



Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Hermann Lang

**GESTEUERTE REGENERATION PERIIMPLANTÄRER
KNOCHENDEFEKTE UNTER ANWENDUNG VERSCHIEDENER
KOLLAGENE, XENOGENER WACHSTUMSFAKTOREN UND
AUTOLOGER PDLSCS**

-

EINE VERGLEICHSTUDIE AM GÖTTINGER MINIATURSCHWEIN

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae

(Dr. med. dent.)

Vorgelegt von

Maria Baudisch

geboren am 13.12.1989 in Gardelegen

Rostock, April 2018

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Lang, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Nebe, Arbeitsbereich Zellbiologie,
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Univ. – Prof. Dr. James Deschner,
Poliklinik für Parodontologie und Zahnerhaltung, Universitätsmedizin Mainz

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2019

Veröffentlichung

Teile der Studie wurden veröffentlicht unter:

Kämmerer, P. W., Scholz, M., Baudisch, M., Liese, J., Wegner, K., Frerich, B., & Lang, H. (2017). Guided bone regeneration using collagen scaffolds, growth factors, and periodontal ligament stem cells for treatment of peri-implant bone defects in vivo. *Stem cells international*, 2017(3):1-9.

Förderung:

Die Studie wurde im Rahmen des Syntero-Landesprojektes finanziell unterstützt (Ministerium für Wirtschaft, Arbeit und Tourismus Mecklenburg-Vorpommern, Nr. V-630-S-083-2010/245).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Einheiten.....	X
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Periimplantitis	1
1.1.1 Aufbau der periimplantären Hart- und Weichgewebe.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3 Therapie	4
1.2 Gesteuerte Knochenregeneration	4
1.3 Wachstumsfaktoren	7
1.4 Dentale Stammzellen.....	9
1.5 Ziele der Studie	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Studiendesign.....	12
2.2 Versuchstiere.....	14
2.3 Materialien	14
2.3.1 Semipermeable Kollagenmembran.....	14
2.3.2 Implantate mit CaP-Beschichtung.....	14
2.3.3 Kollagenmatrix.....	15
2.3.4 Kollagenpulver	15
2.3.5 Kollagenvlies	15
2.3.6 Wachstumsfaktoren	16
2.3.7 Stammzellen.....	16
2.4 Operatives Vorgehen.....	17
2.4.1 Narkose	17
2.4.2 Phase 1: Extraktion und Gewebeentnahme	17

2.4.3	Phase 2: Implantation und Schaffung zirkulärer Defekte.....	18
2.4.4	Phase 3: Polychrome Sequenzmarkierungen	19
2.5	Labortechnisches Vorgehen	20
2.5.1	Isolierung und Kultivierung der Stammzellen	20
2.5.2	Stammzellcharakterisierung.....	22
2.5.3	Materialtestungen prae implantationem	23
2.6	Probengewinnung.....	26
2.6.1	Euthanasie	26
2.6.2	Herstellung der histologischen Schnitte	26
2.7	Auswertungen.....	27
2.7.1	Histomorphometrische Analyse	27
2.7.2	Statistik.....	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Stammzellcharakterisierung.....	29
3.2	Materialtestungen	31
3.3	Histomorphometrische Analyse	32
3.3.1	Bone to Implant Contact (BIC).....	33
3.3.2	New Bone Height (NBH).....	35
3.3.3	Newly Formed Bone (NFB).....	37
4	DISKUSSION	39
4.1	Studiendesign.....	39
4.1.1	Modell Periimplantitis.....	39
4.1.2	Minischwein als Versuchstier.....	40
4.1.3	Methodik.....	40
4.2	Materialien	42
4.2.1	Semipermeable Kollagenmembran.....	42
4.2.2	Implantate mit CaP-Beschichtung.....	43
4.2.3	Kollagenmatrix.....	43

4.2.4	Kollagenpulver	44
4.2.5	Kollagenvlies	45
4.3	Wachstumsfaktoren	46
4.4	Stammzellen aus dem parodontalen Ligament	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	THESEN	50
	Literaturverzeichnis	51
	Anhang	66

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BIC	Bone to Implant Contact
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
BMSCs	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
BV	BONITmatrix®-Vlies
BVWF	BONITmatrix®-Vlies + Wachstumsfaktoren
CaP	Calciumphosphat
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DFDBA	Demineralized Freeze Dried Bone Allograft
DFSCs	Dental Follicle Stem Cells
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMEM-F ₁₂	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DPSCs	Dental Pulp Stem Cells
dPTFE	high-density Polytetrafluorethylen
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid

EGF	Epidermal Growth Factor
ePTFE	expanded Polytetrafluorethylen
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FDBA	Mineralized Freeze Dried Bone Allograft
FGFs	Fibroblast Growth Factors
FKS	Fetales Kälberserum
GBR	Guided Bone Regeneration
GTR	Guided Tissue Regeneration
HA	Hydroxylapatit
HBA	Horizontal Bone Apposition
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – antigen D Related
hMSCs	human Mesenchymal Stem Cells
IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferron γ
IGFs	Insulin-like Growth Factors
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IS-BC	Implant Shoulder to Bone Crest-level

ISO	Internationale Organisation für Normung
KM	Kollagenmatrix
KM/WF	Kollagenmatrix + Wachstumsfaktoren
KP	Kollagenpulver
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
n	Anzahl
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBH	New Bone Height
NFB	Newly Formed Bone
NHS	N-Hydroxysuccinimid
p	Wahrscheinlichkeit
P1	1. Prämolare
P2	2. Prämolare
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-buffered Saline
PDGFs	Platelet-derived Growth Factors
PDLSCs	Periodontal Ligament Stem Cells
PRP	Platelet Rich Plasma
P/S	Penicillin/Streptomycin
rhBMP-2	recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2

ROI	Region of Interest
SCAP	Stem Cells from Apical Papilla
SHED	Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth
SLA	Sandblasted, Large Grit, Acid-etched
TCP	Tricalciumphosphat
TE	Tissue Engineering
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vv.	Venae
WF	Wachstumsfaktoren

Einheiten

g	Gramm
h	Stunden
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
nm	Nanometer
pg	Picogramm
pH	potentia Hydrogenii
U/min	Umdrehungen pro Minute
µl	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau Zahn und Implantat im Vergleich.....	1
Abbildung 2: Faserverlauf Zahn und Implantat im Vergleich	2
Abbildung 3: Stammzellteilung	9
Abbildung 4: Work-Flow.....	12
Abbildung 5: Implantationsschema	13
Abbildung 6: PDLSCs mit fibroblastenähnlicher Struktur.....	16
Abbildung 7: Implantation und Schaffung zirkulärer Defekte	19
Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme der PDLSCs	22
Abbildung 9: Applikation von Kollagenpulver und PDLSCs	26
Abbildung 10: Auswertungsschema	28
Abbildung 11: Nachweis CD29	29
Abbildung 12: Nachweis CD44	30
Abbildung 13: Nachweis CD45	30
Abbildung 14: Life-Death-Färbung der PDLSCs.....	31
Abbildung 15: Life-Death-Färbung der PDLSCs in Kollagenpulver.....	32
Abbildung 16: Mangelhafter histologischer Schnitt	33
Abbildung 17: BIC grafische Darstellung.....	34
Abbildung 18: BIC histologische Ansicht.....	35
Abbildung 19: NBH grafische Darstellung	36
Abbildung 20: NFB Fluoreszenz.	37
Abbildung 21: NFB grafische Darstellung.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf Osteoblasten in vitro	8
Tabelle 2: Spülprotokoll	18
Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Medien	21
Tabelle 4: Eigenschaften humaner dentaler MSCs	23
Tabelle 5: Verdünnungsreihen	24
Tabelle 6: Materialtestungen	25
Tabelle 7: BIC Mittelwerte und Standardabweichungen	34
Tabelle 8: NBH Mittelwerte und Standardabweichungen	36
Tabelle 9: NFB Mittelwerte und Standardabweichungen	38

1 EINLEITUNG

1.1 Periimplantitis

1.1.1 Aufbau der periimplantären Hart- und Weichgewebe

Die Periimplantitis ist eine entzündliche Erkrankung der periimplantären Hart- und Weichgewebe. Sie geht, analog zur Parodontitis, mit Knochenverlust einher und kann unbehandelt zum späten Implantatverlust führen (Zitzmann et al. 2006). Ein Implantat ist ein künstlicher, anorganischer Ersatz eines bereits fehlenden oder nicht erhaltungswürdigen Zahnes. Aus diesem Umstand ergeben sich einige Gemeinsamkeiten, aber auch grundlegende Unterschiede der umliegenden anatomischen Strukturen im Vergleich zum Zahnhalteapparat (Listgarten et al. 1991) (Abb. 1). Während sich das Parodontium in die Bestandteile Gingiva, Desmodont oder parodontales Ligament, Wurzelzement und Alveolarknochen gliedert, befinden sich in direkter Umgebung des Implantates lediglich die periimplantäre Mukosa und der periimplantäre Knochen.

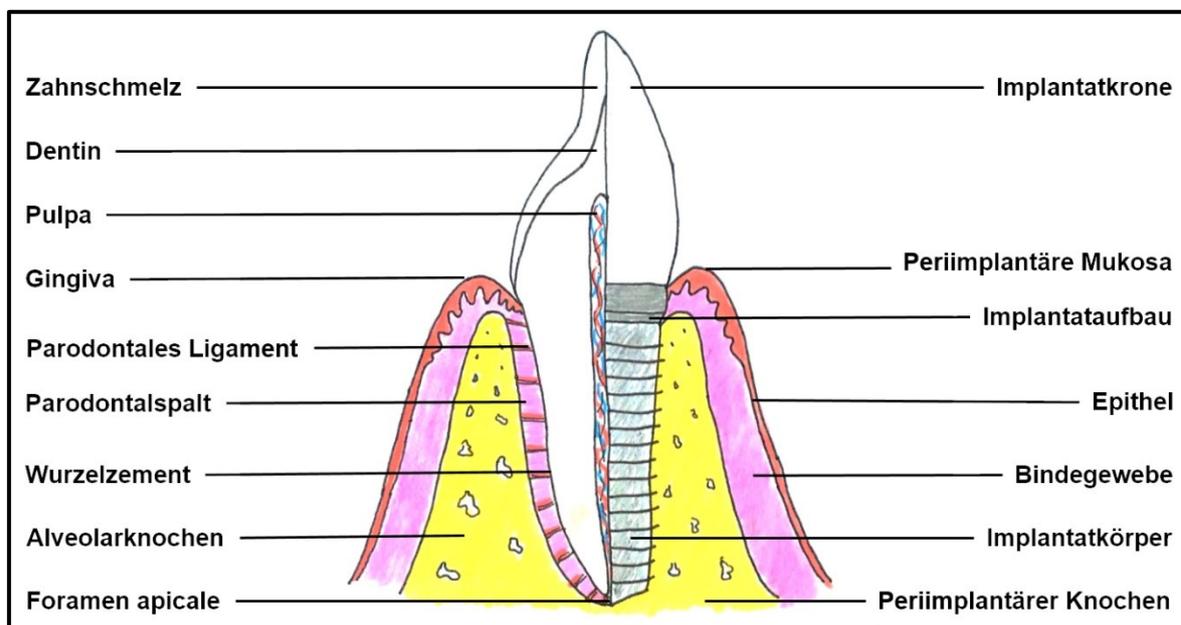


Abbildung 1: Aufbau Zahn und Implantat im Vergleich

Die periimplantäre Mukosa tritt mit der Implantatoberfläche über ein epitheliales und bindegewebiges Attachment in Kontakt. Das Epithel haftet wie beim natürlichen Zahn über eine Basallamina und Hemidesmosomen am Implantat (Listgarten et al. 1991).

Das darunter liegende Bindegewebe unterscheidet sich in der hauptsächlich parallelen Ausrichtung der Kollagenfasern (Abb. 2), enthält weniger Fibroblasten und ist insgesamt schwächer vaskularisiert (Listgarten et al. 1991).

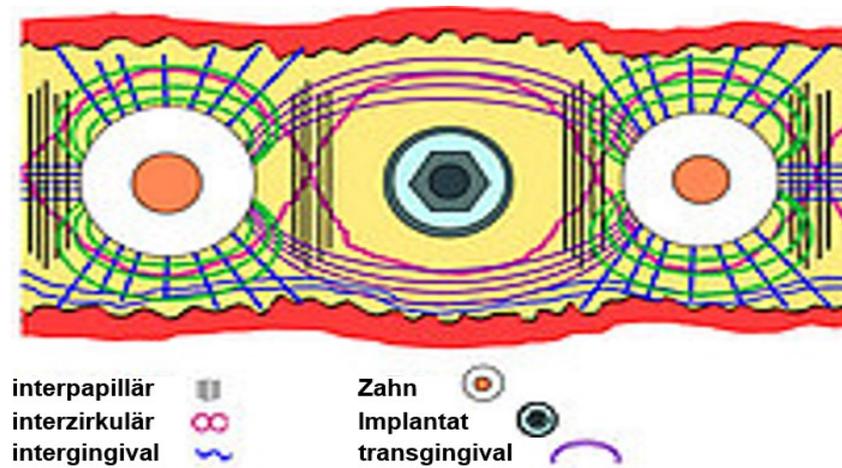


Abbildung 2: Faserverlauf Zahn und Implantat im Vergleich (Zitzmann et al. 2006, nach Page et al. 1974)

Hinsichtlich der knöchernen Verankerung unterscheiden sich Zahn und Implantat. Während der natürliche Zahn über das Desmodont und Wurzelzement federnd-elastisch in der Alveole aufgehängt ist, geht die Implantatoberfläche eine starre Verbindung mit dem umliegenden Knochen ein. Schroeder et al. definierten diesen Zustand als „funktionelle Ankylose“ (Schroeder et al. 1981). Andere Autoren sprachen von Osseointegration als lichtmikroskopisch sichtbarem, direkten Knochenkontakt (Albrektsson & Jacobsson 1987, Brånemark 1983, Listgarten et al. 1991).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Entzündliche Prozesse können die periimplantären Strukturen kompromittieren. Die periimplantäre Mukositis ist ein reversibler Zustand und entspricht der Gingivitis an natürlichen Zähnen. Ist der periimplantäre Knochen ebenfalls vom inflammatorischen Geschehen betroffen und zeigt dieser Abbauprozesse, lautet die Diagnose Periimplantitis (Zitzmann et al. 2006). Für die Entstehung der periimplantären Mukositis ist das Vorhandensein einer bakteriellen Plaque, neben anderen Faktoren, essenziell. Zahlreiche tierexperimentelle sowie klinische Studien lieferten in der Vergangenheit dafür den Nachweis (Berglundh et al. 1992, Lang et al. 1993, Pontoriero et al. 1994, Zitzmann et al. 2001). Die im Speichel vorhandenen Mikroorganismen besiedeln die Zahn- und

Implantatoberflächen gleichermaßen über die Bindung an Glykoproteine des Pellikels (Lang et al. 2000). Infolge der Plaqueakkumulation steigt die Exposition antigener Substanzen. Letztendlich wird eine Entzündungsreaktion induziert, die zunächst auf das Weichgewebe beschränkt ist (Berglundh et al. 1992). Bleibt dieser Zustand über einen längeren Zeitraum bestehen, kann sich die entzündliche Destruktion auf den periimplantären Knochen ausweiten, was die Grenze zur Periimplantitis darstellt (Zitzmann et al. 2006). Entzündliche Prozesse breiten sich zirkulär um das Implantat aus. Unbehandelt führten diese Prozesse im Tierversuch entweder zu einer bindegewebigen Abkapselung und Chronifizierung der Entzündung oder zu einem Fortschreiten des Knochenabbaus bis hin zum Implantatverlust (Marinello et al. 1995).

