof. Dr. rer. nat. J. Wilting

Datum der mündlichen Prüfung: 04.07.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Knochenregeneration von akuten *Critical-size*-Defekten in der Mandibula des Göttinger Minischweins durch die kombinierte Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ aus einem PDLLA/CaCO₃-Komposit“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Troltsch M, **Klenke A**, Santander P, Kauffmann P, Troltsch M, Rau A, Brockmeyer P, Schliephake H (2017): Repair of large saddle defects of the mandibular ridge using dual growth factor release-An experimental pilot study in minipigs. J Clin Periodontol 44, 854-863

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Grundlagen.....	- 3 -
1.1.1 Knochenaufbau und Physiologie.....	- 3 -
1.2 Knochenbildung und Knochenumbau.....	- 5 -
1.3 Defektheilung des Kieferknochens	- 7 -
1.4 Knochenersatz	- 8 -
1.4.1 Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion.....	- 8 -
1.5 Knochenersatzmaterialien.....	- 9 -
1.5.1 Autologer Knochen	- 10 -
1.5.2 Allogener Knochen.....	- 10 -
1.5.3 Xenogene KEM.....	- 11 -
1.5.4 Alloplastische KEM.....	- 11 -
1.6 Wachstumsfaktoren	- 12 -
1.6.1 <i>Bone morphogenetic protein</i>	- 13 -
1.6.2 <i>Vascular endothelial growth factor</i>	- 15 -
1.6.3 Synergistische Wirkung von Wachstumsfaktoren.....	- 16 -
1.6.4 Träger und Freisetzungskinetik.....	- 18 -
2 Zielsetzung und Fragestellung	- 19 -
3 Material und Methoden	- 20 -
3.1 Tiermodell.....	- 20 -
3.2 Versuchsaufbau.....	- 20 -
3.2.1 Gruppeneinteilung.....	- 21 -
3.3 Knochenersatzmaterial und Operationsablauf.....	- 22 -
3.3.1 Trägermaterial	- 22 -
3.3.2 Operationen	- 24 -
3.3.3 Osteotomie und Augmentation durch KEM.....	- 25 -
3.3.4 Euthanasie der Versuchstiere	- 26 -
3.4 Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate	- 27 -
3.4.1 Trenndünnschlifftechnik.....	- 27 -
3.4.2 Histologische Färbung und Digitalisierung.....	- 28 -
3.4.3 Histomorphometrische Auswertung.....	- 29 -
3.5 Statistische Auswertung.....	- 32 -
4 Ergebnisse.....	- 33 -
4.1 Klinischer Verlauf	- 33 -

4.2	Lichtmikroskopische Untersuchung	- 34 -
4.2.1	Negativkontrolle	- 34 -
4.2.2	Blank-Gruppe	- 35 -
4.2.3	BMP-Gruppe	- 36 -
4.2.4	BMP/VEGF-Gruppe.....	- 37 -
4.3	Histomorphometrische Untersuchung.....	- 38 -
4.3.1	Gruppenvergleich.....	- 40 -
5	Diskussion.....	- 47 -
5.1	Diskussion der Methodik.....	- 47 -
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	- 52 -
5.2.1	Negativkontrolle	- 52 -
5.2.2	Blank-Gruppe	- 52 -
5.2.3	BMP-Gruppe	- 54 -
5.2.4	BMP/VEGF-Gruppe.....	- 57 -
6	Zusammenfassung.....	- 66 -
7	Literaturverzeichnis	- 67 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Knochenaufbau.....	- 5 -
Abbildung 2:	PDLLA/CaCO ₃ -Trägermaterial.....	- 23 -
Abbildung 3:	Operation der Schweine	- 26 -
Abbildung 4:	Toluidinfärbung eines Trenndünnschliffpräparats.....	- 28 -
Abbildung 5:	Olympus DotSlide-System 2.0.....	- 29 -
Abbildung 6:	Definition der ROI.....	- 30 -
Abbildung 7:	Auswertung mit Adobe Photoshop.....	- 31 -
Abbildung 8:	Präparate der leer-Gruppe.....	- 34 -
Abbildung 9:	Präparate der Blank-Gruppe	- 35 -
Abbildung 10:	Präparate der BMP-Gruppe.....	- 36 -
Abbildung 11:	Präparate der BMP/VEGF-Gruppe	- 37 -
Abbildung 12:	Verteilung der Messungen.....	- 39 -
Abbildung 13:	Die geschätzten Randmittel für B.Ar. mit 95 % KI.....	- 41 -
Abbildung 14:	Die geschätzten Randmittel für T.Ar. mit 95 % KI.....	- 43 -
Abbildung 15:	Die geschätzten Randmittel für TMD mit 95 % KI.....	- 45 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Versuchsgruppen	- 22 -
Tabelle 2:	Verteilung der Gruppen zum Zeitpunkt T 1.....	- 38 -
Tabelle 3:	Verteilung der Gruppen zum Zeitpunkt T 2.....	- 38 -
Tabelle 4:	Deskriptive Werte für die Messungen, gemittelt nach Segment in Woche vier.	- 40 -
Tabelle 5:	Deskriptive Werte für die Messungen, gemittelt nach Segment in Woche 13.....	- 40 -
Tabelle 6:	Kontrasttests für den Parameter B.Ar.....	- 42 -
Tabelle 7:	Modell Koeffizienten für den Parameter B.Ar.....	- 42 -
Tabelle 8:	Kontrasttests für den Parameter T.Ar.....	- 44 -
Tabelle 9:	Modell Koeffizienten für den Parameter T.Ar.....	- 44 -
Tabelle 10:	Kontrasttests für den Parameter TMD	- 46 -
Tabelle 11:	Modell Koeffizienten für den Parameter TMD.....	- 46 -

Abkürzungsverzeichnis

B.Ar.	mineralisierter Knochen, <i>bone area</i>
Blank	PDLLA/CaCO ₃
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
CSD	<i>critical size defect</i>
DFDBA	<i>demineralized freeze dried bone allograft</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDA	American Food and Drug Administration
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KEM	Knochenersatzmaterial
μCT	Mikro-Computertomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NRP1+	Neuropilin-1
PDLLA	Poly-D-L-Lactid
PLA	Poly lactid
rhBMP-2	<i>recombinant human bone morphogenetic protein 2</i>
rhVEGF ₁₆₅	<i>recombinant human vascular endothelial growth factor-A₁₆₅</i>
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
T 1	Zeitpunkt nach vier Wochen
T 2	Zeitpunkt nach 13 Wochen
T.Ar.	gesamtes Gewebe, <i>tissue area</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TMD	relative Knochenfläche, <i>tissue mineral density</i>
UK	Unterkiefer
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WF	Wachstumsfaktor

1 Einleitung

Traumata, Infektionen und Tumorerkrankungen können Kieferkammdefekte verursachen, welche eine vollkommene Wiederherstellung der beteiligten Gewebe nicht mehr zulassen. Diese Wunden unterliegen einer defizitären Reparatur und werden nach Untersuchungen im Tiermodell als *critical size defect* (CSD) bezeichnet (Schmitz und Hollinger 1986). Im klinischen Alltag kann die Atrophie des Kieferkamms dazu führen, dass Zahnersatz nicht zufriedenstellend eingegliedert werden kann und Kaufunktion und Ästhetik eingeschränkt sind (Emami et al. 2009; Salvi et al. 2018). Dadurch sinkt die mundbezogene Lebensqualität, eine Malnutrition wird gefördert und damit einhergehend folgt eine erhöhte Morbidität im Alter (Saarela et al. 2014). Die Kompensation von Kieferkammdefekten zur Wiederherstellung der Kaufunktion stellt daher eine wichtige therapeutische Maßnahme dar. Dabei bedeutet sie häufig eine große Herausforderung, besonders, wenn eine Versorgung mit endossalen Implantaten angestrebt wird. Hierbei ist neben der allgemeinen Eignung der Patient*innen auch eine kritische Beurteilung des Knochenlagers notwendig (Binon 2007; Buser et al. 2013).

Um nach Zahnentfernungen und Osteotomien die ursprüngliche Dimension des Kieferkamms wiederherzustellen, werden Behandlungsstrategien zum Knochenaufbau verfolgt. Zum Einsatz kommen Knochentransplantationen vom Patienten bzw. von der Patientin selbst, welche stets mit einer Entnahmemorbidität verbunden sind, und Knochenersatzmaterialien (KEM), die ein weiteres OP-Gebiet ersparen. Aufgrund seiner günstigen osteogenetischen und immunologischen Eigenschaften wird der autologe Knochenersatz als klinischer Goldstandard angesehen (Herford und Nguyen 2015; Sakkas et al. 2017; Spin-Neto et al. 2013). Die Entnahme von autologem Knochenmaterial kann allerdings mit Komplikationen wie Schmerzen, Blutungen, Infektionen, Bewegungseinschränkungen und Nervenschädigungen einhergehen (Barone et al. 2011; Cordaro et al. 2011; Nkenke und Neukam 2014). Um derartige Komplikationen zu vermeiden, stehen für den Knochenaufbau neben dem autologen Gewebe auch allogene, xenogene und synthetische Materialien mit unterschiedlichen materialspezifischen Eigenschaften zur Verfügung. Der Nutzen vieler KEM ist aufgrund ihrer rein osteokonduktiven Eigenschaften allerdings mit Einschränkungen verbunden (Troeltzsch et al. 2016).

Biotechnologische Ansätze zur Regeneration von Knochengewebe setzen Signalproteine ein. Anwendung finden hier vor allem osteogene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie das *bone morphogenetic protein* (BMP) (Alonso et al. 2010; Boyne et al. 2005; Fiorellini et al. 2005; Freitas et al. 2015; Gruber et al. 2014; Herford et al. 2017; Schliephake et al. 2008; Triplett et al. 2009).

Weitergehend wird angenommen, dass das regenerative Potenzial des BMP durch eine Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren (WF) gesteigert werden kann. Zur Förderung der Osteogenese rückten dabei die simultane Unterstützung der Angiogenese und der Osteogenese in den Vordergrund (Cakir-Ozkan et al. 2017; Geuze et al. 2012; Hernández et al. 2012;

Kempfen et al. 2009; Lohse et al. 2015; Patel et al. 2008; Schorn et al. 2017; Wang et al. 2017; Young et al. 2009; Zhang et al. 2011).

Die Anwendung von biologischen Signalmolekülen in der regenerativen Medizin erfordert Trägersysteme für eine gezielte Abgabe der WF in Bezug auf die Lokalisation, Freisetzungskinetik und Dosierung. Neben geeigneten mechanischen und strukturellen Eigenschaften ist eines der Merkmale, die ein potenzielles Trägermaterial aufweisen sollte, die Möglichkeit, WF an sich zu koppeln (Schliephake 2010). Das Verabreichungssystem sollte als wichtiger Parameter für die Effektivität von WF bei der Knochenregeneration angesehen werden (El Bialy et al. 2017).

Die Trägersysteme in der klinischen Anwendung basieren auf Kollagenen, welche mit einer WF-Lösung gesättigt werden (Schliephake 2010; Uludag et al. 1999). Trotz seiner guten Biokompatibilität weist das Kollagen als WF-Träger allerdings eine Reihe von Nachteilen auf. Der biologische Abbau der Kollagenmatrix ist schwer zu kontrollieren, darüber hinaus zeigen kollagene Gerüste mechanische Schwächen, was zu einer undefinierten Freisetzungskinetik der WF führen kann (El Bialy et al. 2017; Geiger et al. 2003; Lee und Shin 2007). Ein optimales Trägersystem sollte die lokale WF-Konzentration hoch genug halten, um eine Osteoinduktion zu induzieren und gering genug, um unerwünschte Komplikationen zu vermeiden (El Bialy et al. 2017; Haidar et al. 2009).

Insofern erscheint es sinnvoll, geeignete Trägermaterialien für die Rekonstruktion des Kieferkammes zu entwickeln, um in Zukunft für die Patient*innen zusätzliche belastende Operationen zu vermeiden und Alternativen zum autologen Knochentransplantat zu entwickeln.

Der hier vorliegenden Arbeit sind eine Reihe von Untersuchungen vorangegangen, in welchen ein synthetisches Trägergerüst zur kontrollierten Freisetzung von Signalproteinen etabliert werden konnte. Schliephake et al. (2007) untersuchten in einer *In-vitro*-Studie die Freisetzung von WF aus einem Polylactid (PLA). Die Autor*innen stellten dabei fest, dass die Einbindung von „*recombinant human bone morphogenetic protein 2*“ (rhBMP-2) in das PLA mit einer kontinuierlichen Freisetzung des biologisch aktiven WF möglich ist. Weiterführend wurden mit diesem Material Untersuchungen im Kleintier durchgeführt, um zu klären, ob das derart gebundene rhBMP-2 einen nicht heilenden Defekt im Rattenunterkiefer regenerieren kann. Die Ergebnisse zeigten, dass die mit rhBMP-2 angereicherten PLA-Implantate einen nicht heilenden Defekt überbrücken und die Menge des verloren gegangenen Volumens ersetzen konnten (Schliephake et al. 2008). Auch in ektoper Lokalisation zeigte das Trägermaterial nach Freisetzung von rhBMP-2 einen knochenbildenden Effekt (Gruber et al. 2009). Allerdings schien eine kontinuierliche Zufuhr osteogener Signale erforderlich, um negative Begleiterscheinungen des Polymerabbaus wie die saure Degradation mit Azidose im Gewebe auszugleichen (Schliephake et al. 2008).

In der Folge dieser Versuche wurde das Trägermaterial weiterentwickelt und dem Polymer ein Kalziumkarbonat (CaCO_3) zur Pufferung der sauren Degradationsprodukte hinzugefügt. Schliephake et al. (2015) entwickelten eine lösungsmittelfreie Methode zur Herstellung von

porösen Poly-DL-Lactid/Kalziumkarbonat-Verbundgerüsten (PDLLA/CaCO₃) für die kontrollierte, verzögerte Freisetzung von eingebundenen WF. Per Hochdruckbegasung hergestellte PDLLA/CaCO₃-Gerüste verbesserten *in vitro* die biologische Wirksamkeit der integrierten WF und zeigten während der Resorption des Trägermaterials einen konstanten pH-Wert. Das PDLLA/CaCO₃ wurde anschließend von Lohse et al. (2015) und Moser et al. (2018) im Kleintiermodell untersucht. Verschiedene Mengen von rhBMP-2 und *recombinant human vascular endothelial growth factor-A₁₆₅* (rhVEGF₁₆₅) wurden in Kombination und isoliert mit dem Trägermaterial verbunden und hinsichtlich des osteogenen Potenzials analysiert. Die kombinierte Freisetzung der WF zeigte ein hohes Potenzial für die Knochenneubildung und nur eine deutlich höhere Dosis der reinen rhBMP-2-Freisetzung induzierte eine vergleichbare Regeneration (Lohse et al. 2015). Sowohl das Knochenvolumen als auch die Knochendichte verbesserten sich durch die Addition von geringen Mengen rhVEGF₁₆₅ zum rhBMP-2. Die Autor*innen schlussfolgerten daraus, dass eine verzögerte gleichzeitige Abgabe von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ zu einer effektiveren Knochenbildung führt (Lohse et al. 2015). Auch im ektopen Modell zeigten sich synergistische Effekte bei der kombinierten Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ (Moser et al. 2018).

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden in der hier vorliegenden Untersuchung auf ein der humanen Biologie angenähertes Studienmodell übertragen, um eine klinisch belastbare Methode für die Untersuchung der Knochenregeneration zu ermöglichen. Als Versuchstier wurde dafür das Göttinger Minischwein genutzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob die Regeneration von akuten Satteldefekten des Kieferkamms mit der Implantation von Signalproteinen verbessert werden kann. Außerdem wurde untersucht, ob die Kombination von rhVEGF₁₆₅ und rhBMP-2 bei gleichem Knochenneubildungspotenzial auch im Minischwein eine Reduktion der wirksamen Dosis des rhBMP-2 erlaubt. Weitergehend sollte auch das Potenzial des PDLLA/CaCO₃ für die Freisetzung von WF untersucht werden.

1.1 Grundlagen

1.1.1 Knochenaufbau und Physiologie

Der Knochen ist ein spezialisiertes Bindegewebe, das aus Zellen, Fasern und Grundsubstanz besteht. Im Gegensatz zu anderen Bindegeweben sind seine extrazellulären Bestandteile mineralisiert, was ihm eine erhebliche Festigkeit und Steifigkeit verleiht. Dadurch ist der Knochen für die mechanische Unterstützung des Organismus und den Schutz innerer Organe geeignet und bietet Ansatzpunkte für die Muskeln. Knochengewebe ist steif, um Verformungen zu widerstehen, aber flexibel genug, um Kräfte zu absorbieren (Weatherholt et al. 2012). Zusätzlich ist Knochen durch das Knochenmark an der Hämatopoese und am Mineralstoffwechsel als Speicher für Kalzium und Phosphat beteiligt. Im ausgewachsenen Organismus

besitzt Knochen die Fähigkeit zur Adaptation, sodass ständige strukturelle Veränderungen stattfinden (Clarke 2008).

Histologisch lässt sich im Knochen der zelluläre vom extrazellulären Anteil differenzieren. Bei der extrazellulären Knochenmatrix kann zwischen einem organischen und anorganischen Anteil unterschieden werden. Der organische Teil, welcher 20 bis 40 % einnimmt, wird von Osteoblasten synthetisiert und bildet durch ein breites Netz aus Typ I - Fasern die Grundsubstanz für die Ablagerung des anorganischen Teils. Dieser beträgt 50 bis 70 % der Knochenmatrix und besteht aus anorganischen Phosphaten und Kalzium, die die Apatitkristalle bilden, sowie Karbonat, Magnesium und Fluor. Weiterhin enthält der Knochen bis zu 10 % Wasser und geringe Mengen von Lipiden (Clarke 2008). Die am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen sind sowohl für den Knochenaufbau als auch dessen Abbau verantwortlich. Mit mesenchymaler Herkunft sind hierbei Osteoprogenitorzellen von großer Bedeutung, welche sich nach entsprechender Stimulation zu Osteoblasten ausdifferenzieren und somit maßgeblich für die Knochenbildung verantwortlich sind (Triffitt 2002). Osteoblasten sind stoffwechselaktive Zellen, die neben Kollagen auch WF und Proteine wie Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin und Thrombospondin produzieren. Auf dieser Basis bilden sie das Osteoid, die nicht mineralisierte Grundsubstanz des Knochens (Shapiro 2008). Nach der Einlagerung von Kalzium und Phosphat in die Kollagenstruktur des Osteoids findet die Mineralisierung der Grundsubstanz und damit die Ossifikation statt. Dabei verbleiben Osteoblasten in Lakunen des mineralisierten Gewebes und werden hierbei zu Osteozyten umgewandelt. Osteozyten bilden Fortsätze aus, welche über „gap-junctions“ eine Verbindung zwischen benachbarten Osteozyten ermöglichen und so ein Versorgungs- und Kommunikationsnetz in der knöchernen Matrix bilden (Hirose et al. 2007).

Makroskopisch lässt sich der Knochen in kompaktes und trabekuläres Knochengewebe einteilen (Abb.1). Diese beiden Gewebetypen haben die gleiche Matrixzusammensetzung, unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur und Funktion. Kortikaler Knochen macht etwa 80% der Skelettgewebemasse aus. Er weist eine hohe Matrixmasse pro Volumeneinheit und eine geringe Porosität auf. Diese Eigenschaften verleihen dem kortikalen Knochen eine hohe Druckfestigkeit, die es ihm ermöglicht, einen wichtigen Beitrag für die mechanische Funktion des Knochens zu leisten. Trabekulärer Knochen weist im Vergleich zu kortikalem Knochen eine hohe Porosität auf, wobei die Poren 50 bis 90 % des trabekulären Knochenvolumens ausmachen. Die Poren sind zwischen einem geordneten Netzwerk vertikaler und horizontaler Strukturelemente, den so genannten Trabekeln, eingestreut, die dem trabekulären Knochen ein schwammartiges Aussehen verleihen (Weatherholt et al. 2012). Die Knochenoberflächen sind von spezialisiertem Bindegewebe bedeckt. Das Periost bedeckt die Außenflächen des Knochens und ist in zwei verschiedene Schichten unterteilt, eine äußere faserige und eine innere zelluläre Schicht. Die zelluläre Schicht befindet sich in direktem Kontakt mit der Knochenoberfläche und enthält mesenchymale Stammzellen (MSZ), die das Potenzial haben, sich in osteogene Vorläuferzellen zu differenzieren (Weatherholt et al. 2012). Die endokortikale Oberfläche eines Knochens ist dem Markraum zugewandt und wird vom

Endost ausgekleidet. Das Endost enthält Osteoprogenitorzellen, scheint aber weder MSZ noch hämatopoetische Stammzellen (HSZ) zu enthalten. Die HSZ befinden sich jedoch neben dem Endost angrenzend im Markraum, was auf eine wechselseitige Kommunikation zwischen Zellen innerhalb des Endost und den multipotenten HSZ hindeutet (Taichman 2005). Diese enge Beziehung zwischen den Zellen bildet eine Stammzellnische, in der die Zellen des Endost die Stammzellaktivität physisch unterstützen und beeinflussen (Yin und Li 2006).

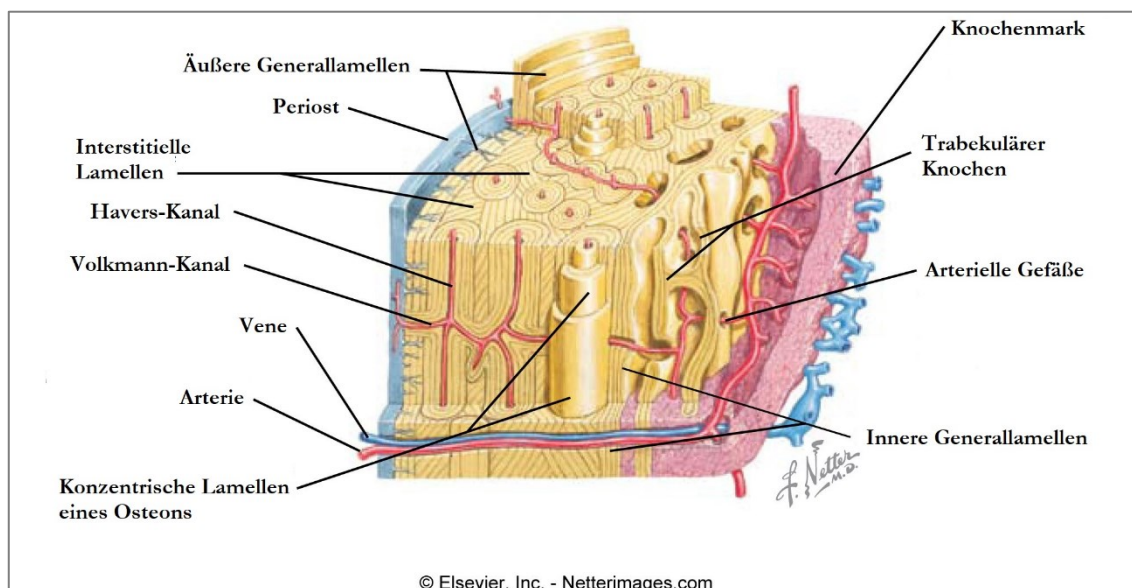


Abbildung 1: Knochenaufbau (Die Netter Illustration wird genutzt mit Genehmigung des Elsevier Verlags. Alle Rechte vorbehalten. www.netterimages.com).

1.2 Knochenbildung und Knochenumbau

Bei der Osteogenese, der Bildung von Knochen, wird zwischen der direkten und indirekten Ossifikation unterschieden. Bei der indirekten Ossifikation, auch chondrale Ossifikation genannt, wird der Knochen um ein knorpeliges Gerüst gebildet. Die knorpelige Struktur verdichtet sich hierbei bereits ab der fünften Embryonalwoche und führt zu einem hyalinen Knorpelgerüst. Je nachdem aus welcher Richtung die Ossifikation stattfindet, ist weiterhin zwischen einer perichondralen und eine enchondralen Ossifikation zu unterscheiden (Gratzl 2002).

Bei der desmalen Ossifikation kommt es zu Verdichtungen des mesenchymalen Gewebes; Osteoblasten differenzieren sich direkt aus dem Mesenchym über Osteoprogenitorzellen aus (Shapiro 2008). In den mesenchymalen Verdichtungszone produzieren die gebildeten Osteoblasten eine Knochenmatrix. Diese Matrix führt durch Einkapselung von Osteoblasten zur Bildung von Knochenbälkchen und Geflechtknochen. Zwischen diesen Knochenbälkchen wachsen weitere Blutgefäße ein. Anschließend differenzieren weitere mesenchymale

Zellen zu Osteoblasten, was für das fortlaufende Wachstum dieser Ossifikationszentren verantwortlich ist. Durch das Verschmelzen von vielen Ossifikationszentren wird das gebildete Bindegewebe schließlich durch Knochengewebe ersetzt (Shapiro und Wu 2019). Je nachdem wie die kollagenen Fasern im Knochengewebe ausgerichtet sind, ist eine Unterteilung zwischen Geflechtknochen und Lamellenknochen möglich. Der hauptsächlich in der Knochenneuentwicklung entstehende Geflechtknochen ist durch eine ungeordnete Disposition der Kollagenfasern gekennzeichnet. Durch die mechanischen Ansprüche während der Funktion wird er in Lamellenknochen umgebaut. Lamellenknochen haben einen geordneten und schichtenartigen Aufbau, der zirkulär um die Blutgefäße herum gerichtet ist und so ein Osteon bildet (Gratzl 2002).

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das in der Lage ist, seine Struktur und Masse zu verändern, um sich an veränderte Anforderungen anzupassen. Die Anpassung wird durch Wachstum, Modellierung und Heilung erreicht. Bei einer Veränderung der mechanischen Ansprüche reagiert Knochen dynamisch und weist dabei eine hohe Regenerations- sowie Adaptationsfähigkeit auf. Überschreitet der mechanische Reiz die Widerstandsfähigkeit des Knochens, kommt es zu Defekten wie einer Fraktur oder Substanzverlust (Weatherholt et al. 2012).

Gefäße spielen eine große Rolle in der Osteogenese. Blutgefäße bilden ein komplexes Netzwerk, das Blut, Sauerstoff, Stoffwechselprodukte und signalgebende Moleküle durch den Körper transportiert. Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein wesentlicher Prozess für die embryonale und postnatale Entwicklung und auch für die Gewebereparatur. Eine gestörte Angiogenese wurde mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der aus mehreren Schritten besteht. Für die Initiierung und raumzeitliche Koordinierung der Angiogenese werden eine Vielzahl von Zytokinen benötigt. Die Hypoxie ist der primäre Faktor für die Auslösung der Angiogenese, welche über hypoxieinduzierbare Faktoren (HIF) die pro-angiogenen WF hochreguliert. Proangiogene Faktoren wie VEGF, FGF, TNF- α und bestimmte Interleukine können von Krebszellen, Stromazellen, Entzündungszellen und Endothelzellen produziert werden (Ye und Jiang 2016). Diese Faktoren fördern die Angiogenese entweder durch die Sprossung von Endothelzellen aus bereits bestehenden Gefäßen oder durch die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen, die aus zirkulierenden Knochenmarkszellen stammen (Garmy-Susini und Varner 2005; Hillen und Griffioen 2007).

Die Bildung neuer Blutgefäße beinhaltet eine Reihe von koordinierten biologischen Prozessen wie Zellproliferation, gesteuerte Migration, Differenzierung und Zell-Zell-Kommunikation (Adams und Alitalo 2007). Die Kapillaraussprossung als zentraler Prozess bei der Gefäßentwicklung beginnt mit einer Tip-Zelle, die sich entlang eines Gradienten von pro-angiogenen Faktoren auf der Basalmembran bewegt, gefolgt vom Wachstum eines Stiels von proliferierenden endothelialen Stammzellen. Die Tip-Zellen sind zu Beginn der Sprossung essenziell, indem sie die Basalmembran abbauen und durch die extrazelluläre Matrix wandern

(Hillen und Griffioen 2007). Die Ausdehnung des neuen Gefäßes beruht auf der Proliferation von Stammzellen, die den Tip-Zellen unmittelbar folgen. Wenn die Tip-Zellen schließlich auf die Spitze anderer Gefäßsprossen stoßen, wird die Migration gehemmt und eine neue Zell-Zell-Adhäsion wird an der Verbindungsstelle etabliert. Die Bildung des Gefäßlumens folgt durch eine Rekrutierung von Perizyten und Fibroblasten zu neuen Gefäßen. In der Folge findet Ablagerung von Proteinen und die terminale Differenzierung von endothelialen Stammzellen statt, die zur Gefäßreifung und Ruhe führen (Adams und Alitalo 2007).

Eine unzureichende Gefäßneubildung kann zu Entwicklungsstörungen, Defiziten bei regenerativen Prozessen und zu einem erhöhten Leidensdruck bei bestimmten Erkrankungen führen (Wietecha und DiPietro 2013; Ye und Jiang 2016). Eine unkontrollierte und übermäßige Angiogenese kann zu Hämangiomen führen und bestimmten pathologischen Veränderungen bei Patient*innen mit chronischen Krankheiten, z. B. Diabetes mellitus, zugrunde liegen (Cheng und Ma 2015; Lee et al. 2000).

1.3 Defektheilung des Kieferknochens

Der Alveolarknochen unterliegt nach einer Zahnextraktion oder Osteotomie der desmalen Knochenheilung. Es erfolgt hierbei eine Stimulation der Knochenheilung durch die Wirkung von Signalproteinen, die eine Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu knochenbildenden Zellen auslösen (Vieira und McCusker 2018).

Die Reparation eines Knochendefekts beginnt mit dem Einstrom von Blut aus den eröffneten Gefäßen. Durch die Ausbildung eines fbringestützten Netzes wird ein stabiles Koagulum gebildet, welches den Defekt ausfüllt und von einem Leukozytenwall überzogen ist (Petrokovski 1967). Signalproteine werden aktiviert und fördern die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen und weiterer an der Knochenheilung beteiligten Zellen. Zu diesen Signalproteinen gehören unter vielen anderen auch *bone morphogenetic protein* (BMP) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Die Differenzierung der Osteoprogenitorzellen führt zur Ausbildung von Osteoblasten und Fibroblasten. Am Fundus des Defektes bildet sich ab dem zweiten bis dritten Tag der Wundheilung ein Granulationsgewebe, welches proliferierende endotheliale Zellen, einsproßende Kapillaren und Granulozyten enthält. Innerhalb einer Woche wird das Koagulum vollständig durch Granulationsgewebe ersetzt. Dort bildet sich im weiteren Verlauf ein kollagenes Netzwerk aus. Dieses wird vom ortsständigen Knochen ausgehend durch die Osteoblasten mineralisiert. Mit einer Neubildung von Knochen ist von den Defektwänden ausgehend ab dem siebten Tag zu rechnen (Schroeder 1991).