Klinisch manifestiert sich die Periimplantitis durch erhöhte Sondierungstiefen und den Austritt von eitrigem Exsudat aus dem periimplantären Sulkus. Radiologisch zeigen sich schüsselförmige Defekte (Lang et al. 2000, Zitzmann et al. 2006). Trotz teilweise fortgeschrittener entzündlicher Destruktion geht die Erkrankung, im Gegensatz zur Parodontitis, vorerst nicht mit erhöhter Implantatmobilität einher. Der apikale Teil des Implantates bleibt lange Zeit osseointegriert (Lang et al. 2000). Mikrobiologisch ähnelt das Keimspektrum dem des natürlichen Zahnes im Krankheitsverlauf von der Gingivitis zur Parodontitis. Gramnegative, anaerobe Stäbchen dominieren das periimplantitische Krankheitsstadium (Leonhardt et al. 1992 und 1993).

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer Periimplantitis zählen, neben inadäquater Mundhygiene, eine parodontale Vorgeschichte, Diabetes und Tabakkonsum (Lindhe & Meyle 2008). Ebenso spielen häufig iatrogene Faktoren bei der Krankheitsentstehung eine Rolle. Technische Komplikationen, wie verbliebene Zementreste, fehlerhafte Positionierung des Implantates oder Überkonturierung der Suprakonstruktion, müssen vor der Behandlung erkannt und beseitigt werden (Lang & Berglundh 2011). Hinsichtlich der Prävalenz periimplantärer Erkrankungen finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben, was vor allem an unterschiedlichen Falldefinitionen, Beobachtungszeiträumen und diagnostischen Kriterien liegt (Mombelli et al. 2012). Eine aktuelle Literaturstudie und Meta-Analyse von Derks & Tomasi kam zu dem Ergebnis, dass eine periimplantäre Mukositis im Mittel in 43 % der Fälle und eine Periimplantitis bei 22 %, der mit Implantaten versorgten Patienten, auftrat (Derks & Tomasi 2015). Diese Werte machen jedoch keinerlei Aussage über Schwere oder Verlauf der Erkrankungen.

1.1.3 Therapie

Unter den vielfältigen chirurgischen und nicht-chirurgischen Behandlungsmöglichkeiten existiert bis heute kein Therapieprotokoll, das einen sicheren Behandlungserfolg garantiert (Zitzmann et al. 2006). Nicht-chirurgische Maßnahmen dienen vor allem der Bekämpfung der Mukositis und werden in der Anfangsphase der Periimplantitis-Therapie zur Schaffung adäquater hygienischer Verhältnisse angewendet. Diese Initialphase umfasst die professionelle Plaqueentfernung und –kontrolle, einschließlich der Instrumentierung der Implantatoberflächen und des chemischen Biofilm-Managements durch beispielsweise Chlorhexidin-Präparate (Mellado-Valero et al. 2013, Zitzmann et al. 2006). Unterstützend kann sich die Anwendung von Lasern vorteilhaft auf die Oberflächendekontamination auswirken (Schwarz et al. 2005). Eine lokale oder systemische Antibiotika-Gabe zum Ende der Initialphase wurde von den Autoren Mombelli & Lang positiv bewertet (Mombelli & Lang 1992, Mombelli et al. 2001).

Periimplantäre Defekte, die mit Knochenverlust und Sondierungstiefen > 5 mm einhergehen, machen eine chirurgische Intervention erforderlich (Daugela et al. 2016, Ramanauskaite et al. 2016). Man unterscheidet zwischen resektiven und regenerativen chirurgischen Verfahren. Ziel der resektiven Therapie ist eine Schaffung periimplantärer Verhältnisse, die die Implantatoberflächen einer optimalen Reinigung zugänglich machen (Daugela et al. 2016). Romeo et al. konnten mit einer kombinierten Resektion und anschließender Implantoplastik über drei Jahre zufriedenstellende Ergebnisse erzielen (Romeo et al. 2005 und 2007). Die resultierende Freilegung der Implantatwurzel bringt jedoch gerade im ästhetisch anspruchsvollen Frontzahnbereich Probleme mit sich (Lang et al. 2000). Beim regenerativen Therapie-Ansatz stehen die erneute Osseointegration und die Wiederherstellung einer physiologischen Einheit aus periimplantären Hart- und Weichgeweben im Vordergrund. Dazu können Membranen, verschiedene Knochenersatzmaterialien, Wachstumsfaktoren und Stammzellen Anwendung finden (Mahato et al. 2016).

1.2 Gesteuerte Knochenregeneration

Die gesteuerte Knochenregeneration (GBR) ist ein chirurgisches Verfahren, bei dem es osteogenen Zellen ermöglicht wird, einen knöchernen Defekt zu besiedeln und entsprechend zu regenerieren. Gleichzeitig werden durch die Platzierung einer Barrieremembran die schneller proliferierenden Epithel- und Bindegewebszellen ausgeschlossen (Dahlin et al. 1988, Nyman 1991, Schenk et al. 1994). Das Prinzip, dass verschiedene Zellen und Gewebe mit unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten

um die Besiedlung eines Kompartimentes konkurrieren, wurde von Melcher bereits 1976 für die parodontale Wundheilung beschrieben (Melcher 1976). In der Implantologie wurde das Verfahren, in Anlehnung an die gesteuerte Geweberegeneration (GTR), vielfach für den Aufbau und die Verbesserung des Knochenlagers verwendet (Buser et al. 1990, Dahlin et al. 1989, Schenk et al. 1994). So untersuchten Schenk et al. beispielsweise die Heilung von großen Knochendefekten am Hundekiefer, welche ohne Membranabdeckung keine vollständige Heilung zeigten (Schenk et al. 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Barrieremembran verschiedene Effekte zugeschrieben. Die Membran stützt das Weichgewebe und verhindert dessen Kollabieren, wodurch der nötige Raum für die Osteogenese offeriert wird. In diesem Raum kann ein stabiles Blutkoagulum entstehen. Später wird daraus Granulationsgewebe mit neuer Vaskularisierung, was essenziell für die Einwanderung osteogener Zellen ist. Es entsteht eine hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren des Blutes im Kompartiment. Gleichzeitig werden die Epithelzellen ausgeschlossen und somit die Bildung eines langen Saumepithels verhindert (Schenk et al. 1994). Wang & Boyapati definierten vier Voraussetzungen für eine erfolgreiche Knochenregeneration, basierend auf den Prinzipien der Wundheilung (Wang & Boyapati 2006):

1. Primärer Wundverschluss, um eine ungestörte Heilung zu ermöglichen
2. Angiogenese zur ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen und Ermöglichung der Migration von mesenchymalen Stammzellen
3. Raum für das Knochenwachstum
4. Entstehung eines stabilen Blutkoagulums

Man unterscheidet nicht-resorbierbare von resorbierbaren Membranen. Zu ersteren zählen die Polytetrafluorethylen-Membranen (e-PTFE und d-PTFE) sowie PTFE-Membranen mit Titanverstärkung und Titanmeshs. Diese unflexiblen, robusten Abdeckungen bringen einige Komplikationen mit sich. Ihre hohe Steifigkeit verlangt eine zusätzliche Fixierung mit beispielsweise Minischrauben (Liu & Kerns 2014). Die fehlende Resorbierbarkeit macht die Entfernung der Membran in einem Zweiteingriff notwendig (Roccuzzo et al. 1996). Eine Membranexposition mit bakterieller Kontamination kann außerdem eine frühzeitige Entfernung erforderlich machen (Tempo & Nalbandian 1993). Bei einem insuffizienten Wundverschluss treten zudem vermehrt Wunddehiszenzen und gingivale Rezessionen auf (Murphy 1995 a und 1995 b).

Durch die Verwendung resorbierbarer Membranen wird die Entfernung in einem zweiten Eingriff unnötig. Synthetische Polyester-Membranen aus Polylactid, Polyglycolid oder Polycaprolacton sind ebenso handelsüblich wie solche aus dem Naturstoff Kollagen (Hutmacher et al. 1996). Polyester haben den Vorteil, dass ihre Herstellung und

Verwendung nahezu unabhängig von natürlichen Ressourcen ist. Sie sind über den Krebszyklus, mit den Endprodukten Kohlenstoffdioxid und Wasser, vollständig biodegradierbar (Hutmacher et al. 1996). Bei ihrem Abbau entstehen jedoch die sauren Zwischenprodukte Pyruvat und Milchsäure. Die synthetischen Materialien stehen deshalb im Verdacht, eine vorübergehende entzündliche Gewebereaktion hervorzurufen. Sie lassen sich des Weiteren nicht heiß sterilisieren (Athanasίου et al. 1996).

Natürliche Kollagenmembranen bestehen hauptsächlich aus Kollagen Typ I oder einer Mischung aus Typ I und III. Das Kollagen wird hauptsächlich aus bovinen oder porcinen Sehnen und Haut gewonnen (Bunyaratavej & Wang 2001). Kollagenmembranen haben einen positiven Einfluss auf die Hämostase und verursachen wenig postoperativen Schmerz (Rastogi et al. 2009). Das Strukturprotein Kollagen hat einen direkten Einfluss auf die Blutgerinnung (Farndale et al. 2004). Die Membranen wirken chemotaktisch auf Fibroblasten (Postlethwaite et al. 1978) und beeinflussen die Knochenbildung (Rothamel et al. 2004).

Resorbierbaren Membranen fehlt es im Allgemeinen an Steifigkeit, was zum Kollabieren der Abdeckungen führen kann. Zur Unterstützung gegen den Weichgewebedruck kommen deshalb zusätzliche Füllstoffe oder Knochenersatzmaterialien zur Anwendung (Liu & Kerns 2014). Diese garantieren den nötigen Raum für die Knochenbildung und fungieren als Gerüst für die vaskulären und osteogenen Zellen (Kay et al. 1997). Knochenersatzmaterialien wirken entweder osteogen, osteoinduktiv oder osteokonduktiv (Misch & Dietsch 1993). Man unterscheidet zwischen autogenen, allogenen, alloplastischen oder xenogenen Materialien. Autogener Knochen verbindet die drei Mechanismen Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion und gilt als Goldstandard der Knochenersatzmaterialien (Liu & Kerns 2014, Misch & Dietsch 1993, Schwarz et al. 2007). Allogener Knochen stammt von einem Individuum derselben Spezies und wirkt osteoinduktiv und -konduktiv. Klassische Vertreter sind entmineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (DFDBA) und mineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (FDBA) (Liu & Kerns 2014). Alloplastische Gerüststoffe, wie Calciumcarbonat, Calciumsulfat, bioaktives Glas oder Tricalciumphosphat (TCP), werden synthetisch hergestellt und wirken osteokonduktiv (Liu & Kerns 2014). Xenogene Knochenersatzmaterialien stammen von Individuen fremder Spezies und wirken osteokonduktiv.

Ein Vertreter der xenogenen Gerüststoffe, welcher im Zusammenhang mit gesteuerter Knochenregeneration jedoch erst wenig untersucht wurde, ist Kollagen. Das Strukturprotein ist ein wesentlicher organischer Bestandteil von Bindegewebe und Extrazellulärmatrix. Kollagen Typ I macht zudem 90 % der organischen Knochenmatrix aus (Lind 1998). Aufgrund seiner guten Biokompatibilität, der biologischen Abbaubarkeit und der geringen

Immunogenität wurde Kollagen bereits vielfach im Tissue Engineering (TE) verwendet. Auch für regenerative Zwecke ist es ein geeignetes Trägermaterial. Kollagengerüste haben eine hohe Porosität und unterstützen die Haftung, das Wachstum und die Funktion vieler verschiedener Zelltypen (Glowacki & Mizuno 2008). *In vivo* konnte für verschiedene Kollagenmaterialien eine gesteigerte Knochenregeneration nachgewiesen werden (Fu et al. 2012, Schwarz et al. 2007). *In vitro* wurde zudem eine gesteigerte Plättchenaktivierung und Zytokinausschüttung in Gegenwart von Kollagen-Matrices beobachtet (Kämmerer et al. 2014). Wie bei den Kollagenmembranen ist die Hauptquelle kollagener Gerüststoffe Rinder- oder Schweinehaut. Diese bergen die potenzielle Gefahr von Zoonosen, beispielsweise BSE-Übertragungen. Hinzu kommt die steigende Ablehnung durch bestimmte Religionsgruppen (Easterbrook & Maddern 2008). Eine Alternative bietet marines Kollagen (Silva et al. 2014), welches zum Beispiel aus Fischabfällen, wie Schuppen, Haut und Gräten oder aus Quallen gewonnen werden kann (Yamada et al. 2014).

1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind biologisch aktive Polypeptide, die über eine Bindung an zellspezifische Rezeptoren Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Metabolismus einer Zielzelle steuern (Barrientos et al. 2008). Komplexe Vorgänge, wie die Wundheilung, hängen vom Zusammenspiel vieler verschiedener Zelltypen ab, welches durch Wachstumsfaktoren koordiniert wird. Unmittelbar nach einem Trauma werden die Faktoren aus dem Serum verletzter Blutgefäße oder von Thrombozyten freigesetzt und initiieren Reparaturvorgänge. Es kommt zu einer Reihe von Abläufen, die eine lokale Entzündung, die Bildung von Granulationsgewebe, neue Gewebsbildung und -umbau und schließlich die Wiederherstellung der Wundfläche umfassen (Barrientos et al. 2008, Werner & Grose 2003). Auch im Knochen wird die Heilung nach einem Trauma von Wachstumsfaktoren initiiert und gesteuert. Die entsprechenden Faktoren werden von Osteoblasten gebildet oder stammen aus dem Blutserum und liegen gebunden in der Knochenmatrix vor. In Folge von Verletzungen oder durch den physiologischen Knochenmetabolismus werden sie freigesetzt (Canalis et al. 1988). Nach ihrer Freisetzung regulieren sie die Funktionen von Osteoblasten und Osteoklasten und greifen so in die komplexen Vorgänge des Bone-Remodeling ein (Lind 1998).

Unter der Vielzahl an bekannten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind einige für den Knochenstoffwechsel von besonderer Bedeutung. Dazu zählen der Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Platelet-derived

Growth Factors (PDGFs), Insulin-like Growth Factors (IGFs), Fibroblast Growth Factors (FGFs) und der Epidermal Growth Factor (EGF). Ihre Wirkung auf Osteoblasten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Wachstumsfaktor	Proliferation	Alkalische Phosphatase	Kollagensynthese	Chemotaxis
TGF-β1	+++	--/+	++	+++
BMP-2,3	0	++	0	+
BMP-7	+	+++	+	ND
PDGF-BB	++	0/-	0	+++
PDGF-AA	+	0	0	+
IGF-1	++	0	+	+
IGF-2	+	0	0	+
FGF-basisch	+	0	0	+
FGF-sauer	0	0	0	0
EGF	+	0	0	0

Tabelle 1: Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf Osteoblasten *in vitro*
 „+“ – Stimulierung; „-“ – Hemmung; „0“ – kein Einfluss; „ND“ – nicht definiert (Lind 1998)

Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf Knochenheilung und –umsatz hat der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). VEGF induziert die Angiogenese, fördert die Osteoblastendifferenzierung und die Reifung des Kallus (Street et al. 2002). Thrombozytenaufbereitungen, wie Platelet Rich Plasma (PRP), vereinen die Effekte gleich mehrerer Wachstumsfaktoren miteinander und liefern somit einen interessanten Therapieansatz (Albanese et al. 2013, Anitua 1999, Fuerst et al. 2003). Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften war die Anwendung einzelner oder kombinierter Wachstumsfaktoren für regenerative Zwecke in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher

in vitro- und *in vivo*-Studien (Hollinger et al. 2008, Lynch et al. 1991, Ortolani et al. 2014, Simion et al. 2006, Street et al. 2002). Trotz der zahlreichen Bemühungen finden bisher lediglich PDGF in der Parodontologie und BMP-2 und 7, für Sinusbodenelevationen und Kieferkammaugmentationen, klinische Anwendung (Stavropoulos & Wikesjö 2012).

1.4 Dentale Stammzellen

Stammzellen besitzen zwei charakteristische Eigenschaften:

1. Es handelt sich um unspezialisierte Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch Zellteilung.
2. Sie können sich unter bestimmten Bedingungen zu spezialisierten Zellen, mit entsprechenden Funktionen, differenzieren (National Institutes of Health 2016).

Bei der asymmetrischen Teilung entstehen jeweils eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle. Läuft die Teilung symmetrisch ab, entstehen entweder zwei Stammzellen oder zwei differenzierte Zellen (Morrison & Kimble 2006) (Abb. 3).

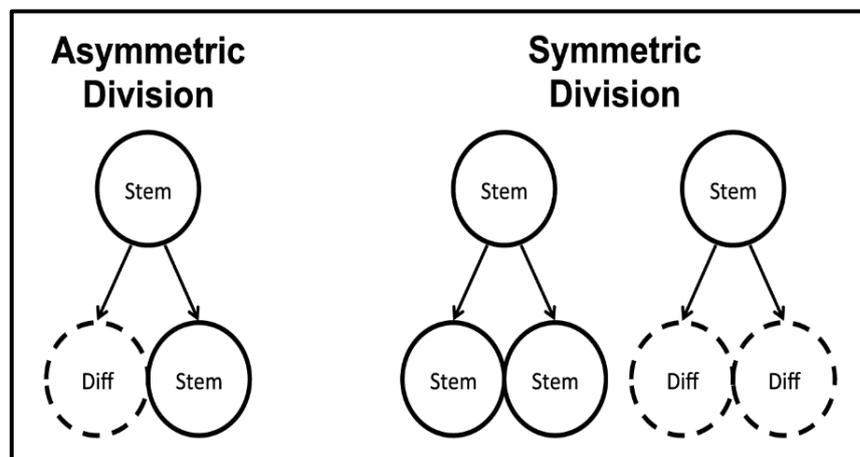


Abbildung 3: Stammzellteilung (Shahriyari & Komarova 2013)

Entsprechend ihrem natürlichen Vorkommen unterscheidet man adulte von embryonalen Stammzellen (Egusa et al. 2012). Durch genetische Manipulation somatischer Zellen lassen sich außerdem induzierbare pluripotente Stammzellen (iPS) erzeugen (Takahashi et al. 2007). Embryonale Stammzellen und iPS-Zellen sind pluripotent. Sie können Zellen aller

drei Keimschichten bilden. Adulte Stammzellen sind in ihrer Potenz beschränkter und können lediglich bestimmte Zelltypen generieren (Egusa et al. 2012). Sie finden sich in fast allen Organen und Geweben. Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung sind sie an Heilungsprozessen beteiligt und liefern ein breites Forschungsfeld in der regenerativen Medizin (Estrela et al. 2011).

Der Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich beherbergt mehrere Nischen adulter Stammzellen. Da es sich bei den entsprechenden Geweben hauptsächlich um mesenchymale Gewebe handelt, spricht man übergreifend von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) (Egusa et al. 2012). Quellen für MSCs sind beispielsweise das Knochenmark des Alveolarknochens (BMSCs), die Pulpa (DPSCs), exfoliierte Milchzähne (SHED), das parodontale Ligament (PDLSCs), Zahnfollikel (DFSCs), die apikale Papille (SCAP) und andere (Egusa et al. 2012). Die MSCs haben ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild und wachsen adhärent zu Zellkulturplastik (Horwitz et al. 2005). Unter entsprechenden *in vitro*-Bedingungen lassen sich die multipotenten Zellen zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren (Dominici et al. 2006). Ferner gelingt die Charakterisierung anhand spezieller Oberflächenmoleküle. Mesenchymale Stammzellen zeigen eine positive Expression der Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90. Gleichzeitig fehlt die Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR (Dominici et al. 2006).

Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs) stellen eine Subpopulation der MSCs dar. Sie lassen sich aus dem Desmodont extrahierter Zähne isolieren (Egusa et al. 2012). PDLSCs haben die Fähigkeit, *in vivo* verschiedene parodontale Strukturen zu regenerieren, einschließlich Sharpey-Fasern, Alveolarknochen und Wurzelzement (Gronthos et al. 2006, Menicanin et al. 2013, Seo et al. 2004).

Um für regenerative Zwecke genutzt werden zu können, benötigen die Stammzellen ein geeignetes Trägermaterial. Laut Lin et al. sollte ein solches Material möglichst der natürlichen Extrazellulärmatrix ähneln, die Zellhaftung unterstützen und eine kontrollierte Freisetzung biologisch aktiver Faktoren ermöglichen (Lin et al. 2009). Verschiedene synthetische und natürliche Substanzen, entweder resorbierbar oder nicht-resorbierbar, wurden in diesem Zusammenhang bereits untersucht (Bartold et al. 2006). Für die Regeneration knöcherner Strukturen haben sich zum Beispiel poröse Keramiken, wie HA und β -TCP, gut bewährt (Dong et al. 2001 und 2002). Auch die Verwendung von Kollagen als Zell-Träger brachte in der Vergangenheit positive Ergebnisse für die knöcherne Regeneration (Xiao et al. 2003).

1.5 Ziele der Studie

In der vorliegenden *in vivo*-Studie wurde der Einfluss verschiedener Kollagene, parodontaler Stammzellen und Wachstumsfaktoren auf die Regeneration chirurgisch angelegter, periimplantärer Defekte am Göttinger Minischwein untersucht. Ziel dieser Vergleichsstudie war es, das regenerative Potenzial der verschiedenen kollagenen Gerüststoffe, xenogenen Wachstumsfaktoren und autologen parodontalen Stammzellen, unter Anwendung der gesteuerten Knochenregeneration, zu bewerten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

15 Göttinger Minischweine wurden auf sieben verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Verteilung wurde randomisiert. Zur Gewinnung parodontaler Stammzellen (PDLSCs) wurden jeweils die 1. und 2. Prämolaren im III. und IV. Quadranten des Unterkiefers extrahiert. 90 Tage nach der Zahnextraktion wurden insgesamt 46 Implantate anstelle der ehemaligen Prämolaren inseriert (jeweils zwei Implantate pro Kieferhälfte). Zeitgleich wurden koronal zirkuläre Knochendefekte mit den Maßen 7 × 5 mm angelegt. Die Defekte wurden, entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe, mit verschiedenen Materialien therapiert (Abb. 5) und anschließend mit einer semipermeablen Membran abgedeckt. Nach 14, 28 und 84 Tagen post implantationem erfolgte eine klinische Untersuchung des Heilungsverlaufes in Prämedikation. Gleichzeitig erfolgte die intravenöse Verabreichung von drei verschiedenen fluorochromen Farbstoffen. Nach 120 Tagen wurden die Versuchstiere euthanasiert und die Kiefer histologisch aufgearbeitet.

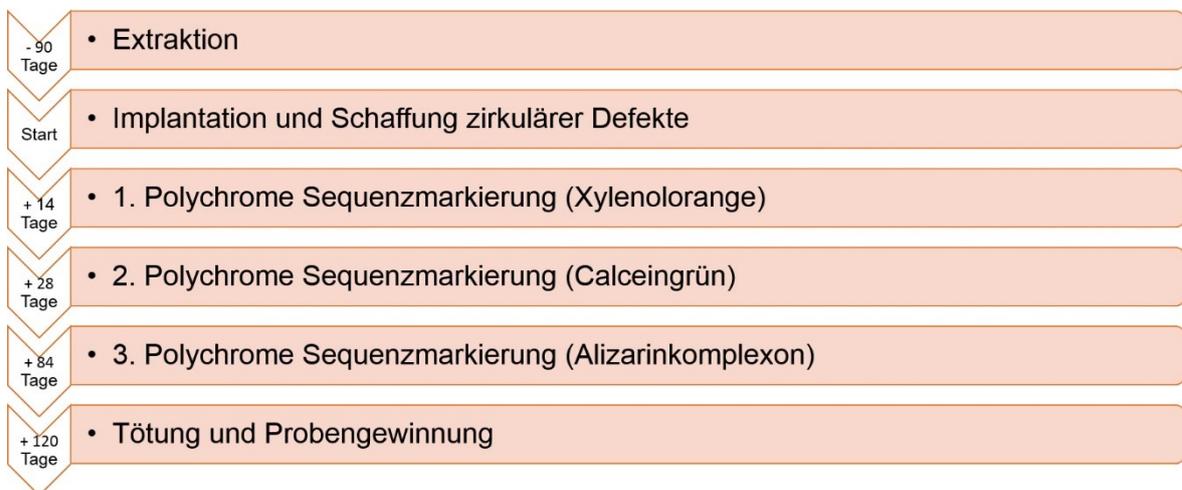


Abbildung 4: Work-Flow

Zeitlicher Ablauf des Experimentes. Zwischen Extraktion und Implantation erfolgte die Isolierung und Kultivierung der parodontalen Stammzellen aus dem Desmodont.

Schwein	III. Quadrant		IV. Quadrant	
	P1	P2	P1	P2
207627	BV	KM	Leer	-
208054	KM	BV	-	Leer
207574	BV/WF	KM/WF	Leer	-
207882	KM/WF	BV/WF	-	Leer
208178	KP/PDLSCs	KP/PDLSCs	KM	BV
208380	KP	KP	KP/PDLSCs	KP/PDLSCs
208248	KP/PDLSCs	KP/PDLSCs	KP/PDLSCs	KP/PDLSCs
209356	Abszess	Abszess	Leer	Leer
208196	BV/WF	BV	KM	KM
207733	BV/WF	BV	BV	BV/WF
211715	KP	KP	-	-
211717	KP	KP	-	-
305148	BV/WF	BV/WF	BV	BV
305068	KM/WF	KM	KM/WF	KM/WF
211343	-	-	Abszess	Abszess

Abbildung 5: Implantationsschema

„P1“ – Regio 1. Prämolare; „P2“ – Regio 2. Prämolare; „BV“ – BONITmatrix®-Vlies;
 „BV/WF“ – BONITmatrix®-Vlies + Wachstumsfaktoren; „KM“ – Kollagenmatrix; „KM/WF“ – Kollagenmatrix +
 Wachstumsfaktoren; „KP“ – Kollagenpulver; „KP/PDLSCs“ – Kollagenpulver + PDLSCs;
 „Leer“ – Kontrollgruppe, Blutkoagulum; „-“ – nicht Bestandteil dieser Untersuchung

Folgende Gruppen wurden untersucht:

1. Gruppe: BONITmatrix®-Vlies (BV, n = 8)
2. Gruppe: BONITmatrix®-Vlies + Wachstumsfaktoren (BV/WF, n = 7)
3. Gruppe: Kollagenmatrix (KM, n = 6)
4. Gruppe: Kollagenmatrix + Wachstumsfaktoren (KM/WF, n = 5)
5. Gruppe: Kollagenpulver (KP, n = 6)
6. Gruppe: Kollagenpulver + PDLSC (KP/PDLSCs, n = 8)
7. Gruppe: Leerprobe (Blutkoagulum) (Leer, n = 6)

2.2 Versuchstiere

Die Studie wurde an 15 weiblichen Göttinger Miniaturschweinen durchgeführt. Zum Versuchszeitpunkt wogen die Tiere zwischen 30 und 45,8 kg und befanden sich in der 2. Dentition (22 ± 3 Monate). Alle Schweine wurden unter konventionellen Bedingungen im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (18196 Dummerstorf, Mecklenburg-Vorpommern) gehalten. Sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und weicher Nahrung und wurden zur Kennzeichnung mit Ohrmarken versehen. Das Experiment wurde von den lokalen Behörden überwacht und entsprechend deutschem Tierschutzgesetz genehmigt (Versuchstiergenehmigung 7221.3-1.1-075/11, Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland).

2.3 Materialien

2.3.1 Semipermeable Kollagenmembran

Im Rahmen der gesteuerten Knochenregeneration wurden alle Implantate mit einer selektiv permeablen Kollagenmembran (Angiopore®, 35 x 45 mm, Bredent Medical GmbH, Senden) abgedeckt. Durch die mechanische Barriere sollten die schneller proliferierenden Epithel- und Bindegewebszellen am Einsprossen gehindert und eine schnellere Ossifikation der periimplantären Defekte gewährleistet werden.

2.3.2 Implantate mit CaP-Beschichtung

Für den Versuch wurden konische SLA-Schraubenimplantate (alphatech® Tube-Line BONITex®, 4,3x12 mm, FMZ GmbH, Rostock) mit Calciumphosphat-Beschichtung (CaP) verwendet. Das selbstschneidende Gewinde ermöglicht eine schonende Insertion und eine gute Primärstabilität. Die BONITex®-Ausführung kombiniert die typische Rauigkeit eines

sandgestrahlten, säuregeätzten Implantats (SLA) mit einer dünnen, schnell resorbierbaren CaP-Schicht (FMZ-GmbH 2017).

2.3.3 Kollagenmatrix

Drei verschiedene kollagene Gerüststoffe wurden in dieser Studie untersucht und mit Wachstumsfaktoren und Stammzellen kombiniert. Das erste Testmaterial war eine Matrix aus Quallenkollagen (BIOSERV, Rostock). Dabei handelt es sich um ein synthetisches Gerüst mit dem Hauptbestandteil Kollagen. Die Matrix ähnelt in ihrer Struktur stark der Extrazellulärmatrix von Knorpel und zeichnet sich durch ihre hohe mechanische Stabilität und gute Biokompatibilität aus. Zusätzlich unterstützt sie die Zellproliferation. Das poröse, dreidimensionale Gerüst wurde durch die Vernetzung einer wässrigen Quallenkollagen-Lösung (*Rhopilema spec.*), mittels EDC- und NHS-Gruppen, erzeugt (Meyer et al. 2010). Anschließend erfolgte eine enzymatische Degradation mit Hilfe von Kollagenase, entsprechend DIN ISO 10993.

2.3.4 Kollagenpulver

Als Zweites wurde ein Kollagenpulver verwendet (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck). Das Pulver wurde im Advanced CryoSafe™-Verfahren aus Rinderhaut hergestellt und enthält fibrilläres Kollagen Typ I, III und V. Die modulierte Biomatrix soll körpereigene Regenerationsmechanismen aktivieren (MedSkin-Suwelack 2017). Der Implantation vorangestellte *in vitro*-Versuche qualifizierten das Kollagenpulver als besten Träger für die PDLSCs (s. 2.5.3, S. 23-24 und 3.2, S. 31-32).

2.3.5 Kollagenvlies

Das letzte Material war ein BONITmatrix®/Kollagen-Vlies (DOT GmbH, Rostock). Das Vlies wurde durch Kombination von 1 % Kollagen mit BONITmatrix® (Massenverhältnis 4:1) und anschließende Gefriertrocknung im Sublimator erzeugt. Das fertige Produkt wurde in Blister eingeschweißt und gammasterilisiert. BONITmatrix® ist ein synthetisches Knochenaufbaumaterial, welches durch seine gleichmäßige und vollständige Resorption ein geeigneter Platzhalter für die Knochenneubildung ist. Es verbindet gute Osseointegrationseigenschaften mit multizentrischer Osteoneogenese. Das Material setzt sich aus den nanokristallinen Calciumphosphaten HA und β -TCP (Verhältnis 60:40) zusammen, die in ein amorphes Gerüst aus Siliziumdioxid eingelassen sind (DOT-Coating 2017). Dadurch ergibt sich ein interkonnektierendes Porensystem, welches die Diffusion biologischer Flüssigkeiten ermöglicht und Wachstumsfaktoren des Blutes effektiv binden kann.

2.3.6 Wachstumsfaktoren

Neben den verwendeten Kollagenen wurde ein Wachstumsfaktor-Gemisch (DOT GmbH, Rostock) mittels Einmalspritzen in die Defekte eingebracht. Die Wachstumsfaktoren wurden aus gammasterilisiertem Thrombozyten-Lyophilisat gewonnen. Dieses wurde zunächst in steriler Kochsalzlösung (0,9 %) gelöst, bis eine Konzentration an Wachstumsfaktoren von 2 mg/ml erreicht war. Danach wurde jeweils 1 ml Lösung in sterile Einmalspritzen (Transcoject GmbH, Neumünster) aufgezogen. Pro Defekt wurden jeweils 0,15 ml der Suspension (0,3 mg Wachstumsfaktoren zu je 178,7 pg VEGF, 64,8 pg b-FGF, 90,2 pg IGF-1 und 52023,8 pg TGF- β) appliziert.