Evian et al. (1982) entnahmen zur Beschreibung der alveolären Knochenheilung Bohrkerne aus Extraktionsalveolen, welche in zweiwöchigen Zeitabständen von der vierten bis zur 16. Woche beurteilt wurden. Zwei Phasen der knöchernen Regeneration waren dabei ersichtlich. Von der vierten bis zur achten Woche fand eine progressive osteogene Phase mit einer Proliferation von osteogenen Zellen und unreifer Knochenbildung statt. Von der achten bis zur zwölften Woche verlangsamte sich die Osteogenese, die Trabekel reiften aus und

vergrößerten ihr Volumen. Von der zwölften bis 16. Wochen schien sich der Knochen bei Vorhandensein eines etablierten alveolären Trabekelknochens zu stabilisieren. Das osteogenetische Potenzial war nur noch gering, was an einem schwach ausgeprägten oder nicht mehr vorhandenen Osteoidsaum erkennbar war. Die vollständige Ausdifferenzierung des Knochens mit einhergehender radiologischer Unauffälligkeit kommt erst nach mehreren Monaten zum Abschluss (Amler 1969).

Nach Traumata im Kieferkamm wird die ursprüngliche Dimension des Kieferknochens schon nach kurzer Zeit nicht mehr dimensionsstabil repräsentiert. Mit fortlaufender Zeit erfolgt eine zunehmende vertikale und horizontale Atrophie des nicht belasteten Knochens (Araujo und Lindhe 2005; Cardaropoli et al. 2005; Cawood und Howell 1988).

1.4 Knochenersatz

Eine vollständige Regeneration von Knochendefekten kann bis zu einem gewissen Ausmaß vom Organismus geleistet werden. Eine Überschreitung des Regenerationspotenzials führt zu einem CSD, der je nach Ausdehnung zu ästhetischen und funktionellen Einschränkungen führen kann und in der Lebenszeit des Individuums nicht vollständig ausheilt (Schmitz und Hollinger 1986). Die Kompensation von solchen Defekten durch eine Knochenaugmentation ist daher häufig eine notwendige Herausforderung (García-Gareta et al. 2015). Es können verschiedene Zeitpunkte für die Augmentation von Knochen unterschieden werden. Der Versuch einer kammerhaltenden Augmentation im Sinne einer *ridge preservation* wird unmittelbar nach dem vorangegangenen Trauma durchgeführt, um der Resorption des Kieferkammes entgegenzuwirken (Kalsi et al. 2019). Hierbei werden die Defekte unmittelbar nach dem Trauma mit einem KEM aufgefüllt, um weitere chirurgische Eingriff für den Knochenaufbau weitestgehend zu vermeiden (Hammerle et al. 2008; Kalsi et al. 2019). Ist der Knochen bereits atrophiert, sodass die weitergehende Versorgung des Kiefers, z. B. mit Implantaten, nicht mehr möglich ist, kann der Knochen zu einem späteren Zeitpunkt rekonstruiert werden. Dieses verzögerte Vorgehen bedarf allerdings häufig invasiver Maßnahmen mit dementsprechenden Komorbiditäten (Cordaro et al. 2011; Nkenke und Neukam 2014). Daher werden verschiedene KEM-Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften für den klinischen Einsatz genutzt, um die Komorbiditäten durch eine autologe Knochentransplantation zu vermeiden (Troeltzsch et al. 2016).

1.4.1 Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion

Die Osteogenese bezeichnet den Prozess der Knochenbildung. Diese kann durch verschiedene exogene Einflüsse beeinflusst werden. Dazu gehört auch der simulierende Effekt von WF. Knochengewebe beinhaltet osteogene Zellen und WF und wirkt daher osteogenetisch bei der Knochenregeneration (Yamada und Egusa 2018). Bei der Knochenaugmentation können knochenbildende Zellen und/oder Vorläuferzellen mit einem Transplantat oder einem Trägermaterial in den Defekt eingebracht werden. Diese können auf diesem Wege

durch die direkte Stimulation der Knochenneubildung einen osteogenetischen Effekt ausüben (Giannoudis et al. 2005).

Wenn das eingebrachte KEM eine dreidimensionale Grundstruktur wiederherstellt, aber keine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung von Zellen ausübt, handelt es sich um ein osteokonduktives Material (Albrektsson und Johansson 2001). Das KEM dient hierbei als Gerüst für das Einwandern von Zellen aus dem Defektrand, die auf dieser Leitschiene Knochen und Gefäße bilden können (García-Gareta et al. 2015). Dieser passive Prozess wird maßgeblich von der Porosität des Materials beeinflusst, welche die Adhäsion und das Einwachsen von Zellen und Gefäßen ermöglicht (Calori et al. 2011; Loh und Choong 2013).

Die Osteoinduktion ist der Prozess, durch den die Osteogenese induziert wird. Sie tritt bei jeder Art von Knochenheilungsprozessen auf. Die Osteoinduktion impliziert die Rekrutierung von unreifen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und deren Stimulation, sich zu Osteoblasten zu entwickeln (Albrektsson und Johansson 2001). Sie ist gekennzeichnet durch komplexe Regulationsmechanismen, die durch osteoinduktive Proteine wie BMP und andere Zytokine gesteuert werden. Für wenige KEM, z. B. für *demineralized freeze dried bone allograft* (DFDBA), werden osteoinduktive Eigenschaften beschrieben. Diese können durch gebundene WF eine Auswirkung auf die Zellen und die osteoblastäre Differenzierung haben und damit die Bildung von neuen Knochen stimulieren (Calori et al. 2011; Urist 2002).

1.5 Knochenersatzmaterialien

Biokompatible KEM sollten weder teratogen, kanzerogen noch toxisch auf die umgebenden Gewebe wirken. Auch proinflammatorische oder immunogene Reaktionen sollten möglichst ausgeschlossen werden (Yamada und Egusa 2018). Die KEM sollen den Defekt auffüllen, das Koagulum stabilisieren und damit die Osteogenese fördern (Albrektsson und Johansson 2001). Eine stimulierende Wirkung auf die an der Knochenneubildung beteiligten Zellen können vom KEM selbst oder durch Zytokine wie BMP ausgeübt werden (García-Gareta et al. 2015). Durch eine geeignete Porosität des Materials wird die Neovaskularisation, damit der Stoffaustausch und in der Konsequenz das Einwachsen von Knochengewebe in das KEM unterstützt (Loh und Choong 2013). Bei größeren Defekten ist für die Reparation des Defektes auch ein möglichst formstabiles Verhalten des KEM von Vorteil (Calori et al. 2011). Die Resorption des KEM sollte in einem definierten Zeitraum mit gleichzeitigem Ersatz durch körpereigenen Knochen erfolgen, um spätere Fremdkörperreaktionen auszuschließen und biomechanisch gut belastbares Gewebe zu erzielen. Daher sollte die Resorption günstigstenfalls in der gleichen Geschwindigkeit wie die Gewebeneubildung ablaufen (Yamada und Egusa 2018). Vorteilhaft für den klinischen Einsatz ist eine geringe Techniksensitivität und eine gute Verfügbarkeit des KEM bei entsprechender Kosteneffizienz (Giannoudis et al. 2005). Um eine zusätzliche Belastung für den Patienten bei der Entnahme von körpereigenem Knochen zu vermeiden, rückten daher Ersatzmaterialien

unterschiedlichen Ursprungs in den Fokus. Diese KEM können ihrer Herkunft entsprechend weiter unterteilt werden.

1.5.1 Autologer Knochen

Der körpereigene Knochen stellt aufgrund seiner osteogenen Eigenschaften den „Goldstandard“ für die Knochenaugmentation dar (Herford und Nguyen 2015; Sakkas et al. 2017; Spin-Neto et al. 2013). Gängige Verfahren umfassen entweder die direkte Implantation des Spenderknochens oder dessen Zerkleinerung und die anschließende Mischung der resultierenden Partikel mit einem KEM. Das Gewebe wird dabei aus intraoralen (Oberkiefer oder Unterkiefer) oder extraoralen (Beckenkamm oder Schädeldach) Lokalisationen gewonnen (Kang et al. 2015). Die Transplantate sind in Bezug auf ihre osteogenen Fähigkeiten jedoch nicht gleichwertig. Von den Schädelknochen gewonnene Transplantate zeigen im Vergleich zum Beckenknochen nach oraler Implantation eine bessere Stabilität (Mertens et al. 2013). Kiefertransplantate sind im Vergleich zum Beckenknochen mit einem besseren Transplantatüberleben, osteogener Aktivität und geringerem Volumenverlust verbunden (Kang et al. 2015). Darüber hinaus zeigen sie im Vergleich zum Beckenkammtransplantat einen höheren Mineralisierungsgrad auf (Schlegel et al. 2006). Für die Entnahme des autologen Knochens ist allerdings ein zusätzlicher chirurgischer Eingriff notwendig, daher ist dessen Verwendung mit entsprechenden Komorbiditäten verbunden (Cordaro et al. 2011; Nkenke und Neukam 2014).

1.5.2 Allogener Knochen

Allogene KEM werden aus Spenderknochen von lebenden Individuen oder Leichen gewonnen. Allogener Knochen wird in frischer, gefrorener oder gefriergetrockneter Form, kortikal oder spongiös hergestellt (Boyce et al. 1999). Allogene Transplantate üben in erster Linie osteokonduktive und schwach osteoinduktive Eigenschaften aus und fungieren als Gerüst, in das die Wirtszellen einwandern und sich vermehren, differenzieren und neuen Knochen produzieren. Bei den allogenen biologischen Materialien besteht prinzipiell die Gefahr einer Übertragung von Krankheiten. Auch eine antigene Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden (Friedlaender et al. 1999; Giannoudis et al. 2005). Bei der Vorbereitung der Transplantate wird daher versucht, alle potenziellen infektiösen und antigenen Bestandteile aus dem Knochengerüst herauszulösen, um eine immunogene oder infektiöse Reaktion zu vermeiden (Graham et al. 2010; Whang und Wang 2003). Eine Möglichkeit, allogenes KEM herzustellen, besteht in der Dekalzifizierung und Sterilisierung des Spendergewebes. Hierbei verbleibt das demineralisierte Grundgerüst mit den darin verfügbaren WF für eine osteoinduktive Wirkung (Ehrler und Vaccaro 2000; Giannoudis et al. 2005). Nach der Verwendung von allogenen KEM, welches den Richtlinien entsprechend aufbereitet worden ist, wurden keine größeren systemischen Komplikationen berichtet (Hinsenkamp et al. 2012). Spin-Neto et al. (2014) stellten allerdings fest, dass allogene KEM langsamer inkorporiert und remodelliert werden als autologe Transplantate.

1.5.3 Xenogene KEM

Aus tierischem Knochen, Algen und Korallen können poröse Hydroxylapatite gewonnen werden. Xenogene KEM bestehen im Wesentlichen aus diesem Hydroxylapatit, welches nach der Eliminierung aller organischen Bestandteile eine ähnliche Struktur wie die humanen Apatite zeigt. Am Ende des Aufbereitungsprozesses steht ein Biomaterial, dessen Partikel interkonnektierende Poren aufweisen. Diese Poren ermöglichen das Einwachsen neuer Blutgefäße und eine osteoblastäre Zellmigration in das Transplantat (Ohayon 2011). Sie stellen aufgrund ihrer Porosität, Stabilität und ihres Resorptionsverhaltens ein gut geeignetes und häufig genutztes KEM dar (Hammerle et al. 2008). Da bei der Herstellung alle organischen Bestandteile aus dem gewonnenen Material entfernt werden, können die Übertragung von Krankheiten und immunologische Abwehrreaktionen nahezu ausgeschlossen werden (Kim et al. 2016). Die mineralische Zusammensetzung sowie die physikalischen und chemischen Eigenschaften sind dem menschlichen Knochen sehr ähnlich. Dies trifft vor allem für den bovinen Knochen zu, weshalb dieser bei der Anwendung von KEM eine weite Verbreitung gefunden hat (Aludden et al. 2017; Jung et al. 2013).

1.5.4 Alloplastische KEM

1.5.4.1 Keramiken

Keramiken als KEM sollen das im menschlichen Knochen vorkommende Apatit imitieren und eine dem natürlichen Knochen ähnliche Matrix bilden. Dabei stehen Hydroxylapatite und Tricalciumphosphate als Basis der KEM im Vordergrund. Bei der Herstellung der Keramiken werden die pulverigen Ausgangsstoffe unter hoher Temperatur und hohem Druck zu einem Festmaterial mit bestimmter Porosität und Dichte gesintert. Dieses hat großen Einfluss auf die späteren Eigenschaften, da eine höhere Dichte mit einer geringeren Porosität und damit auch einer verlangsamten Resorption verbunden ist. Die Porosität spielt bei der Osseointegration der Keramiken einen entscheidenden Einfluss (LeGeros 2002; Li et al. 2009). Keramische KEM weisen eine gute Biokompatibilität auf, sind kostengünstig und in großem Umfang verfügbar. Es ist möglich, diese KEM in verschiedenen Formen oder zu einem Granulat zerkleinert zu verarbeiten. Sie weisen im Gegensatz zu den autologen Transplantaten jedoch weder eine osteogenetische noch eine osteoinduktive Wirkung für die Förderung der Knochenneubildung auf (Johnson et al. 1996; LeGeros 2002).

1.5.4.2 Polymere

Polymere werden vor allem in der Fixation von Frakturen in Form von Schrauben und Stiften und zur Wundversorgung mit synthetischen Nahtmaterialien angewandt. Sie besitzen dabei eine gute Biokompatibilität. Polymere können als natürliche und synthetische Materialien auch für die Knochenaugmentation zum Einsatz kommen und werden im Körper hydrolytisch gespalten und metabolisiert (Middleton und Tipton 2000).

Zu den natürlichen Polymeren gehören Kollagen, Fibrin, Gelatine, Chitosan und die Hyaluronsäure. Sie zeigen aufgrund ihres nativen Ursprungs eine gute Biokompatibilität und sind gut biodegradierbar (García-Gareta et al. 2015; Lee et al. 2012). Kollagene wurden häufig als medizinisches Trägermaterial für Medikamente, Nanopartikel oder als Gerüst für eine Besiedelung mit Stammzellen genutzt (Chan et al. 2010; Geiger et al. 2003). Das osteokonduktive Potenzial erscheint aufgrund der geringen Stabilität und der raschen Resorption im Gewebe aber als gering. Durch verschiedene chemische Modifikationen konnten die Materialeigenschaften verbessert werden (Geiger et al. 2003).

Synthetische Polymere bilden ein großes Spektrum, da sie in verschiedenen Formen mit unterschiedlichen mechanischen Voraussetzungen für ein gesteuertes Degradationsverhalten hergestellt werden können. Es stehen hierbei Materialien wie das Polyglycolid, Poly-L-Lactid, Poly-DL-Lactid und weitere Copolymere zur Verfügung. Ihr Degradationsverhalten hängt maßgeblich von den Mischverhältnissen der Comonomere zueinander ab (Gentile et al. 2014). Die Degradationsprodukte im Gewebe sind die im menschlichen Körper auch vorkommenden Glycolidsäure und Laktidsäure, welche vom körpereigenen Metabolismus abgebaut werden (Gentile et al. 2014).

Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von Polymeren ist die Tatsache, dass ihr Abbau mit einem periimplantären pH-Abfall verbunden ist, der zu Gewebereizungen führen und die Knochenbildung nachteilig beeinflussen kann. *In vitro* wurde die Zelldifferenzierung negativ beeinflusst und *in vivo* konnten entzündliche Reaktionen beobachtet werden (Ara et al. 2002; Kohn et al. 2002; Schiller und Epple 2003; Schliephake et al. 2008). Die Zugabe von neutralisierenden Komponenten wie Kalziumkarbonat und/oder Kalziumphosphat konnte helfen, die bei der Resorption des Trägers entstehenden sauren Abbauprodukte zu reduzieren (Schiller und Epple 2003; Schliephake et al. 2015).

Mithilfe spezifischer Herstellungsprozesse wie der Hochdruckbegasung mit CO₂ können PLA-Trägermaterialien mit Signalproteinen für die Knochenneubildung aufgeschäumt werden und auf diesem Wege als Kompositmaterial ein osteoinduktives Potenzial entwickeln (Schliephake et al. 2015). Kompositmaterialien sind aus verschiedenen Substanzen oder Materialien zusammengesetzte Produkte. Als KEM bestehen sie aus einem Trägermaterial, welches mit WF oder Zellen für eine osteoinduktive Wirkung ergänzt wird (García-Gareta et al. 2015).

1.6 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Teil eines signalgebenden Systems, welches die Gewebeheilung koordiniert. Sie vermitteln ihre Signale durch gezielte Rezeptorbindungen an Zellen, was eine Aktivierung von spezifischen Gensequenzen in den Zellen hervorruft (Solheim 1998). Die Osteogenese beinhaltet die Migration und Mitose von mesenchymalen Stammzellen sowie deren Differenzierung in Osteoprogenitorzellen (Hankenson et al. 2015). An den Differenzierungsvorgängen sind in den unterschiedlichen Geweben sind verschiedene WF mit

unterschiedlichen Signalinduktionen beteiligt. Beispiele hierfür sind *insulin-like growth factor* (IGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der *transforming growth factor Beta* (TGF- β) mit dem BMP-2. Die durch WF unterstützte Geweberegeneration erscheint vielversprechend, um die Nachteile verschiedener Therapieansätze auszugleichen. Hierbei steht bei der Knochenregeneration vor allem die Förderung der Osteoinduktion im Fokus, wobei insbesondere der Nutzen osteogener und angiogener Zytokine wie BMP und VEGF und deren synergistisches Zusammenspiel untersucht wurde (Li et al. 2016; Rather et al. 2019).

1.6.1 *Bone morphogenetic protein*

Die Knochenheilung und die damit einhergehende Mineralisation des Gewebes ist ein komplexer Vorgang, in den verschiedene Faktoren wie präosteoblastäre Zellen, physikalisch-chemische Signalprozesse und ein Netzwerk von Molekülen eingebunden in eine organische Matrix beteiligt sind (Hankenson et al. 2015). Der Prozess der Knochenheilung beginnt innerhalb kurzer Zeit nach der Verletzung und ist abhängig von der Größe des Defektes, der Aktivität von Osteoprogenitorzellen und den Mechanismen, welche deren Proliferation, Differenzierung und Funktion beeinflussen. Dabei wurde der Einfluss von WF auf die Stimulierung der präosteoblastären Differenzierungsprozesse und deren Proliferation untersucht (Linkhart et al. 1996). Hierbei spielen vor allem die verschiedenen BMP eine wichtige Rolle bei Mitose, Differenzierung, Chemotaxis und der osteogenen Aktivität (Solheim 1998). Sie gelten als potente Mediatoren in der Proliferation und Differenzierung von MSZ zu osteogenen Zellen. *Bone morphogenetic protein* interagiert dabei mit anderen WF in einem komplexen zellulären Signalweg. Es sind derzeit mehr als 20 verschiedene BMP bekannt, welche in den Bezug zum Knochenstoffwechsel zu setzen sind (Carreira et al. 2014). Hierbei werden vor allem BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 mit einem erhöhten osteogenen Potenzial verbunden (Chen et al. 2004; Kang et al. 2004). Sie alle zählen zu der Familie der TGF- β -Zytokine, da sie alle sehr ähnliche strukturelle Voraussetzungen erfüllen.

Bone morphogenetic protein wird von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Thrombozyten synthetisiert, wobei sich die Produktion nicht nur auf den Knochen beschränkt (Pecina und Vukicevic 2007). Neben ihrem weitreichenden Einfluss auf die Knochenneubildung wurden viele Prozesse in der embryonalen Entwicklung und der Zellfunktion untersucht (Chen et al. 2004; Wozney 1992). *Bone morphogenetic proteins* sind wichtige Faktoren bei der Genese verschiedener Zelltypen, der Organogenese, der Zahnentwicklung, der Chemotaxis, der Apoptose und vieler geweblicher Reparaturmechanismen (Ducy und Karsenty 2000).

Die Wirkung der BMP ist aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit zeitabhängig und löst eine sequenzielle Kaskade von Ereignissen aus, die zu Chondrogenese, Osteogenese, Angiogenese und einer kontrollierten Synthese der extrazellulären Matrix führt. Die Aktivität von BMP wird dabei lokal durch mehrere Antagonisten geregelt (Carreira et al. 2014). Der

Signalweg wird über spezifische *bone morphogenetic protein receptors* (BMPR) auf der Zelloberfläche der mesenchymalen Stammzellen (MSZ) vermittelt (Scarfi 2016). Diese Rezeptoren sind Transmembranproteine, die das extrazelluläre Kompartiment mit dem zytoplasmatischen Raum verbinden. Die Interaktion der BMP mit den Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus. Der durch die Bindung von BMP aktivierte BMPR-II-Rezeptor fördert die Rekrutierung und Phosphorylierung vom BMPR-Typ IA oder BMPR-IB. Diese Ereignisse provozieren die Phosphorylierung von intrazellulären Botenstoffen, genannt rezeptorregulierte Smad-Proteine (R-Smad), die mit dem Protein MAD-Homolog 4 (Smad4) dimerisieren und in den Zellkern transportiert werden, wo sie die Zellteilung und die Expression spezifischer Gene und damit auch die Differenzierung der MSZ zu Osteoblasten regulieren (Miyazono et al. 2010).

Für therapeutische und wissenschaftliche Zwecke werden rekombinante Formen der BMP angewandt. Ende der 1980er Jahre wurden die ersten Sequenzen der BMP-Familie geklont und exprimiert, welches ein hohes Potenzial für ihre zukünftige therapeutische Anwendung eröffnete. In der Folge konnten biologisch aktive rekombinante BMP hergestellt werden (Wozney et al. 1988). *Bone morphogenetic proteins* wirken schon in sehr niedrigen Dosen im Gewebe, jedoch sind höhere Mengen im Operationsbereich notwendig, um osteoinduktive Eigenschaften zu erreichen. Dies ist mit ihrer kurzen Halbwertszeit zu erklären (Jung et al. 2017). Aus diesem Grund besteht eine hohe Nachfrage und es verlangt nach einem effizienten System, um ausreichende Mengen an biologisch aktivem BMP für die klinische Anwendung bereitzustellen. Etablierte Methoden zur BMP-Gewinnung aus demineralisierter Knochenmatrix sind aufwändig und zu ineffizient. Daher wurden verschiedene Modelle zur Gewinnung rekombinanter Formen der Proteine entwickelt. Die Wahl des Systems ist dabei der limitierende Faktor für die Effektivität und die Qualität der Proteine (Carreira et al. 2014).

Es kommen hierfür vornehmlich zwei Ansätze in Betracht. Zum einen können Proteine aus eukaryotischen Expressionssystemen gewonnen werden, wobei nur eine relativ geringe Menge an rekombinanten Proteinen produziert werden kann (Wozney et al. 1988). Prokaryotische Expressionssysteme ermöglichen die Herstellung größerer Mengen bei geringerem technischem Einsatz. *Escherichia coli* ist hierbei aufgrund seiner hohen Wachstumsraten das am häufigsten angewendete Bakterium für die Produktion von Proteinen (Long et al. 2006).

Rekombinantes humanes BMP-2 und rhBMP-7 waren die ersten WF, die als Alternative für Knochentransplantate eingeführt wurden. Dabei stellt das rhBMP-2 das vorherrschende BMP im klinischen Einsatz dar (Ramly et al. 2019). Im Jahr 2002 wurde mit Kollagen verbundenes rhBMP-2 (INFUSE; Medtronic, Memphis, Tennessee) von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für begrenzte Anwendungen bei der anterioren lumbalen interkorporellen Fusion zugelassen. Die von der FDA zugelassenen Indikationen wurden 2004 für die Behandlung akuter offener Tibiafrakturen erweitert, 2007 wurde rhBMP-2 als Alternative zum autologen Knochentransplantat für die Sinus- und lokalisierte Alveolarkamm-Augmentation zugelassen (Ramly et al. 2019).

1.6.2 *Vascular endothelial growth factor*

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) spielt eine wichtige und vielgestaltige Rolle bei der vaskulären Embryonalentwicklung (Vaskulogenese), dem Entstehen neuer Blutgefäße (Angiogenese) und bei der Ausbildung funktioneller Kollateralen aus vorgebildeten Kapillaren (Arteriogenese) (Hu und Olsen 2016). Im adulten Organismus findet die Angiogenese bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und bei pathologischen Bedingungen wie diabetischer Retinopathie, Arthritis, Tumorwachstum und -metastasierung statt (Carmeliet 2003). *Vascular endothelial growth factor* ist ein angiogener Wachstumsfaktor, der auch als essenziell für die Knochenregeneration beschrieben wird (Axelrad et al. 2007; Deckers et al. 2000). Die Blutversorgung stellt für die Defektversorgung und Gewebeneubildung die größte Herausforderung und damit den wichtigsten limitierenden Faktor dar (Saran et al. 2014). Eine suffiziente Diffusion und nutritive Versorgung in die umliegenden Gewebe ist nur in einem Umkreis von 200 µm um das nächste Kapillargefäß möglich (Jain et al. 2005). Der Knochen ist ein hoch vaskularisiertes Gewebe, daher stellt eine gute Mikrozirkulation eine unabdingbare Voraussetzung für eine Gewebeneubildung dar (Saran et al. 2014). Eine Unterbrechung der Vaskularisation bedingt eine verminderte Knochenbildung (Gerber et al. 1999), wohingegen die Stimulation zu einer verstärkten Osteoneogenese führte (Kaigler et al. 2006).

Die Familie der VEGF wird von mindestens sechs homodimeren Proteinen gebildet: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und dem plazentären Wachstumsfaktor PlGF (Ferrara et al. 2003). *Vascular endothelial growth factor*-A ist die am häufigsten vorkommende Form und übernimmt eine wichtige Funktion bei der Proliferation, Migration und Aktivierung von Endothelzellen und fördert die Durchlässigkeit und Fenestration von Blutgefäßen (Ferrara et al. 2003). *Vascular endothelial growth factor* -C und -D sind wichtig für die Lymphangiogenese, VEGF-B spielt eine Rolle bei der embryonalen Angiogenese und PlGF ist ein kritischer Bestandteil der plazentaren Angiogenese (Ferrara et al. 2003; Yonemura et al. 2005). Abhängig von der alternativen Spleißung kommt VEGF-A in vier Isoformen beim Menschen vor, darunter VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ (Ferrara und Davis-Smyth 1997). *Vascular endothelial growth factor* ₁₆₅ ist hierbei die häufigste Isoform und wird üblicherweise für Untersuchungen in Tiermodellen verwendet. Die Signalkette des VEGF wird über verschiedene *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFR) und Neuropilin1 und Neuropilin2 vermittelt. Der Signalrezeptor VEGFR2 ist unter diesen der häufigste und wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert, um Angiogenese, Vaskulogenese sowie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zu bewirken (Ferrara et al. 2003). Durch Bindung an Liganden werden die VEGF-Rezeptoren dimerisiert, was zu einer Phosphorylierung bestimmter Rezeptortyrosinreste führt. Diese vermitteln daraufhin mitogene und chemotaktische Signale in der Zelle (Ferrara et al. 2003; Koch et al. 2011).

Vascular endothelial growth factor wird durch viele Faktoren wie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, Hormone und mechanische Reize reguliert. Auch die Hypoxie gilt als wichtiger Faktor für die VEGF-Expression, insbesondere in Tumor- und Knochengewebe (Wang et

al. 2007). Mehrere WF, die für die Knochenentwicklung und Knochenheilung eine entscheidende Rolle spielen, regulieren insbesondere in osteoblastischen Zellen die VEGF-Expression (Hu und Olsen 2016). Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Mitglieder der Familie der TGF- β , wie TGF- β 1, TGF- β 2, BMP-2, BMP-4, BMP-7, IGF und *fibroblast growth factor* 2 (Deckers et al. 2000; Goad et al. 1996; Saadeh et al. 2000). Entzündungsfaktoren wie Prostaglandin E1 und E2, Interleukin (IL) -1, IL-6 und IL-8, die während der Entzündungsphase der Knochenheilung erhöht werden, induzieren ebenfalls die VEGF-Expression (Harada et al. 1994). Der mechanische Stimulus des Knochens ist ein weiterer Regulationsfaktor der VEGF-Expression (Nakai et al. 2009; Thi et al. 2010).

Bei der Knochenentwicklung und Homöostase spielen diverse Regulierungsfaktoren eine Rolle. Die Modulation des VEGF-Spiegels in Osteoblasten scheint eine Grundlage für Strategien zur Kontrolle der Knochenregeneration bilden zu können. Darüber hinaus ist eine direkte Wirkung des VEGF auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) beschrieben worden (Deckers et al. 2000; Zhang et al. 2011). Auf Osteoblasten wurden Rezeptoren für VEGF gefunden, ein Hinweis darauf, dass VEGF die osteoblastäre Differenzierung direkt stimulieren kann (Deckers et al. 2000). Street et al. (2002) hemmten bei Frakturheilungen von Mäusen die VEGF-Stimulation. In der Folge war die Knochenheilung eingeschränkt. Gerber et al. (1999) kamen bei Untersuchungen an Mäusen zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei die Inhibition der VEGF-Expression zu einer eingeschränkten Angio- und Osteogenese führte. Außerdem konnten die Autor*innen nachweisen, dass die VEGF-Inhibition durch einen Rezeptorantagonisten die Funktion von BMP-2 und BMP-4 bei der Knochenregeneration hemmt (Gerber et al. 1999).

Für das VEGF alleine wird *in vivo* allerdings kein signifikant vorteilhafter Effekt auf die Osteogenese beschrieben (Dreyer et al. 2020). Die Signalwege der verschiedenen WF und deren Vernetzungen miteinander stehen daher im Fokus der Forschung und es deutet sich an, dass die Wirkung von VEGF in der Osteogenese über die alleinige Förderung der Angiogenese hinausgeht (Grosso et al. 2017; Hu und Olsen 2016).