2.3.7 Stammzellen

Dentale Stammzellen wurden aus dem parodontalen Ligament der extrahierten unteren Prämolaren gewonnen und *in vitro* kultiviert. Nach Insertion der Implantate wurden zwischen 4×10^5 und $1,7 \times 10^6$ Zellen der Passagen 3 - 4 in die Knochendefekte appliziert. PDLSCs sind eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen und weisen deren typische Eigenschaften wie Klonogenizität, Selbsterneuerung und eine hohe Proliferationsfähigkeit auf. Sie sind multipotent und können sich zu unterschiedlichen Phenotypen differenzieren (Benatti et al. 2007). Unter standardmäßigen Zellkulturbedingungen wachsen sie adhärent zu Plastik (Horwitz et al. 2005) und haben ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild (Gronthos et al. 2006) (Abb. 6).

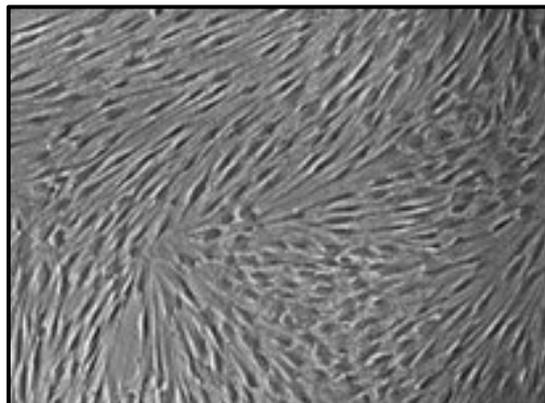


Abbildung 6: PDLSCs mit fibroblastenähnlicher Struktur (Fortino et al. 2014)

2.4 Operatives Vorgehen

2.4.1 Narkose

Alle chirurgischen Eingriffe erfolgten unter sterilen Bedingungen in Vollnarkose und wurden von chirurgisch erfahrenen Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie (Universitätsmedizin Rostock) durchgeführt. Präoperativ wurde den Schweinen zunächst 1,5 ml Midazolam und 10 %-iges Ketamin (3 ml pro 10 kg Körpergewicht) (Sanochemia Pharmazeutika AG, Neufeld, Österreich) intramuskulär verabreicht. Nach erfolgter Sedierung wurden die Tiere mit sterilen Tüchern abgedeckt, die Perioralregion rasiert und mit einer Jod-Lösung (Betaisodona®, Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn) desinfiziert. Anschließend wurde das Operationsgebiet mit Lokalanästhetikum (Ultracain D-S forte, 1:100.000, 2 ml, Sanofi Deutschland GmbH, Frankfurt) infiltriert. Die Einleitung der Intubationsnarkose erfolgte mit Fentanyl (0,5 - 0,8 ml/min, Janssen-Cilag, Neuss) über einen Perfusor. Nach Applikation des Endotrachealtubus wurden die Versuchstiere an ein Beatmungsgerät angeschlossen und die Narkose mit 1,5 %-igem Isofluran (AbbVie AG, Baar, Schweiz) unter zusätzlicher Sauerstoffgabe (1,5 l/min) aufrechterhalten. Intravenös wurden weiterhin 0,25 – 0,4 ml Pancuronium (2 mg/ml, Organon Teknika, Eppelheim) als Muskelrelaxanz und 3 ml Novaminsulfon (500 mg, Ratiopharm GmbH, Ulm) verabreicht. Um die Hydratation während der gesamten Operation aufrecht zu erhalten, erhielten die Schweine über drei Stunden 500 ml Ringer-Infusionslösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Im Rahmen der Infektionsprophylaxe wurde intraoperativ ein Antibiotikum mit breitem Wirkspektrum (Ampicillin/Sulbactam 1000 mg/500 mg, HEXAL AG, Holzkirchen) intravenös verabreicht. Postoperativ erfolgte eine orale Antibiose mit Synulox® (250 mg, 2×1, Pfizer AG, New York, USA) für weitere sieben Tage. In dieser Zeit wurde weiterhin ein Analgetikum verabreicht (Metacam®-Suspension, 15 mg/ml, 2,7 ml pro 100 kg Körpergewicht, Boehringer Ingelheim Vetmediaca GmbH, Ingelheim am Rhein).

2.4.2 Phase 1: Extraktion und Gewebeentnahme

Im Rahmen des ersten chirurgischen Eingriffs wurden jeweils die 1. und 2. unteren Prämolaren in beiden Quadranten extrahiert. Die Zahnentfernung erfolgte schonend mit Hilfe von Beinschen Hebeln und zahnärztlichen Extraktionszangen. Um die Proben von überschüssigem Gewebe, Blut, Speichel und Bakterien zu befreien, wurden sie wiederholt mit verschiedenen konzentrierten, antibiotischen Spüllösungen gereinigt (Tab. 2). Sowohl die 50 ml-Transportfalcons (CELLSTAR® Tubes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) als auch verwendete Pinzetten wurden zwischendurch abgeflammt, um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Anschließend erfolgte der Transport in einer Lösung aus DMEM-F₁₂ (gibco® by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) und

2 % Penicillin/Streptomycin (Pen Strep Glutamine 1x, gibco® by Life Technologies, Grand Island, NY, USA) bei konstant 4 °C ins Labor.

Lösung	Zusammensetzung
Spüllösung	1. 50 ml PBS 2. 50 ml PBS, 500 µl P/S 3. 20 ml PBS, 200 µl P/S 4. 20 ml PBS, 2 ml P/S 5. 20 ml PBS, 200 µl P/S 6. 20 ml PBS, 200 µl P/S
Transportlösung	7. 20 ml DMEM/F12, 400 µl P/S

Tabelle 2: Spülprotokoll

2.4.3 Phase 2: Implantation und Schaffung zirkulärer Defekte

Nach einer dreimonatigen Heilungsphase wurden an Stelle der ehemaligen Prämolaren Implantate inseriert. Um die zahnlosen Kieferabschnitte freizulegen, erfolgte zunächst die Bildung eines Mukoperiostlappens. Die Schnittführung verlief krestal, leicht lingual auf dem Alveolarkamm. Der Lappen wurde mittels Skalpell präpariert und mit dem Rasparatorium mobilisiert. Eine vertikale Entlastungsinzision wurde nach mesial gelegt. Die Implantatbohrungen erfolgten nach Herstellerangaben, zunächst die Pilotbohrung (4 mm) und anschließend die definitive Bohrung (4,3 mm). Um die zirkulären Defekte zu schaffen, wurden die koronalen 5 mm, der insgesamt 12 mm tiefen Bohrung, mit einem genormten Bohrer auf 7 mm erweitert (Abb. 7 B). Anschließend wurden auf jeder Seite des Unterkiefers 1 - 2 Implantate manuell mit einem Drehmomentschlüssel eingedreht und mit Titan-Einheilkappen versehen (Abb. 7 C). Die zirkulären Defekte wurden, entsprechend der verschiedenen Versuchsgruppen, mit den Kollagenen allein oder zusätzlich mit Wachstumsfaktoren oder Stammzellen therapiert. Zum Vergleich wurden einige Defekte unbehandelt gelassen (Leerprobe, lediglich Membranabdeckung). Zum Einbringen wurde ein steriler Heidemann-Spatel verwendet. Alle periimplantären Defekte wurden

anschließend mit einer selektiv permeablen Membran (Angiopore®, 35 × 45 mm, 0,3 -0,5 mm, Bredent Medical GmbH, Senden, Germany) zur gesteuerten Knochenregeneration abgedeckt. Zuletzt wurde der Mukoperiostlappen replaziert und mit resorbierbaren Nähten (Vicryl®, 3-0, Polylactin 910, SH-1 plus, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) fixiert.

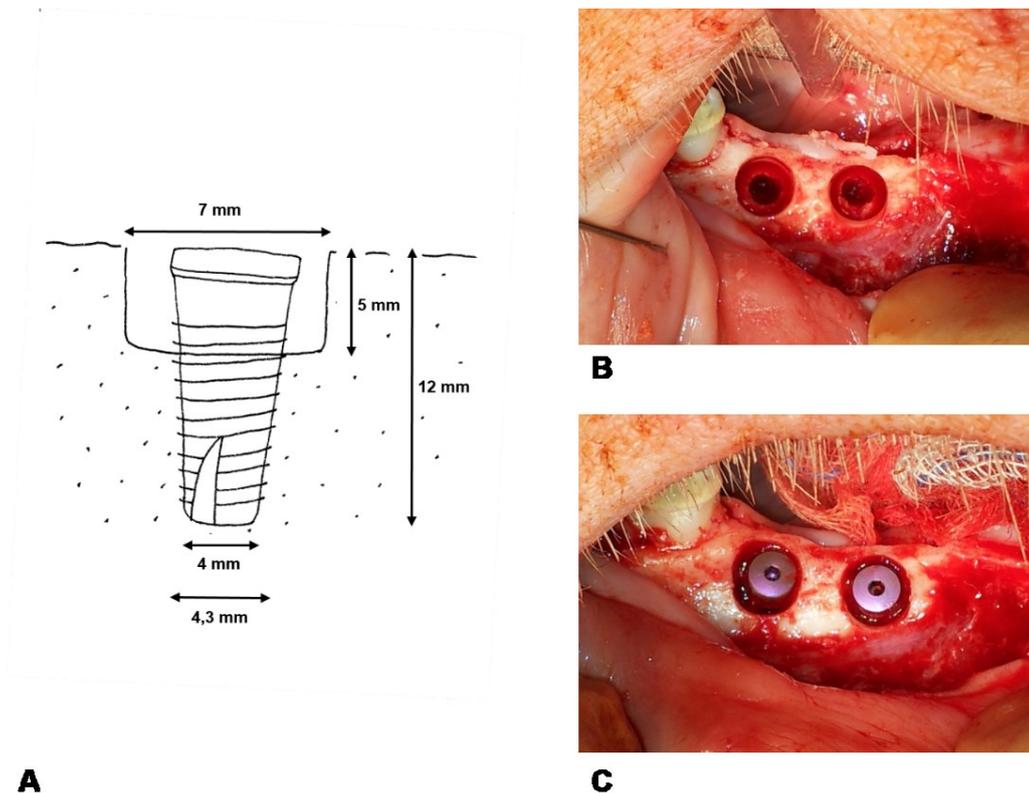


Abbildung 7: Implantation und Schaffung zirkulärer Defekte

A) Schema Implantatbohrung und zirkulärer Defekt, **B)** Zirkuläre Defekte in situ, **C)** Implantate mit Einheilkappen in situ

2.4.4 Phase 3: Polychrome Sequenzmarkierungen

In der Einheilphase erhielten die Versuchstiere drei verschiedene fluorochrome Farbstoffe in festgeschriebener Reihenfolge. Gestartet wurde am 14. Tag post implantationem mit Xylenolorange (6 %, 2-5 g/Tier, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Nach 28 Tagen folgte Calceingrün (1 %, 0,8-1,5 g/Tier, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und nach 84 Tagen Alizarinkomplexon (3 %, 1-1,5 g/Tier, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Applikation erfolgte intravenös durch langsame Schwerkraftinfusion (10 ml/min).

Parallel erfolgte eine klinische Untersuchung der Tiere in Prämedikation. Um Metabolismus und Ausscheidung der Fluorochrome zu überprüfen, wurde die Farbe des Urins inspiziert. Die polychrome Sequenzmarkierung dient der histologischen Evaluation von Knochenneubildung und Remodellierungsprozessen. Sie ermöglicht eine intravitale Färbung des neu gebildeten Knochens zum jeweiligen Applikationszeitpunkt der fluoreszierenden Farbstoffe. Histologisch zeigen sich Strukturen, die den Jahresringen eines Baumes ähneln.

2.5 Labortechnisches Vorgehen

2.5.1 Isolierung und Kultivierung der Stammzellen

Die Isolierung und Kultivierung der parodontalen Stammzellen erfolgte nach dem Protokoll von Haddouti et al. aus dem Jahr 2009. Alle Laborarbeiten wurden von der Doktorandin, unter Anleitung von Mitarbeiterinnen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und des Institutes für Biowissenschaften und Mikrobiologie, durchgeführt. Nach dem Transport ins Labor wurden die Proben in Petrischalen unter der Sterilbox zerlegt. Das parodontale Ligament wurde vorsichtig mit einem Skalpell von der Wurzeloberfläche gelöst, unter ständiger Feuchthaltung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom, Berlin), welche mit Penicillin/Streptomycin (Pen Strep Glutamine 1x, gibco®, Grand Island, NY, USA) versetzt wurde. Die Gewebestücke wurden jeweils mit einer großen Pipette (25 ml) in 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen (Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) überführt. Pro Röhrchen wurden 5 ml Dispaselösung (Tab. 3), bestehend aus DMEM-F₁₂ und Dispase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), appliziert und die Proben für 1-2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 1900 U/min. Die überschüssige Dispaselösung wurde vorsichtig abpipettiert. Die verbliebenen Zellpellets wurden anschließend mit jeweils 3 ml Zellkulturmedium (Tab. 3), bestehend aus DMEM-F₁₂ und 10 % Fetalem Kälberserum (FKS inaktiviert, Biochrom, Berlin), in Zellkulturflaschen (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) angesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert.

Nach 24 h wurden die Proben unter dem Lichtmikroskop auf bakterielle Kontamination untersucht. Freischwimmende Zellen wurden abpipettiert und die Zellkulturflaschen anschließend auf 20 ml Kulturmedium aufgefüllt. Die Gewebestücke zeigten nach diesem Zeitraum bereits Adhärenz am Flaschenboden. Aus den kontaminierten Kulturflaschen wurde das verunreinigte Medium abgenommen. Danach wurde vorsichtig mit PBS gespült, ohne die Adhärenz der Gewebestücke zu verletzen, und erneut 20 ml Zellkulturmedium

aufgefüllt. Die Proben wurden täglich kontrolliert und der Vorgang gegebenenfalls wiederholt.

Nach circa zwei Wochen konnten erste adhärente PDLSCs unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden (Abb. 8). Mit wachsender Koloniegröße wurde das Kulturmedium circa drei Mal wöchentlich gewechselt. Dazu wurde das alte Medium unter Schonung des Zellrasens abpipettiert und neues aufgefüllt. Nach vollständiger Konfluenz des Zellrasens wurden die Stammzellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abpipettiert und 2 ml Trypsin (gibco®, Grand Island, NY, USA) zugesetzt. Nach 10 minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Die freischwimmenden Zellen wurden mittels Pipette abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden beide Flaschen wieder mit 20 ml Medium aufgefüllt und eine erneute Konfluenz des Zellrasens abgewartet. Diese Vorgänge wurden bis zur 4. Passage wiederholt. Die Zellen der verschiedenen Passagen wurden nach jeweils vollständiger Besiedlung der Kulturflaschen bei – 70 °C eingefroren. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und zentrifugiert, bevor die Zellpellets in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und FKS gelöst und anschließend in Cryotubes (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben wurden. Eine Woche prae implantationem wurden die Zellen aufgetaut und erneut kultiviert.

Lösung	Zusammensetzung
Dispaselösung	5 ml DMEM-F ₁₂ 2,5 mg/ml Dispase
Zellkulturmedium	500 ml DMEM-F ₁₂ 50 ml FKS 5 ml P/S
DMSO-Lösung	2,7 ml FKS 300 µl DMSO

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Medien

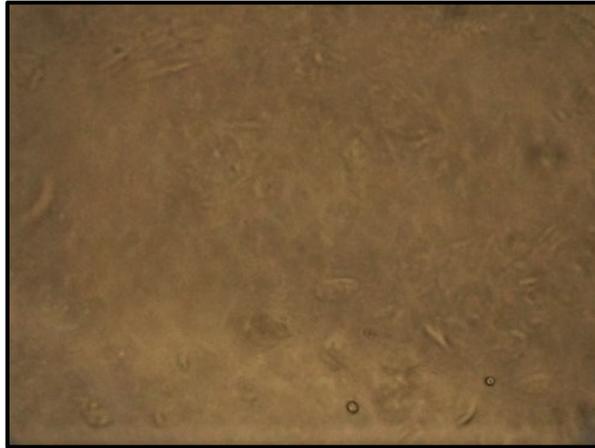


Abbildung 8: lichtmikroskopische Aufnahme der PDLSCs

2.5.2 Stammzellcharakterisierung

Die Charakterisierung der parodontalen Stammzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS), anhand spezifischer Oberflächenantigene (Tab. 4). Zunächst wurden Zellen der Passage 4 trypsinisiert wie bereits beschrieben. Anschließend wurde 1 ml FKS zugesetzt, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde bei 21 °C und 1900 U/min für 10 min zentrifugiert. Das verbliebene Zellpellet wurde mit 99 µl FACS-Puffer sowie 1 % PBS (pH = 7,2) und 0,2 % sterilem bovinem Serumalbumin (BSA) versetzt. Dann wurden 1 µl der entsprechenden monoklonalen Antikörper sowie Isotyp-Kontrollantikörper (Negativkontrolle) dazu gegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde erneut 1 ml FACS-Puffer zugesetzt und das Gemisch bei 4 °C und 1900 U/min für weitere 10 min zentrifugiert. Der Überschuss wurde abpipettiert und weitere 100 µl FACS-Puffer ergänzt, bevor die Messungen am Zytometer (BD Accuri C6, Becton-Dickinson, Mansfield, MA, USA) durchgeführt wurden.

Stammzellen	CD Antigen-Expression		Weitere repräsentative Marker	<i>In vitro</i> Differenzierung	<i>In vivo</i> Gewebebildung
	Positiv	Negativ			
PDLSC	CD9 CD10 CD13 CD29 CD44 CD49d CD59 CD73 CD90 CD105 CD106 CD146 CD166	CD31 CD34 CD45	STRO-1 Scleraxis	Dentogene Linie (Zementoblasten), Mesodermale Linie (Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten), Ektodermale Linie (Nervenzellen)	Dentogene Linie (Zement, parodontales Ligament), Mesodermale Linie (Alveolarknochen)

Tabelle 4: Eigenschaften humaner dentaler MSCs (Auszug aus Egusa et al. 2012)

2.5.3 Materialtestungen prae implantationem

In Vorbereitung auf die Implantation musste ein geeignetes Trägermaterial für die Stammzellen gefunden werden. Dazu wurden alle in dieser Studie verwendeten Kollagene über 24 h zusammen mit den PDLSCs bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgten eine Inspektion unter dem Lichtmikroskop sowie eine Life-Death-Färbung zur Beurteilung der Zellvitalität unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Das BONITmatrix®-Vlies und die Kollagenmatrix wurden in 24-Well-Platten (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit jeweils 2×10^6 – $3,2 \times 10^6$ Zellen in 900 µl Zellkulturmedium pro Well inkubiert. Nach 24 h wurden die Proben zunächst unter dem Lichtmikroskop beurteilt, bevor 2 µl Safranin zugesetzt wurden und 30 min später die Vitalität unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden konnte.

Das Kollagenpulver in seiner reinen Form zeigte einen sauren pH-Wert (pH = 4). Vor der Inkorporation mit den Stammzellen musste dieser pH-Wert zunächst neutralisiert werden. Dazu wurden Verdünnungsreihen mit den Puffern HEPES, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) und Kaliumphosphat (K₃PO₄) angefertigt (Tab. 5).

Kollagenpulver	Puffer	Menge Puffer	DMEM-F ₁₂	pH
0,1 g	HEPES	1000 µl	0	4,8 (schwankend)
0,1 g	HEPES	800 µl	0	4,3 (schwankend)
0,1 g	NaHCO ₃	0,1 g	200 µl	9,1
0,1 g	NaHCO ₃	0,1 g	500 µl	8,1
0,1 g	NaHCO ₃	0,07 g	800 µl	7,9
0,1 g	NaHCO ₃	0,01 g	800 µl	7,6
0,1 g	NaHCO ₃	800 µl 2 %-ige Lösung	0	7,6
0,1 g	NaHCO ₃	400 µl 2 %-ige Lösung	400 µl	7,1
0,1 g	NaHCO ₃	600 µl 2 %-ige Lösung	200 µl	7,5
0,1 g	K ₃ PO ₄	300 µl	500 µl	8,0
0,1 g	K ₃ PO ₄	200 µl	600 µl	7,5

Tabelle 5: Verdünnungsreihen Kollagenpulver und verschiedene Puffer

Das Kollagenpulver wurde anschließend in 24-Well-Platten mit den verschiedenen Puffern und PDLSCs für 24 h inkubiert (Tab. 6). Danach erfolgte eine Life-Death-Färbung mit 2 µl Safranin und die entsprechende Auswertung. Die Kombination von Kollagenpulver und Kaliumphosphatpuffer erwies sich als am besten geeignet für die spätere Applikation der parodontalen Stammzellen (s. 3.2, S. 31-32).

A	0,1 g Kollagenpulver + 400 µl DMEM-F ₁₂ + 400 µl 2 % NaHCO ₃ + 6 × 10 ⁵ PDLSCs
B	0,1 g Kollagenpulver + 300 µl DMEM-F ₁₂ + 500 µl 2 % NaHCO ₃ + 6 × 10 ⁵ PDLSCs
C	0,1 g Kollagenpulver + 800 µl HEPES + 6 × 10 ⁵ PDLSCs
D	0,1 g Kollagenpulver + 600 µl DMEM-F ₁₂ + 200 µl K ₃ PO ₄ + 6 × 10 ⁵ PDLSCs

Tabelle 6: Materialtestungen Kollagenpulver mit verschiedenen Puffern und PDLSCs

Vor der Implantation wurden unter sterilen Bedingungen 24-Well-Platten vorbereitet. Die 1. Reihe wurde mit jeweils mit 0,1 g Kollagenpulver pro Well ausgestattet. In die 2. Reihe wurde jeweils 200 µl Kaliumphosphatpuffer pro Well vorgelegt. Anschließend erfolgte die Trypsinierung der Stammzellen mit 2 ml Trypsin. Die abgelösten Zellen wurden mit 2 ml Zellkulturmedium versetzt und bei 4 °C und 1900 U/min für 4 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 600 µl Zellkulturmedium (ohne FKS) gelöst. 20 µl der gelösten Zellen wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt, in eine Neubauerzählkammer überführt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die restliche Zellsuspension wurde jeweils in ein Well der 3. Reihe der 24-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden die vorbereiteten Platten auf Eis gelagert und in den Operationssaal transportiert. Zeitgleich mit der Implantation erfolgte zunächst die Mischung des Puffers mit dem Kollagenpulver mittels 1000 µl Pipetten und danach mit den Stammzellen (Abb. 9). Die fertige Suspension wurde mit einem sterilen Heidemann-Spatel in die Defekte eingebracht. Pro Defekt wurden 0,1 g Kollagenpulver mit 4×10^5 – $1,7 \times 10^6$ PDLSCs appliziert.

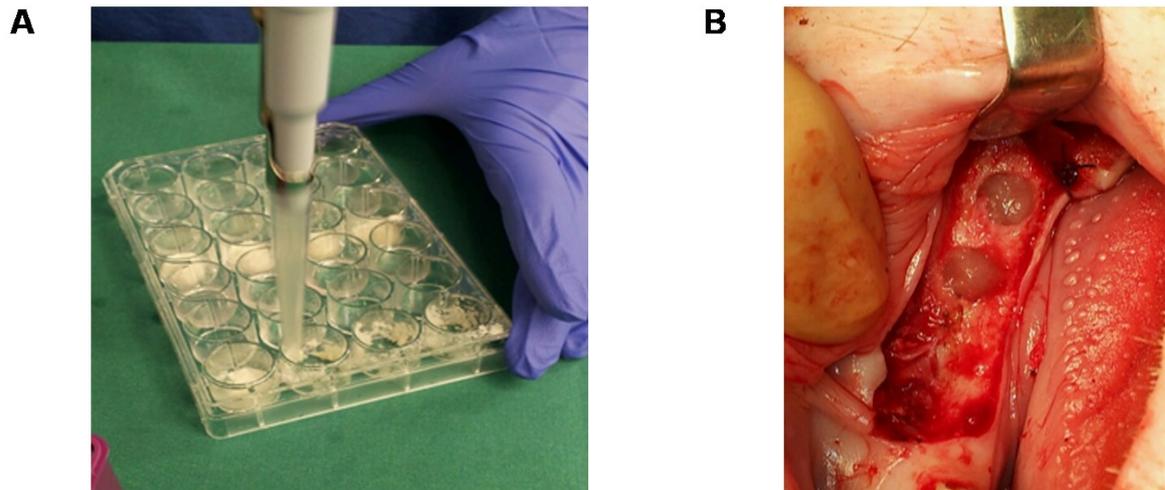


Abbildung 9: Applikation von Kollagenpulver und PDLSCs

A) Vorbereitung der Kollagenpulver-Zellsuspension vor der Applikation, **B)** Ansicht in Situ nach Applikation

2.6 Probengewinnung

2.6.1 Euthanasie

120 Tage nach der Implantation erfolgte die Opferung der Versuchstiere unter Vollnarkose. Nach Intubation folgten die Präparation und Katheterisierung der beiden Vv. jugulares externae und der Aa. carotes externae. Anschließend wurden die Gefäße mit einer Lösung aus Ringer-Lactat und Natrium-Heparin (10.000 IE, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gespült. Für die Tötung wurde eine Überdosis Thiopental (Ospedalia AG, Hünenburg, Schweiz) verwendet. Nach der Extubation erfolgte die Fixation der oralen Strukturen mit 3 l Formaldehyd (10 %, Helm Austria GmbH, Wien, Österreich) über die Aa. carotes.

2.6.2 Herstellung der histologischen Schnitte

Die Herstellung der histologischen Schnitte wurde von Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (Universitätsmedizin Rostock) vorgenommen. Die Unterkiefer der Schweine wurden exartikuliert und mittels Säge (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt) in Segmente geschnitten. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Sägeschnitte in 4 % Formafix® (Global Technologies Ltd., Düsseldorf) für sieben Tage. Das Formalin wurde über zwei Stunden mit heißem Wasser ausgewaschen, bevor die Schnitte für 14 Tage in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurden (70 %, 80 %, 96 %, 100 %). Danach erfolgte die Block-Einbettung in Technovit (Technovit® 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau) über 28 Tage. Für die Einbettung wurde ein Gemisch aus Technovit

und Ethanol verwendet, wobei die Technovit-Konzentration stetig erhöht wurde (30 %, 50 %, 70 %, 100%). Nach Ablauf der 28 Tage erfolgte die endgültige Einbettung in 100 % Technovit und die Aushärtung mit einem Lichtpolymerisationsgerät. Die weitere Aushärtung erfolgte bei 50 °C im Brutschrank und die Endhärtung bei Tageslicht. Die Probenblöcke wurden auf Plexiglasobjektträger geklebt und in sagittaler Richtung plan geschliffen. Danach wurde ein neuer Objektträger auf die entstandene Ebene geklebt und der Block mit dem Microtom (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt), unter permanenter Kühlung, auf eine Stärke von 250 µm geschliffen. Die Schnitte wurden anschließend weiter auf 15 µm reduziert, poliert und mit Toluidinblau gefärbt.

2.7 Auswertungen

2.7.1 Histomorphometrische Analyse

Die histologische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl Zeiss, Axio Imager M2, 20 ×, Jena). Die Schnitte wurden von einem Mitarbeiter der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie eingescannt (AxioCam MRC5, Carl Zeiss, Jena) und mit dem Programm AxioVision SE64 Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena) von der Doktorandin ausgewertet. In Anlehnung an die Größe des zirkulären Defektes wurde in jedem Bild eine Region of Interest (ROI) mit einem Rahmen der Abmessung 7 × 5 mm markiert. Alle Messungen wurden innerhalb der ROI vorgenommen (Abb. 10). Neu gebildeter Knochen wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Axiovert 40 CFL, 4 ×, AxioCam MRC5, HBO 50, Jena) bei Wellenlängen von 490 – 520 nm identifiziert. Parallel dazu wurden die Grenzen des neu gebildeten Knochens mit einer roten Linie, innerhalb des eingescannten Schnittbildes, markiert (AxioVision SE64 Rel. 4.8). Der Flächeninhalt wurde mit Hilfe der freien Software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) errechnet. Die folgenden Parameter wurden an beiden Seiten des Implantats gemessen und der Durchschnitt ermittelt:

1. Bone to Implant Contact (BIC) – prozentualer Anteil neu gebildeten Knochens in direktem Kontakt zur Implantatoberfläche, innerhalb der ROI
2. New Bone Height (NBH) – Strecke vom Boden der ROI zum koronalsten Punkt des BIC
3. Horizontal Bone Apposition (HBA₁₋₃) – horizontale Strecke von der Implantatoberfläche zur äußeren Knochengrenze, jeweils gemessen an der Oberkante (1), der Mitte (2) und dem Boden (3) der ROI

4. Implant Shoulder to Bone Crest Level (IS-BC) – vertikale Distanz von der Implantatschulter zur Cresta alveolaris
5. Newly Formed Bone (NFB) – Fläche des neu gebildeten Knochens, innerhalb der ROI

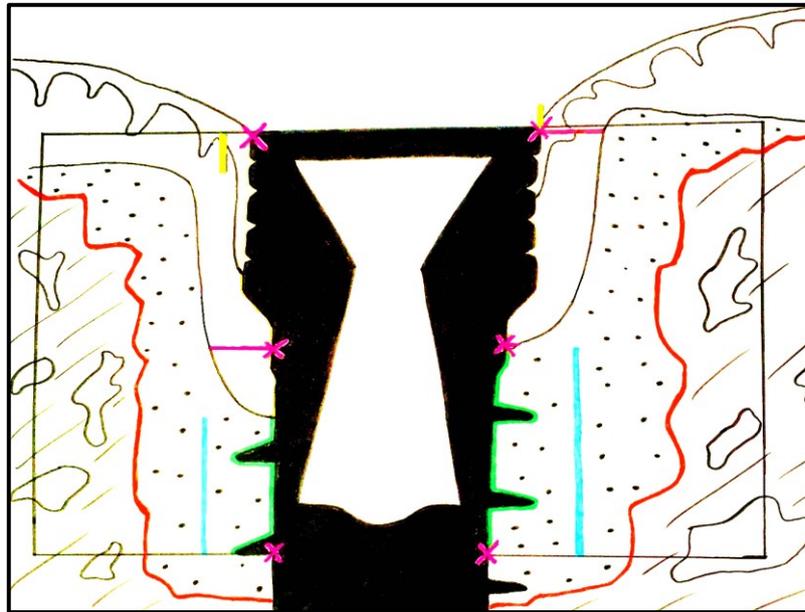


Abbildung 10: Auswertungsschema

Grün – BIC, Blau – NBH, Rot – NFB, Pink – HBA₁₋₃, Gelb – IS-BC

2.7.2 Statistik

Für die beschriebenen Parameter wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die gewonnenen Daten mittels Säulendiagrammen dargestellt (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Der Kolmogorov-Smirnov-Test lieferte die Erkenntnis, dass die Daten keiner Normalverteilung folgten. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ($n \leq 8$) und der hohen Standardabweichungen wurde daraufhin ein Nicht-parametrisches statistisches Verfahren angewendet. Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests für unabhängige Stichproben wurden die zentralen Tendenzen der Gruppen miteinander verglichen. Es wurde für jeden der oben genannten Parameter die Leerprobe gegen eines der verwendeten Materialien getestet. Die Materialien untereinander wurden anschließend ebenfalls gegeneinander getestet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 5\%$ ($p \leq 0,05$) gewählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA).