1.6.3 Synergistische Wirkung von Wachstumsfaktoren

Der erste Bericht über die Implantation eines Polymers zur kombinierten Freisetzung von WF wurde im Jahr 2001 veröffentlicht, wobei hier die angiogenen Zytokine VEGF und PDGF für die therapeutische Angiogenese verwendet worden sind (Richardson et al. 2001). Aufgrund der Komplexität der Knochenheilung und der Vielzahl an beteiligten Mediatoren erscheint eine spezifische Kombination von WF auch für eine effektivere Knochenregeneration sinnvoll (Simmons et al. 2004). Verschiedene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass VEGF und BMP neben der Steigerung der Angiogenese und der Rekrutierung von MSZ auch synergistisch agieren, um das Zellüberleben, die Knorpelbildung und -resorption sowie die Mineralisierung des Knochens zu verbessern (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005). Das

gegenseitige Wechselspiel in den Signalwegen zwischen VEGF und BMP hat dabei zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Grosso et al. (2017) beschreiben, dass ein physiologischer Spiegel des VEGF die Knochenhomöostase aufrechterhält, während zu wenig VEGF die Differenzierung der Osteoblasten unterbricht und zu viel VEGF die Osteoklastenrekritierung erhöht, was zu einer Knochenresorption führen kann. Während der Knochenregeneration produzieren Osteoblasten VEGF und fördern dadurch die Migration und Proliferation von Endothelzellen. Im Gegenzug sezernieren die Endothelzellen osteogene Faktoren wie BMP-2 und BMP-4, die die osteogene Differenzierung der MSZ unterstützen. VEGF reguliert ferner dosisabhängig die Expression von Sema3A in Endothelzellen, welches die osteoklastische Differenzierung unterdrückt und damit die Knochenbildung unterstützt. Sema3A ist weitergehend für die Rekrutierung von Neuropilin-1-exprimierenden (Nrp1+) Monozyten verantwortlich, die die Gefäßstabilisierung fördern. Die synergistischen Effekte von VEGF auf die BMP-induzierte Knochenbildung scheinen demzufolge nicht nur auf die effizientere Angiogenese zurückzuführen zu sein. In MSZ wird nach Aktivierung der VEGF-Signaltransduktion die Reaktion auf BMP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikant verbessert (Cui et al. 2010; Li et al. 2015; Madhu et al. 2014). Die Anwendung von VEGF-spezifischen Antagonisten inhibiert die durch BMP-2 und BMP-4 induzierte Knochenregeneration, was für eine Kopplung der beiden Faktoren spricht (Peng et al. 2002; Peng et al. 2005).

Bei der gleichzeitigen Freisetzung von BMP und VEGF in der Knochenregeneration ist das quantitative Verhältnis der Wachstumsfaktoren zueinander ein weiterer entscheidender Faktor für den synergistischen Effekt. Diesbezüglich scheint bei einer Kombination der WF eine geringere Dosierung des VEGF gegenüber einer höheren Dosis BMP effektiver für die Knochenregeneration zu sein (Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Liu et al. 2020; Lohse et al. 2015; Peng et al. 2002; Peng et al. 2005; Wang et al. 2017).

Die kombinierte Freisetzung der beiden WF führte verschiedenen Untersuchungen zufolge zu einer hohen Effizienz bei der Knochenneubildung (Cakir-Ozkan et al. 2017; Chen et al. 2020; Liu et al. 2020; Lohse et al. 2015; Rather et al. 2019; Schorn et al. 2017; Wang et al. 2017; Wang et al. 2018; Zhang et al. 2011). Auf molekularer Ebene war die Expression von Faktoren, die mit der osteogenen Differenzierung zusammenhängen, bei der kombinierten Wirkung von BMP-2 und VEGF₁₆₅ deutlich erhöht (Wang et al. 2018).

Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und ihrer potenziellen Nebenwirkungen ergeben sich für die Knochenregeneration allerdings Einschränkungen bei der Anwendung von WF (Almubarak et al. 2016; Benglis et al. 2008; Leknes et al. 2008; Mitchell et al. 2016). Insofern spielen geeignete Systeme für die Freisetzung der wirksamen WF eine wichtige Rolle für Knochenregeneration (Schliephake 2010).

1.6.4 Träger und Freisetzungskinetik

Das Trägersystem kann als einer der wichtigsten Parameter für die Verabreichung von WF angesehen werden (El Bialy et al. 2017). Neben geeigneten mechanischen und strukturellen Eigenschaften sollten potenzielle Trägermaterialien WF an sich koppeln können (Schliephake 2010). Ein richtig konzipiertes Verabreichungssystem wird lokal durch einen chirurgischen Eingriff implantiert und ist in der Lage, die WF nur an der Zielstelle der benötigten Regeneration freizusetzen (El Bialy et al. 2017). Für diesen Zweck sind verschiedene Biomaterialien als Trägergerüste geeignet. Neben dem Kollagen zählen xenogene KEM, Gelatine, Chitosan und die Polylaktide zu den für die Kopplung von WF befähigten Trägermaterialien (Kim und Tabata 2015). Unter den Trägern natürlichen Ursprungs wurde das Kollagen am häufigsten angewendet (Geiger et al. 2003).

Natürliche Polymere wurden wegen ihrer vorteilhaften Eigenschaften wie Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit und Löslichkeit in physiologischen Umgebungen weitgehend für die Verabreichung von BMP untersucht. Da die meisten natürlichen Polymere von Tieren stammen, haben sie den Nachteil der Immunogenität und des potenziellen Risikos der Übertragung von Krankheitserregern. Kollagen ist der am häufigsten verwendete Träger für die Verabreichung von rhBMP und wird bei den klinisch angewandten rhBMP-Produkten INFUSE® und OP-1® verwendet (El Bialy et al. 2017). Obwohl es das einzige Trägermaterial ist, das eine klinische Zulassung erhalten hat, haben Kollagenschwämme nur ein eingeschränktes Vermögen zur verzögerten Abgabe von WF (Geiger et al. 2003; Uludag et al. 1999). Obwohl die Dosierungsanforderungen für die therapeutische Anwendung von WF noch nicht klar definiert sind, besteht eine weitgehende Einigkeit darüber, dass die kontrollierte, verzögerte WF-Freisetzung vorteilhafter für die natürliche Geweberegeneration ist als die rasche Freisetzung der WF (Schliephake 2010). Durch den Einsatz von Materialien zur kontrollierten Freisetzung der Faktoren erscheint eine prolongierte Wirkung der WF möglich (Helary und Desimone 2015; Li et al. 2016; Schliephake et al. 2007; Schliephake et al. 2015). Hierbei rückten zwei verschiedene Ansätze zur Freisetzung der WF in den Fokus. Die sequenzielle Freisetzung orientierte sich an der temporären Expression der WF bei der Knochenheilung (Cakir-Ozkan et al. 2017; Kempfen et al. 2009), während ein anderer Ansatz die simultane und verzögerte Freisetzung der WF favorisierte (Chen et al. 2020; Hernández et al. 2012; Lohse et al. 2015; Patel et al. 2008). Die rekombinanten WF können dabei auf verschiedene Weise an die Trägermaterialien gebunden werden. Hernández et al. (2012) und Kempfen et al. (2009) koppelten die WF an separate Trägermaterialien und bauten sie dann in poröse KEM ein. Auch per CO₂-Hochdruckbegasung konnten die Zytokine mit einem Polymer verbunden und die prolongierte Abgabe der WF aus den Polymeren nachgewiesen werden (Schliephake et al. 2007; Schliephake et al. 2015). Neben der Einbindung rekombinater Zytokine können WF ihre Wirkung auch zellvermittelt durch einen Gentransfer ausüben, wobei meist Stammzellen an spezifische Trägermaterialien gekoppelt wurden (Kanczler et al. 2010; Peng et al. 2002; Peng et al. 2005; Samee et al. 2008; Xiao et al. 2011).

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die Knochenregeneration von großen Kieferdefekten stellt in der klinischen Therapie eine große Herausforderung dar. Ein Verfahren, welches den hohen Anforderungen an einen Knochenersatz ohne Einschränkungen genügt, steht aktuell nicht zur Verfügung. Für die Therapie ausgedehnter Defekte stellt daher noch immer der autologe Knochenersatz den Goldstandard dar, obwohl in der Vergangenheit bereits verschiedene alternative KEM entwickelt worden sind (Herford und Nguyen 2015; Sakkas et al. 2017; Troeltzsch et al. 2016).

Um das osteogene Potenzial von KEM zu erhöhen, wurden bereits verschiedene Untersuchungen unternommen, die bei der Anwendung von WF ein erhöhtes osteoinduktives Potenzial bestätigten. Hierbei deutete sich für die synergistische Wirkung von BMP und VEGF ein positiver Einfluss auf die Knochenregeneration an (Cakir-Ozkan et al. 2017; Chen et al. 2020; Geuze et al. 2012; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Liu et al. 2020; Lohse et al. 2015; Patel et al. 2008; Rather et al. 2019; Schorn et al. 2017; Wang et al. 2017; Wang et al. 2018; Young et al. 2009; Zhang et al. 2011).

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde erstmals im Großtier das osteogene Potenzial eines mit WF verbundenen PDLA/CaCO₃-Kompositmaterial untersucht. Diesem wurden zur kontrollierten Freisetzung die WF rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ hinzugefügt. Neben der Frage, ob das verwendete Studienmodell für weiterführende Untersuchungen geeignet ist, wurden folgende Hypothesen überprüft.

Durch die Implantation eines PDLA/CaCO₃-Trägermaterials mit einer verzögerten Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ kann die Regeneration eines klinisch relevanten CSD im Unterkiefer des Mischweins verbessert werden. Die gewählten Dosierungen der WF üben im Mischwein einen positiven Effekt auf die knöchernen Regeneration aus. Dabei ermöglicht die Addition einer geringen Dosis rhVEGF₁₆₅ eine Dosisreduktion des rhBMP-2 bei der WF-unterstützten Knochenregeneration. Für die Freisetzung von WF im Mischwein stellt das PDLA/CaCO₃ ein geeignetes Trägermaterial dar.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden 18 weibliche Göttinger Minischweine genutzt. Diese stammten aus der Aufzuchtanstalt Eußenheim/Oberfeld. Die Versuchstiere waren zum Operationszeitpunkt zwei bis drei Jahre alt und wogen zwischen 30 bis 50 kg.

Die Haltung und Pflege der Tiere sowie alle chirurgischen Eingriffe wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Rechtsvorschriften für den Tierschutz und den Vorschriften für Tierversuche des Landes Niedersachsen entsprechend durchgeführt. Die Versuche wurden bei der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Braunschweig gemeldet und unter der Lizenznummer 33.9-42502-04-13 / 1088 zugelassen.

Die Tiere wurden ab vier Wochen vor Versuchsbeginn in den Tierställen der Georg-August-Universität in Holtensen betreut. Für die chirurgischen Eingriffe wurden die Versuchstiere in das zentrale Tierlabor der UMG Göttingen überführt, dort operiert und medizinisch entsprechend der ARRIVE Richtlinien versorgt (Kilkenny et al. 2010). Die postoperative Haltung fand ebenfalls im zentralen Tierlabor statt, die Haltung und tierärztliche Überwachung nach sicherer postoperativer Genesung erfolgte wiederum in den Tierställen der Georg-August-Universität in Holtensen. Prä- und postoperativ wurden die Tiere einzeln in Paddocks gehalten. Die Haltungsbedingungen sahen alle zwölf Stunden einen Hell-/Dunkel-Wechsel vor. Die Raumtemperatur lag zwischen 20 und 24 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 50 bis 60 %. Zur Ernährung erhielten die Tiere 450 bis 500 g Schweinefutter (Ssniff Minipig, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ohne Limitation. Als Ausschlusskriterien für den Tierversuch wurden der Kieferbruch und starke Infektionen bei den Versuchstieren festgelegt.

3.2 Versuchsaufbau

Für die Untersuchung wurden im Unterkiefer der Versuchstiere aufgrund der notwendigen Ausdehnung nur ein CSD pro Kieferseite präpariert. Zwölf Tiere wurden den Vergleichsgruppen und sechs Tiere den Kontrollgruppen zugeordnet. Die Schweine wurden hierfür durchlaufend nummeriert, beginnend mit den Kontrollgruppen. Dabei wurden die Testseiten der Kontrollgruppen („leer“ und „Blank“) und der Vergleichsgruppen („BMP“ und „BMP/VEGF“) ohne weitere Randomisierung festgelegt.

Für diese Untersuchung wurden bei 18 Minischweinen in beiden Unterkieferquadranten großflächige krestale Knochendefekte geschaffen. Den Schweinen wurden in einer ersten Operation die Prämolaren und der erste Molar des UK entfernt, woraufhin die entstandenen Alveolarkammdefekte der freien Heilung überlassen worden sind.

Nach 13 Wochen erfolgte eine zweite Operation im ausgeheilten Alveolarkamm. Dabei wurden die vorher definierten CSD präpariert. Diese sind unmittelbar nach OP der Gruppenzugehörigkeit entsprechend mit dem vorbereiteten Kompositmaterial implantiert worden. Die Schweine wurden per Zufall in vier Gruppen mit unterschiedlicher augmentativer Versorgung zu zwei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten eingeteilt. Diese Zeitpunkte wurden auf vier und 13 Wochen nach der Implantation des Kompositmaterials determiniert.

Drei Tieren der frühen Gruppe wurden nach vorangehender zufälliger Zuordnung auf der einen Seite mit 0,5 g PDLA/CaCO₃-Trägermaterial implantiert, die kontralaterale Seite wurde für die Negativkontrolle unbehandelt der freien Heilung überlassen. Auch zum späten Zeitpunkt nach 13 Wochen wurden drei derart versorgte Tiere in die Untersuchung einbezogen. In den Gruppen mit einer Implantation von WF wurden pro Untersuchungszeitpunkt jeweils sechs Tiere auf der einen Seite mit 0,5 g Kompositmaterial mit 800 µg rhBMP-2 und auf der kontralateralen Seite mit 0,5 g Kompositmaterial mit 400 µg rhBMP-2 und 50 µg rhVEGF₁₆₅ augmentiert. Die Untersuchung erfolgte auch hier nach vier und nach 13 Wochen Heilungszeit.

Die Versuchstiere wurden nach Ablauf des definierten Zeitintervalls euthanasiert und ihre Kiefersegmente für die weitere Analyse vorbereitet. Hierzu wurden Trenndünnschliffpräparate hergestellt und per Durchlichtmikroskopie automatisiert eingelesen und digital archiviert. Mithilfe einer Toluidin-Färbung konnten die Schliffe in der Folge histologisch und histomorphometrisch untersucht werden. Die statistische Berechnung der erhobenen Daten erfolgte mit linearen gemischten Effekt-Modellen.

3.2.1 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt, wobei die zwei Gruppen ohne die Freisetzung von WF jeweils drei Tiere umfassten (A. und B.). Die Versuchsgruppen mit der Freisetzung von WF umfassten nach vier Wochen aufgrund des frühzeitigen Todes eines Tieres fünf Tiere (C.) und nach 13 Wochen sechs Tiere (D.). Die Tabelle 1 gibt eine genaue Übersicht über die Gruppeneinteilung der Versuchstiere.

In den Kontrollgruppen A. und B. wurde das PDLA/CaCO₃-Material ohne Wachstumsfaktoren (Blank) auf der einen Seite des Unterkiefers eingebracht, wohingegen die kontralaterale Seite nach der Osteotomie unbehandelt der freien Heilung (leer) überlassen blieb. In den Vergleichsgruppen C. und D. wurde auf einer Seite das Kompositmaterial mit 800 µg rhBMP-2 (BMP) implantiert und die kontralaterale Seite mit dem Kompositmaterial mit der Kombination von 400 µg rhBMP-2 und 50 µg rhVEGF₁₆₅ (BMP+VEGF) versorgt. Für die Dosierungen der WF wurden die Erkenntnisse vorangegangener Untersuchungen im Kleintiermodell genutzt und für die hier vorliegende Untersuchung defektorientiert angepasst (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018).

Tabelle 1: Versuchsgruppen.

Gruppe	Schwein	UK rechts	UK links
A.	82	Blank	leer
Vier Wochen	77	leer	Blank
	81	Blank	leer
B.	55	Blank	leer
13 Wochen	64	leer	Blank
	97	leer	Blank
C.	83	BMP	BMP+VEGF
Vier Wochen	98	BMP+VEGF	BMP
	94	BMP+VEGF	BMP
	93	BMP	BMP+VEGF
	92	BMP	BMP+VEGF
D.	96	BMP	BMP+VEGF
13 Wochen	89	BMP+VEGF	BMP
	95	BMP+VEGF	BMP
	68	BMP	BMP+VEGF
	80	BMP	BMP+VEGF
	99	BMP+VEGF	BMP

3.3 Knochenersatzmaterial und Operationsablauf

3.3.1 Trägermaterial

Als Trägermaterial wurde ein Kompositmaterial aus einer Kombination von PDLA und CaCO_3 verwendet. Dieses besteht aus einem granulierten Puder aus amorphem PDLA (Resomer R 208, Boehringer Ingelheim, Deutschland) mit einer Korngröße von $3000 \mu\text{m}$ und einem kristallinen CaCO_3 (Schaefer Kalk GmbH, Dietz, Deutschland) mit einer Partikelgröße von etwa $12 \mu\text{m}$. Diese Materialien wurden trocken in einem Verhältnis von 4 : 1 (PDLA : CaCO_3) gemischt und mit einem Rotorschüttler bei 5000 bis 160000 *revolutions per minute* (rpm) geschleudert. In der vorliegenden Untersuchung kam der rekombinante humane WF rhBMP-2 (RELIATech GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland) zur Anwendung. Gewonnen wurden die Zytokine einem etablierten Verfahren entsprechend aus einer Escherichia coli-Bakterienkultur (Vallejo et al. 2002). Auch das rhVEGF₁₆₅ wurde in seiner rekombinanten Form verwendet und von der Firma RELIATech bezogen. Die für die Versuche

genutzten WF wurden im hauseigenen Labor mit Essigsäure gelöst und mit PBS (*phosphate buffered saline*) weiter verdünnt. Für die Herstellung des Kompositmaterials wurden die gelösten WF mit dem Gemisch aus PDLLA und CaCO_3 auf einem Rotorschüttler durchmischt und bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Daraufhin erfolgte die Schockgefrierung mit Stickstoff und die Lyophilisierung unter Vakuum in einem Gefriertrocknungsgerät (Fa. Christ Alpha 2-4, Osterode am Harz, Deutschland). Das getrocknete Lyophilisat wurde zur Hochdruckbegasung und Formgebung in runde Polytetrafluorethylen-Hohlformen (Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, KLS Martin Group, Tuttlingen, Deutschland) mit einer Höhe von 3 mm und einem Durchmesser von 8 mm eingebracht und für zwei Stunden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 100 bar mit Kohlendioxid (CO_2) begast. Durch die Hochdruckbegasung verflüssigte sich das Kompositmaterial, welches durch das rasche Ablassen des Überdrucks aufschäumte. Dieser Prozess erfolgte durch die Firma KLS Martin. Die Kompositträger wiesen daraufhin den Hohlformen entsprechend einen Durchmesser von 8 mm und eine Dicke von 3 mm auf und wurden zur Implantation präoperativ zu einem Granulat zermahlen (Abb. 2). Das Material wurde zu diesem Zwecke mit einer Knochenmühle (Karl Leibinger Medizintechnik GmbH&Co.KG, Mühlheim an der Donau, Deutschland) zerkleinert.



Abbildung 2: PDLLA/ CaCO_3 -Trägermaterial mit Eigenblut gemischt direkt vor Augmentation.

3.3.2 Operationen

Alle operativen Eingriffe wurden im tierexperimentellen Operationssaal der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Bei der ersten Operation erfolgte gewichtsadaptiert eine Prämedikation mit 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Diazepam, welches oral verabreicht wurde. Etwa 20 Minuten später schloss sich eine tiefergehende Sedierung mit 10 mg/kg Ketamin (WDT, Garbsen, Deutschland) und 2 mg/kg Azaperon (Stresnil®, Janssen, Neuss, Deutschland) mit intramuskulärer (i.m.) Injektion an, um einen Venenkatheter sicher einbringen zu können. Die Narkoseeinleitung erfolgte daraufhin mit Thiopental (Trapanal®, Byk-Gulden, Konstanz, Deutschland), bis eine ausreichende Intubationsfähigkeit gegeben war. Die Erhaltung der Narkose erfolgt anschließend mit 2 bis 4 % Isofluran (Forene®, Fa. Abbott GmbH & Co. KG, Hannover, Deutschland), die unterstützende Analgesie mit Piritramid (Dipidolor® Janssen, Neuss, Deutschland) und Ketamin per Perfusor. Unterstützend wurden 5 bis 10 ml/kg Sterofundin zugeführt und die Augen mit Bephanthen-Augensalbe (Bepanthen®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) versorgt.

Nach Eintreten der Narkose erfolgte die Reinigung und Desinfektion des OP-Feldes mit einer Iodlösung (Braunol®, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Octenisept (Octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) und Darstellung des OP-Feldes mit dementsprechenden Fixierhilfen und operativen Haken. In diesem ersten Eingriff wurden nach zusätzlicher Infiltrationsanästhesie mit Xylocain 2 % (Xylocain®, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) im Unterkiefer die Prämolaren der zweiten Dentition und seitengleich ein Molar entfernt. Dieses erfolgte über eine Hebel- und Zangenextraktion, in schwierigen Fällen auch mithilfe einer unterstützenden Osteotomie. Die entstandenen Extraktionswunden wurden durch eine plastische Deckung nach Rehrmann mit einer resorbierbaren Naht (Vicryl, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und für 13 Wochen der Heilung überlassen.

Die Operationsdauer betrug zwischen 60 bis 120 Minuten. Perioperativ erhielten die Mischweine eine antibiotische Abschirmung mit 40 mg/kg Penicillin und 60 mg/kg Streptomycin (Animedic®, Senden-Boesensell, Deutschland). Die Tiere erhielten post-operativ zur Analgesie 2 × täglich 0,6 mg Buprenorphin (Temgesic Essex®, München, Deutschland) i.m. und oral bei Bedarf 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl®, Fa. Zoetis, New Jersey, USA). Ab dem zweiten postoperativen Tag erhielten die Schweine oral 7,5 mg/kg Carprofen und nach Bedarf Buprenorphin i.m..

3.3.3 Osteotomie und Augmentation durch KEM

Nach 13 Wochen erfolgte die zweite Operation, bei der die akuten Defekte in einem definierten Ausmaß präpariert und versorgt worden sind. Hierbei wurden die Prämedikation und analog der ersten Operation durchgeführt. Die Einleitung der Narkose wurde in der zweiten Operation mit Propofol 1 % durchgeführt und für die perioperative Analgesie wurde Fentanyl statt Piritramid verwendet.

Nach Eintreten der Narkose wurde das OP-Feld ebenfalls gereinigt und desinfiziert, woran anschließend die Darstellung des Situs mit voran beschriebenen Hilfsmitteln erfolgte. Für eine bessere blutungsarme Übersicht wurde wieder eine Infiltrationsanästhesie mit Xylocain 2 % durchgeführt und daran anschließend mit der Operation begonnen. Dabei erfolgte zunächst eine seitengleiche krestale Schnittführung auf dem ausgeheilten Kieferkamm bis zum zweiten Molaren. Eine nach labial gerichtete vertikale Entlastungsinzision wurde im Bereich der ersten Prämolaren durchgeführt. Nach subperiostaler Präparation mit einem Raspatorium und Darstellung des Operationsfeldes wurde mit chirurgischen Fräsen unter steriler Wasserkühlung ein krestaler Satteldefekt mit einer Ausdehnung von $2 \times 2 \times 1$ cm geschaffen. Die Ausdehnung des Defekts wurde intraoperativ mithilfe eines sterilen Metallblocks überprüft und entsprechend korrigiert. In den meisten Segmenten imponierte nach der Präparation das eröffnete Knochenmark des UK.

Unmittelbar nach der Osteotomie wurden die Defekte in der Kontrollgruppe unbehandelt verschlossen oder der Versuchsgruppen entsprechend mit 0,5 g des mit Eigenblut gemischten granulierten PDDL A/CaCO₃-Kompositmaterial versorgt. Danach erfolgte ein speicheldichter Wundverschluss mit einem resorbierbarem Nahtmaterial (Abb. 3). Die Operationsdauer betrug auch bei der zweiten Operation zwischen 60 und 120 Minuten. Die postoperative Versorgung der Versuchstiere erfolgte analog der ersten Operation.

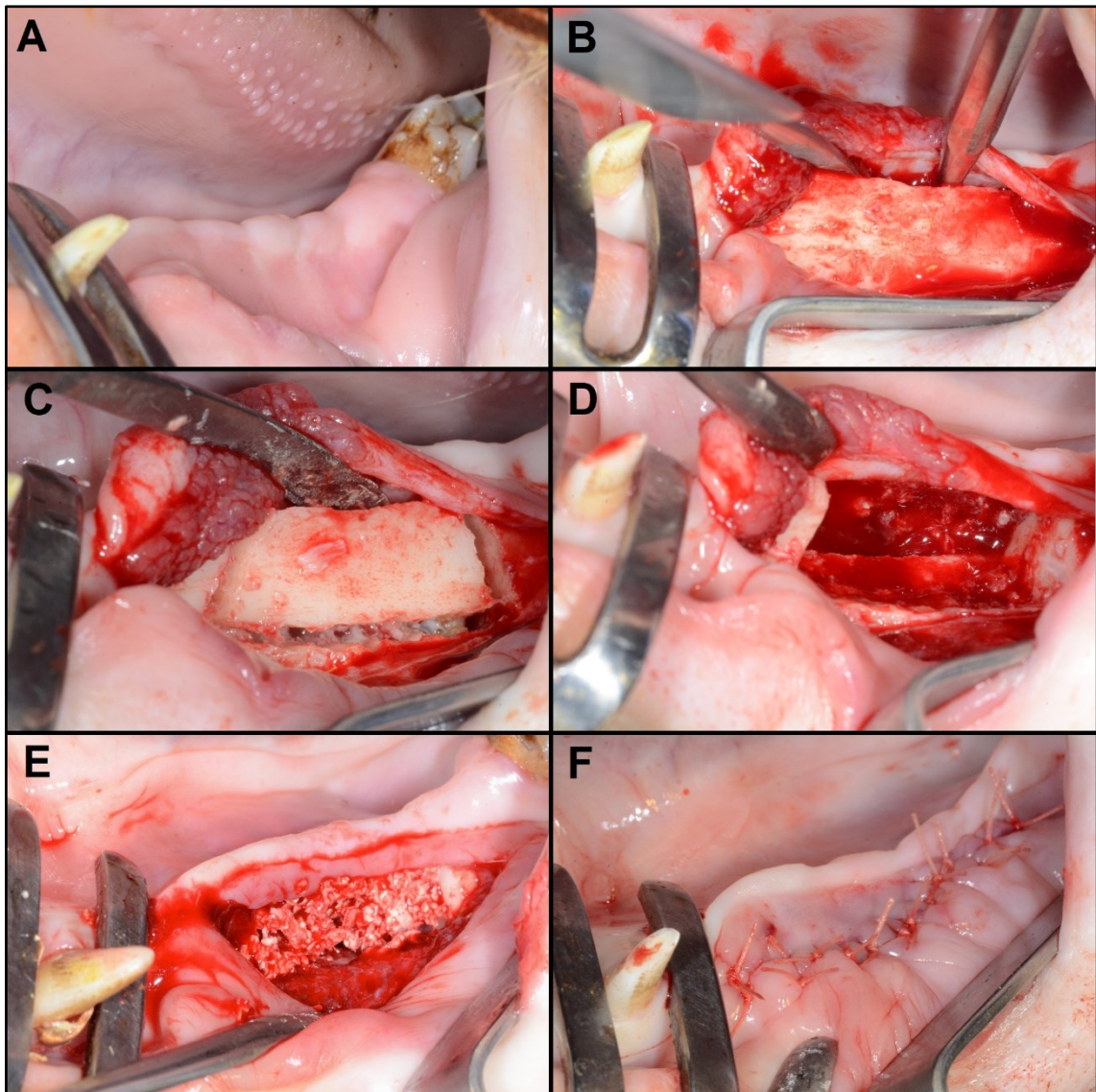


Abbildung 3: Operation der Schweine. A: Ausgeheilte Unterkiefer 13 Wochen nach Zahnentfernung; B: Inzision und Darstellung des OP-Situs; C: Defektosteotomie; D: Darstellung des CSD vor Augmentation; E: Implantation der PDLLA/CaCO₃-Späne; F: Speicheldichter Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial.

3.3.4 Euthanasie der Versuchstiere

Den Versuchsgruppen entsprechend erfolgte nach vier und 13 Wochen die Euthanasie der entsprechenden Tiere durch eine überdosierte intravenöse Narkosemedikation mit Azaperon und Embutramid (T61®, Fa. Hoechst Roussel Vet GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Vor Entnahme der Präparate wurde der Tod durch einen Veterinärmediziner festgestellt.

3.4 Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate

3.4.1 Trenndünnschlifftechnik

Die histologische Aufarbeitung der Tierpräparate erfolgte in den Laboreinrichtungen der Klinik für Mund-, Kiefer - und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Unterkiefer wurden den Versuchstieren unmittelbar nach dem Tod entnommen, gekennzeichnet und grob segmentiert. Diese Unterkiefersegmente wurden daran anschließend direkt in einer 4 % neutral phosphatgepufferten Formalinlösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und in die Laboreinrichtungen überführt.