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von kollagenen Gerüststoffen, xenogenen Wachstumsfaktoren und PDLSCs auf die Ossifikation von chirurgisch geschaffenen periimplantären Defekten zu untersuchen. Vor der Implantation wurden diverse Untersuchungen durchgeführt, um ein adäquates Trägermaterial für die vorher charakterisierten Stammzellen zu finden.

3.1 Stammzellcharakterisierung

Die Stammzellen wurden anhand der Oberflächenantigene CD29, CD44 und CD45 erfolgreich als PDLSCs identifiziert. Für die Antigene CD29 und CD44 konnte eine positive Expression nachgewiesen werden. Die fehlende Expression von CD45 ist ebenfalls typisch für diese Stammzellpopulation. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Histogrammen und Dot Plots (Abb. 11,12 und 13).

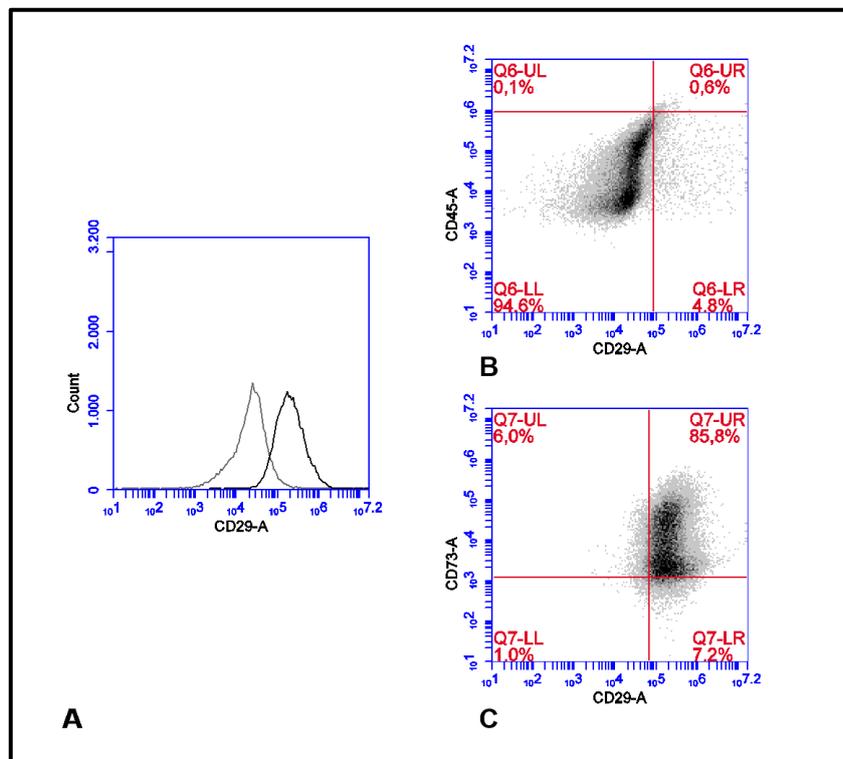


Abbildung 11: Nachweis CD29

A) Histogramm; Grau – Isotyp (Negativkontrolle), Schwarz – CD29; Der Kurvenversatz kennzeichnet das Vorhandensein von CD29, B) Dot Plot Isotypkontrolle, C) Dot Plot CD29⁺

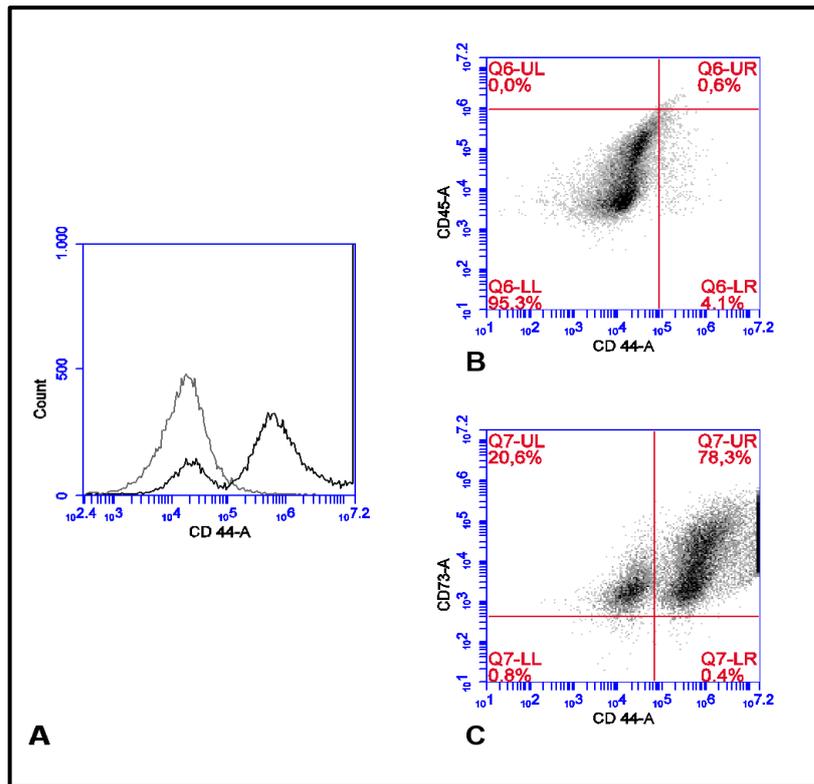


Abbildung 12: Nachweis CD44

A) Histogramm; Grau – Isotyp (Negativkontrolle), Schwarz – CD44; Der Kurvenversatz kennzeichnet das Vorhandensein von CD44, **B)** Dot Plot Isotypkontrolle, **C)** Dot Plot CD44⁺

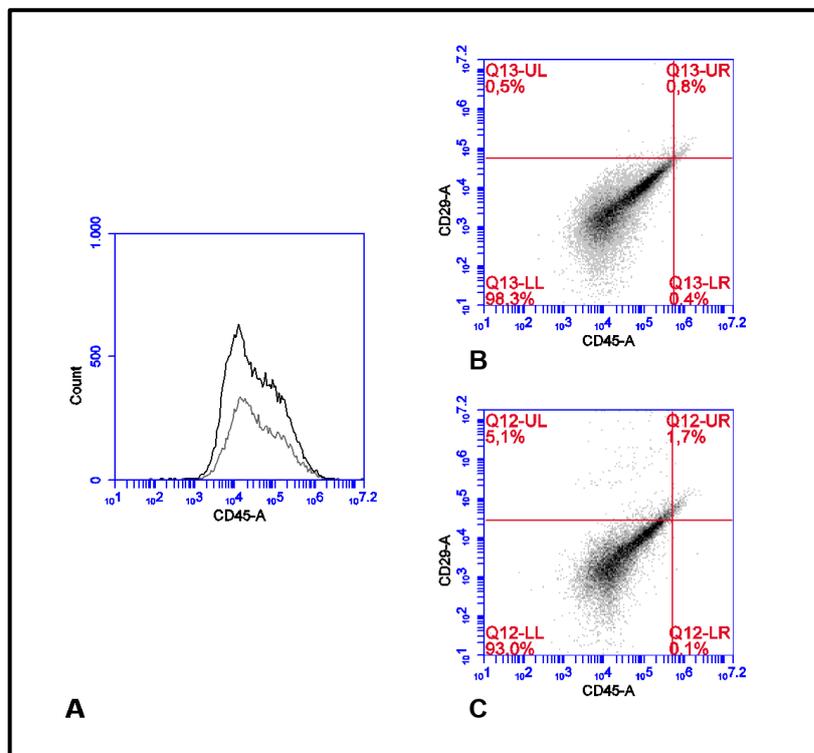


Abbildung 13: Nachweis CD45

A) Histogramm; Grau – Isotyp (Negativkontrolle), Schwarz – CD45; Die Überlagerung der Kurven kennzeichnet das Fehlen von CD45, **B)** Dot Plot Isotypkontrolle, **C)** Dot Plot CD45⁻

3.2 Materialtestungen

Alle in dieser Studie untersuchten Kollagene wurden vor der Implantation zusammen mit den PDLSCs für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Beurteilung der Zellvitalität lichtmikroskopisch und mittels Life-Death-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Nach 24 h zeigten die PDLSCs unter dem Lichtmikroskop Adhärenz am Rand der Kollagenmatrix. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erwiesen sich die Zellen jedoch hauptsächlich als avital (Abb. 14 A). Die BONITmatrix®-Vlies-Probe zeigte unter dem Lichtmikroskop freischwimmende Zellen, die sich nicht an das Vlies angelagert hatten. Adhärenz war nur am Boden des Wells erkennbar. Auch hier überlebten die meisten Zellen die Prozedur nicht (Abb. 14 B). In der Folge wurden die beiden Kollagene als potenzielle Träger für die Stammzellen verworfen und nur deren alleinige Implantation sowie die Implantation in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor-Gemisch vorgesehen.

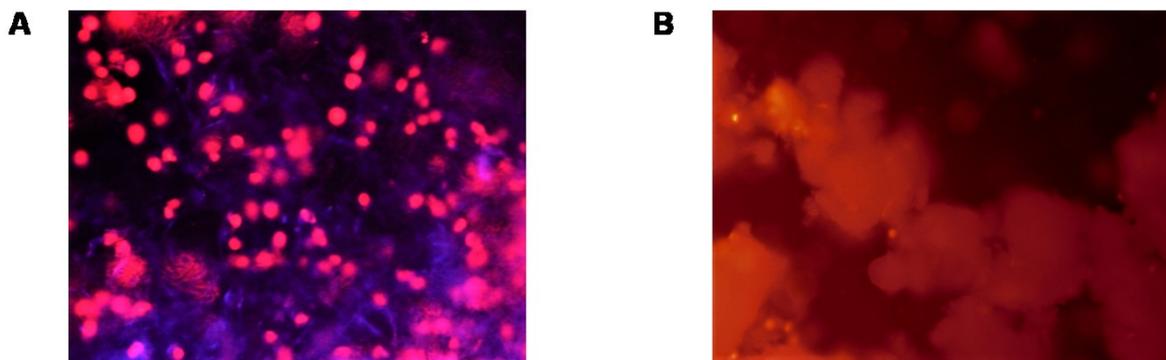


Abbildung 14: Life-Death-Färbung der PDLSCs Nach 24 h sind die meisten Zellen avital (Rot).

A) Kollagenmatrix, **B)** BONITmatrix®-Vlies

Das saure Kollagenpulver wurde vor der Inkubation mit den PDLSCs mit verschiedenen Puffern auf einen neutralen pH-Wert gebracht. Nach 24 h erfolgte die entsprechende Auswertung. Die Kollagenpulverproben mit den Puffern NaHCO_3 und HEPES zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop sowohl vitale (Grün) als auch avitale Zellen (Rot). Da sich die pH-Wert-Einstellung mit HEPES als schwierig erwies und nach 24 h mehr avitale als vitale Zellen in dem Gemisch vorhanden waren, schied dieser Puffer aus (Abb. 15 C). NaHCO_3 lieferte zwar einen stabilen pH-Wert, jedoch überlebte nur ungefähr die Hälfte der Zellen 24 h in der Probe (Abb. 15 A und B). Die meisten vitalen Zellen waren in der Kollagenpulverprobe mit K_3PO_4 nachweisbar (Abb. 15 D). Für die Implantation wurde das Kaliumphosphat-gepufferte Kollagenpulver als bestes Trägermaterial für die PDLSCs ausgewählt.

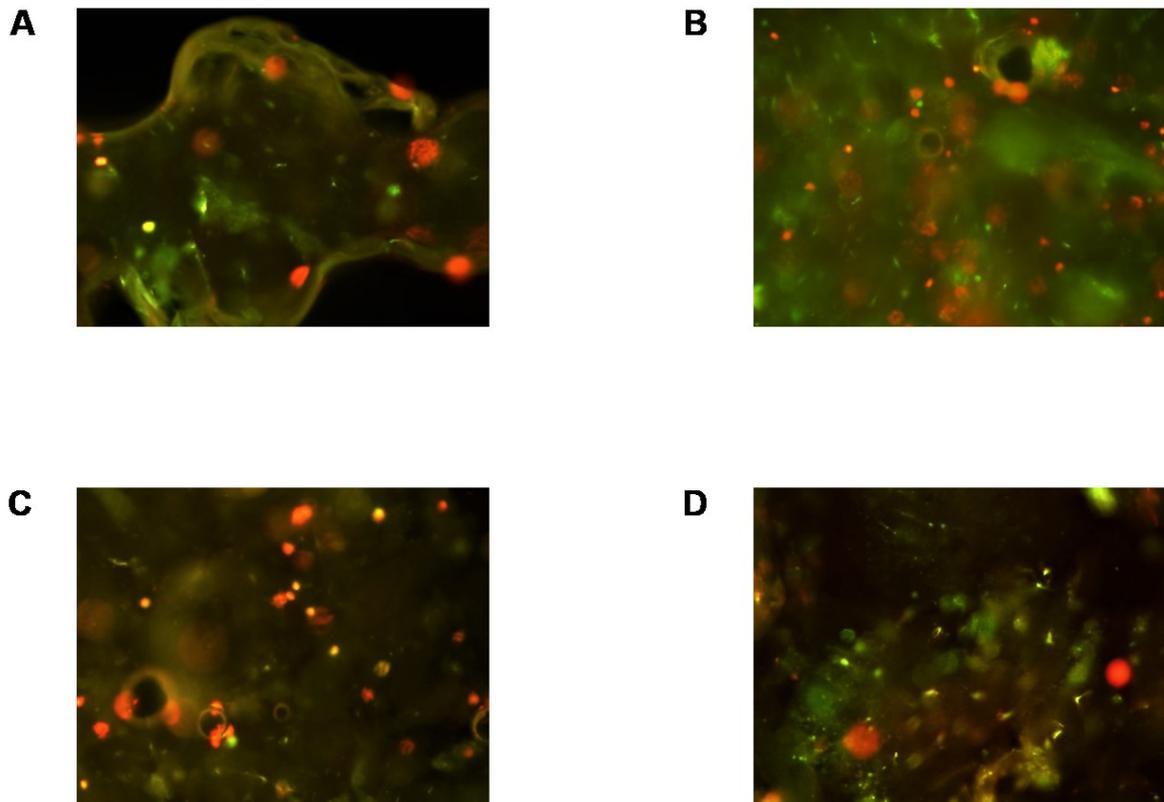


Abbildung 15: Life-Death-Färbung der PDLSCs in Kollagenpulver

Nach 24 h sind vitale (Grün) und avitale Zellen (Rot) sichtbar.

- A)** 0,1 g Kollagenpulver + 400 μ l DMEM-F₁₂ + 400 μ l 2 % NaHCO₃ ,
B) 0,1 g Kollagenpulver + 300 μ l DMEM-F₁₂ + 500 μ l 2 % NaHCO₃ , **C)** 0,1 g Kollagenpulver + 800 μ l HEPES ,
D) 0,1 g Kollagenpulver + 600 μ l DMEM-F₁₂ + 200 μ l K₃PO₄

3.3 Histomorphometrische Analyse

Die Knochenbildung innerhalb der periimplantären Defekte wurde nach 120 Tagen histomorphometrisch evaluiert. Neu gebildeter Knochen konnte aufgrund der Polychromen Sequenzmarkierung unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Die histologischen Schnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Insgesamt wurden 46 Implantate in 15 Minischweinen inseriert und die zirkulären Defekte entsprechend der Versuchsgruppen therapiert (Abb. 5, S. 13). Sechs verschiedene Materialien wurden anhand der histologischen Messungen mit der Leerprobe (Blutkoagulum) und untereinander verglichen. Die Einheilung verlief weitestgehend komplikationslos. Die Schweine der Nummern 209356 und 211343 entwickelten Abszesse. Die zwei Leerdefekte von Schwein 209356 gingen trotzdem in die Auswertung ein.

Von den ursprünglich vorgesehenen Parametern (BIC, NBH, HBA₁, HBA₂, HBA₃, IS-BC und NFB) wurden für die Auswertung die drei Parameter BIC, NBH und NFB ausgewählt.

Die anderen Parameter konnten auf den histologischen Schnitten nicht ausreichend beurteilt werden, da betreffende Bereiche oft nicht angeschnitten waren oder Artefakte die Messungen behinderten (Abb. 16).

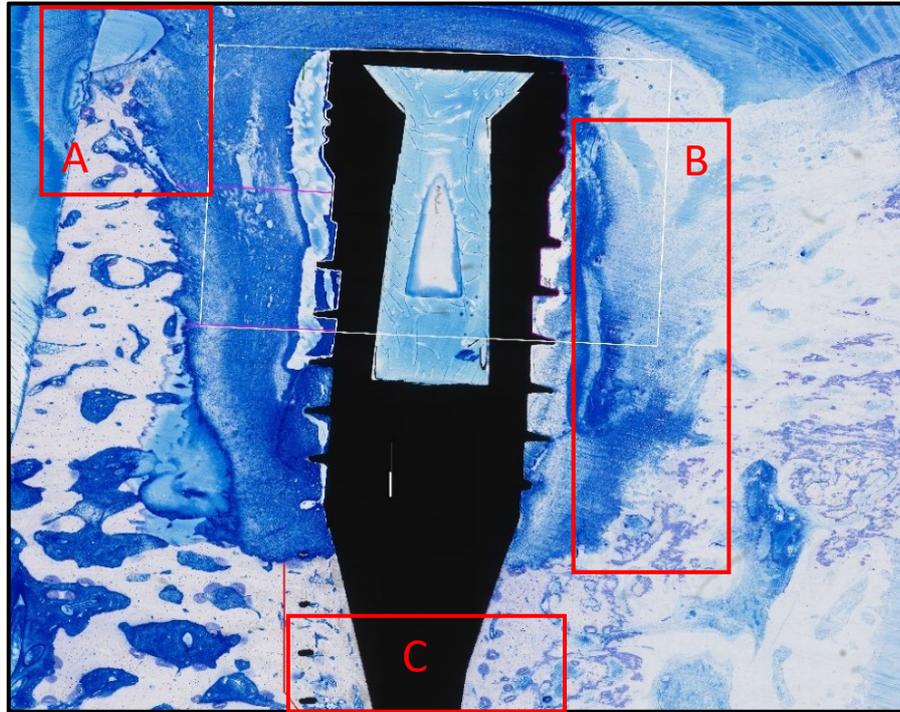


Abbildung 16: Mangelhafter histologischer Schnitt (574 3P2, Kollagenmatrix + WF)

A) Die Cresta alveolaris ist nicht eindeutig identifizierbar. **B)** Der Knochen ist nicht eindeutig von Artefakten zu unterscheiden, die laterale Begrenzung des knöchernen Defektes ist nur auf der gegenüberliegenden Seite sichtbar. **C)** Das Implantat ist unvollständig abgebildet.

3.3.1 Bone to Implant Contact (BIC)

Als Erstes wurde der prozentuale Anteil neu gebildeten Knochens mit direktem Kontakt zur Implantatoberfläche, innerhalb der ROI, bestimmt (Tab. 7). BONITmatrix®-Vlies zeigte in Verbindung mit Wachstumsfaktoren ($30,75 \pm 27,73 \%$) (Abb. 18 A) und ohne Wachstumsfaktoren ($34,36 \pm 18,48 \%$) höhere Werte für den Knochenkontakt als die Leerprobe ($29,41 \pm 38,89 \%$). Auch die Kombination von Kollagenpulver und Stammzellen aus dem parodontalen Ligament wirkte sich gegenüber der Leerprobe positiv auf die Osseointegration aus ($44,06 \pm 24,28 \%$). Die höchsten Werte erreichte das Kollagenpulver allein ($65,81 \pm 15,50 \%$) (Abb. 18 B). Die Kollagenmatrix wirkte sich negativ auf den BIC aus ($7,35 \pm 11,46 \%$), auch in Verbindung mit Wachstumsfaktoren ($1,97 \pm 4,40 \%$) (Abb. 18 C). Einige histologische Schnitte zeigten keinerlei Knochenkontakt innerhalb der ROI. Weiterhin waren Resorptionszeichen, eine unregelmäßige Knochenkontur und

mehrkernige Riesenzellen (Abb. 18 D), höchstwahrscheinlich Osteoklasten, erkennbar. Entgegen dieser Beobachtungen unterschied sich die Osseointegration bei keinem der getesteten Materialien statistisch signifikant von derjenigen der Leerprobe (für alle $p > 0,05$). Die Kollagenpulver-Gruppe zeigte signifikant mehr BIC im Vergleich zu den beiden Kollagenmatrix-Gruppen ($p = 0,002$ und $p = 0,004$) (Abb. 17).

Füllstoff	Mittelwert (%)	Standardabweichung \pm
BONITmatrix®-Vlies	34,36	18,48
BONITmatrix®-Vlies + WF	30,75	27,73
Kollagenmatrix	7,35	11,46
Kollagenmatrix + WF	1,97	4,40
Kollagenpulver	65,81	15,50
Kollagenpulver + PDLSCs	44,06	24,28
Leerprobe (Blutkoagulum)	29,41	38,89

Tabelle 7: BIC Mittelwerte und Standardabweichungen

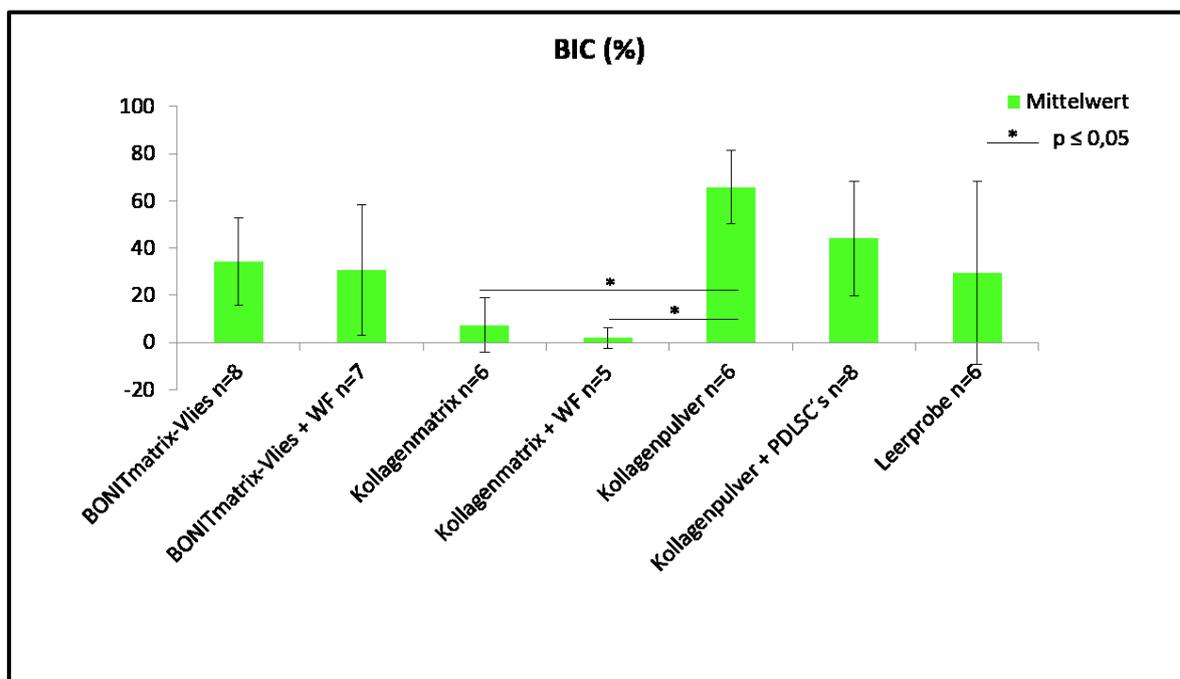


Abbildung 17: BIC grafische Darstellung

„*“ – Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Materialien

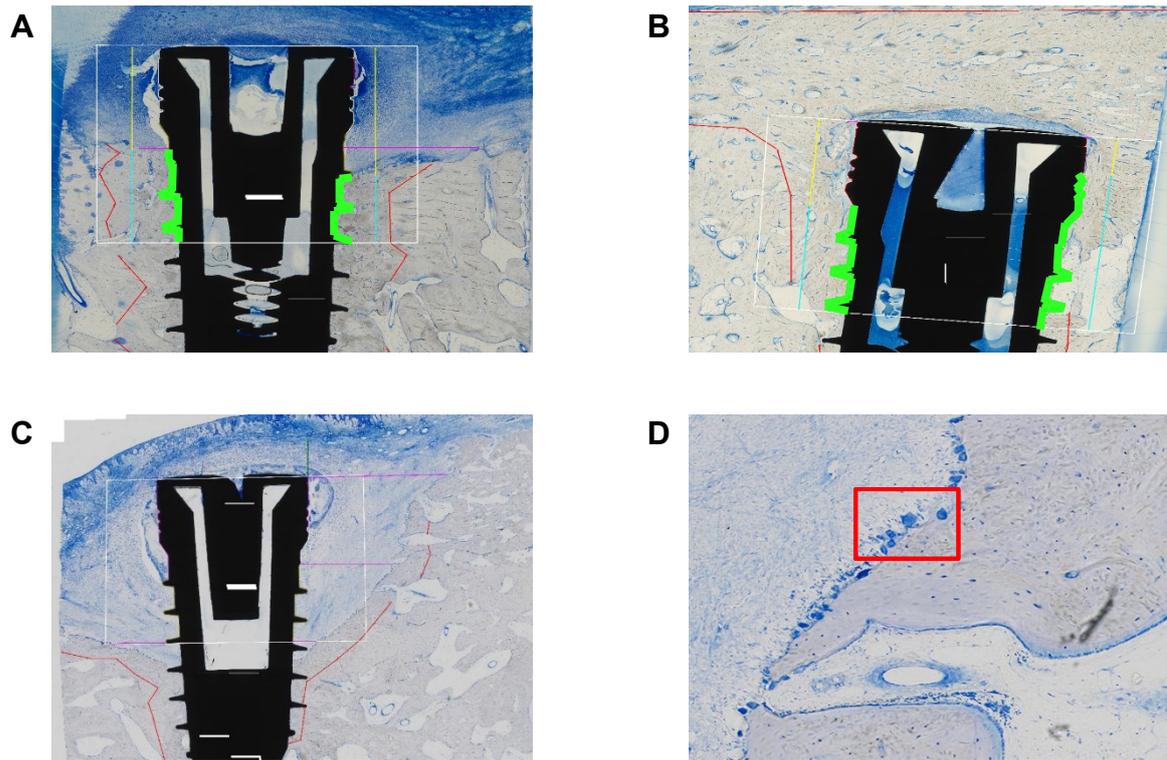


Abbildung 18: BIC histologische Ansicht

A) 733 3P1, BONITmatrix®-Vlies + WF mit durchschnittlich $30,75 \pm 27,73$ % BIC (Grün illustriert), **B)** 380 3P2, Kollagenpulver mit durchschnittlich $65,81 \pm 15,50$ % BIC (Grün illustriert), **C)** 068 4P2, Kollagenmatrix + WF, kein BIC innerhalb der ROI, **D)** Ausschnitt aus 068 4P2, man beachte die mehrkernigen Riesenzellen (Rot umrahmt)

3.3.2 New Bone Height (NBH)

NBH beschreibt die vertikale Knochenbildung ausgehend vom Defektboden. Gemessen wurde eine vertikale Strecke, vom Boden der ROI, bis zum koronalsten Punkt des BIC. Die Werte der BONITmatrix®-Vlies-Gruppe ($1,82 \pm 1,15$ mm) und BONITmatrix®-Vlies/WF-Gruppe ($1,67 \pm 1,59$ mm) unterschieden sich nur geringfügig von denen der Leerprobe ($1,71 \pm 2,18$ mm) (Tab. 8). Die Kollagenmatrix-Proben ($0,31 \pm 0,49$ mm) zeigten eine geringere vertikale Knochenbildung im Defektbereich. In Verbindung mit Wachstumsfaktoren war sie am geringsten ($0,07 \pm 0,18$ mm). Das Kollagenpulver mit Stammzellen wirkte sich positiv auf die Knochenhöhe aus ($2,34 \pm 1,72$ mm). Die stärkste vertikale Knochenbildung zeigten die Kollagenpulver-Proben ($3,97 \pm 1,13$ mm). Im Vergleich zu den Gruppen Kollagenmatrix und Kollagenmatrix/WF war die Knochenbildung hier statistisch signifikant erhöht ($p < 0,001$) (Abb. 19).

Füllstoff	Mittelwert (mm)	Standardabweichung ±
BONITmatrix®-Vlies	1,82	1,15
BONITmatrix®-Vlies + WF	1,67	1,59
Kollagenmatrix	0,31	0,49
Kollagenmatrix + WF	0,07	0,18
Kollagenpulver	3,97	1,13
Kollagenpulver + PDLSCs	2,34	1,72
Leerprobe (Blutkoagulum)	1,71	2,18

Tabelle 8: NBH Mittelwerte und Standardabweichungen

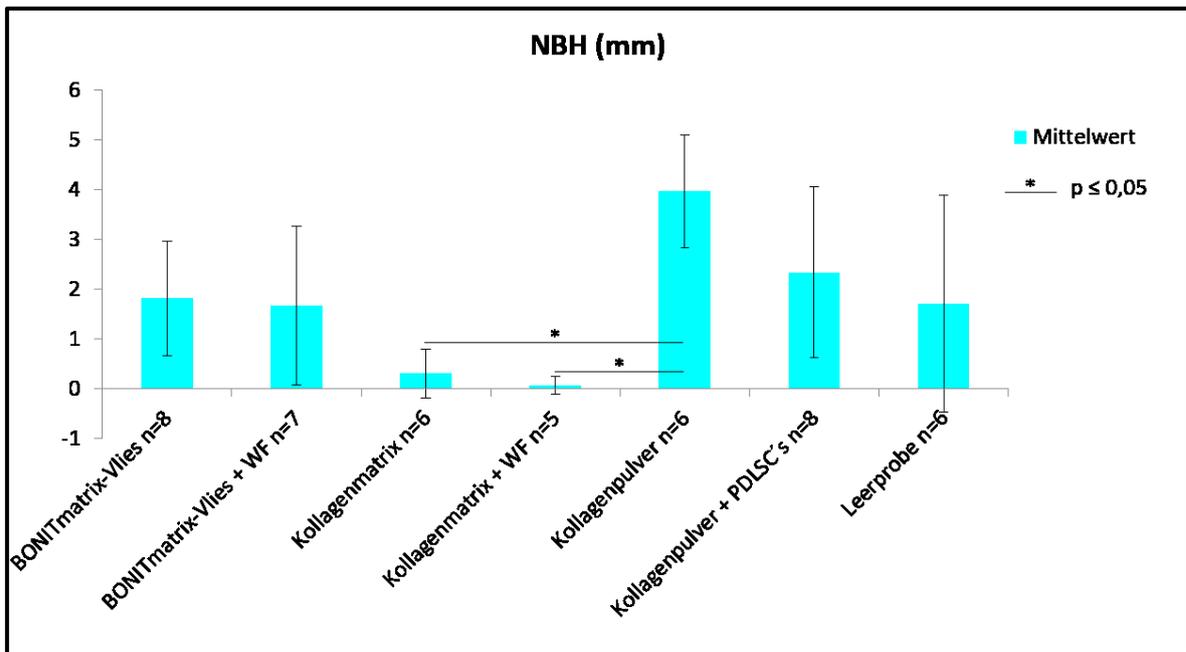


Abbildung 19: NBH grafische Darstellung

„—*“ – Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Materialien

3.3.3 Newly Formed Bone (NFB)

Durch die Polychromen Sequenzmarkierungen konnte der zeitliche Verlauf der Knochenbildung unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Neu gebildeter Knochen zeigte eine stärkere Fluoreszenz als alter Knochen (Abb. 20). Nach Darstellung und Markierung der entsprechenden Flächen, innerhalb der ROI, erfolgte die Berechnung des Flächeninhaltes. In allen Gruppen konnte mehr oder weniger Osteoneogenese nachgewiesen werden (Tab. 9). Die Kollagenmatrix- ($1,44 \pm 1,31 \text{ mm}^2$) und Kollagenmatrix/WF-Proben ($0,42 \pm 0,64 \text{ mm}^2$) zeigten insgesamt weniger Knochenbildung als die Leerprobe ($3,16 \pm 4,31 \text{ mm}^2$). Bei allen anderen Materialien wurde mehr neuer Knochen im Defektbereich gebildet, jedoch nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 21). In den Gruppen Kollagenpulver ($6,02 \pm 3,71 \text{ mm}^2$) und Kollagenpulver/PDLSCs ($6,14 \pm 3,36 \text{ mm}^2$) konnte die größte Fläche neu gebildeten Knochens verzeichnet werden. Die Unterschiede zur Kollagenmatrix/WF-Gruppe waren statistisch signifikant ($p < 0,001$ und $p = 0,001$) (Abb. 21).