Hier erfolgte die weitere seitengleiche Segmentierung der Kiefersegmente mit einer Diamantbandsäge (Fa. Pathoservice, Oststeinbeck, Deutschland), um den Bereich von Interesse darzustellen. Die Unterkiefer wurden hierzu direkt mesial des zweiten Molaren und distal des Eckzahnes im rechten Winkel zum basalen Unterkieferrand segmentiert. Hierbei erfolgte die Eröffnung der Markräume, um eine bessere Penetration der Fixierlösungen zuzulassen. Die in Formalinlösung fixierten Knochensegmente wurden vor der Einbettung in den Kunststoff zunächst in Leitungswasser gewässert, womit das überschüssige Formalin entfernt wurde. Daran anschließend folgte die Dehydratation der Knochensegmente durch die Lagerung in Ethanol (Hausapotheke, UMG Göttingen) in aufsteigender Konzentration für jeweils 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach erfolgter Dehydratation wurde die Einbettung der Präparate in Gussformen durchgeführt. Hierbei wurden die Gussformen mit dem autopolymerisierenden Kunststoff Technovit 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) aufgefüllt. Die Aushärtung der eingebetteten Segmente erfolgte im Kühlschrank bei -3 °C für 48 Stunden. Die Verarbeitung des Kunststoffs erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Zur Herstellung der Trenndünnschliff-Präparate wurden die segmentierten, in Technovit 9100 NEU eingebetteten Präparate mit der Diamantsäge auf Objektträgerdimension getrimmt und dann mit dem Sekundenkleber Loctite 420 (Henkel, Düsseldorf, Deutschland) auf Objektträgern (Pathoservice GmbH, Oststeinbek, Deutschland) fixiert. Nach Trocknung des Klebers und der Markierung des Präparats konnte der Objektträger in der Diamantbandsäge fixiert werden und ein eingebettetes Knochenfragment abgetrennt werden. Dieses geschah parallel zur Achse des Objektträgers. Der resultierende Knochenblock wurde nach glätten der Sägefläche erneut auf einen Träger verklebt. Von diesem verklebten Objektträger wurde wieder ein Knochenfragment parallel zur Achse des Objektträgers abgesägt und die plane Sägefläche des Knochenblocks wiederum auf einem Objektträger fixiert. Auf diese Weise konnten die Knochensegmente in ihrer gesamten Länge zu Sägeschnitten verarbeitet werden. Für die histomorphometrische Analyse wurden die Sägeschnitte mit einem Teller-schleifgerät (Exakt, Norderstedt, Deutschland) unter Verwendung von Schleifscheiben (Hermes Schleifmittel, Hamburg, Deutschland) verschiedener Körnungsgrößen auf eine Dicke von 50 bis 60 µm dünn geschliffen. Anschließend erfolgte eine Politur der Dünnschliffe mit

einer Polierscheibe (Dia-plus W. Messner, Oststeinbeck, Deutschland) der Körnung 4000 auf eine Präparatdicke von 20 bis 30 μm .

3.4.2 Histologische Färbung und Digitalisierung

Die Färbung der Dünnschliffpräparate mit Toluidinblau erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Hierbei wurden zur Herstellung der Färbelösung zwei Lösungen angesetzt. Für Lösung eins wurde 1 g Toluidinblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 100 ml Borax 1 % (Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Lösung zwei bestand aus 1 g Pyronin G (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100 ml destilliertem Wasser (Interne Wasseraufbereitung, UMG Göttingen). Es wurde eine Mischung im Verhältnis 4 : 1 (Lösung 1: Lösung 2) vorgenommen, um die fertige Färbelösung zu erhalten. Daraufhin wurden alle Präparate gefärbt und zur histologischen Untersuchung mit dem Eindeckmittel Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Glasplättchen (Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland) abgedeckt. Bei der histologischen Begutachtung der Präparate stellte sich, wie in Abb. 4 dargestellt, neu gebildeter Knochen blau bis dunkelblau gefärbt, maturierter Knochen schwach bläulich und kollagenes Gewebe und Weichgewebe nahezu ungefärbt dar.

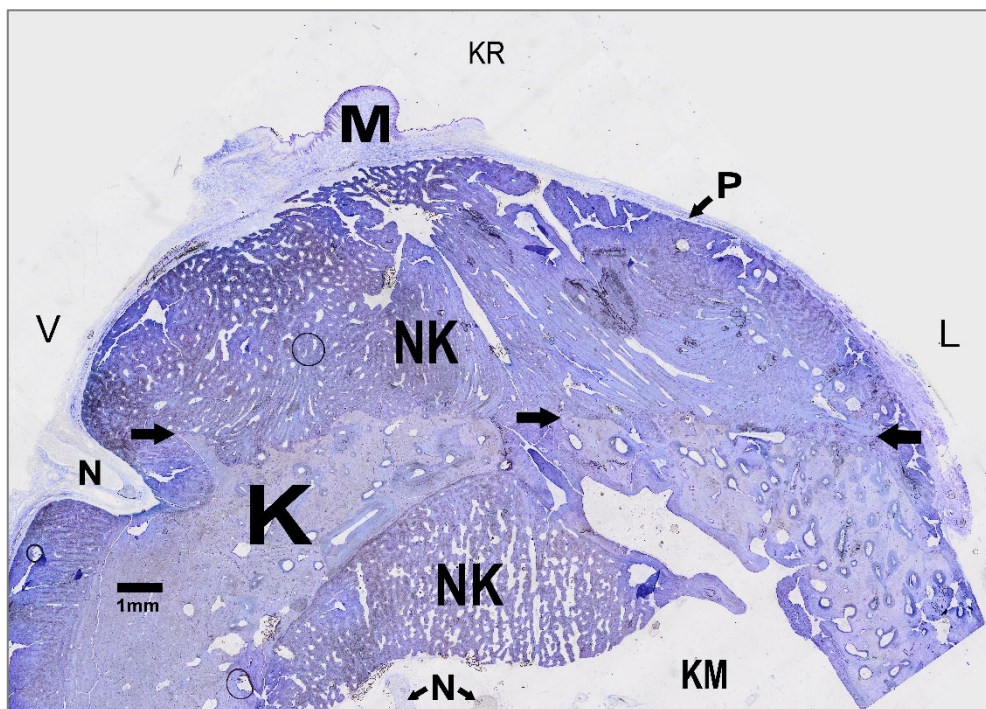


Abbildung 4: Toluidinfärbung eines Trenndünnschliffpräparats der PDLLA/CaCO₃ + rhBMP-2 /rhVEGF₁₆₅-Gruppe: Pfeile: Defektbegrenzung; K: maturiertes Knochengewebe; KM: Knochenmark; M: Mukosa; N: Nerv; NK: neu gebildetes Knochengewebe; P: Periost; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5 \times .

Die Digitalisierung der Präparate für die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit dem Durchlichtmikroskop Olympus BX51 (Fa. Olympus, Hamburg, Deutschland) bei einer zwei- bis zehnfachen Vergrößerung. Dabei wurde für die Archivierung der Schliﬀpräparate das Olympus „DotSlide-System“ (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland) genutzt. Diese Arbeit erfolgte am MOLCI (*Molecular Optical and Live Cell Imaging*) der Universitätsmedizin Göttingen (Abb. 5). Das „DotSlide-System“ ermöglichte mithilfe einer Beladungsvorrichtung die automatisierte digitale Erfassung von bis zu 50 Schliﬀen.

Jedes Einzelne der gescannten Präparate wurde in einer „Virtual Studio Content Imaging Installer Format“-Datei (.vsi) gespeichert und in der Folge mithilfe der Software „CellSens Dimension“ (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in eine „Tagged Image File Format“-Datei (.tiff) konvertiert. Dieser Schritt erfolgte zur Reduktion der Datenmenge und um die Auswertung der Daten mit anderen Programmen zu ermöglichen. Für die Darstellung und Auswertung der Trenndünnschliffe wurde die Software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) genutzt.

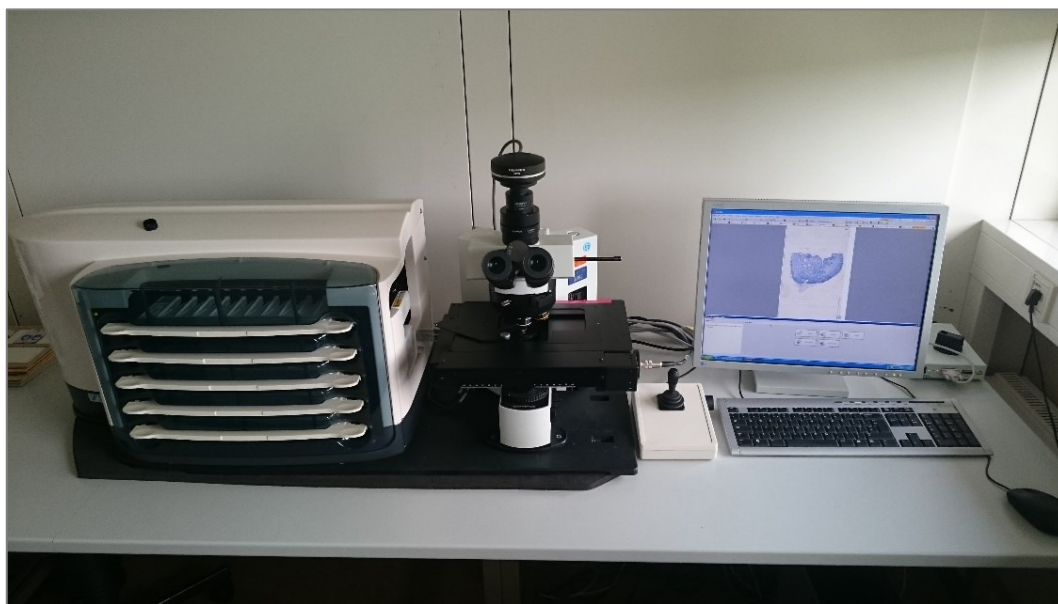


Abbildung 5: Olympus DotSlide-System 2.0 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

3.4.3 Histomorphometrische Auswertung

Für die Beurteilung der Knochenregeneration wurde eine histomorphometrische Analyse durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die aus den Defekten gewonnenen Schliﬀpräparate hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht. Die histomorphometrisch untersuchten Parameter waren das gesamte regenerierte Gewebe (T.Ar. [mm²]), der mineralisierte Knochen (B.Ar. [mm²]) und die relative Knochenfläche des Gewebes (TMD [%]).

Der Mineralisationsgrad wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{TMD} = \frac{\text{B.Ar.} \times 100}{\text{T.Ar.}}$$

Die gesamte regenerierte Gewebefläche (T.Ar.) inkludierte neben der mineralisierten Knochenmatrix auch das Mesenchym, während die neu gebildete mineralisierte Knochenfläche (B.Ar.) nur die ossifizierte Strukturen repräsentierte. Das relative Verhältnis dieser beiden Parameter zueinander ließ Aufschlüsse über den Mineralisationsgrad des neu gebildeten Geflechtknochens zu. Die histomorphometrische Auswertung wurde randomisiert und verblindet von einem geschulten Untersucher vorgenommen. Für die repräsentative Darstellung der Regenerationsprozesse wurden die Defektsegmente in gesamter Länge aufgearbeitet und alle verfügbaren Dünnschliffe ausgewertet. In der Vier-Wochen-Gruppe wurden die Daten von 13 Schliffen, in der 13-Wochen-Gruppe von 14 Schliffen pro Versuchstier einbezogen.

Es wurden zwei Zeitpunkte für die Untersuchungen determiniert. Die frühe Gruppe T 1, welche vier Wochen nach der Implantation untersucht wurde, umfasste nach dem frühzeitigen Tod eines Tieres insgesamt acht Tiere. Für die späte Untersuchung nach 13 Wochen (T 2) wurden neun Minischweine ausgewertet. Das Gewebe, welches sich zu den Untersuchungszeitpunkten krestal des präparierten Defekts darstellte, bildete den Bereich von Interesse (ROI). Dieser konnte anhand der deutlichen Blaufärbung vom umgebenden maturierten Gewebe abgegrenzt werden und der weiteren quantitativen Untersuchung zugeführt werden (Abb. 6). Der vestibulär und lingual des Kieferkammes sowie im Markraum gebildete neue Knochen wurde nicht in die Analyse einbezogen.

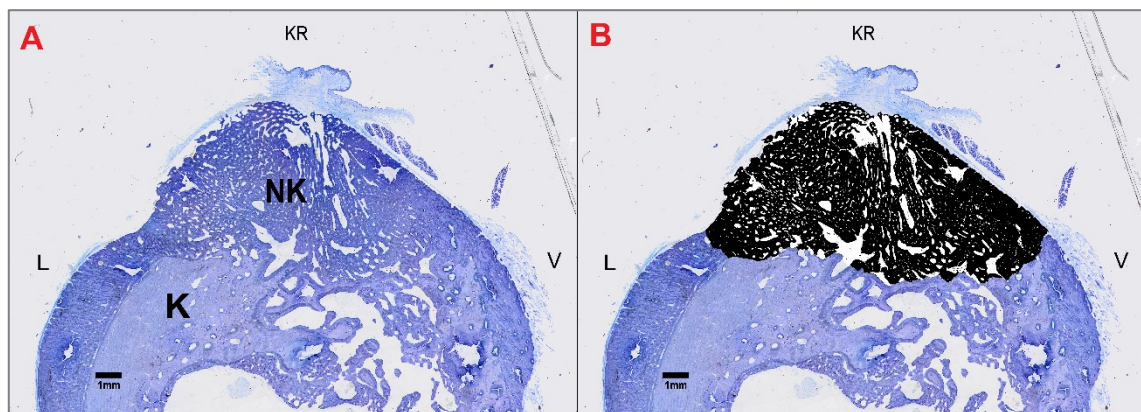


Abbildung 6: Definition der ROI (*region of interest*) im Trenndünnschliffpräparat. Darstellung des Originalpräparats (A) und des neu gebildeten, für die Analyse schwarz markierten Knochengewebe = ROI (B); Pfeile: Defektbegrenzung; K: maturierter Knochen; NK: neu gebildetes Knochengewebe; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5×.

Die im Schliffpräparat abgebildete neu gebildete Gewebefläche wurde vom Untersucher mithilfe des „Lasso-Werkzeugs“ unter sorgfältiger Kontrolle eingegrenzt. Die beschriebene Fläche wurde nochmals visuell überprüft und anhand der Pixelmenge quantifiziert. Dabei wurde streng auf die Defektbegrenzung geachtet und die subperiostale wie auch die markraumnahe Knochenneubildung außerhalb des Defekts nicht in die Markierung mit einbezogen. In der Folge wurde ein Binärbild des ROI erzeugt, um das ossifizierte Gewebe innerhalb der Gesamtfläche darzustellen. Auch diese wurde anhand der Pixelmenge quantifiziert (Abb. 7).

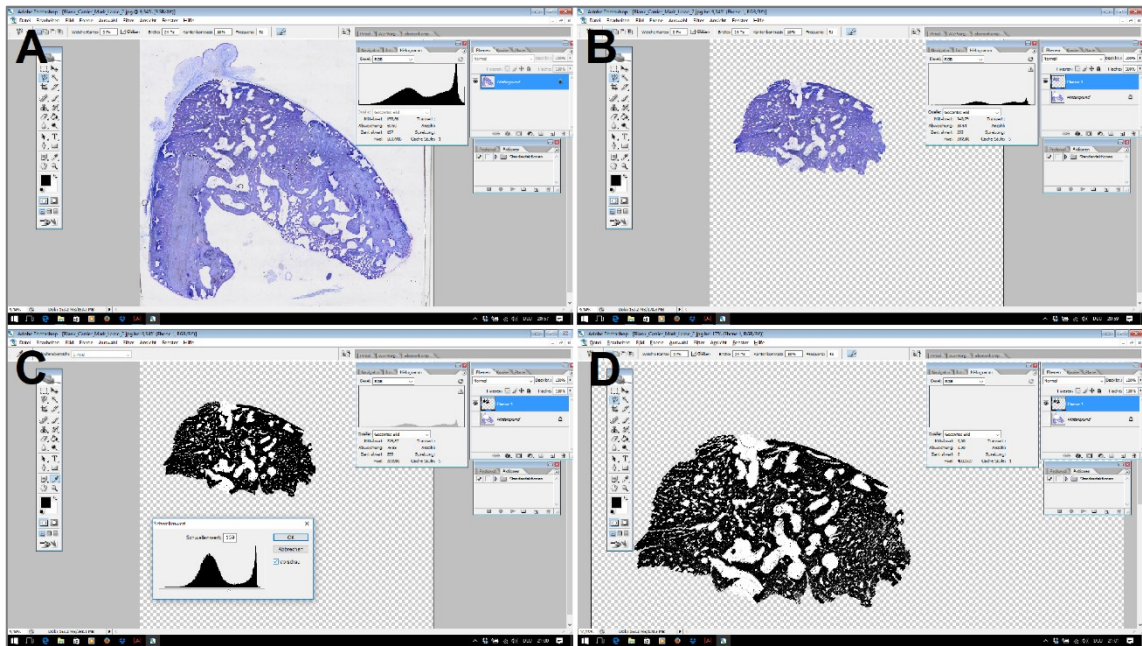


Abbildung 7: Auswertung mit Adobe Photoshop CS5. A: Präparat in Rohform; B: Freistellen der neu gebildete Knochenmatrix zur quantitativen Bewertung; C: Binärbild; D: Darstellung des markierten, neu gebildeten Knochengewebes zur quantitativen Bewertung.

Ein Pixel (px) stellt eine quadratische Fläche dar und entsprach in der X- und der Y-Achse einer Kantenlänge von $\approx 0,31 \mu\text{m}$. Daraus ergab sich für die metrische Darstellung der Flächen ein Wert von $\approx 0,096 \mu\text{m}^2/\text{Pixel}$. Indem die neu gebildete mineralisierte Knochenmatrix in Relation zur gesamten Fläche der Gewebeneubildung gesetzt wurde, konnte auch die relative Knochenfläche und damit die Mineralisationsdichte der Flächen in Prozent erfasst werden.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden durch die Wissenschaftliche Serviceeinheit „Medizinischen Biometrie und Statistische Bioinformatik“ (MBSB) durchgeführt. Alle Analysen wurden mit der Statistiksoftware R (Version 3.6.1; R Core Team 2018) unter Verwendung der R-Pakete lme4 [Version 1.1.21 (Bates et al. 2015)] für die gemischte lineare Regression, lmer-Test [Version 3.1.0 (Kuznetsova et al. 2017)] für die Schätzung der Freiheitsgrade und emmeans (Version 1.4.7) für die Schätzung der Randmittel und die Kontrasttests durchgeführt. Die Daten wurden für jede Gruppe unter Verwendung von relativen und absoluten Häufigkeiten bzw. Mittelwert mit Standardabweichung (SD) und Median mit Minimum (min) und Maximum (max) zusammengefasst. Für jedes Ergebnis wurde die Verteilung der Messwerte in Form von Violinplots gruppiert nach Zeit und Versuchsgruppe visualisiert. Der Einfluss der Zeit, der Versuchsgruppen und deren Interaktion auf die Knochenregeneration wurde mit Hilfe von gemischten linearen Modellen analysiert. Messungen desselben Kiefersegments und desselben Tieres wurden als korreliert betrachtet und das Tier sowie die unter den Tieren verschachtelten Segmente wurden den Modellen als Zufallsfaktoren hinzugefügt. Aus den Modellen wurden die Randmittel geschätzt und es wurden paarweise Kontrasttests zwischen den Zeitpunkten sowie zwischen den Gruppen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf $\alpha = 5\%$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinischer Verlauf

Bei der ersten Operation wurde die Entfernung der Zähne in beiden Unterkieferquadranten durchgeführt. Die Minischweine zeigten infolge dieser Belastung am ersten postoperativen Tag ein eingeschränktes Allgemeinbefinden, wobei sie weniger aktiv waren und kaum Nahrung zu sich nahmen. Nach einer Analgesie mit Buprenorphin setzte rasch eine Verbesserung des Allgemeinzustandes ein. Die Tiere erholten sich in der Folge innerhalb von drei bis fünf Tagen gut von der Operation. Eine eingehende Nachkontrolle der Wunden war im postoperativen Verlauf am nicht sedierten Tier nicht möglich, die Tiere zeigten bis zur zweiten Operation kein auffälliges Verhalten. Aufgrund der Belastungen des ersten Eingriffs wurde während der zweiten Operation zur Analgesie auf Fentanyl zurückgegriffen. Die Schweine erholten sich nach der Narkose schneller als bei der ersten Operation. Der Allgemeinzustand war am postoperativen Tag eingeschränkt, die Tiere aßen verhalten, jedoch stellte sich deren Zustand als insgesamt besser heraus als nach dem ersten Eingriff. Aufgrund von Narkosekomplikationen musste ein Minischwein einen Tag postoperativ euthanasiert werden. Bei postoperativen Wundkontrollen wurden in sechs von 36 Defektarealen Wunddehiszenzen diagnostiziert.

4.2 Lichtmikroskopische Untersuchung

4.2.1 Negativkontrolle

Die Knochenneubildung in der unbehandelten Kontrollgruppe stellte sich nach vier Wochen als heterogen dar und zeigte wie in Abb. 8A nur eine geringe, dem maturierten Knochen angrenzende Neubildung von feinen spongiösen Trabekeln. Der krestal gelegene Knochendefekt ist gut ersichtlich. Im Defektareal zeigt sich eine deutliche Abgrenzung des dunkelblau gefärbten, neu gebildeten Knochengewebes zum deutlich kompakteren ortständigen Knochen. Dabei erscheinen die defektbedeckenden Weichgewebe in ihrer transversalen und vertikalen Ausdehnung insgesamt reduziert. Infektionen waren zu diesem Zeitpunkt nicht ersichtlich.

Dreizehn Wochen nach der Osteotomie war bei den Versuchstieren eine deutliche Zunahme von neu gebildetem Knochengewebe zu erkennen. Die ursprüngliche Dimension des Kiefers konnte nicht wiederhergestellt werden. Es stellte sich eine homogene Neubildung von Geflechtknochen dar, wobei sich kein Anhalt für Entzündungen zeigten. Abbildung 8B zeigt einen repräsentativen Trenndünnschliff der unbehandelten Negativkontrolle. Neben der homogenen Geflechtknochenbildung erscheint die Kontur der Kieferkamms insgesamt als atrophiert. Der neu gebildete, dunkelblau gefärbte Geflechtknochen lässt sich gut vom hellbläulich dargestellten maturierten Knochengewebe abgrenzen. Dieses stellt sich deutlich kompakter dar als der neu gebildete Knochen. Krestal des Kieferkamms imponiert ein im Weichgewebe befindlicher Knochensequester.

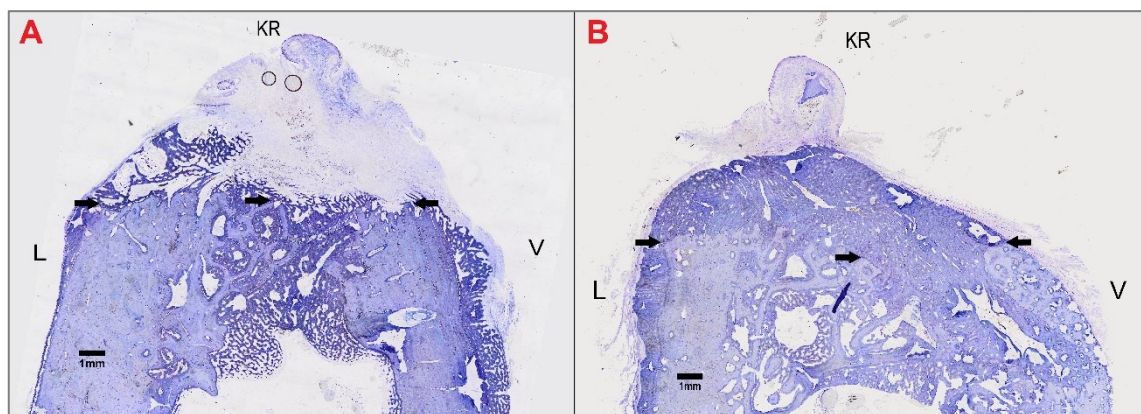


Abbildung 8: Präparate der leer-Gruppe nach vier (A) und 13 Wochen (B); Pfeile: Defektbegrenzung; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5×.

4.2.2 Blank-Gruppe

Die Trenndünnschliffe dieser Gruppe wiesen nach vier Wochen Regeneration eine heterogene Knochenneubildung auf. In den mit PDLLA/CaCO₃ versorgten Defekten ließ sich eine geringe, dem maturierten Knochen basal aufgelagerte Knochenneubildung nachweisen. Residuales Trägermaterial war in den Defekten der Versuchstiere in unterschiedlich großem Umfang vorhanden. Entzündliche Veränderungen waren zu diesem Zeitpunkt nicht ersichtlich. Abbildung 9A präsentiert ein Schliffpräparat der Blank-Gruppe. Das Defektareal lässt sich im krestalen Kieferkamm klar vom maturierten Knochen abgrenzen. In diesem Trenndünnschliff stellen sich viele scharf begrenzte Lakunen dar, welche auf residuales PDLLA/CaCO₃ (*) zurückzuführen sind. Dieses bildet eine Matrix, welche das Weichgewebe nahezu raumerhaltend abstützt. Es deutet sich eine ausgesprochen geringe spongiöse Knochenneubildung im Bereich des basalen Defektareals an. Eine knöcherne Neubildung imponiert außerhalb des präparierten Defektes subperiostal am Kieferkamm.

Dreizehn Woche nach der Implantation mit dem nativen PDLLA/CaCO₃ deutete sich in der gesamten Gruppe eine deutliche Zunahme von neu gebildetem Geflechtknochen an. Die Mineralisation wirkte dabei inhomogener als bei den anderen Gruppen. Die ursprüngliche Dimension des Kieferkamms konnte in der Blank-Gruppe wie in Abb. 9B repräsentiert nicht regeneriert werden. Der Kieferkamm imponiert in seiner vertikalen Dimension reduziert. Im neu gebildeten Knochengewebe zeigen sich flächige Areale, welche in großen Anteilen von Bindegewebe durchzogen sind. Entzündungsreaktionen sind dabei nicht zu erkennen. In diesem Präparat ist neben der inhomogenen Knochenneubildung im Defektareal zusätzlich eine Knochenneubildung in den Markräumen zu ersichtlich.

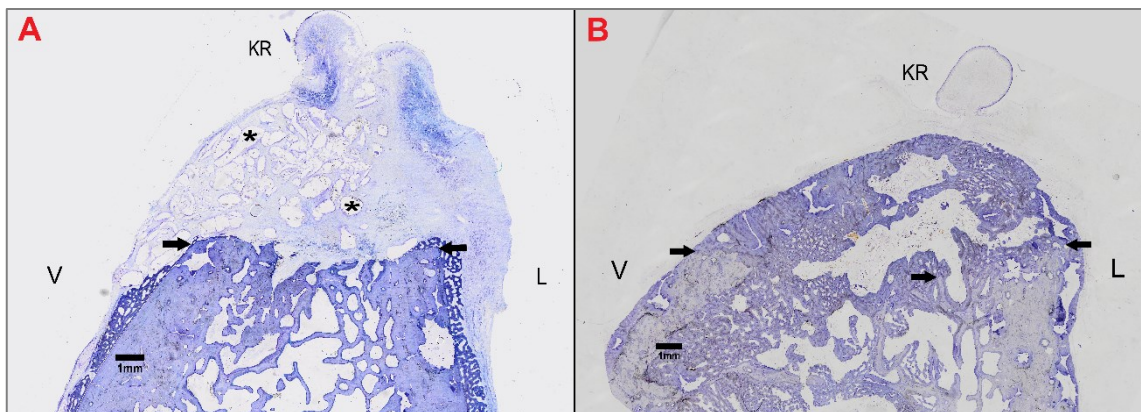


Abbildung 9: Präparate der Blank-Gruppe nach vier (A) und 13 Wochen (B); Pfeile: Defektbegrenzung; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5×.

4.2.3 BMP-Gruppe

Die Versuchstiere dieser Gruppe zeigten vier Wochen nach der Implantation des PDLA/CaCO₃ + 800 µg rhBMP-2 eine heterogene Knochenneubildung. Die defektbedeckende Mukosa wurde durch das Trägermaterial gestützt. In Abb. 10A stellen sich neben einer dem maturierten Knochen angrenzenden spongiösen Knochenneubildung auch feine knöcherne Trabekelstrukturen dar, welche in das Defektareal einwachsen. Darüber hinaus zeigt sich eine über das Defektareal hinausgehende, subperiostale Neubildung von Knochengewebe am lingualen Kieferkamm. In dem betrachteten Schliffpräparat deuten sich in der Umgebung der neu gebildeten Trabekel Lakunen an, welche auf residuales PDLA/CaCO₃-Trägermaterial hinweisen (*). Die Dimension des ursprünglichen Kieferkamms konnte durch die Implantation des PDLA/CaCO₃ annähernd gehalten werden.

Nach 13 Wochen Knochenregeneration wurde eine deutliche Zunahme der Knochenneubildung registriert. Es wurde eine deutlich homogenere Ausbildung von Geflechtknochen als nach vier Wochen ersichtlich. Es deuteten sich dabei keine entzündlichen Reaktionen an. Die Abb. 10B zeigt ein repräsentatives Schliffpräparat der BMP-Gruppe, welches ein im Vergleich zur Blank-Kontrolle homogeneres Knochengewebe mit wenigen Lakunen darstellt. Im Kontrast zu den Schliffen der frühen Gruppe imponiert in diesem Präparat wenig Anhalt für residuales PDLA/CaCO₃. Eine vermehrte Knochenbildung ist angrenzend an den ursprünglichen Defekt auch subperiostal am vestibulären und lingualen Kieferkamm und in den Markräumen ersichtlich. Der ortständige kompaktere Knochen lässt sich durch seine hellere Färbung vom neu gebildeten krestal davon gebildeten Knochengewebe abgrenzen. Die BMP-Gruppe zeigt im Vergleich mit den Kontrollgruppen ein insgesamt höheres Regenerationspotenzial in Hinblick auf die vertikale und transversale Dimension des Kieferkamms.

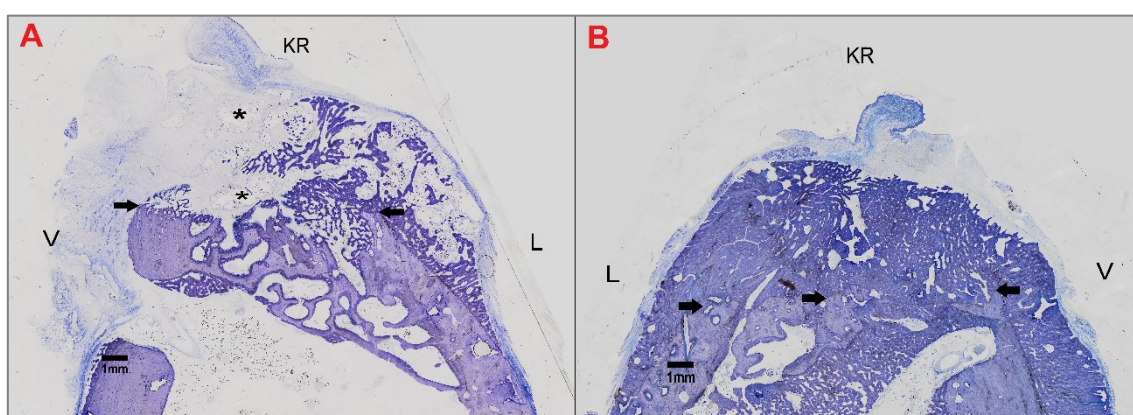


Abbildung 10: Präparate der BMP-Gruppe nach vier (A) und 13 Wochen (B); Pfeile: Defektbegrenzung; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5×.

4.2.4 BMP/VEGF-Gruppe

Die Versuchstiere dieser Gruppe präsentierten nach vier Wochen Regeneration eine quantitativ und qualitativ heterogene Knochenneubildung. Diese zeigte sich sowohl innerhalb der Defekte wie auch im subperiostalen und markraumnahen Bereich. Die Dimension des ursprünglichen Kieferkamms wurde durch die Trägermatrix auch in dieser Gruppe annähernd repräsentiert. Zum frühen Zeitpunkt deuteten sich in den Trenndünnschliffen keine infektiösen Anzeichen an. Abbildung 11A beschreibt ein Präparat dieser mit PDLA/CaCO₃ und rhBMP-2+rhVEGF₁₆₅ augmentierten Versuchsgruppe. Der neu gebildete spongiöse Knochen lässt sich krestal eindeutig vom deutlich kompakteren ortsständigen Knochen differenzieren. Im Defektareal imponieren viele scharf begrenzte Lakunen (*), welche auf eine größere Menge von nicht degradiertem Kompositmaterial hinweisen. Das Komposit bildet eine Leitschiene, welcher die Knochenneubildung mit feinen Trabekeln in das Zentrum des Defektes folgt. Dabei findet im betrachteten Trenndünnschliff in direkter Anbindung zum ortsständigen Knochen eine vermehrte Neubildung von Knochengewebe statt. Der Markraum des Unterkiefers erscheint in diesem Schliffpräparat weit eröffnet.

Im Vergleich zur korrespondierenden Vier-Wochen-Gruppe zeigten die Versuchstiere nach 13 Wochen eine deutliche Zunahme von neu gebildetem Knochengewebe. Das neu gebildete Knochengewebe erschien in dieser Gruppe, wie in Abb. 11B, relativ homogen ausgebildet. In dem Schliffpräparat zeigen sich nur wenige, in die Knochenmatrix eingebundene Lakunen, welche noch residuales Trägermaterial enthalten könnten. Entzündungsreaktionen waren in den Schliffpräparaten nicht nachweisbar. In vielen Schliffen dieser Gruppe zeigte sich auch außerhalb des Defektbereichs eine ausgeprägte Knochenneubildung, welche sich angrenzend an den Markraum und vestibulär wie lingual am Kieferkamm manifestierte. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen imponiert ein insgesamt deutlich erhöhter vertikaler und transversaler Aufbau des Kieferkamms.

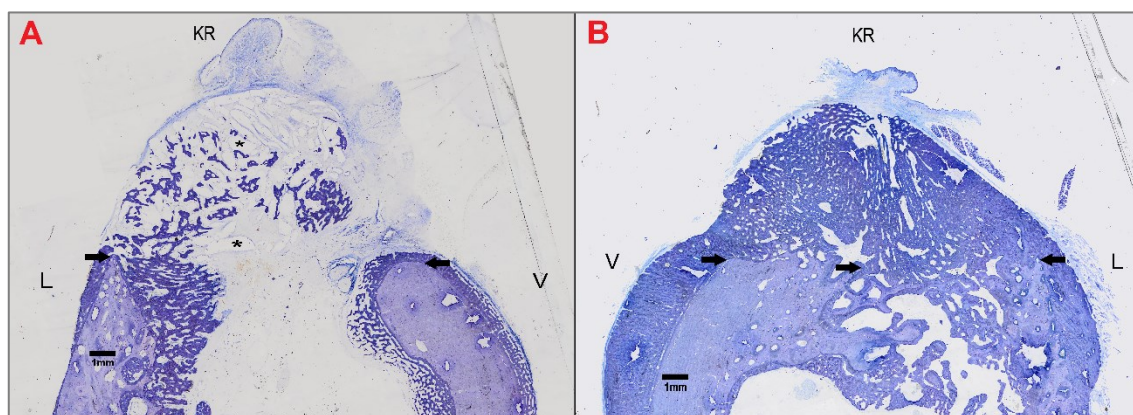


Abbildung 11: Präparate der BMP/VEGF-Gruppe nach vier (A) und 13 Wochen (B); Pfeile: Defektbegrenzung; V: Vestibulär; L: Lingual; KR: Krestal; Vergrößerung: 5×.

4.3 Histomorphometrische Untersuchung

Für die Untersuchung wurden vier Gruppen mit einer unterschiedlichen Defektversorgung gebildet:

- leer = Unbehandelte Negativkontrolle
- Blank = PDLA/CaCO₃
- BMP = PDLA/CaCO₃ + 800 µg rhBMP-2
- BMP/VEGF = PDLA/CaCO₃ + 400 µg rhBMP-2 + 50 µg rhVEGF₁₆₅

In jedem Schliffpräparat wurden drei Messungen vorgenommen:

- Mineralisierte Knochenfläche (B.Ar. [mm²])
- Gesamte Gewebefläche (T.Ar. [mm²])
- Relative Knochenfläche (TMD [%])

In jedem Minischwein wurden beide Unterkieferseiten (links und rechts) verwendet, sodass sich die Schliffe der verschiedenen Gruppen auf 34 Segmente verteilen (Tab. 2 und 3).

Tabelle 2: Verteilung der Gruppen zum Zeitpunkt T 1.

Parameter		Total	leer	Blank	BMP	BMP/VEGF
n		16	3	3	5	5
Seite	links	8 (50,0 %)	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	2 (40,0 %)	3 (60,0 %)
	rechts	8 (50,0 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)

Tabelle 3: Verteilung der Gruppen zum Zeitpunkt T 2.

Parameter		Total	leer	Blank	BMP	BMP/VEGF
n		18	3	3	6	6
Seite	links	9 (50,0 %)	2 (66,7 %)	2 (66,7 %)	3 (50,0 %)	2 (33,3 %)
	rechts	9 (50,0 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	3 (50,0 %)	4 (66,7 %)

Die Verteilung der Stichproben ist in Abb. 12 grafisch dargestellt. Jede Markierung innerhalb der farbig gekennzeichneten Violinplots stellt eine Stichprobe dar.

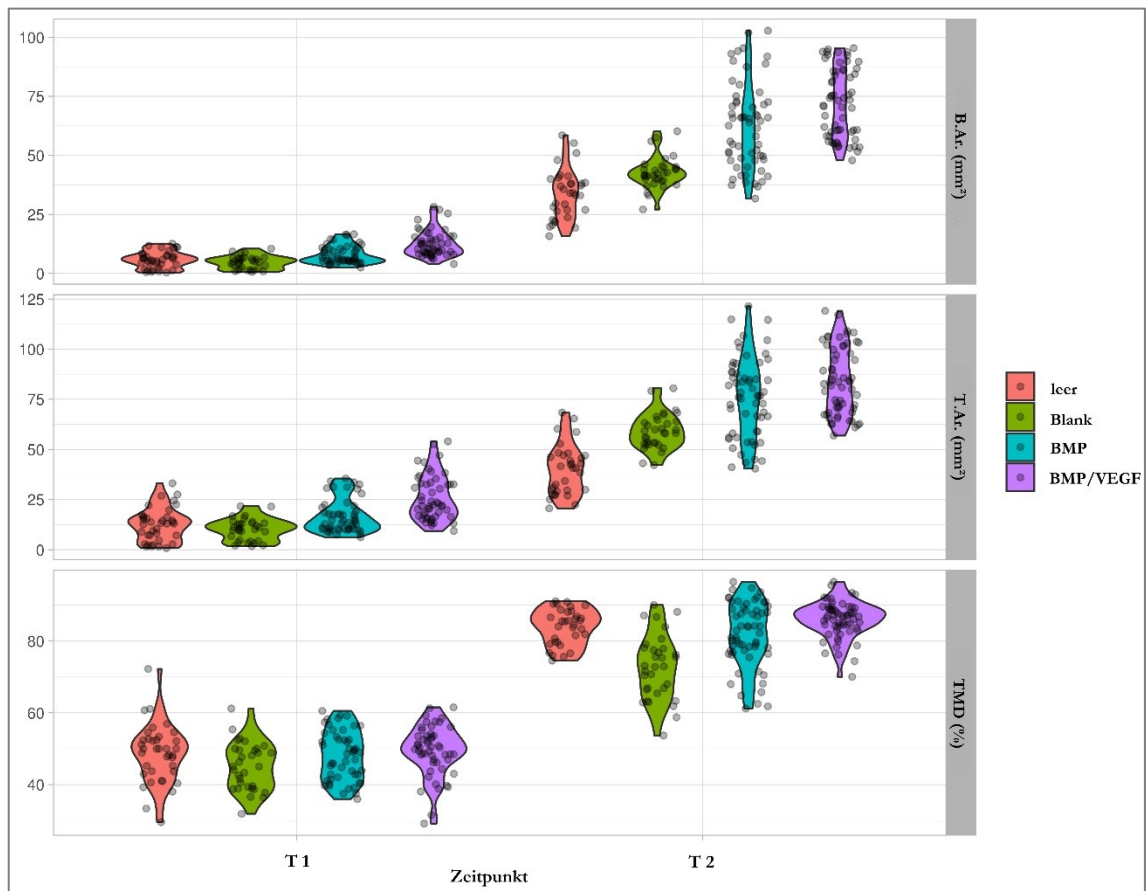


Abbildung 12: Verteilung der Messungen. Jede Tafel zeigt eine Messung (obere Tafel: mineralisierter Knochen; mittlere Tafel: gesamte Gewebefläche; untere Tafel: relative Knochenfläche). Die Farben repräsentieren die vier Gruppen. Die linke Hälfte des Diagramms zeigt den Zeitpunkt vier Wochen, der rechte Teil den Zeitpunkt 13 Wochen. Jeder Punkt ist eine Einzelmessung. Die farbigen Violinen beschreiben die empirische Verteilung (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2019).

Die Tabellen 4 und 5 beinhalten die deskriptiven Werte für die durchgeführten Messungen. Diese Ergebnisse sind einer Auswertung der MBSB entnommen. Für die verschiedenen Parameter wird zu den beiden Untersuchungszeitpunkten der Mittelwert und der Median angezeigt.

Tabelle 4: Deskriptive Werte für die Messungen, gemittelt nach Segment in Woche vier.

Parameter		leer	Blank	BMP	BMP/VEGF
n		3	3	5	5
B.Ar. (mm ²)	$M \pm SD$	5,6 \pm 3,3	4,5 \pm 2,7	8 \pm 4	12 \pm 4
	Median (min; max)	7,2 (1,8; 7,8)	5 (1,6; 6,9)	5,7 (5,1; 14)	11 (8,2; 19)
T.Ar. (mm ²)	$M \pm SD$	12 \pm 8	9,8 \pm 5,6	17 \pm 9	26 \pm 9
	Median (min; max)	14 (3,1; 18)	12 (3,6; 14)	13 (9,5; 31)	23 (17; 40)
TMD (%)	$M \pm SD$	49 \pm 6	45 \pm 3	48 \pm 5	49 \pm 2
	Median (min; max)	52 (43; 53)	43 (43; 48)	46 (44; 53)	49 (47; 54)

Tabelle 5: Deskriptive Werte für die Messungen, gemittelt nach Segment in Woche 13.

Parameter		leer	Blank	BMP	BMP/VEGF
n		3	3	6	6
B.Ar. (mm ²)	$M \pm SD$	34 \pm 10	43 \pm 4	62 \pm 18	72 \pm 14
	Median (min; max)	33 (25; 44)	41 (39; 48)	58 (45; 88)	68 (59; 92)
T.Ar. (mm ²)	$M \pm SD$	41 \pm 12	59 \pm 8	76 \pm 19	84 \pm 16
	Median (min; max)	39 (29; 53)	57 (52; 68)	78 (55; 97)	79 (68; 108)
TMD (%)	$M \pm SD$	84 \pm 1	73 \pm 3	82 \pm 9	86 \pm 2
	Median (min; max)	84 (83; 85)	73 (70; 76)	83 (67; 91)	86 (83; 89)

4.3.1 Gruppenvergleich

4.3.1.1 Mineralisierter Knochen

Zum frühen Zeitpunkt nach vier Wochen deutete sich für die BMP/VEGF-Gruppe mit 12 ± 4 mm² die größte Fläche von mineralisiertem Knochengewebe an. Damit wiesen diese Segmente eine größere Fläche als die der BMP-Gruppe (8 ± 4 mm²) auf. Die Versuchstiere der Blank-Gruppe regenerierten $4,5 \pm 2,7$ mm² mineralisierten Knochen und zeigten damit eine geringere Neubildung als die unbehandelte leer-Kontrolle, welche zu diesem Zeitpunkt $5,6 \pm 3,3$ mm² präsentierte (Tab. 4). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch die Kontrasttests zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt (Tab. 6).

Wie in Tab. 5 dargestellt, bildeten die Segmente der BMP/VEGF-Gruppe zum späten Zeitpunkt mit $72 \pm 14 \text{ mm}^2$ die größte mineralisierte Knochenfläche aus. Gegenüber der BMP-Gruppe ($62 \pm 18 \text{ mm}^2$) regenerierten sie damit eine signifikant größere Fläche ($p < 0,001$). Im Vergleich mit der Negativkontrolle imponierten in der BMP-Gruppe ($p = 0,003$) und der BMP/VEGF-Gruppe ($p < 0,001$) signifikant größere Flächen. Auch in den Defekten der Blank-Gruppe mineralisierte mit $43 \pm 4 \text{ mm}^2$ eine größere Knochenfläche als in der nicht behandelten Kontrollgruppe ($34 \pm 10 \text{ mm}^2$) ($p = 0,004$). Allerdings zeigten die Schliffpräparate der Blank-Gruppe gegenüber der BMP-Gruppe ($p = 0,029$) und der BMP/VEGF-Gruppe ($p = < 0,001$) eine signifikant kleinere mineralisierte Fläche (Tab.6). Abbildung 13 stellt den Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Negativkontrolle graphisch dar.

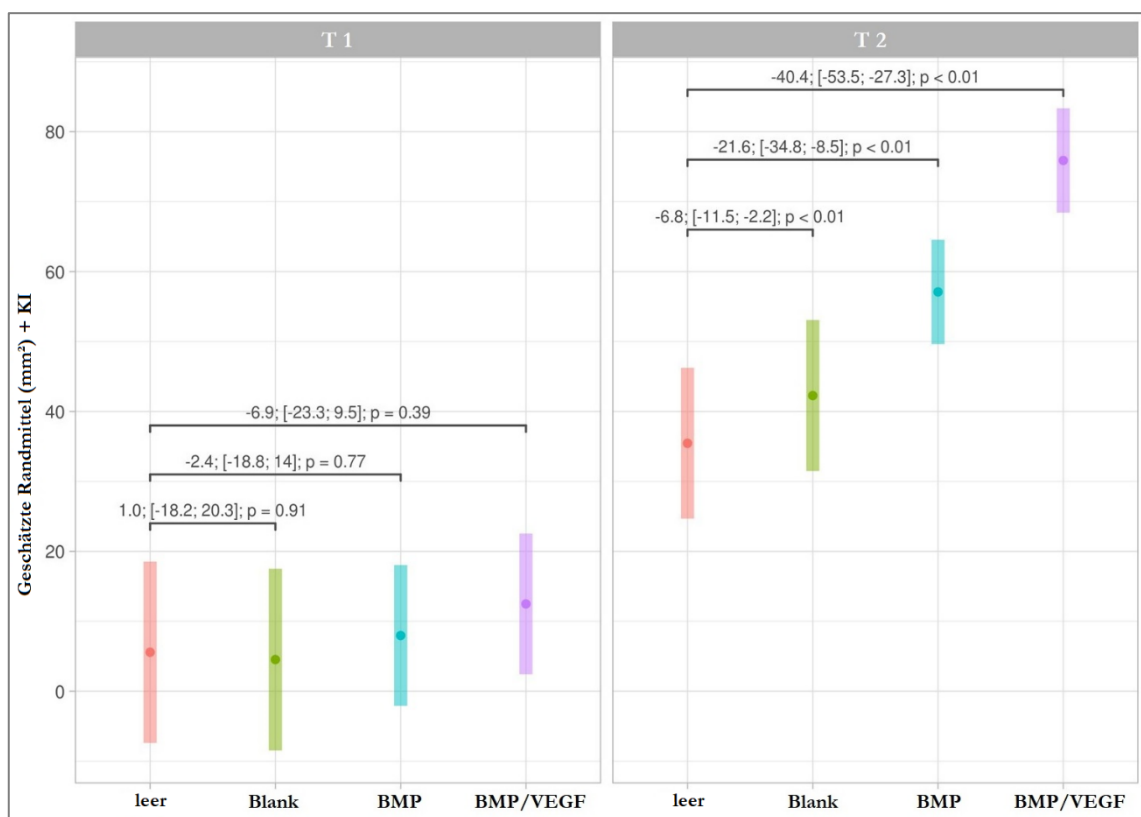


Abbildung 13: Die geschätzten Randmittel aus dem Modell für den Parameter B.Ar. mit 95 % Konfidenzintervall (KI). Im linken Diagramm sind die Gruppen für den Zeitpunkt T1, im rechten für T2 aufgeführt. Über den Balken sind die paarweisen Unterschiede der geschätzten Randmittel mit 95 % KI und die zugehörigen p-Werte im Vergleich mit der Negativkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2019).

Tabelle 6: Kontrasttests zur Analyse paarweiser Unterschiede für den Parameter B.Ar..

Vergleich	Schätzwert	KI	p-Wert
T1: leer – Blank	1,0	[-18,2; 20,3]	0,908
T1: leer – BMP	-2,4	[-18,8; 14]	0,766
T1: leer - BMP/VEGF	-6,9	[-23,3; 9,4]	0,393
T1: Blank – BMP	-3,4	[-19,8; 12,9]	0,669
T1: Blank – BMP/VEGF	-8,0	[-24,3; 8,4]	0,326
T1: BMP – BMP/VEGF	-4,5	[-19,4; 10,4]	0,523
T2: leer – Blank	-6,8	[-11,5; -2,2]	0,004
T2: leer – BMP	-21,6	[-34,8; -8,5]	0,003
T2: leer – BMP/VEGF	-40,4	[-53,5; -27,3]	< 0,001
T2: Blank – BMP	-14,8	[-27,9; -1,7]	0,029
T2: Blank – BMP/VEGF	-33,6	[-46,7; -20,5]	< 0,001
T2: BMP – BMP/VEGF	-18,8	[-23,4; -14,2]	< 0,001
leer: T 1 – T 2	-29,9	[-46,6; -13,1]	0,001
Blank: T 1 – T 2	-37,7	[-54,5; -21]	< 0,001
BMP: T 1 – T 2	-49,1	[-61,6; -36,7]	< 0,001
BMP/VEGF: T 1 – T 2	-63,4	[-75,8; -51]	< 0,001

Der Zuwachs der mineralisierten Knochenmatrix zwischen den Zeitpunkten T 1 und T 2 ist in Tab. 6 für jede Gruppe separat dargestellt. Alle Gruppen haben zum Zeitpunkt T 2 mehr mineralisierten Knochen regeneriert als zum Zeitpunkt T 1 ($p=0,001$).

Im Vergleich mit der unbehandelten Negativkontrolle registrierte das Modell für die BMP/VEGF-Gruppe in den neun Wochen von T 1 zu T 2 einen signifikant beschleunigten Zuwachs von mineralisiertem Knochen ($p=0,003$) (Tab. 7).

Tabelle 7: Modell Koeffizienten mit 95% KI und p-Wert für den Parameter B.Ar..

Term	Level	Term 2	Level 2	Schätzwert	KI	p-Wert
(Intercept)				5,58	[-6,779; 17,90]	0,385
Gruppe	leer					
Gruppe	Blank			-1,05		
Gruppe	BMP			2,39		
Gruppe	BMP/VEGF			6,91		
Zeitpunkt	4					
Zeitpunkt	13			29,88	[14,085; 45,70]	0,001
Zeitpunkt	4	*	*			
Zeitpunkt	13	Gruppe	leer			
Zeitpunkt	13	Gruppe	Blank	7,87	[-10.211; 25.90]	0,401
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP	19,25	[-0.457; 39.00]	0,066
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP/VEGF	33,52	[13,820; 53,20]	0,003

4.3.1.2 Gesamtes Gewebe

Nach vier Wochen Knochenregeneration zeigte die BMP/VEGF-Gruppe mit $26 \pm 9 \text{ mm}^2$ die größte Fläche von neu gebildetem Gewebe. In den Defekten der BMP-Gruppe regenerierte mit $17 \pm 9 \text{ mm}^2$ eine größere Fläche als in der leer-Gruppe (12 ± 8). Die Versuchstiere der Blank-Gruppe bildeten zu diesem Zeitpunkt mit $9,8 \pm 5,6 \text{ mm}^2$ die kleinste neu gebildete Gewebefläche aus (Tab. 4). Nach vier Wochen stellten sich, wie in Tab. 8 ersichtlich, keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen dar.

Nach 13 Wochen wurde, wie in Tab. 5 beschrieben, die größte regenerierte Gewebefläche in den Schliffpräparaten der BMP/VEGF-Gruppe gemessen. Diese stellte sich mit $84 \pm 16 \text{ mm}^2$ signifikant größer dar als die Flächen der BMP-Gruppe ($76 \pm 19 \text{ mm}^2$) ($p < 0,001$) und der Blank-Gruppe ($59 \pm 8 \text{ mm}^2$) ($p = 0,003$). Auch gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe, die eine Gesamtfläche von $41 \pm 12 \text{ mm}^2$ aufwies, regenerierte die BMP/VEGF-Gruppe signifikant mehr Gewebe ($p < 0,001$). Die leere Kontrollgruppe zeigte gegenüber den Gruppen Blank ($p < 0,001$) und BMP ($p = 0,002$) eine signifikant geringere Gesamtfläche (Tab. 8). Der Vergleich der Versuchsgruppen mit der Negativkontrolle wird durch die Abb. 14 für beide Untersuchungszeitpunkte graphisch beschrieben.

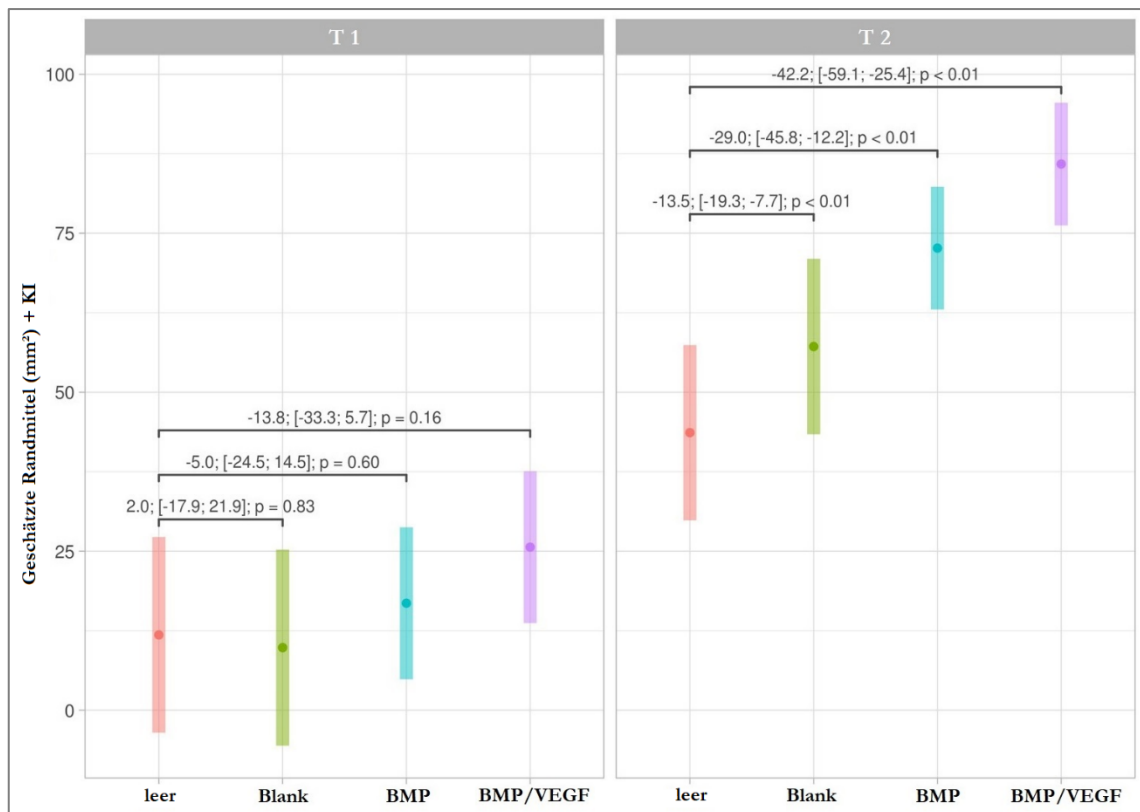


Abbildung 14: Die geschätzten Randmittel aus dem Modell für den Parameter T.Ar. mit 95 % KI. Im linken Diagramm sind die Gruppen für den Zeitpunkt T1 und rechts für T2 aufgeführt. Über den Balken sind die paarweisen Unterschiede der geschätzten Randmittel mit 95 % KI und die zugehörigen p-Werte im Vergleich mit der Negativkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2019).

Tabelle 8: Kontrasttests zur Analyse paarweiser Unterschiede für den Parameter T.Ar..

Vergleich	Schätzwert	KI	p-Wert
T1: leer – Blank	2,0	[-17,9; 21,9]	0,831
T1: leer – BMP	-5,0	[-24,5; 14,5]	0,603
T1: leer – BMP/VEGF	-13,8	[-33,3; 5,7]	0,157
T1: Blank – BMP	-7,0	[-26,5; 12,5]	0,467
T1: Blank – BMP/VEGF	-15,8	[-35,3; 3,7]	0,107
T1: BMP – BMP/VEGF	-8,8	[-24,2; 6,6]	0,238
T2: leer – Blank	-13,5	[-19,3; -7,7]	< 0,001
T2: leer – BMP	-29,0	[-45,8; -12,2]	0,002
T2: leer – BMP/VEGF	-42,2	[-59,1; -25,4]	< 0,001
T2: Blank – BMP	-15,5	[-32,3; 1,4]	0,069
T2: Blank – BMP/VEGF	-28,7	[-45,5; -11,9]	0,002
T2: BMP – BMP/VEGF	-13,2	[-18,9; -7,5]	< 0,001
leer: T 1 – T 2	-31,8	[-52,4; -11,2]	0,004
Blank: T 1 – T 2	-47,3	[-67,9; -26,7]	< 0,001
BMP: T 1 – T 2	-55,8	[-71,1; -40,6]	< 0,001
BMP/VEGF: T 1 – T 2	-60,2	[-75,5; -45]	< 0,001

Die untersuchten Gruppen regenerierten zum Zeitpunkt T 2 mehr Knochengewebe als zum Zeitpunkt T 1. Alle Gruppen zeigten, wie in Tab. 8 beschrieben, einen signifikanten Zuwachs. Die BMP/VEGF-Gruppe regenerierte das neue Gewebe in diesem Intervall signifikant schneller als die unbehandelte Negativkontrolle ($p=0,031$) (Tab. 9).

Tabelle 9: Modell Koeffizienten mit 95% KI und p-Wert für den Parameter T.Ar..

Term	Level	Term 2	Level 2	Schätzwert	KI	p-Wert
(Intercept)				11,84	[-2,761; 26,40]	0,125
Gruppe	leer					
Gruppe	Blank			-2,00		
Gruppe	BMP			4,98		
Gruppe	BMP/VEGF			13,79		
Zeitpunkt	4					
Zeitpunkt	13			31,80	[12,498; 51,10]	0,004
Zeitpunkt	4	*	*			
Zeitpunkt	13	Gruppe	leer			
Zeitpunkt	13	Gruppe	Blank	15,55	[-3,344; 34,40]	0,127
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP	24,04	[-0,034; 48,10]	0,064
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP/VEGF	28,45	[4,373; 52,50]	0,031

4.3.1.3 Relative Knochenfläche

Die Dichte des regenerierten Knochengewebes variierte zum Zeitpunkt T 1 von $45 \pm 3 \%$ für die Blank-Gruppe bis $49 \pm 2 \%$ für die BMP/VEGF-Gruppe (Tab. 4). Damit wies der neu gebildete Knochen der BMP/VEGF-Gruppe zwar den höchsten Mineralisationsgrad im regenerierten Gewebe auf, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede gegenüber den anderen Gruppen (Tab. 10). Die Versuchstiere der BMP-Gruppe bildeten eine Gewebedichte von $48 \pm 5 \%$ aus, während das Knochengewebe der unbehandelten Kontrollgruppe eine Dichte von $48 \pm 4 \%$ aufwies. Für den Zeitpunkt T 2 wurde die höchste relative Knochenfläche mit $86 \pm 2 \%$ für die Versuchstiere der BMP/VEGF-Gruppe gemessen (Tab. 5). Damit regenerierte diese eine signifikant höhere Dichte als die BMP-Gruppe, welche $82 \pm 9 \%$ aufwies ($p=0,002$). Der geringste Wert wurde mit $73 \pm 3 \%$ für die Blank-Gruppe registriert, welches eine signifikant geringere Dichte als die der BMP/VEGF-Gruppe ($p=<0,001$) und der BMP-Gruppe ($p=0,048$) bedeutete. Eine signifikant größere relative Knochenfläche als die Blank-Gruppe zeigte auch die leer-Kontrollgruppe, welche nach Auswertung der Schliffpräparate eine Dichte von $84 \pm 1 \%$ generierte ($p=0,001$) (Tab. 10). Die Abbildung 15 stellt den Vergleich der einzelnen Gruppen zusätzlich graphisch dar.



Abbildung 15: Die geschätzten Randmittel aus dem Modell für den Parameter TMD mit 95 % KI. Im linken Diagramm sind die Gruppen für den Zeitpunkt T1 und rechts für T2 aufgeführt. Über den Balken sind die paarweisen Unterschiede der geschätzten Randmittel mit 95 % KI und die zugehörigen p-Werte im Vergleich mit der Negativkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt angegeben (modifiziert nach der Auswertung und Aufbereitung durch die MBSB 2019).

Tabelle 10: Kontrasttests zur Analyse paarweiser Unterschiede für den Parameter TMD.