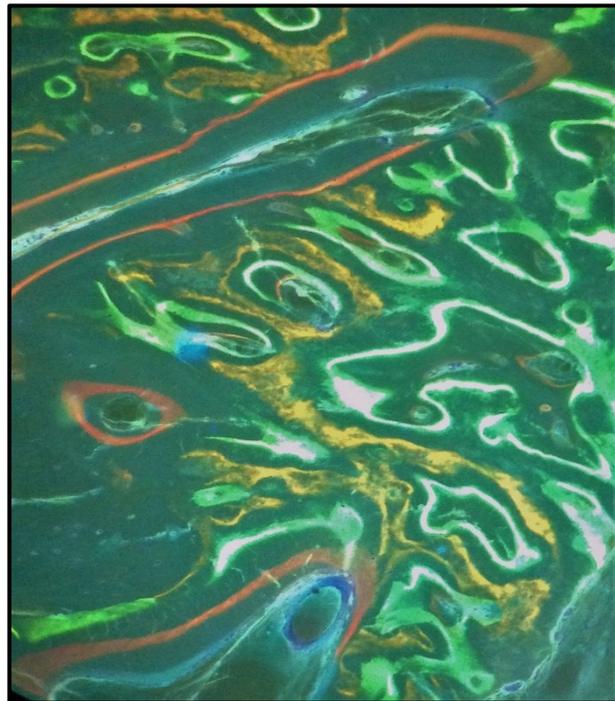


Abbildung 20: NFB Fluoreszenz

Der neu gebildete Knochen im rechten Bildabschnitt fluoresziert stärker als alter Knochen (links).

Füllstoff	Mittelwert (mm ²)	Standardabweichung ±
BONITmatrix®-Vlies	4,78	3,57
BONITmatrix®-Vlies + WF	4,11	3,61
Kollagenmatrix	1,44	1,31
Kollagenmatrix + WF	0,42	0,64
Kollagenpulver	6,02	3,71
Kollagenpulver + PDLSCs	6,14	3,36
Leerprobe (Blutkoagulum)	3,16	4,31

Tabelle 9: NFB Mittelwerte und Standardabweichungen

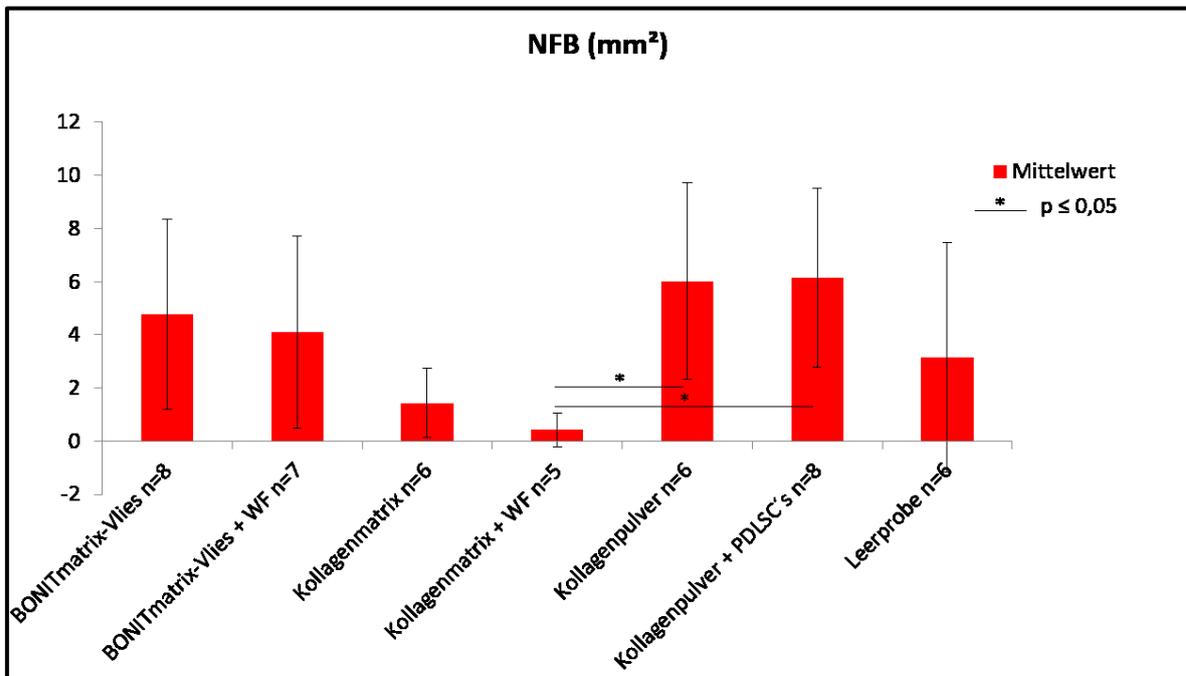


Abbildung 21: NFB grafische Darstellung

„*“ – Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Materialien

4 DISKUSSION

Trotz einer Vielzahl von Behandlungsprotokollen für periimplantäre Erkrankungen existiert nach heutigem Wissenstand noch kein evidenten Therapiekonzept (Figuero et al. 2014, Mahato et al. 2016, Romanos & Weitz 2012, Zitzmann et al. 2006). Chirurgische und gesteuert regenerative Methoden, unter Verwendung von Kollagenmembranen, wurden bereits erfolgreich in der Periimplantitistherapie angewendet (Jung et al. 2017, Schwarz et al. 2010). Insgesamt bleiben die Behandlungserfolge jedoch wenig vorhersagbar und derzeit scheint noch keine Methode einen sicheren Therapieerfolg garantieren zu können. Tierexperimentelle Studien sind deshalb weiter unerlässlich, um neue Therapieoptionen zu untersuchen.

In der vorliegenden *in vivo*-Studie wurde das regenerative Potenzial verschiedener Kollagene, Wachstumsfaktoren und parodontaler Stammzellen, in Verbindung mit gesteuerter Knochenregeneration, vergleichend untersucht. Nach 120 Tagen gedeckter Einheilung konnte in allen Gruppen neuer Knochen im Defektbereich nachgewiesen werden.

4.1 Studiendesign

4.1.1 Modell Periimplantitis

Zwei verschiedene Modelle haben sich für die Erzeugung periimplantärer Defekte bewährt. In Anlehnung an die natürliche Plaque-assoziierte Pathogenese platzierten einige Autoren Ligaturen um Implantate und induzierten eine Periimplantitis. Die folgende Plaqueakkumulation resultierte über einen längeren Zeitraum in Knochenabbau und zirkulären Defekten (Lang et al. 1993, Leonhardt et al. 1992, Nociti et al. 2001, Persson et al. 2001, Wetzel et al. 1999). Dieses Vorgehen ist sehr zeitaufwendig. Andere Arbeitsgruppen erzeugten zirkuläre Defekte oder Dehiszenzen deshalb chirurgisch, zeitgleich mit der Implantatinsertion (Boticelli et al. 2003, de Barros et al. 2012, Schwarz et al. 2007a und 2007b). In unserem Versuch wurden die zirkulären Defekte mit der Implantation artifiziell angelegt und unterschiedlichen Therapien unterzogen. Eine Standardisierung wurde dabei durch die Verwendung eines genormten Bohrers bei allen Defekten erreicht.

4.1.2 Minischwein als Versuchstier

Die Wahl von geeigneten Versuchstieren ist von großer Wichtigkeit für die Herstellung eines klinischen Bezuges zu den experimentell gewonnenen Ergebnissen. Während sich Nagetiere schon allein wegen ihrer Größe und des damit verbundenen fehlenden Platzangebotes für multiple Implantationen nicht eignen, gelten größere Versuchstiere wie Hunde, Schafe oder Schweine als die Spezies der Wahl. Implantationen wurden in der zahnmedizinischen Forschung bereits oft an Hunden untersucht. Ihre Knochenzusammensetzung und –mikrostruktur ähnelt stark der des Menschen. Die Verwendung von Haustieren für die medizinische Forschung wirft jedoch vermehrt ethische Fragestellungen auf (Pearce et al. 2007). In den letzten Jahren hat sich das Minischwein für präklinische Studien gut etabliert. Der porcine Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich ähnelt stark dem menschlichen hinsichtlich Entwicklung, Anatomie, Physio- und Pathophysiologie (Wang et al. 2007, Stembirek et al. 2012). Im Hinblick auf Knochenstruktur und Remodellierungsprozesse ähnelt Schweineknöchel noch stärker humanem Knochen, als es beim Hund der Fall ist (Pearce et al. 2007). Gewonnene Erkenntnisse sind relativ gut auf den Menschen übertragbar. Das Minischwein bildet zwei Dentitionen aus und zeigt weiterhin eine spontane Entstehung von Krankheiten wie Gingivitis und Parodontitis (Liu et al. 2008). Die Haltung der Omnivoren ist vergleichsweise aufwendig, kostenintensiv und unterliegt strengen gesetzlichen Vorgaben. Für tierexperimentelle Studien ergibt sich deshalb häufig eine begrenzte Anzahl an Individuen. Die Ergebnisse von *in vivo*-Studien hängen immer von einer Vielzahl individueller Faktoren ab. Unterschiede im allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere, genetische oder immunologische Faktoren können den individuellen Heilungsverlauf beeinflussen und Schwankungen bei den Ergebnissen hervorrufen.

4.1.3 Methodik

Die Besonderheit der vorliegenden Studie liegt in der Vielzahl der getesteten Materialien und dem vergleichenden Charakter. 46 zirkuläre Defekte wurden mit sieben verschiedenen Materialkombinationen entsprechend der Versuchsgruppen therapiert. Ihre Verteilung auf die Defekte wurde randomisiert. Durch die gleichzeitige Anwendung verschiedener kollagenbasierter Therapien, innerhalb eines Individuums, sollte ein direkter Vergleich der Wirksamkeit ermöglicht werden. Aus der Komplexität der Studie ergeben sich jedoch kleine Stichprobengrößen ($n \leq 8$). Neben den individuellen Voraussetzungen der Tiere für den Heilungserfolg resultieren aus der begrenzten Anzahl der Stichproben zum Teil große Standardabweichungen bei den Ergebnissen. Auch klinische Faktoren, wie die Fähigkeiten und Erfahrungen des Operateurs, haben Einfluss auf die

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Für die Einheilung der Implantate und die knöchernen Regeneration der Defekte wurde ein Zeitraum von 120 Tagen gewählt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung anhand von histomorphometrischen Parametern. Andere Autoren erzielten nach dieser Zeit Erfolge in der knöchernen Regeneration entsprechender Defekte (Boticelli et al. 2003, Schenk et al. 1994). Branemark definierte einen Zeitraum von 3-4 Monaten als angemessen für eine Osseointegration. Nach der angegebenen Zeit und unter Immobilisation soll sich eine dünne Schicht kompakten Knochens an die Implantatoberfläche angelagert haben, ohne dass eine Bindegewebsschicht zwischen Implantat und altem Knochen entsteht (Branemark 1983). Laut Schenk & Buser verläuft die Osseointegration in drei Stadien. Zunächst erfolgt, analog zur direkten Frakturheilung, die Bildung von Geflechtknochen. Dieser wird entsprechend der Belastung nach und nach durch lamellären und parallelfaserigen Knochen ersetzt. Zuletzt findet zeitlebens ein funktionelles Bone-Remodeling statt (Schenk & Buser 1998).

Zur Beurteilung der jeweiligen Ossifikationsaktivität hat sich die Verabreichung verschiedener fluorochromer Farbstoffe bewährt (Gradinger & Gollwitzer 2006, Rahn 1976). Knochenneubildung und -umsatz werden unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und der zeitliche Verlauf der Knochenbildung kann nachvollzogen werden. Nach Verabreichung von Xylenolorange, Calceingrün und Alizarinkomplexon zeigte der neu gebildete Lamellenknochen in unseren Defekten eine stärkere Fluoreszenz als der alte Knochen. Es traten jedoch auch im alten Knochen immer wieder jahresringähnliche Strukturen auf. Dieses Phänomen wurde als Indiz für das physiologische Bone-Remodeling des bestehenden Knochens gewertet.

4.2 Materialien

4.2.1 Semipermeable Kollagenmembran

Die Verwendung von Membranen, im Rahmen der gesteuerten Knochenregeneration, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Sie dient der Stabilisierung des Blutkoagulums, hält Knochenersatzmaterialien im Defekt und verhindert gleichzeitig das Einsprossen von schneller proliferierenden Geweben. Kollagenmembranen besitzen außerdem eine hydrophile Oberfläche, die sich gut in umliegendes Gewebe integriert und die Entfernung in einem zweiten Eingriff unnötig macht (de Vicente et al. 2006). Betrachtet man den Umstand, dass nach 120 Tagen gedeckter Einheilung in allen Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe, neuer Knochen gebildet wurde, ist dieser Effekt wahrscheinlich der in allen Fällen verwendeten semipermeablen Kollagenmembran zuzuschreiben. Eine Gegenüberstellung der Defektheilung mit und ohne Membran war jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

De Vicente et al. verglichen die Heilung zirkulärer Defekte unter Verwendung von DFDBA und Bio-Oss®, jeweils mit und ohne Membranabdeckung, an Beagle-Hunden. Die Kombination von Bio-Oss® und Kollagenmembran zeigte dabei die besten Ergebnisse, jedoch ohne Signifikanz. Für die Einheilung wurde hier ein Zeitraum von 36 Wochen gewählt (de Vicente et al. 2006). Auch andere Defektmorphologien, wie zum Beispiel 3-wandige Defekte, scheinen von einer zusätzlichen Membrananwendung zu profitieren (Schenk et al. 1994). Wetzel et al. untersuchten die Reosseointegration von Implantaten nach Ligatur-induzierter Periimplantitis an Hunden. Auch hier führte die Membranabdeckung nach sechs Monaten zu mehr Knochenbildung im Defektbereich. Es kam jedoch auch vereinzelt zu Membranexpositionen und damit verbundenen Infektionen (Wetzel et al. 1999). Die Autoren Botticelli et al. fanden bei ihren Untersuchungen zur Knochensprungdistanz nach vier Monaten keine Verbesserungen bei Verwendung einer Membran. Sie schlussfolgerten, dass kleine zirkuläre Defekte ein ausreichend stabiles Blutkoagulum erzeugen und dass bei intaktem Mukoperiostlappen auf eine zusätzliche Membranabdeckung verzichtet werden kann (Botticelli et al. 2003).

Auch klinisch sind sich die Autoren uneinig über die Vorteile der GBR. Schwarz et al. bewerteten die Verwendung einer Kollagenmembran, in Verbindung mit bovinem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss®), als positiv für die Regeneration zirkulärer Defekte (Schwarz et al. 2010). Eine aktuelle Studie zeigte außerdem, dass kleine bukkale Dehiszenz-Defekte von einer Membranabdeckung profitieren, im Vergleich zur spontanen Heilung ohne GBR (