Vergleich	Schätzwert	KI	p-Wert
T1: leer – Blank	4,1	[-5; 13,2]	0,348
T1: leer – BMP	0,9	[-6,8; 8,6]	0,814
T1: leer – BMP/VEGF	-0,5	[-8,2; 7,2]	0,892
T1: Blank – BMP	-3,2	[-10,9; 4,5]	0,403
T1: Blank – BMP/VEGF	-4,6	[-12,3; 3,1]	0,232
T1: BMP – BMP/VEGF	-1,4	[-8,5; 5,7]	0,674
T2: leer – Blank	8,3	[3,7; 13]	0,001
T2: leer – BMP	1,6	[-5; 8,2]	0,622
T2: leer – BMP/VEGF	-5,1	[-11,7; 1,5]	0,125
T2: Blank – BMP	-6,7	[-13,3; -0,1]	0,048
T2: Blank – BMP/VEGF	-13,4	[-20; -6,8]	< 0,001
T2: BMP – BMP/VEGF	-6,7	[-10,9; -2,5]	0,002
leer: T 1 – T 2	-33,4	[-41,5; -25,3]	< 0,001
Blank: T 1 – T 2	-29,2	[-37,3; -21,1]	< 0,001
BMP: T 1 – T 2	-32,7	[-38,8; -26,6]	< 0,001
BMP/VEGF: T 1 – T 2	-38,0	[-44,1; -31,9]	< 0,001

Alle Versuchsgruppen regenerierten nach 13 Wochen mehr Knochengewebe. Den Kontrasttests entsprechend wurde in allen Gruppen zum Zeitpunkt T 2 eine signifikant höhere Knochendichte als zum Zeitpunkt T 1 registriert ($p < 0,001$) (Tab. 10). Gegenüber der Negativkontrolle zeigte keine der Gruppen eine beschleunigte Zunahme der relativen Knochenfläche in den neun Wochen zwischen T 1 und T 2 (Tab. 11).

Tabelle 11: Modell Koeffizienten mit 95% KI und p-Wert für den Parameter TMD.

Term	Level	Term 2	Level 2	Schätzwert	KI	p-Wert
(Intercept)				48,969	[43,20; 54,74]	< 0,001
Gruppe	leer					
Gruppe	Blank			-4,083		
Gruppe	BMP			-0,888		
Gruppe	BMP/VEGF			0,515		
Zeitpunkt	4					
Zeitpunkt	13			33,384	[25,75; 41,01]	< 0,001
Zeitpunkt	4	*	*			
Zeitpunkt	13	Gruppe	leer			
Zeitpunkt	13	Gruppe	Blank	-4,218	[-13,56; 5,13]	0,382
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP	-0,715	[-10,30; 8,87]	0,885
Zeitpunkt	13	Gruppe	BMP/VEGF	4,587	[-5,00; 14,17]	0,356

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Bevor ein KEM in der klinischen Anwendung am Menschen genutzt werden kann, muss sichergestellt werden, dass es den hohen Anforderungen an die Biokompatibilität und Funktionalität gerecht wird. Für die Charakterisierung von knochenkontaktierenden Materialien und zur Vorbereitung von *In-vivo*-Tierversuchen sind *In-vitro*-Untersuchungen gut geeignet (Davies et al. 2006). Sie liefern Informationen über die Zytotoxizität, Genotoxizität, Zellproliferation und -differenzierung. Allerdings ist es nur eingeschränkt möglich, die spezifische und physiologische Gewebereaktion gegenüber diesen Materialien nachzuweisen. Darüber hinaus sind *In-vitro*-Zellkultursysteme nicht in der Lage, physiologische Belastungen zu reproduzieren, die einer klinische Anwendung gleichen (Davies et al. 2006). Olthof et al. (2018) stellten fest, dass *In-vitro*-Versuche nur eine ungenaue Korrelation zur *In-vivo*-Freisetzung von WF zuließen. Tiermodelle sind daher unerlässlich für die Bewertung der Biokompatibilität, der Gewebereaktion und der mechanischen Funktion. In der medizinischen Forschung sollte dabei das Prinzip der weitgehenden Reduzierung von Tierversuchen Anwendung finden (Pearce et al. 2007). Dem folgend wurde die Anzahl der Versuchstiere in der vorliegenden Untersuchung weitmöglichst begrenzt. Hierzu wurden die gewonnenen Erkenntnisse vorangegangener Arbeiten genutzt, welche WF-Dosisuntersuchungen im Kleintiermodell vorgenommen haben (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018). Die hier vorliegende Untersuchung stellt die erste Untersuchung dar, welche sich im Großtiermodell mit PDLA/CaCO₃ als Trägermaterial für die kombinierte Abgabe von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ beschäftigte. Darüber hinaus wurde das Trägerpolymer zum ersten Mal zerkleinert in Form von PDLA/CaCO₃- Spänen in einen CSD implantiert.

Für Studien zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Knochen und spezifischen Materialien ist ein Verständnis der artspezifischen Knochenmerkmale und des Knochenmetabolismus wichtig. Jede Spezies hat diesbezüglich spezifische Vor- und Nachteile hinsichtlich ihrer Eignung für die Untersuchung eines KEM. Beim Vergleich der Knochenzusammensetzung weist neben dem Hund auch der Schweineknochen weitgehende Ähnlichkeiten zum humanen Knochen auf und gilt als repräsentativ für den menschlichen Knochen (Aerssens et al. 1998; Ruehe et al. 2009). Für Versuche mit KEM sollte neben den knochenspezifischen Parametern auch die Größe des Tieres berücksichtigt werden, um die Eignung für das spezifische Defektmodell sicherzustellen. Unter Berücksichtigung dieser Parameter ist das Mischweinein ein gut etabliertes Tiermodell für die Untersuchung der Knochenregeneration (Gruber et al. 2014; Ruehe et al. 2009; Schliephake et al. 1998; Zechner et al. 2003).

Die generierten Defekte können in Kleindefektmodelle und Großdefektmodelle unterteilt werden. Kleine Defekte weisen aufgrund ihres geringen Ausmaßes wenig mechanische Belastungen auf. Dadurch können iatrogen Einflüsse auf die Knochenheilung nahezu ausgeschlossen werden und es kann auch ohne Intervention zur vollständigen knöchernen

Ausheilung und damit zu einer Verzerrung des osteogenen Potenzials eines KEM kommen (Stutzle et al. 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Defektmodell untersucht, welches eine spontane knöcherne Regeneration desselben nicht zulassen sollte. Im Unterkiefer des Minischweins bieten sich zu diesem Zweck Kontinuitätsdefekte oder große Knochendefekte ohne Kontinuitätsunterbrechung an. Schmitz und Hollinger (1986) definierten einen CSD als die kleinste intraossäre Wunde, die während des gesamten Lebenszyklus nicht ausheilen wird. Diese Defekte füllen sich unbehindert mit faserigem Bindegewebe, obwohl eine begrenzte Knochenregeneration an den Rändern des Defektes beschrieben wurde. Dabei nahmen sie an, dass die Freisetzung von WF aus den Defekträndern die Differenzierung von im Defekt liegenden Stammzellen zu Osteoblasten bewirkt. Diese Zellen mineralisieren die extrazelluläre Matrix und bilden Knocheninseln aus, die ein Gerüst für das Wachstum des neuen Knochens bilden. Wachstumsfaktoren und Stammzellen sind im Zentrum eines CSD nur begrenzt verfügbar, was zu einer geringeren Differenzierung und weniger Knochenapposition in diesem Bereich führt (Schmitz et al. 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde im UK der Versuchstiere ein krestaler Satteldefekt mit einem Volumen von etwa 2 cm^3 präpariert, um diesen mit dem Komposit zu augmentieren. Für den Unterkiefer von Göttinger Minischweinen spezifizierten auch Ruehe et al. (2009) krestale Defekte von ungefähr $1,9 \text{ cm}^3$ als CSD. Diese regenerierten nur 57,4 % des ursprünglichen Knochenvolumens und wurden daher als nicht vollständig heilende Knochendefekte im Sinne eines CSD bezeichnet (Ruehe et al. 2009). Ob für einen CSD im Minischwein größere Knochendefekte benötigt werden, kann aufgrund unterschiedlicher Defektcharakteristika in den verschiedenen Studien allerdings nur schwer beurteilt werden. Henkel et al. (2006) beschrieben im Kontrast zur vorliegenden Untersuchung und Ruehe et al. (2009) einen Knochendefekt von $>5 \text{ cm}^3$ als CSD. Neben den verfügbaren Stammzellen des ortsständigen Knochens könnten dabei die im Periost liegenden Stammzellen von besonderer Bedeutung sein, die für die knöcherne Regeneration rekrutiert werden können. Wenn die periostale Bedeckung intakt bleibt, tritt eine Knochenneubildung aus dem Periost und aus dem ortsständigen Knochen auf (Huh et al. 2005). Einen weiteren Effekt auf die Knochenregeneration hat das Alter der Versuchstiere. Jungtiere zeigen eine erhöhte Potenz, Knochendefekte zu regenerieren, daher sollten die Tiere wie in der vorliegenden Untersuchung ausgewachsen sein (Corte et al. 2019; Ruehe et al. 2009). Als Parameter für das abgeschlossene Wachstum wurde das maximale Längenwachstum und der Schluss der Epiphysenfugen für den Zeitraum um den 21. bis 24. Lebensmonat beschrieben (Tsutsumi et al. 2004).

Bei Minischweinen wurde ein erhöhtes Auftreten von Wundheilungsstörungen beobachtet (Gruber et al. 2014; Henkel et al. 2001; Wiltfang et al. 2001). Gruber et al. (2014) machten dafür die Schnittführung bei der Präparation der Weichgewebe verantwortlich. Sie stellten fest, dass eine distal des präparierten Defekts positionierte vestibuläre Entlastungsinzision zu einer Minderperfusion des Lappengewebes führte. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde die Schnittführung in der vorliegenden Untersuchung angepasst. Um Durchblutungsstörungen der Weichgewebe zu vermeiden, wurde nur eine mesiale, vertikale

Entlastungsinzision durchgeführt. Die Lokalisation der untersuchten Defekte kann für das Auftreten von Komplikationen mitentscheidend sein. Für die Materialforschung genutzte Defekte sind der oralen Kavität häufig kaum ausgesetzt und könnten daher weniger empfindlich gegenüber Wundheilungsstörungen sein. Für die vorliegende Untersuchung waren die untersuchten CSD allerdings in einem Bereich des Unterkiefers lokalisiert, welcher der natürlichen Mastikation ausgesetzt waren. Herring (1976) beobachtete, dass Schweine unter natürlichen Bedingungen mit hohen Kräften kauen und jede Seite der Kiefer unabhängig voneinander nutzen. Im Gegensatz dazu haben Menschen eine langsamere und einseitigere Kaubewegung, welches eine bewusste Schonung von operativen Wunden ermöglicht.

In der vorliegenden Untersuchung wurde neben einer möglichst atraumatischen Präparation auch ein sorgfältiger primärer Wundverschluss durchgeführt. Die Minischweine erhielten postoperativ eine antiinflammatorische Schmerzmedikation und wurden auf Wundinfektionen hin überprüft. Aufgrund der fehlenden Schonung wurden die implantierten Kieferabschnitte normal belastet, was entsprechend widrigen Verhältnissen zur gesteuerten Einheilung eines KEM bedeutete. Daher stellte die angewandte Methode ein klinisch hoch belastbares Studienmodell dar, welches den potenziellen Komplikationen einer KEM-Therapie beim Menschen sehr nahekommt. Tierversuche an diesen Großtiermodellen stellen trotz der angeführten Schwierigkeiten die einzige Möglichkeit dar, spezifische Materialien von der vor-klinischen Entwicklung und Untersuchung in den klinischen Einsatz zu übernehmen und schlussendlich eine Etablierung für den Einsatz am Menschen zu ermöglichen. Die Regeneration eines Knochendefektes mithilfe eines KEM kann dafür anhand verschiedener Parameter wie der Knochenneubildung, dem Resorptionsverhalten des KEM oder infektiösen Prozessen untersucht werden.

Durch die Entwicklung der Trenndünnschliff-Technik wurde es möglich, nach einem standardisierten Verfahren kalzifizierte Knochenpräparate zu verarbeiten und histologisch zu untersuchen (Donath und Breuner 1982). Daher wurde diese Technik auch für die vorliegende Studie verwendet, um das Ausmaß der knöchernen Regeneration innerhalb der Knochendefekte nach KEM-Implantation zu untersuchen. Die Knochenmikroarchitektur kann mithilfe der Histomorphometrie oder durch hochauflösende Mikrocomputertomographie (μ CT) bestimmt werden (Tamminen et al. 2011; Vidal et al. 2012). Die histomorphometrische Analyse von Knochen Schliffen liefert dabei Informationen über die regenerierte Knochenfläche und den Knochenumbau, dem *Remodeling*. Hierbei können neben Aussagen über die zelluläre Aktivität auch Hinweise über die Osteoidbildung, die Resorptionsprozesse und den Mineralisierungsgrad getroffen werden. Sie stellt zur Analyse von Knochenstrukturen ein Standardverfahren dar und kann mit entsprechenden Färbungen auch zur Untersuchung metabolischer Prozesse herangezogen werden (Vidal et al. 2012). Eine Alternative dazu stellt die hochauflösende μ CT dar, welche eine dreidimensionale Analyse der trabekulären Mikroarchitektur und eine Quantifizierung der räumlichen Mineralisation von Knochenproben zulässt. Die Genauigkeit der μ CT hängt allerdings maßgeblich von der Bildauflösung ab (Muller 2003). Verschiedene Untersuchungen haben die Korrelation von histomorphometrischen

und μ CT-Untersuchungen bei gesunden und pathologischen Zuständen des Knochens untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen der μ CT und der Histomorphometrie (Marechal et al. 2005; Muller et al. 1998; Tamminen et al. 2011; Thomsen et al. 2005). Auch Chappard et al. (2005) fanden signifikante Korrelationen zwischen den beiden Methoden, zeigten aber, dass das μ CT das Knochenvolumen eher überschätzt. Für die vorliegende Untersuchung stellte die Histomorphometrie in Rücksicht auf beschriebene Korrelationen zum μ CT ein genaues und validiertes Verfahren zur zweidimensionalen Quantifizierung dar. Hierbei bietet sie zum frühen Zeitpunkt Vorteile bei der genauen Differenzierung der spärlich ausgebildeten Knochen trabekel, welche mit radiologischen Verfahren nur schwer möglich gewesen wäre. Auch Marechal et al. (2005) resümierten, dass neu gebildeter Knochen im μ CT kaum vom maturierten Knochen zu unterscheiden ist. Leider ließ die zweidimensionale Untersuchungsmethode aber weder Rückschlüsse auf die dreidimensionale trabekuläre Vernetzung des Knochens zu, noch war eine genaue Volumenmessung möglich. Weiterführende Untersuchungen mit dem vorliegenden Studienmodell könnten die μ CT zur Darstellung der ausgereiften knöchernen Strukturen implementieren und dadurch genauere volumetrische Aussagen zur knöchernen Regeneration treffen.

Zur Differenzierung der hartgeweblichen Strukturen wurden die histologischen Dünnschliffpräparate mit einer zytologischen Färbung behandelt. Für die Darstellung des neu gebildeten Knochengewebes stellte sich die Toluidin-Färbung als gut geeignet dar (Buser et al. 1998; Moest et al. 2015; Moreira et al. 2013). Der neu gebildete Knochen hebt sich durch die dunkelblaue Färbung sehr deutlich vom hellbläulich dargestellten maturierten Gewebe ab und lässt sich dadurch eindeutig identifizieren. Das residuale PDLLA/ CaCO_3 wurde bei der Herstellung der histologischen Präparate herausgelöst und imponierte in den Trenndünnschliffen in Form von begrenzten, leeren Lakunen. Vor allem nach 13 Wochen ließen sich diese Strukturen in den Defekten nicht mehr eindeutig identifizieren, sodass kaum Rückschlüsse über verbliebenes Kompositmaterial getroffen werden konnten.

Der Schwerpunkt der Untersuchung lag in der histomorphometrischen Vermessung der neu gebildeten Knochenstrukturen, um Aussagen über die Effektivität der knöchernen Regenerationsprozesse zu treffen. Für die histomorphometrische Quantifizierung bot sich dabei neben der Digitalisierung der Präparate auch eine digitale Vermessung der Strukturen an. Hierbei wurden die regenerierten Flächen unter Zuhilfenahme des Programms Adobe Photoshop CS5 mit einer Pixelquantifizierung vermessen. Da die Präparate vor der Messung keiner weiteren Bildbearbeitung zugeführt wurden, bestand eine Schwierigkeit darin, die unterschiedlichen Kontraste der Präparate zu differenzieren. Daher wurde eine eingehende Kontrolle der ROI durchgeführt, um eine Über- oder Unterinterpretation des neu gebildeten Knochengewebes zu vermeiden. Diese Methode wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen im Kleintiermodell etabliert (Moser et al. 2018). Da vor Beginn der vorliegenden Untersuchung angenommen wurde, dass durch die Größe der Knochenosteotomie ein CSD entstehen würde, wurden für eine repräsentative Darstellung des Defektes Präparate aus allen Teilen des Defekts in die Untersuchung überführt. So sollte eine Unter- bzw. Überinterpretation

des Regenerationspotenzials vermieden werden, da die zentralen Anteile eines CSD ein geringeres Potenzial zur Knochenheilung aufweisen (Schmitz et al. 1990).

In der vorliegenden Untersuchung wurden rekombinante WF genutzt, welche im Verbund mit PDLA/CaCO₃ in die CSD implantiert wurden. Die biologische Wirkung der hier angewendeten WF rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ wurde bereits in vorangehend beschriebenen Studien nachgewiesen und daher nicht weiter evaluiert (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018; Schliephake et al. 2015). Weitergehende Untersuchungen auf molekularer Ebene könnten ergänzende Informationen über deren Effektivität und die synergistische Wirkung geben. Osteogene Markerproteine wie RUNX2, ALP und angiogene Endothelzell-Markerproteine könnten einen Nutzen für solche Untersuchungen haben, wurden in dem vorliegenden Versuch jedoch nicht implementiert.

Die Zeitpunkte für die Interventionen wurden auf vier und 13 Wochen festgelegt, um den Prozess der Knochenregeneration repräsentativ darzustellen. Während nach vier Wochen erste trabekuläre Knochenstrukturen imponieren, ist das proliferative Knochenwachstum mit einer zunehmend geringerer Osteoidapposition zwischen der zwölften und der 16. Wochen nahezu abgeschlossen (Evian et al. 1982). Daher bietet sich dieser Zeitraum für eine Analyse der knöchernen Regeneration an. In anderen Untersuchungen wurde die Regeneration zu späteren Zeitpunkten dargestellt, wobei im Kleintierversuch noch signifikant positive Einflüsse auf die Knochenneubildung beschrieben worden sind (Lohse et al. 2015). Da in der vorliegenden Untersuchung ersichtlich wurde, dass in den WF-Vergleichsgruppen bereits nach 13 Wochen vergleichsweise weniger residuales PDLA/CaCO₃ verblieben war, kann ein späterer Interventionszeitpunkt von geringerem Interesse betrachtet werden. Unter klinischen Gesichtspunkten ist die Untersuchung nach 13 Wochen von erhöhtem Interesse, da dieser Zeitpunkt für therapeutische Interventionen wie eine dentale Implantatinserktion von Bedeutung ist (Tonetti et al. 2019).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Vor Beginn der Untersuchung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Regeneration eines klinisch relevanten CSD durch die Implantation von WF positiv beeinflusst werden kann. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die Addition einer geringen Dosis rhVEGF₁₆₅ eine Reduktion des wirksamen rhBMP-2 zulässt, um ein äquivalentes osteoinduktives Potenzial zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden neben der unbehandelten Gruppe zur Negativkontrolle eine Gruppe mit dem nativen Trägermaterial und zwei Vergleichsgruppen mit WF-Freisetzung, BMP und BMP/VEGF, gebildet und hinsichtlich verschiedener Parameter verglichen.

5.2.1 Negativkontrolle

Vier Wochen nach der operativen Schaffung der Kieferkammdefekte war eine geringe Neubildung von knöchernem Gewebe festzustellen. Diese entsprach mit der Ausbildung von frühen unreifen Knochen trabekeln dem physiologischen Verlauf der Knochenheilung. Die Kontur der Weichgewebe über den Defekten war zu diesem Zeitpunkt in ihrer transversalen und vertikalen Ausdehnung bereits ersichtlich reduziert. Folglich zeigten die unbehandelten Defekte nach 13 Wochen im Vergleich mit den behandelten Gruppen die geringste Menge an neu gebildetem Knochengewebe und mineralisierter Knochenmatrix. Dabei wurde ersichtlich, dass die regenerative Knochenheilung die ursprüngliche Ausdehnung des Knochens nicht wiederherstellen konnte und in Folge der Osteotomie eine ausgeprägte vertikale und transversale Atrophie des Kiefers resultierte. Damit konnte der für die vorliegende Untersuchung definierte krestale Satteldefekt des UK als CSD bestätigt werden. Für den Unterkiefer von Mischweinen beschrieben schon andere Untersuchungen einen Defekt mit ähnlicher Ausdehnung als CSD (Groger et al. 2003; Ruehe et al. 2009; Schliephake und Aleyt 1998). Da in der vorliegenden Untersuchung keine Volumenmessung vorgenommen wurde und die Knochendefekte anderer Studien nicht die gleiche Morphologie aufwiesen, können die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten allerdings nur mit Einschränkungen verglichen werden.

5.2.2 Blank-Gruppe

In der vorliegenden Untersuchung wurde als KEM ein bioresorbierbares Kompositmaterial aus einer Kombination von PDLLA und CaCO₃ verwendet, welches neben seiner nativen Form als auch als Trägermaterial für die kontrollierte, verzögerte Freisetzung von osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktoren diente. Das verwendete Material wurde vor dem hier vorliegenden ersten Großtierversuch bereits *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Studien untersucht und etabliert (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2017; Schliephake et al. 2015). In der vorliegenden Untersuchung wurde zur Kontrolle gegenüber den WF-Gruppen eine Blank-Gruppe gebildet. Deren CSD wurden mit dem nativen Trägermaterial ohne WF augmentiert. Durch den Vergleich mit der unbehandelten Negativkontrolle sollte auch das

osteokonduktive Potenzial und weitergehend die Biokompatibilität des PDLA/CaCO₃ untersucht werden.

Das PDLA/CaCO₃-Trägermaterial wurde während der Aufbereitung der Präparate aus den Knochenblöcken herausgelöst, wodurch in den Dünnschliffen begrenzte, leere Einschlüsse imponierten. Diesem folgend lag das fragmentierte PDLA/CaCO₃ nach vier Wochen noch in größerem Umfang vor. Neben einer geringen Menge von neu gebildetem Knochengewebe stützte das Polymer die defektbedeckenden Weichgewebe und deutete eine osteokonduktive Matrix für den einwachsenden Knochen an. Nach 13 Wochen zeigten die Versuchstiere der Blank-Gruppe signifikant mehr neugebildetes Knochengewebe als die Negativkontrolle. Vermutlich kam hierbei das osteokonduktive Potenzial des PDLA/CaCO₃ zum Tragen. Auffällig war zu diesem Zeitpunkt allerdings die signifikant geringere Dichte des regenerierten Knochengewebes, welches mit verbliebenen PDLA/CaCO₃-Partikeln zu erklären sein könnte. Eine ausgeprägte Entzündungsantwort war in der vorliegenden Untersuchung in allen Versuchsgruppen und zu beiden Zeitpunkten nicht ersichtlich, welches auf eine gute Biokompatibilität des PDLA/CaCO₃ hindeutete. Dieser Befund deckt sich mit den vorangegangenen Versuchen in verschiedenen Tiermodellen. Auch Lohse et al. (2015) konnten keinen Anhalt für entzündliche Reaktionen des Gewebes nachweisen. Weitere Studien beschreiben in diesem Zusammenhang den Nutzen von CaCO₃ als Puffersystem, um den pH-Abfall bei der Degradation des PDLA abzumildern (Backhaus et al. 2013; Eufinger et al. 2007; Schiller und Epple 2003; Schliephake et al. 2015). Die vorliegende Untersuchung konnte das Langzeitverhalten des Trägermaterials allerdings nicht darstellen, welches, wie andere Polymere, noch zu einem späteren Zeitpunkt Fremdkörperreaktionen und Entzündungen im Gewebe auslösen könnte (Ramot et al. 2016). Hinsichtlich der Langzeitverhaltens registrierten verschiedene Untersuchungen zum PDLA/CaCO₃ neben einer guten Biokompatibilität auch ein günstiges mechanischen Verhalten. Dabei resultierte nach dem vollständigen Abbau des PDLA/CaCO₃ ein kompletter Ersatz des Trägermaterials durch neugebildeten Knochen (Backhaus et al. 2013; Eufinger et al. 2007; Schiller et al. 2004). Ein Grund hierfür könnten die PH-Wert-Stabilität während der Degradation und günstige materialspezifische Eigenschaften wie die Porengröße des PDLA/CaCO₃ von 200 bis 400 µm sein, die für die einwachsenden Knochentrabekel und Blutgefäße gut geeignet erscheint (Backhaus et al. 2013; Eufinger et al. 2007; Karageorgiou und Kaplan 2005; Oh et al. 2007; Schliephake et al. 2015). Ob das residuale Trägermaterial auch in dem hier vorliegenden Modell über einen längeren Zeitraum entzündungsfrei resorbiert und durch ortsständigen Knochen ersetzt worden wäre, sollte in zukünftigen Arbeiten evaluiert werden. Zusätzlich sollten Untersuchungen über den Einfluss der Form des augmentierten Komposits durchgeführt werden. Es sind keine Untersuchungen bekannt, welche das Komposit in einer zerkleinerten Form in akute CSD augmentiert haben. Im hier vorliegenden Modell konnten die Satteldefekte des Unterkiefers nur in dieser Darreichung vollständig und dreidimensional korrekt augmentiert werden. Eine Folge dieser Modifikation könnte eine veränderte Resorptionskinetik gewesen

sein, insofern stellt sich ein direkter Vergleich mit anderen Untersuchungen zum PDLA/CaCO₃ als schwierig heraus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das hier angewendete PDLA/CaCO₃ eine osteokonduktive Matrix ausbilden kann, welches in Bezug auf die quantitative Knochenregeneration den signifikanten Vorteil gegenüber der Negativkontrolle erklärt. Die Mineralisationsdichte des Knochens war hingegen signifikant geringer und entsprach nicht der physiologischen Ausheilung des Knochens. Damit erschien die Qualität des regenerierten Gewebes den anderen Versuchsgruppen gegenüber unterlegen.

5.2.3 BMP-Gruppe

Das PDLA/CaCO₃ stellte auf Basis der vorangegangenen Untersuchungen ein gut geeignetes Trägermaterial für die Freisetzung von WF und die Regeneration von großen Knochendefekten dar (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018; Schliephake et al. 2015). Das regenerative Potenzial eines KEM ist dabei allerdings in hohem Maße von seiner osteogenetischen oder osteoinduktiven Wirkung auf das Zielgewebe abhängig. Bei Kompositmaterialien stützt sich das osteoinduktive Potenzial auf die integrierten WF und deren Dosiskonzentration und Freisetzungskinetik (Li et al. 2016). Die Freisetzungskinetik hängt für das hier verwendete PDLA/CaCO₃ von dessen Resorptionskinetik und damit vom Metabolismus des individuellen Organismus ab. Dieser Faktor könnte zwischen den verschiedenen Spezies, welche zur Untersuchung des PDLA/CaCO₃ genutzt worden sind, differieren. Dadurch erscheint eine Übertragung der Ergebnisse der Kleintiermodelle auf das Minischwein erschwert. Weiter erschwerend kommen die unklaren Dosisanforderungen der verschiedenen Spezies hinzu (Gothard et al. 2014). Die Dosisauswahl für die vorliegende Untersuchung begründete sich auf den Wirksamkeitsstudien, welche vorangehend an Ratten durchgeführt worden sind und sich als effektiv für die Knochenregeneration gezeigt haben (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018). Dabei zeigte die kombinierte Freisetzung der WF in einem Verhältnis von 8:1 (BMP:VEGF) nach 13 Wochen das gleiche Regenerationspotenzial auf die Knochenneubildung wie die doppelte Menge rhBMP-2 als alleinigem WF. In dem vorliegenden Großtierversuch wurde die Menge der freizusetzenden Dosis auf Basis der Erkenntnisse aus den Kleintierversuchen berechnet (Lohse et al. 2015). Aufgrund der größeren Defektvolumen wurde die Menge des zu augmentierenden Komposits und damit die WF-Dosis angepasst. Das Dosisverhältnis von 8:1 wurde für die kombinierte Abgabe der WF vom Kleintiermodell übernommen.

Bislang konzentrierte sich der Einsatz von WF bei der gesteuerten Knochenregeneration vor allem auf Faktoren, die den Prozess der Knochenbildung direkt beeinflussen können oder dazu dienen, die Anzahl von knochenbildenden Vorläuferzellen zu erhöhen. Die Knochenregeneration ist allerdings ein sehr komplexer Prozess mit definierten, sich überschneidenden Heilungsphasen. Die exogene Beeinflussung erfordert daher ein gut abgestimmtes Vorgehen (Hankenson et al. 2015). Es hat sich gezeigt, dass BMP unterschiedliche zeitliche

Expressionsmuster und Anforderungen an die Konzentration stellen. BMP-2 hat dabei ausgeprägte artspezifische Konzentrationsanforderungen für die Osteogenese, wobei die BMP-2-Konzentration, die für die Induktion einer Knochenbildung erforderlich ist, bei nicht-menschlichen Primaten wesentlich höher ist als bei Nagetieren (Boden et al. 2002).

Die dosisabhängige Wirksamkeit beim Menschen wurde in Studien zur Frakturheilung beobachtet, bei denen die mediane Zeit bis zur Frakturheilung mit 1,50 mg/ml jedoch nicht mit 0,75 mg/ml BMP-2 reduziert werden konnte (Govender et al. 2002). Klinische Studien im Kieferbereich untersuchten die Dosiswirksamkeit von rhBMP-2 bei der Augmentation von Extraktionsalveolen und Sinusaugmentationen und fanden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 0,75 mg/ml und 1,5 mg/ml (Boyne et al. 2005; Fiorellini et al. 2005). Die osteoinduktive Wirkung der Faktoren ist in diesen Studien mit einer Freisetzung des BMP-2 aus einem Kollagenträger erzielt worden und ist insofern mit der vorliegenden Untersuchung nicht vergleichbar. Für die aktuell zum therapeutischen Einsatz am Menschen zugelassenen Anwendungen von BMP-2 wird dieses Protokoll genutzt, das durch die rasche Freisetzung einer hohen Dosis BMP-2 gekennzeichnet ist (Krishnan et al. 2017). Bei einer unsachgemäßen Anwendung der mit BMP-2 angereicherten Kollagenträger sind jedoch auch schwerwiegende Nebenwirkungen gemeldet worden (James et al. 2016). So ist es beim Einsatz von BMP-2 in der Wirbelsäulenchirurgie zu Dysphagien mit schweren Dysfunktionen gekommen (Cahill et al. 2009; Carragee et al. 2011). Diese könnten auf die Verabreichung von unphysiologisch hohen Dosen des BMP-2 zurückzuführen sein (Krishnan et al. 2017). Supraphysiologische Konzentrationen von BMP-2 können darüber hinaus das Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Prozessen verändern. Zara et al. (2011) haben gezeigt, dass hochdosiertes BMP-2 in einem orthotopen Modell eine Entzündung induzierte, die *in vivo* zu einer strukturell abnormalen Knochenbildung geführt hat. Bis heute ist allerdings keine geeignete Alternative identifiziert worden, die ohne die potenziellen, unerwünschten Nebenwirkungen eine ähnliche oder bessere Wirksamkeit bei der Induktion der Knochenbildung hätte. Die Dosierung, die Trägergerüste, die Freisetzungskinetik und der Ort der BMP-2-Anwendung stellen hierbei die Variablen dar, die zu potenziell unerwünschten Ereignissen führen können (James et al. 2016; Krishnan et al. 2017).

Da supraphysiologische Dosen vornehmlich mit einer raschen Freisetzung des BMP vergesellschaftet sind, stellt der Einsatz des in der vorliegenden Arbeit angewendeten PDLLA/CaCO₃ mit eingeschäumten WF einen alternativen Ansatz zur Freisetzung der Zytokine dar. In vorangegangenen Untersuchungen konnte *in vitro* und *in vivo* eine nachhaltige Freisetzung der WF aus dem PDLLA/CaCO₃ dargestellt werden (Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018; Schliephake et al. 2015). Die Studien von Lohse et al. (2015) und Moser et al. (2018) kamen zu dem Ergebnis, dass die kontrollierte, verzögerte Abgabe gegenüber einer raschen Freisetzung der WF einen positiven Langzeiteffekt auf die *In-vivo*-Knochenheilung ausübte und dieser überlegen war. Einschränkend sollte hierbei allerdings berücksichtigt

werden, dass die Korrelation zwischen der *In-vitro*-Freisetzung der WF und der klinischen Realität ungenau ist (Olthof et al. 2018).

In der hier vorliegenden Untersuchung deutete sich in der BMP-Gruppe nach vier Wochen eine heterogene Knochenneubildung an. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen konnte für die rhBMP-2-Freisetzung kein Vorteil für die Knochenneubildung abgeleitet werden. Dieses Ergebnis steht somit im Kontrast zu anderen Studien, welche zu diesem Zeitpunkt nach der Anwendung von rhBMP-2 eine signifikant gesteigerte Knochenregeneration festgestellt haben (Gruber et al. 2014; Schliephake et al. 2008). Auch Lohse et al. (2015) zeigten nach vier Wochen mit dem gleichen Material und einer äquivalenten Dosis eine signifikant erhöhte Knochenneubildung in der BMP-Gruppe. Aufgrund der unterschiedlichen Tiermodelle und Defektmorphologien lassen sich deren Ergebnisse allerdings nur eingeschränkt mit denen der vorliegenden Untersuchung vergleichen. Ein Faktor für den Kontrast könnte die zur Knochenregeneration benötigte wirksame Dosis des rhBMP-2 sein, welche in der Ratte deutlich niedriger als beim Minischwein ist (Gothard et al. 2014). Da das rhBMP-2 in dem vorliegenden Modell verzögert freigesetzt wurde, kann angenommen werden, dass die Menge des wirksamen rhBMP-2 in den ersten Wochen noch nicht ausreichte, um im Minischwein einen signifikanten Vorteil auf die Knochenregeneration auszuüben. Aufgrund der Defektlagerung könnten auch iatrogene Faktoren das Ergebnis beeinflusst haben und den Kontrast zu den anderen Untersuchungen erklären. Die Knochendefekte bei Lohse et al. (2015) waren während der Heilung kaum iatrogenen Einflüssen ausgesetzt, da sie im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung außerhalb der mastikatorischen Einflüsse lokalisiert waren.

Auch in den CSD der BMP-Gruppe stellte sich nach vier Wochen noch residuales Kompositmaterial dar. Dabei wurden in den verschiedenen Minischweinen unterschiedlich große Mengen des verbliebenen PDLLA/CaCO₃ und damit auch verfügbaren rhBMP-2 registriert. Es kann im Rahmen der postoperativen Heilungsprozesse nicht ausgeschlossen werden, dass Kompositfragmente und damit WF durch nicht bemerkte Wunddehiszenzen ausgewaschen worden sind. Auch unbemerkte entzündliche Prozesse zu einem initialen Zeitpunkt der Knochenregeneration müssen bedacht werden und könnten den vorherrschenden Kontrast zu den anderen Untersuchungen erklären.

Nach 13 Wochen regenerierten die Versuchstiere der BMP-Gruppe signifikant mehr mineralisierten Knochen als die Kontrollgruppen, welches neben dem Potenzial des rhBMP-2 zur Osteoinduktion auch die verzögerte Freisetzung der Zytokine aus dem PDLLA/CaCO₃ bestätigte. Das PDLLA/CaCO₃-Trägermaterial wurde dabei nicht vollständig resorbiert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe Menge des residualen Komposits im weiteren Verlauf noch rhBMP-2 exprimiert hätte und dadurch eine weitere exogene Steigerung der Knochenregeneration möglich gewesen wäre. Weitergehende Untersuchungen über diese Langzeiteffekte des rhBMP-2 wären in diesem Zusammenhang von Interesse, da vorangegangene Studien im Kleintier noch nach 26 Wochen signifikante Veränderungen bei der Knochenregeneration feststellten (Lohse et al. 2015). Relativierend anzumerken ist

allerdings, dass im Kleintiermodell nach 13 Wochen deutlich mehr residuales PDLLA/CaCO₃ vorlag, welches auf die Form der Darreichung zurückzuführen ist. Die zerkleinerte Form des Komposits könnte aufgrund der größeren Oberfläche im Gewebe einer rascheren Resorption unterlegen gewesen sein. Zukünftige Untersuchungen zu diesem Verhalten stellen sich als hochrelevant für die Augmentation des Komposits dar, da die Form der Darreichung entscheidend für die Resorptionskinetik und Dosisanforderung sein kann.

Die Freisetzung von rhBMP-2 aus den PDLLA/CaCO₃-Trägern stellt mit Rücksicht auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung eine Möglichkeit dar, die Knochenregeneration im Minischwein positiv zu beeinflussen. Die Anwendung von rhBMP-2 zur Regeneration von großen Knochendefekten gilt als anerkannt und die Effektivität wurde von verschiedenen Studien bestätigt (Carlisle et al. 2019; Herford et al. 2017; Rottgers et al. 2014). Aufgrund der verschiedenen möglichen Nebenwirkungen bei der hochdosierten Anwendung von rhBMP-2 sind Systeme zur Reduktion der Menge von biologisch aktivem rhBMP-2 von hohem Interesse.

Das PDLLA/CaCO₃ bietet dabei aufgrund seiner materialspezifischen Eigenschaften verschiedene Vorteile gegenüber den klinisch gebräuchlichen Kollagenen. Kollagene erscheinen mechanisch wenig belastbar und der biologische Abbau der Kollagenmatrix ist nur schwer zu kontrollieren, was zu einer undefinierten Freisetzungskinetik des eingeschlossenen WF führen kann (Lee und Shin 2007). Obwohl die Retention von rhBMP-2 an der Defektstelle durch den Einbau in einen Kollagenschwamm verlängert wurde, konnte *in vivo* gezeigt werden, dass aufgrund der anfänglich raschen Freisetzung nach zwei Wochen nur fünf Prozent des Signalproteins im Kollagen verblieben waren (Geiger et al. 2003). Die Abgabe der WF aus Kollagenträgern erfolgt meist durch eine rasche Freisetzung mit einem Verlust von bis zu 80 % der WF-Aktivität innerhalb der ersten 48 h nach der Implantation (Uludag et al. 1999). Das Risiko für eine derart rasche Abgabe und unkontrollierte Dosierung der WF kann durch den Einsatz eines mit den WF aufgeschäumten PDLLA/CaCO₃ reduziert werden, da die Resorptionskinetik maßgeblich für die WF-Freisetzung verantwortlich ist. Darüber hinaus können die PDLLA/CaCO₃-Träger im Gegensatz zu xenogenen Trägermaterialien patientenindividuell in beliebiger dreidimensionaler Form hergestellt und implantiert werden, was bei komplexen Knochenaugmentationen einen großen Vorteil für die Operateur*innen und die Patient*innen darstellt.

5.2.4 BMP/VEGF-Gruppe

Die erfolgreiche Regeneration von Knochengewebe ist neben der BMP-vermittelten Osteogenese auch maßgeblich von einer suffizienten Angiogenese abhängig. Der Zufluss von Sauerstoff und Nährstoffen, welche für die Regeneration von Knochengewebe notwendig sind, muss durch eine ausreichende Vaskularisation sichergestellt sein (Rather et al. 2019; Saran et al. 2014; Stegen et al. 2015). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass BMP-2 die Knochenbildung induzierte, aber auch die Vaskularisation förderte. Bei CSD erschien das

Potenzial von BMP-2 für die Gefäßbildung aber unzureichend zu sein, sodass ergänzende Faktoren für eine ausreichende Neovaskularisation notwendig erschienen (Pearson et al. 2019). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung der angiogene WF rhVEGF₁₆₅ in Kombination mit rhBMP-2 genutzt.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein von Endothelzellen produziertes Protein, das nach einer Verletzung der Gewebe die Neubildung von Gefäßen induziert. VEGF erhöht die Gefäßpermeabilität, nachdem es die lokale Angiogenese gefördert hat (Neufeld et al. 1999). Dadurch wird eine verstärkte Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen ermöglicht, wodurch auf indirektem Wege die Knochenregeneration gefördert wird (Zhang et al. 2011). Bouletreau et al. (2002) untersuchten im Zusammenhang mit der Knochenregeneration die Rolle einer Hypoxie und VEGF auf die Aktivierung von Endothelzellen. Sie stellten dabei fest, dass die Endothelzellen durch die Produktion von BMP-2 eine wichtige osteogene Rolle bei der Frakturheilung spielen könnten. Die Autor*innen beobachteten eine zwei- bis dreifache Hochregulierung der BMP-2 mRNA-Expression in Endothelzellen, die durch eine Hypoxie oder VEGF stimuliert wurde. Außerdem schienen die kombinierten Effekte der Hypoxie und rhVEGF additiv auf die BMP-2 mRNA-Expression in Endothelzellen zu wirken. Das VEGF stimuliert nicht nur die Angiogenese, sondern verstärkt bei der Knochenregeneration auch indirekt die Ausschüttung von BMP-2 (Bouletreau et al. 2002). Durch Verbindungen zwischen den VEGF- und BMP-Signalwegen spielt das Zytokin auch eine wichtige Rolle für die Differenzierung der MSC zu Osteoblasten (Aryal et al. 2014; Grosso et al. 2017).

Im Gegensatz zum oft bestätigten knochenbildenden Effekt des BMP-2 reicht der Einsatz von VEGF allein allerdings nicht aus, um eine effizientere Heilung von Knochendefekten zu ermöglichen (Dreyer et al. 2020). In Kombination mit BMP-2 konnte VEGF jedoch auf synergistische Weise die Regenerationsfähigkeit von Defekten kritischer Größe fördern (Cakir-Ozkan et al. 2017; Chen et al. 2020; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Liu K. et al. 2020; Lohse et al. 2015; Patel et al. 2008; Wang et al. 2017). Auch eine Dosisreduktion des BMP-2 erschien durch den kombinierten Einsatz der Zytokine möglich (Lohse et al. 2015). In einigen Untersuchungen wurde bei der Kombination der WF vor allem für die frühe Knochenregeneration ein Vorteil festgestellt (Cakir-Ozkan et al. 2017; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Patel et al. 2008).

Blau und Banfi (2001) folgend sollte die Freisetzung von VEGF über einen ausreichend langen Zeitraum gewährleistet sein, um stabile Gefäße auszubilden. Dabei wurde angedeutet, dass eine rasche Freisetzung von VEGF die Angiogenese zwar effektiv induzierte, die neu gebildeten Gefäße aber nicht langzeitstabil waren. Eine anhaltende Überexpression kann allerdings negative Effekte auf die Knochenhomöostase haben (Helmrich et al. 2013). Die Expression des VEGF sollte dabei für mindestens vier Wochen aufrechterhalten werden, um die Stabilisierung und Persistenz der neu gebildeten Gefäße zu ermöglichen (Ozawa et al. 2004; Uccelli et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine prolongierte

Freisetzung des rhVEGF₁₆₅ aus dem PDLLA/CaCO₃ angestrebt. Diese sollte einen nachhaltigen Effekt auf die Gefäßneubildung haben und damit eine effiziente nutritive Versorgung des Gewebes unterstützen. In einer vorangegangenen Untersuchung im Kleintiermodell wurde die effektive Wirkung der Kombination von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ nachgewiesen, wobei sich bei der kombinierten Freisetzung auch eine Dosisreduktion des rhBMP-2 als effektiv erwiesen hat (Lohse et al. 2015).

Um die Hypothese zu überprüfen, ob durch die Addition von rhVEGF₁₆₅ auch im Minischwein eine Dosisreduktion des rhBMP-2 möglich ist, wurde in der vorliegenden Untersuchung die BMP/VEGF-Gruppe gebildet. Die Dosis des rhBMP-2 wurde in Relation zur BMP-Gruppe halbiert und das Potenzial dieser Kombination zur Knochenregeneration untersucht. Diese Dosisreduktion erscheint vor dem Hintergrund von möglichen Nebenwirkungen des rhBMP-2 als sinnvoll, wurde aber nur in wenigen Studien analysiert (Hernández et al. 2012; Lohse et al. 2015; Moser et al. 2018).

Nach vier Wochen wurde für die BMP/VEGF-Gruppe die quantitativ größte Fläche an neu gebildetem Knochengewebe registriert. Es konnte jedoch kein signifikanter Vorteil zu den anderen Gruppen festgestellt werden. Bei früheren Untersuchungen im Kleintiermodell konnten zu diesem Zeitpunkt mit dem gleichen Material ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Lohse et al. 2015). Im Kontrast zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde bei den Ratten für die kombinierte Freisetzung aber eine geringere Knochenneubildungsrate als bei der doppelten Menge rhBMP-2 registriert. Verschiedene andere Arbeiten im Kleintiermodell beschrieben für die duale Freisetzung von BMP und VEGF nach vier Wochen eine signifikant gesteigerte Knochenregeneration (Cakir-Ozkan et al. 2017; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Patel et al. 2008). Unterschiedliche Tier- und Defektmodelle und WF-Dosierungen erschweren den Vergleich der Untersuchungen, insofern könnten nur zusätzliche Dosiskombinationen und angepasste Defektmorphologien zur Erklärung dieses Befundes beitragen.

Nach 13 Wochen regenerierte die BMP/VEGF-Gruppe allerdings signifikant mehr Knochen als die anderen Gruppen. Der Mineralisationsgrad des Knochengewebes erschien dem physiologisch ausgeheilten Defekt ähnlich und stellte sich gegenüber der BMP-Gruppe und der Blank-Gruppe als signifikant höher dar. Durch eine Beschleunigung der metabolischen Prozesse könnte eine raschere Resorption des Komposits stattgefunden haben, was den Unterschied zu den beiden Gruppen erklären könnte. Die BMP/VEGF-Gruppe regenerierte signifikant mehr Knochengewebe als die BMP-Gruppe, obwohl diese die doppelte wirksame Dosis rhBMP-2 freigesetzt hat. Eine Erklärung dafür könnte in der synergistischen Wirkung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ liegen, welche mit einer stimulierten Gefäßneubildung und einem beschleunigten Metabolismus verbunden ist (Grosso et al. 2017; Peng et al. 2005).

In Anbetracht der Bedeutung von endogenem VEGF für die normale Knochenbildung und -reparatur erscheint eine Behandlung mit exogenem VEGF auch zur Förderung der Angiogenese bei der Knochenheilung als sinnvoll. Exogenes VEGF steigerte in Tiermodellen die

Angiogenese (Eckardt et al. 2003; Kempen et al. 2009; Kleinheinz et al. 2005; Patel et al. 2008; Richardson et al. 2001; Tarkka et al. 2003; Wang et al. 2017). Darüber hinaus stellten Street et al. (2002) eine verbesserte Ossifikation und Kallusreifung sowie eine verbesserte knöcherne Überbrückung in einem Frakturmodell beim Kaninchen fest. Tarkka et al. (2003) folgerten aus ihren Untersuchungen eine beschleunigte Regeneration und eine erhöhte Knochendichte. Nachdem Kleinheinz et al. (2005) durch den Einsatz von exogenem zugeführtem VEGF aus Kollagenträgern eine beschleunigte Neoangiogenese nachgewiesen haben, wurden auch andere Materialien zur kontrollierten Freisetzung der Zytokine angewendet. Hierbei wurden neben Modifikationen der Kollagene auch poly-laktidbasierte Trägermaterialien etabliert. Auch die Kombination des VEGF mit anderen WF wurde untersucht, wobei in verschiedenen Untersuchungen erhöhte Gefäßdichten registriert werden konnten (Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Patel et al. 2008; Richardson et al. 2001; Wang et al. 2017; Wang et al. 2018).

Von vorrangiger Bedeutung für die Knochenregeneration stellt sich neben dem Trägermaterial und der WF-Dosis auch das Dosisverhältnis der WF zueinander dar. Es scheint eine Korrelation zwischen dem Regenerationsgrad des Knochens und dem Mengenverhältnis der beiden Zytokine zu bestehen. Höhere VEGF-Spiegel bedingten weniger Knochenregeneration, wohingegen niedrigere VEGF-Mengen in Relation zu höheren BMP-Konzentrationen eine gesteigerte Knochenneubildung beförderten. Erstmals stellten Peng et al. (2002) bei ihren Versuchen an Mäusen fest, dass bei der Freisetzung von BMP und VEGF in einem Verhältnis von 5:1 eine signifikant erhöhte Knochenregeneration zu verzeichnen war. Sie schlussfolgerten später, dass VEGF während der Osteogenese die Angiogenese stimuliert und die metabolischen Prozesse durch die synergistische Wirkung der WF beschleunigt wurden (Peng et al. 2005). In der vorliegenden Untersuchung wurde daher eine gegenüber dem rhVEGF₁₆₅ um den Faktor acht erhöhte Dosis rhBMP-2 angewandt. Diese gegenüber Peng et al. (2005) modifizierte Relation wurde basierend auf vorangegangenen Dosisuntersuchungen an Kleintieren gewählt (Lohse et al. 2015).

In der Vergangenheit wurden diverse Untersuchungen zur Regeneration von CSD unternommen, welche neben der reinen BMP-Abgabe auch bei der kombinierten Freisetzung von BMP und VEGF einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung feststellten (Cakir-Ozkan et al. 2017; Chen et al. 2020; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Liu et al. 2020; Lohse et al. 2015; Patel et al. 2008; Wang et al. 2017). Der positive Effekt war in einigen Studien allerdings nur nach vier Wochen signifikant. Zu späteren Zeitpunkten relativierte sich dieser Vorteil gegenüber der reinen BMP-Freisetzung (Cakir-Ozkan et al. 2017; Hernández et al. 2012; Kempen et al. 2009; Patel et al. 2008). Hierbei differierten die eingesetzten Trägermaterialien und die Untersuchungszeitpunkte voneinander. Auch hinsichtlich der eingesetzten Wirkdosis und der Dosisrelation von BMP zu VEGF ließ sich ein breites Spektrum von Versuchsansätzen feststellen. Es sind allerdings keine Untersuchungen im Großtiermodell bekannt, welche dabei die Dosis des wirksamen BMP reduzierten. Daher

können aus den Ergebnissen der anderen Autoren nur vorsichtige Rückschlüsse für die vorliegende Untersuchung gezogen werden.

Patel et al. (2008) untersuchten die Auswirkungen der simultanen Freisetzung von VEGF und BMP-2 in einem kranialen CSD bei Ratten. Hierbei wurden die Wachstumsfaktoren aus Gelatinemikropartikeln freigesetzt, die in ein Polymergerüst eingefügt worden sind. Die Gruppe mit der kombinierten Freisetzung zeigte gegenüber den anderen Gruppen nach vier Wochen eine signifikant höhere Knochenneubildung. Die Autoren folgerten daraus einen synergistischen Effekt für die kombinierte Wirkung von VEGF und BMP-2 auf die Knochenbildung und deuteten auf ein Zusammenspiel dieser WF für die frühe Knochenregeneration hin. Die Ergebnisse zeigten im Kontrast zur vorliegenden Arbeit allerdings, dass die Addition von VEGF die von BMP-2 erreichte Knochenbildung nach zwölf Wochen nicht beeinflusste (Patel et al. 2008). Eine ergänzende Studie von Young et al. (2009) untersuchte mit dem gleichen Material verschiedene Dosierungen von BMP-2 und VEGF, welche simultan in einem CSD bei Ratten freigesetzt wurden. Nach zwölf Wochen wurde bei abnehmender BMP-2-Freisetzung eine dosisabhängige Abnahme der Knochenbildung beobachtet. Die Zugabe von VEGF zum BMP-2 führte auch in diesem Modell zu keinem signifikanten Anstieg der Knochenneubildung. Für den Parameter der knöchernen Überbrückung der CSD wurde hingegen ein signifikanter Vorteil für die kombinierte WF-Freisetzung gemessen (Young et al. 2009). Für die Knochenregeneration beschrieben beide Untersuchungen eine effektive Wirkung für die simultane Abgabe von BMP-2 und VEGF, jedoch deutete sich für diese Kombination keine überlegene Stellung gegenüber der reinen BMP-2-Wirkung an. Diese Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse der hier vorliegenden Untersuchung in dem Punkt, dass die kombinierte Abgabe der WF einen positiven Effekt auf die Knochenregeneration hat. Zum frühen Zeitpunkt stellte sich in der hier vorliegenden Arbeit zwar eine verstärkte Neubildung von Knochen dar, diese erwies sich entgegen den Erkenntnissen von Patel et al. (2008) allerdings nicht als vorteilhafter gegenüber der reinen rhBMP-2-Freisetzung. Im Kontrast zu den Arbeiten von Patel et al. (2008) und Young et al. (2009) deutete sich im hier vorliegenden Modell allerdings eine signifikant erhöhte Knochenneubildung nach 13 Wochen an. Dieser Kontrast könnte dadurch erklärt werden, dass in der hier vorliegenden Untersuchung neben allen anderen methodischen Unterschieden ein anderes Dosisverhältnis genutzt wurde. Patel et al. (2008) und Young et al. (2009) kombinierten eine im Dosisverhältnis erhöhte Menge VEGF mit dem BMP. Diese Kombination steht den Erkenntnissen von Peng et al. (2002) entgegen, die für eine effektive Knochenregeneration ein dementsprechendes WF-Verhältnis favorisierten. Young et al. (2009) hielten es im kritischen Rückblick für durchaus möglich, dass eine zu rasche Freisetzung des VEGF dazu geführt haben könnte, dass zu späteren Zeitpunkten nicht genügend VEGF für die Aufrechterhaltung des Gefäßnetzwerks vorhanden war. Darüber hinaus könnte die niedrige VEGF:BMP-2-Relation dazu geführt haben, dass ein Überschuss an VEGF die MSC in eine endotheliale Differenzierung drängten (Peng et al. 2002). Dem folgend könnte sich die verzögerte Freisetzung einer höheren Dosis rhBMP-2 mit einer geringeren Dosis rhVEGF₁₆₅

effektiver auf die osteogene Differenzierung der MSC ausgewirkt haben, was den Kontrast der beiden Studien zu der hier vorliegenden erklären könnte. Einen sehr wichtigen Faktor könnte durch das Trägermaterial selbst ausgeübt worden sein, da das PDLA/CaCO₃ im Unterschied zu den Trägern von Patel et al. (2008) und Young et al. (2009) einen osteokonduktiven Effekt auf das Gewebe ausübte und somit die Knochenregeneration positiv verstärkte.

Einen anderen Ansatz zur Freisetzung der wirksamen WF stellt die zeitlich kontrollierte, sequenzielle Freisetzung von WF dar (Cakir-Ozkan et al. 2017; Geuze et al. 2012; Kempen et al. 2009). Die Abgabe der WF orientiert sich hierbei an der physiologisch vorgefundenen WF-Kinetik bei der Knochenregeneration. Die WF wurden dazu von Kempen et al. (2009) in einem Verbundgerüst aus PLGA + BMP-2 und mit VEGF beladenem Gelatine-Hydrogel verwendet. Diese Gerüste zeigten im Kleintiermodell innerhalb der ersten Tage eine rasche Freisetzung des VEGF und eine verzögerte Abgabe des BMP-2 über die gesamte Versuchsdauer. Sie stellten dabei wie Patel et al. (2008) fest, dass VEGF alleine keine erhöhte Knochenbildung induzierte, aber die Bildung des Gefäßnetzes stimuliert wurde. Im Vergleich zur alleinigen Wirkung des rhBMP-2 verbesserte die Addition des VEGF die ektope Knochenbildung signifikant, wohingegen kein Effekt für die orthotope Lokalisation registriert wurde. Obwohl Kempen et al. (2009) in der Kombinationsgruppe sogar eine deutlich erhöhte Dosis BMP freisetzten, konnte gegenüber der alleinigen Wirkung des rhBMP-2 kein gesteigerter Effekt auf die knöchernen Regeneration festgestellt werden. Einen ähnlichen Effekt auf die Knochenregeneration stellten auch Cakir-Ozkan et al. (2017) fest, wobei die CSD im Unterkiefer von Hasen lokalisiert waren. Auch in dieser Untersuchung wurde das VEGF zeitlich kontrolliert innerhalb der ersten Tage nach der Implantation freigesetzt, wohingegen die BMP-Abgabe verzögert über einen längeren Zeitraum anhielt. Dafür nutzten sie Polymer-Träger, denen die WF ihrer spezifischen Freisetzung entsprechend aufgelagert wurden. Die Knochenregeneration stellte sich ähnlich wie bei Kempen et al. (2009) dar. Eine gegenüber der alleinigen Wirkung von rhBMP-2 signifikant gesteigerte Regeneration nach vier Wochen, welche nach acht Wochen allerdings keinen Vorteil zeigte. Die Ergebnisse von Cakir-Ozkan et al. (2017) zeigten in den mit VEGF verbundenen Gruppen aber sowohl nach vier als auch nach acht Wochen eine signifikante Zunahme des Gefäßvolumens im Unterkieferknochen. Diese Daten bestätigten nochmals, dass die VEGF-Freisetzung zu mehr Blutgefäßen im Knochengewebe führen kann. Cakir-Ozkan et al. (2017) untersuchten weitergehend, wie viel Trägermaterial zu beiden Zeitpunkten in den Defekten verblieben war. Sie registrierten dabei für die kombinierte Freisetzung der WF eine geringere Menge von residualem KEM als in den anderen Gruppen, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Nach 13 Wochen regenerierten die Minischweine der vorliegenden Untersuchung eine signifikant erhöhte Mineralisationsdichte, was auf beschleunigte metabolische Prozesse bei der Knochenregeneration und der Resorption des PDLA/CaCO₃ zurückzuführen sein könnte. In Hinblick auf die quantitative Knochenneubildung könnte der Kontrast zwischen der vorliegenden Untersuchung und den Arbeiten zur sequenziellen WF-Freisetzung mit den Erkenntnissen von

Peng et al. (2005) zu erklären sein. Deren Ergebnisse betonten die Bedeutung einer hohen BMP-2:VEGF-Relation, wenn die beiden WF zur Beschleunigung der Knochenregeneration eingesetzt werden. Die Daten von Kempen et al. (2009) und Cakir-Ozkan et al. (2017) zeigten allerdings keine verbesserte Knochenbildung, obwohl deren Freisetzungssysteme mit einer hohen Menge an BMP-2 gesättigt waren. Gegebenenfalls hatte die frühe Freisetzung des gesamten VEGF eine Umkehrung der WF-Relation zur Folge, was Einfluss auf die langfristigen Regenerationsprozesse hatte.

Ein der hier vorliegenden Untersuchung ähnliches Modell zur simultanen verzögerten Abgabe der WF entwickelten Hernández et al. (2012). Hierbei nutzten sie hochporöse Polymere und kombinierten in ihren Vergleichsgruppen zwei unterschiedliche BMP-2-Dosen mit einer festen Dosis VEGF. Die Knochenregeneration und Gefäßbildung wurden dabei in einem Frakturmodell im Kaninchen untersucht. Die WF wurden simultan über einen Zeitraum von vier Wochen mit einer moderat erhöhten Freisetzung zu Beginn der Untersuchung abgegeben. Die Autor*innen beschrieben eine signifikant höhere Knochenneubildung und Vaskularisation nach vier Wochen, die Regeneration wurde in Relation zur reinen BMP-2 Wirkung jedoch bei keiner der WF-Kombinationen nachhaltig verbessert. Zwölf Wochen nach der Implantation war die Menge des neu gebildeten Knochens im Vergleich zu den reinen BMP-2-Abgaben tendenziell sogar geringer. Interessanterweise konnten Hernández et al. (2012) in ihrer Untersuchung aber zeigen, dass eine deutlich verringerte BMP-2-Dosis in Kombination mit der spezifischen Dosis VEGF ein ähnliches Knochenvolumen regenerierte wie eine um den Faktor fünf erhöhte Dosis BMP-2 mit der gleichen Addition des VEGF. Mit Rücksicht auf die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung kann somit geschlussfolgert werden, dass die Dosis des rhBMP-2 bei der kombinierten Wirkung deutlich verringert werden kann, um effektiv auf die knöcherne Regeneration zu wirken. Die vergleichsweise erhöhte Knochenneubildung in der hier vorliegenden Untersuchung ist allerdings nicht in der WF-Dosis, sondern in der Resorptionskinetik der unterschiedlichen Träger zu vermuten. Die PLGA-Träger von Hernández et al. (2012) resorbierten vollständig in den ersten vier Wochen nach der Implantation und setzten die wirksamen WF dabei vollständig frei. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten die Versuchstiere eine signifikant erhöhte Gewebeneubildung. Nach der vollständigen Freisetzung der WF konnte hingegen kein Vorteil für die regenerativen Prozesse gemessen werden. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten PDLLA/CaCO₃-Träger zeigten neben ihren osteokonduktiven Eigenschaften eine langsamere Resorptionskinetik und ließen damit eine nachhaltigere Abgabe der WF zu, welches vermeintlich zu einer effektiveren Langzeitwirkung auf die Regeneration der CSD führte.

Die Untersuchung von Lohse et al. (2015) kam nach 13 Wochen bei Dosisuntersuchungen mit rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ zu ähnlichen Ergebnissen wie die hier vorliegende Arbeit. Dabei wurde von Lohse et al. (2015) und Moser et al. (2018) neben der Dosiswirkung auch untersucht, ob Unterschiede zwischen der raschen und der verzögerten Freisetzung der WF bestehen. Sie beschrieben für die kombinierte, verzögerte Freisetzung gegenüber der reinen BMP-Abgabe einen signifikanten Vorteil auf die Knochenregeneration. Die Dosisrelation

von 8:1 stellte sich dabei als gut geeignet für die effiziente knöcherne Regeneration dar. Diese Feststellung unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, welche bei dieser Dosisrelation auch eine signifikant gesteigerte Knochenneubildung zeigte.

Alle voran beschriebenen Untersuchungen unterscheiden sich allerdings in vielen Parametern voneinander. Zusätzlich zu den Unterschieden bei den Trägermaterialien und der Freisetzungskinetik müssen für vergleichende Aussagen auch Unterschiede auf Basis der Dosierung der WF und der lokalen Mikroumgebung berücksichtigt werden. Anzuführen sind in diesem Zusammenhang auch die chirurgischen Traumata. Diese bedingen Hämatome verschiedener Ausprägung, welche wiederum eine Quelle für endogene chemotaktische, angiogene und mitogene WF sein können (Kempen et al. 2009). Diese angeführten Punkte erschweren vergleichende Aussagen zwischen den beschriebenen Arbeiten und der hier vorliegenden Untersuchung. Zusammenfassend kann allerdings geschlussfolgert werden, dass die physiologische Gewebeheilung durch eine verzögerte Freisetzung von WF in geringer Gewebekonzentration nachhaltig und effektiv unterstützt werden kann. Diese These unterstützend beschrieben Grosso et al. (2017), dass bei exzessiven Konzentrationen, welche durch eine rasche Freisetzung von BMP und VEGF ausgelöst werden können, die endogene Expression der WF reguliert werden könnte. Dieses hätte in der Folge inhibierende Einflüsse auf die Geweberegeneration. Darüber hinaus hat die Wirkung der Zytokine bei der raschen Freisetzung nur einen temporär begrenzten Einfluss auf die Regeneration. Vor diesem Hintergrund erscheint die verzögerte Freisetzung geringer Mengen von WF über einen prolongierten Zeitraum als sinnvoll. Dieses kann durch den Einsatz eines kontrolliert resorbierenden KEM und dabei verzögert freiwerdender WF gewährleistet werden kann. Das PDLA/CaCO₃ scheint diese Kautelen in Kombination mit per CO₂-Hochdruckbegasung verbundener WF zu erfüllen (Eufinger et al. 2007; Lohse et al. 2015; Schiller et al. 2004; Schliephake et al. 2015). Inwiefern sich die fragmentierte Darreichung des Trägermaterials auf die resorptiven Eigenschaften und die Ergebnisse dieser Untersuchung auswirkten, sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung beschreiben eine herausragende Stellung der kombinierten Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ an, jedoch sollte dieses Ergebnis vor dem Hintergrund der fehlenden Unterstützung in der Literatur auch kritisch betrachtet werden. Eine Erklärung für die hohe Effizienz könnte in den synergistischen Effekten der WF-Signalwege mit einer sich gegenseitig verstärkenden Stimulation von Angiogenese und Osteogenese liegen (Grosso et al. 2017; Peng et al. 2005). Neben der exogenen Zufuhr von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ scheint es auch möglich, dass eine verstärkte Neoangiogenese und das damit einhergehende dichtere Gefäßnetz eine erhöhte endogene BMP-2-Ausschüttung aus den Endothelzellen hervorgerufen hat (Bouletreau et al. 2002).

Jedoch müssen in Hinsicht auf den Kontrast zur alleinigen BMP-Wirkung auch verschiedene andere Faktoren in Betracht gezogen werden, welche methodisch nicht ausgeschlossen werden konnten. Einige Versuchstiere zeigten nach der Operation Wunddehiszenzen, wodurch

ein Ausschwemmen des KEM aus den Defekten befördert werden konnte. Auch unerkannte Infektionen im augmentierten Bereich könnten das Ergebnis beeinflusst haben. Insofern das Risiko für derartige, das Ergebnis beeinflussende Faktoren, für alle Gruppen als äquivalent betrachtet wird, kann festgestellt werden, dass die verzögerte Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ eine der doppelten Dosis rhBMP-2 mindestens äquivalente Knochenregeneration ermöglicht.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung sollte klären, ob durch die kombinierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren rhBMP-2 und rhVEGF₁₆₅ aus PDLLA/CaCO₃-Kompositmaterial eine äquivalente Knochenneubildung zu der Beladung der Trägermaterialien mit rhBMP-2 allein erfolgt. Dabei wurde untersucht, ob die kombinierte Freisetzung der Zytokine eine Dosisreduktion von rhBMP-2 zulässt. Für die vorliegende Studie wurde das PDLLA/CaCO₃-Trägergerüst neben der Kontrollgruppe in der ersten Vergleichsgruppe mit 800 µg rhBMP-2 und in der zweiten mit einer Kombination von 400 µg rhBMP-2 und 50 µg rhVEGF₁₆₅ in einem Dosisverhältnis von 8:1 verbunden. In dem Göttinger Minipig-Tiermodell wurden in 18 Tieren CSD Defekte im Unterkiefer gesetzt, mit den Vergleichsmaterialien versorgt und nach vier und 13 Wochen histomorphometrisch untersucht. Analysiert wurden die neu gebildete gesamte Gewebefläche, die mineralisierte Knochenfläche und die relative Knochenfläche. Neben der Bestätigung, dass es sich bei der gewählten Defektgröße nachweislich um CSD im Göttinger Minischwein handelt, beschreiben die Ergebnisse, dass die verzögerte Freisetzung von 400 µg rhBMP-2 und 50 µg rhVEGF₁₆₅ aus dem Trägermaterial eine effektive Knochenneubildung induzierte. Nach vier und nach 13 Wochen zeigte die Vergleichsgruppe mit der dualen Freisetzung gegenüber den anderen Gruppen eine erhöhte Knochenneubildung und Knochendichte und bestätigte eine effektive Regeneration des Defektes. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass die kontrollierte, verzögerte Freisetzung von WF aus einem Trägermaterial effektiv zur Regeneration von Knochengewebe beitragen kann, dass PDLLA/CaCO₃ biokompatibel und mit dem Dosisverhältnis von 8:1 (BMP:VEGF) geeignet für die kombinierte Freisetzung der WF ist. Durch die Addition des angiogenen Zytokin rhVEGF₁₆₅ zum rhBMP-2 wurde eine Dosisreduktion des rhBMP-2 ermöglicht. Das angewandte Studienmodell ist zusammenfassend aufgrund der Lokalisation der CSD in Hinblick auf zu erwartenden Komplikationen und der dem Menschen ähnlichen knochenphysiologischen Eigenschaften ein gut geeignetes Verfahren zur Austestung von KEM im Tissue Engineering.

7 Literaturverzeichnis

- Adams RH, Alitalo K (2007): Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464-478
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998): Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139, 663-670
- Albrektsson T, Johansson C (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10, 96-101
- Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, Marcucio R, Miclau T, Healy K, Bahney C (2016): Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone* 83, 197-209
- Alonso N, Tanikawa DY, Freitas RaS, Canan L, Ozawa TO, Rocha DL (2010): Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 1183-1189
- Aludden HC, Mordenfeld A, Hallman M, Dahlin C, Jensen T (2017): Lateral ridge augmentation with Bio-Oss alone or Bio-Oss mixed with particulate autogenous bone graft: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 46, 1030-1038
- Amler MH (1969): The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 27, 309-318
- Ara M, Watanabe M, Imai Y (2002): Effect of blending calcium compounds on hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid). *Biomaterials* 23, 2479-2483
- Araujo MG, Lindhe J (2005): Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 32, 212-218
- Aryal R, Chen XP, Fang C, Hu YC (2014): Bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in bone tissue regeneration: new insight and perspectives. *Orthop Surg* 6, 171-178
- Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA (2007): New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* 38, 49-62
- Backhaus S, Annen T, Epple M (2013): A porous pH-stabilized composite material consisting of poly (D,L-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 44, 107-111
- Barone A, Ricci M, Mangano F, Covani U (2011): Morbidity associated with iliac crest harvesting in the treatment of maxillary and mandibular atrophies: a 10-year analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 69, 2298-2304
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015): Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1-48
- Benglis D, Wang MY, Levi AD (2008): A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 62, 423-431

- Binon PP (2007): Treatment planning complications and surgical miscues. *J Oral Maxillofac Surg* 65, 73-92
- Blau HM, Banfi A (2001): The well-tempered vessel. *Nat Med* 7, 532-534
- Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG (2002): Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine (Phila Pa 1976)* 27, 2662-2673
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002): Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109, 2384-2397
- Boyce T, Edwards J, Scarborough N (1999): Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 30, 571-581
- Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG (2005): De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1693-1707
- Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK (1998): Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 9, 137-150
- Buser D, Chappuis V, Kuchler U, Bornstein MM, Wittneben JG, Buser R, Cavusoglu Y, Belser UC (2013): Long-term stability of early implant placement with contour augmentation. *J Dent Res* 92, 176-182
- Cahill KS, Chi JH, Day A, Claus EB (2009): Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures. *JAMA* 302, 58-66
- Cakir-Ozkan N, Egri 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
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C (2011): The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury* 42, 56-63
- Cardaropoli G, Araujo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J (2005): Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 32, 435-440
- Carlisle P, Guda T, Silliman DT, Burdette AJ, Talley AD, Alvarez R, Tucker D, Hale RG, Guelcher SA, BrownBaer PR (2019): Localized low-dose rhBMP-2 is effective at promoting bone regeneration in mandibular segmental defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 107, 1491-1503
- Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660
- 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

- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014): Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* 561, 64-73
- Cawood JI, Howell RA (1988): A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17, 232-236
- Chan BP, Hui TY, Wong MY, Yip KH, Chan GC (2010): Mesenchymal stem cell-encapsulated collagen microspheres for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 225-235
- Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M (2005): Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 20, 1177-1184
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004): Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233-241
- Chen S, Shi Y, Zhang X, Ma J (2020): Evaluation of BMP-2 and VEGF loaded 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced osteogenic capacity in vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 112, 110893
- Cheng R, Ma JX (2015): Angiogenesis in diabetes and obesity. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 67-75
- Clarke B (2008): Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 131-139
- Cordaro L, Torsello F, Miuccio MT, di Torresanto VM, Eliopoulos D (2011): Mandibular bone harvesting for alveolar reconstruction and implant placement: subjective and objective cross-sectional evaluation of donor and recipient site up to 4 years. *Clin Oral Implants Res* 22, 1320-1326
- Corte GM, Hunigen H, Richardson KC, Niehues SM, Plendl J (2019): Cephalometric studies of the mandible, its masticatory muscles and vasculature of growing Gottingen Minipigs-A comparative anatomical study to refine experimental mandibular surgery. *PLoS One* 14, e0215875
- Cui F, Wang X, Liu X, Dighe AS, Balian G, Cui Q (2010): VEGF and BMP-6 enhance bone formation mediated by cloned mouse osteoprogenitor cells. *Growth Factors* 28, 306-317
- Davies CM, Jones DB, Stoddart MJ, Koller K, Smith E, Archer CW, Richards RG (2006): Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater* 11, 57-75
- Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW (2000): Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141, 1667-1674
- Donath K, Breuner G (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11, 318-326
- Dreyer CH, Kjaergaard K, Ding M, Qin L (2020): Vascular endothelial growth factor for in vivo bone formation: A systematic review. *J Orthop Translat* 24, 46-57
- Ducy P, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207-2214
- Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I (2003): Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 21, 335-340

-
- Ehrler DM, Vaccaro AR (2000): The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 38-45
- El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M (2017): Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharmaceutical research* 34, 1152-1170
- Emami E, Heydecke G, Rompre PH, de Grandmont P, Feine JS (2009): Impact of implant support for mandibular dentures on satisfaction, oral and general health-related quality of life: a meta-analysis of randomized-controlled trials. *Clin Oral Implants Res* 20, 533-544
- Eufinger H, Rasche C, Lehmbrock J, Wehmoller M, Weihe S, Schmitz I, Schiller C, Epple M (2007): Performance of functionally graded implants of polylactides and calcium phosphate/calcium carbonate in an ovine model for computer assisted craniectomy and cranioplasty. *Biomaterials* 28, 475-485
- Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H (1982): The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol* 53, 81-85
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676
- Fiorellini JP, Howell TH, Cochran D, Malmquist J, Lilly LC, Spagnoli D, Toljanic J, Jones A, Nevins M (2005): Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein-2 for extraction socket augmentation. *J Periodontol* 76, 605-613
- Freitas RM, Spin-Neto R, Marcantonio Junior E, Pereira LA, Wikesjö UM, Susin C (2015): Alveolar ridge and maxillary sinus augmentation using rhBMP-2: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res* 17, 192-201
- Friedlaender GE, Strong DM, Tomford WW, Mankin HJ (1999): Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 30, 583-588
- García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW (2015): Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 81, 112-121
- Garmy-Susini B, Varner JA (2005): Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer* 93, 855-858
- Geiger M, Li RH, Friess W (2003): Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1613-1629
- Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV (2014): An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 15, 3640-3659
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628
- Geuze RE, Theyse LF, Kempen DH, Hazewinkel HA, Kraak HY, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J (2012): A differential effect of bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor release timing on osteogenesis at ectopic and orthotopic sites in a large-animal model. *Tissue Eng Part A* 18, 2052-2062

- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005): Bone substitutes: an update. *Injury* 36, 20-27
- Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., Patterson C (1996): Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137, 2262-2268
- Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM, Oreffo RO (2014): Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 28, 166-207
- Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, et al. (2002): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84, 2123-2134
- Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E (2010): Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 10, 885-901
- Gratzl M: Knochen. In: Junqueira LC, Carneiro J, Kelley R, Gratzl M (Hrsg.): *Histologie*. 5. Auflage. Springer, Berlin 2002, 91-106
- Groger A, Klaring S, Merten HA, Holste J, Kaps C, Sittinger M (2003): Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37, 129-133
- Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N (2017): It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 5, 68
- Gruber R, Weich HA, Dullin C, Schliephake H (2009): Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactic acid and rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* 20, 24-30
- Gruber R, Krohn S, Mauth C, Dard M, Molenberg A, Lange K, Perske C, Schliephake H (2014): Mandibular reconstruction using a calcium phosphate/polyethylene glycol hydrogel carrier with BMP-2. *J Clin Periodontol* 41, 820-826
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M (2009): Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnology Letters* 31, 1817
- Hammerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP (2008): Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res* 19, 19-25
- Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M (2015): Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 94, 3-12
- Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB (1994): Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 93, 2490-2496
- Helary C, Desimone MF (2015): Recent advances in biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol* 16, 635-645

- Helmrich U, Di Maggio N, Guven S, Groppa E, Melly L, Largo RD, Heberer M, Martin I, Scherberich A, Banfi A (2013): Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. *Biomaterials* 34, 5025-5035
- Henkel KO, Ma L, Lenz JH, Jonas L, Gundlach KK (2001): Closure of vertical alveolar bone defects with guided horizontal distraction osteogenesis: an experimental study in pigs and first clinical results. *J Craniomaxillofac Surg* 29, 249-253
- Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V (2006): Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102, 606-613
- Herford AS, Nguyen K (2015): Complex bone augmentation in alveolar ridge defects. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 27, 227-244
- Herford AS, Miller M, Signorino F (2017): Maxillofacial Defects and the Use of Growth Factors. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 29, 75-88
- Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Évora M, Delgado A, Évora C (2012): In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res A* 100, 2382-2391
- Herring SW (1976): The dynamics of mastication in pigs. *Arch Oral Biol* 21, 473-480
- Hillen F, Griffioen AW (2007): Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26, 489-502
- Hinsenkamp M, Muylle L, Eastlund T, Fehily D, Noel L, Strong DM (2012): Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *Int Orthop* 36, 633-641
- Hirose S, Li M, Kojima T, de Freitas PH, Ubaidus S, Oda K, Saito C, Amizuka N (2007): A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining. *J Bone Miner Metab* 25, 374-382
- 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
- Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D (2005): Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol* 23, 821-823
- James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C (2016): A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 22, 284-297
- Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, Meyers L, Sciadini MF (1996): Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 14, 351-369
- Jung RE, Philipp A, Annen BM, Signorelli L, Thoma DS, Hammerle CH, Attin T, Schmidlin P (2013): Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 40, 90-98

- Jung T, Lee JH, Park S, Kim YJ, Seo J, Shim HE, Kim KS, Jang HS, Chung HM, Oh SG, et al. (2017): Effect of BMP-2 Delivery Mode on Osteogenic Differentiation of Stem Cells. *Stem Cells Int* 2017, 7859184
- Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH (2006): VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 21, 735-744
- Kalsi AS, Kalsi JS, Bassi S (2019): Alveolar ridge preservation: why, when and how. *Br Dent J* 227, 264-274
- Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NM, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO (2010): The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31, 1242-1250
- Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, Jiang W, Luu HH, Luo J, Szatkowski JP, et al. (2004): Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 11, 1312-1320
- Kang YH, Kim HM, Byun JH, Kim UK, Sung IY, Cho YC, Park BW (2015): Stability of simultaneously placed dental implants with autologous bone grafts harvested from the iliac crest or intraoral jaw bone. *BMC Oral Health* 15, 172
- Karageorgiou V, Kaplan D (2005): Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491
- Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJ (2009): Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30, 2816-2825
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010): Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 1, 94-99
- Kim Y, Rodriguez AE, Nowzari H (2016): The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. *Clin Implant Dent Relat Res* 18, 1095-1102
- Kim YH, Tabata Y (2015): Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 94, 28-40
- Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann HP (2005): VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1310-1316
- Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L (2011): Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 437, 169-183
- Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH (2002): Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res* 60, 292-299
- Krishnan L, Priddy LB, Esancy C, Klosterhoff BS, Stevens HY, Tran L, Guldborg RE (2017): Delivery vehicle effects on bone regeneration and heterotopic ossification induced by high dose BMP-2. *Acta Biomater* 49, 101-112
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2017): lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. 2017 82, 26

- Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM (2000): VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102, 898-901
- Lee S-H, Shin H (2007): Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 339-359
- Lee Y, Kwon J, Khang G, Lee D (2012): Reduction of inflammatory responses and enhancement of extracellular matrix formation by vanillin-incorporated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng Part A* 18, 1967-1978
- LeGeros RZ (2002): Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*, 81-98
- Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UM (2008): Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: radiographic observations. *Clin Oral Implants Res* 19, 1027-1033
- Li B, Wang H, Qiu G, Su X, Wu Z (2016): Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions. *Biomed Res Int* 2016, 2869572
- Li B, Chen X, Guo B, Wang X, Fan H, Zhang X (2009): Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure. *Acta Biomater* 5, 134-143
- Li CJ, Madhu V, Balian G, Dighe AS, Cui Q (2015): Cross-Talk Between VEGF and BMP-6 Pathways Accelerates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *J Cell Physiol* 230, 2671-2682
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ (1996): Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19, 1-12
- Liu K, Meng CX, Lv ZY, Zhang YJ, Li J, Li KY, Liu FZ, Zhang B, Cui FZ (2020): Enhancement of BMP-2 and VEGF carried by mineralized collagen for mandibular bone regeneration. *Regen Biomater* 7, 435-440
- Loh QL, Choong C (2013): Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev* 19, 485-502
- 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
- Long S, Truong L, Bennett K, Phillips A, Wong-Staal F, Ma H (2006): Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 46, 374-378
- Madhu V, Li CJ, Dighe AS, Balian G, Cui Q (2014): BMP-non-responsive Sca1+ CD73+ CD44+ mouse bone marrow derived osteoprogenitor cells respond to combination of VEGF and BMP-6 to display enhanced osteoblastic differentiation and ectopic bone formation. *PLoS One* 9, e103060
- Marechal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, van Steenberghe D (2005): Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res* 16, 708-714

- Mertens C, Decker C, Seeberger R, Hoffmann J, Sander A, Freier K (2013): Early bone resorption after vertical bone augmentation--a comparison of calvarial and iliac grafts. *Clin Oral Implants Res* 24, 820-825
- Middleton JC, Tipton AJ (2000): Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21, 2335-2346
- Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR (2016): Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater* 30, 1-12
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M (2010): Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147, 35-51
- Moest T, Wehrhan F, Lutz R, Schmitt CM, Neukam FW, Schlegel KA (2015): Extra-oral defect augmentation using autologous, bovine and equine bone blocks: A preclinical histomorphometrical comparative study. *J Craniomaxillofac Surg* 43, 559-566
- Moreira DC, Sa CN, Andrade MG, Borio dos Santos Calmon de Bittencourt TC, de Almeida Reis SR, Pithon MM, Sadigursky M (2013): Angiogenesis and osteogenesis at incorporation process of onlay bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* 71, 2048-2057
- Moser N, Goldstein J, Kauffmann P, Epple M, Schliephake H (2018): Experimental variation of the level and the ratio of angiogenic and osteogenic signaling affects the spatiotemporal expression of bone-specific markers and organization of bone formation in ectopic sites. *Clin Oral Investig* 22, 1223-1234
- Moser N, Lohse N, Golstein J, Kauffmann P, Sven B, Epple M, Schliephake H (2017): Do we need retarded delivery of bone growth factors in facial bone repair? An experimental study in rats. *Eur Cell Mater* 34, 162-179
- Muller R (2003): Bone microarchitecture assessment: current and future trends. *Osteoporos Int* 14, 89-95
- Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rueggsegger P (1998): Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23, 59-66
- Nakai T, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J (2009): Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep* 2, 229-234
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9-22
- Nkenke E, Neukam FW (2014): Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol* 7, 203-217
- Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH (2007): In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28, 1664-1671
- Ohayon L (2011): Ridge enlargement using deproteinized bovine bone and a bioresorbable collagen membrane: a tomodensitometric, histologic, and histomorphometric analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 31, 237-245
- Olthof MGL, Tryfonidou MA, Dadsetan M, Dhert WJA, Yaszemski MJ, Kempen DHR, Lu L (2018): In Vitro and In Vivo Correlation of Bone Morphogenetic Protein-2 Release Profiles from Complex Delivery Vehicles. *Tissue Eng Part C Methods* 24, 379-390

- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM (2004): Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest* 113, 516-527
- Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, 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
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007): Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13, 1-10
- Pearson HB, Mason DE, Kegelman CD, Zhao L, Dawahare JH, Kacena MA, Boerckel JD (2019): Effects of Bone Morphogenetic Protein-2 on Neovascularization During Large Bone Defect Regeneration. *Tissue Eng Part A* 25, 1623-1634
- Pecina M, Vukicevic S (2007): Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. *Int Orthop* 31, 719-720
- Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J (2002): Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110, 751-759
- Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005): VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 2017-2027
- Pietrokovski J (1967): Extraction wound healing after tooth fracture in rats. *J Dent Res* 46, 232-240
- Ramly EP, Alfonso AR, Kantar RS, Wang MM, Siso JRD, Ibrahim A, Coelho PG, Flores RL (2019): Safety and Efficacy of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in Craniofacial Surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 7, e2347
- Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A (2016): Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* 107, 153-162
- Rather HA, Jhala D, Vasita R (2019): Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 103, 109761
- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001): Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19, 1029-1034
- Rottgers SA, Cray JJ, Jr., Smith DM, Mooney MP, Losee JE, Cooper GM (2014): Bone morphogenetic protein 2-mediated mandible reconstruction successfully heals bony defects but inhibits concurrent inferior alveolar nerve grafting: a rabbit experimental model. *J Craniofac Surg* 25, 2241-2245
- 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
- Saaddeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (2000): Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 141, 2075-2083
- Saarela RK, Soini H, Hiltunen K, Muurinen S, Suominen M, Pitkala K (2014): Dentition status, malnutrition and mortality among older service housing residents. *J Nutr Health Aging* 18, 34-38

-
- Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A (2017): Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent* 3, 23
- Salvi GE, Monje A, Tomasi C (2018): Long-term biological complications of dental implants placed either in pristine or in augmented sites: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 29, 294-310
- Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S (2008): Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci* 108, 18-31
- Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014): Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 561, 109-117
- Scarfi S (2016): Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World J Stem Cells* 8, 1-12
- Schiller C, Epple M (2003): Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials* 24, 2037-2043
- Schiller C, Rasche C, Wehmöller M, Beckmann F, Eufinger H, Epple M, Weihe S (2004): Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate. *Biomaterials* 25, 1239-1247
- Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW, Rupprecht S, Thorwarth M (2006): Changes of mineralization of free autogenous bone grafts used for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 17, 673-678
- Schliephake H (2010): Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14, 17-22
- Schliephake H, Aleyt J (1998): Mandibular onlay grafting using prefabricated bone grafts with primary implant placement: an experimental study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 384-393
- Schliephake H, Jamil MU, Knebel JW (1998): Experimental reconstruction of the mandible using polylactic acid tubes and basic fibroblast growth factor in alloplastic scaffolds. *J Oral Maxillofac Surg* 56, 616-626
- 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* 83, 455-462
- Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S (2008): Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid--an experimental study in rats. *Biomaterials* 29, 103-110
- 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
- Schmitz JP, Hollinger JO (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 299-308
- Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD (1990): Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)* 138, 185-192

- Schorn L, Sproll C, Ommerborn M, Naujoks C, Kubler NR, Depprich R (2017): Vertical bone regeneration using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med* 13, 11
- Schroeder HE: *Pathobiologie oraler Strukturen*. 3. Auflage; Karger, Basel 1991
- Shapiro F (2008): Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15, 53-76
- Shapiro F, Wu JY (2019): Woven bone overview: structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups. *Eur Cell Mater* 38, 137-167
- Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ (2004): Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35, 562-569
- Solheim E (1998): Growth factors in bone. *Int Orthop* 22, 410-416
- Spin-Neto R, Stavropoulos A, Dias Pereira LA, Marcantonio E, Jr., Wenzel A (2013): Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clin Oral Implants Res* 24, 167-173
- Spin-Neto R, Stavropoulos A, Coletti FL, Faeda RS, Pereira LA, Marcantonio E, Jr. (2014): Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 25, 226-233
- Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G (2015): Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70, 19-27
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, et al. (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9656-9661
- Stutzle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L (1998): [Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]. *Orthopade* 27, 118-125
- Taichman RS (2005): Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631-2639
- Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H (2011): Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J Bone Miner Metab* 29, 442-448
- Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, Soini Y, Yla-Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T (2003): Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med* 5, 560-566
- Thi MM, Suadicani SO, Spray DC (2010): Fluid flow-induced soluble vascular endothelial growth factor isoforms regulate actin adaptation in osteoblasts. *J Biol Chem* 285, 30931-30941
- Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W (2005): Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc* 218, 171-179
- Tonetti MS, Jung RE, Avila-Ortiz G, Blanco J, Cosyn J, Fickl S, Figuero E, Goldstein M, Graziani F, Madianos P, et al. (2019): Management of the extraction socket and timing of implant placement: Consensus report and clinical recommendations of group 3 of the XV European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 46, 183-194

-
- Triffitt JT (2002): Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *J Biomed Mater Res* 63, 384-389
- Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, Boyne PJ (2009): Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 1947-1960
- Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, Rau A, Schliephake H (2016): Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg* 44, 1618-1629
- Tsutsumi H, Katagiri K, Takeda S, Nasu T, Igarashi S, Tanigawa M, Mamba K (2004): Standardized data and relationship between bone growth and bone metabolism in female Gottingen minipigs. *Exp Anim* 53, 331-337
- Uccelli A, Wolff T, Valente P, Di Maggio N, Pellegrino M, Gurke L, Banfi A, Gianni-Barrera R (2019): Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Med Wkly* 149, w20011
- 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 (2002): Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res*, 4-10
- Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U (2002): Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 94, 185-194
- Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascão R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, et al. (2012): Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port* 37, 294-300
- Vieira WA, McCusker CD (2018): Regenerative Models for the Integration and Regeneration of Head Skeletal Tissues. *Int J Mol Sci* 19
- Wang Q, Zhang Y, Li B, Chen L (2017): Controlled dual delivery of low doses of BMP-2 and VEGF in a silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for vascularized bone regeneration. *J Mater Chem B* 5, 6963-6972
- Wang T, Guo S, Zhang H (2018): Synergistic Effects of Controlled-Released BMP-2 and VEGF from nHAC/PLGAs Scaffold on Osteogenesis. *Biomed Res Int* 2018, 3516463
- Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Bouxsein ML, Faugere MC, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, et al. (2007): The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117, 1616-1626
- Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ (2012): Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *J Hand Ther* 25, 123-131
- Whang PG, Wang JC (2003): Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J* 3, 155-165
- Wietecha MS, DiPietro LA (2013): Therapeutic Approaches to the Regulation of Wound Angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2, 81-86

-
- Wiltfang J, Kessler P, Merten HA, Neukam FW (2001): Continuous and intermittent bone distraction using a microhydraulic cylinder: an experimental study in minipigs. *Br J Oral Maxillofac Surg* 39, 2-7
- Wozney JM (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32, 160-167
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
- Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, Hou H, Tang T, Fan X (2011): Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater* 6, 015013
- Yamada M, Egusa H (2018): Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res* 62, 152-161
- Ye L, Jiang WG (2016): Bone morphogenetic proteins in tumour associated angiogenesis and implication in cancer therapies. *Cancer Lett* 380, 586-597
- Yin T, Li L (2006): The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116, 1195-1201
- Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, Sasaki T, Miura M (2005): Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Clin Oncol* 10, 318-327
- Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M, et al. (2009): Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A* 15, 2347-2362
- Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, Li W, Chiang M, Chung J, Kwak J, et al. (2011): High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 17, 1389-1399
- Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G (2003): Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 15-22
- Zhang W, Wang X, Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, Zeng D, Chen J, Zhang Z, Kaplan DL, et al. (2011): The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF(165) and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials* 32, 9415-9424

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Henning Schliephake und Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Philipp Kauffmann für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. med. dent. Petra Santander, Herrn Dr. med. Dr. med. dent. Markus Tröltzsch und Herr Dr. med. Dr. med. dent. Norman Moser für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und deren ausdauernde Bereitschaft zur wissenschaftlichen und technischen Unterstützung bedanken.

Für die stete Hilfsbereitschaft bei den Arbeiten in den Laboreinrichtungen möchte ich mich sehr herzlich bei allen technischen Mitarbeiterinnen der Abteilung für MKG-Chirurgie, insbesondere bei Frau Schäfer, Frau Kant und Frau Schulz, bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Andreas Leha von der Wissenschaftlichen Serviceeinheit „Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik“ für die eingehende Beratung und Durchführung der statistischen Analysen.

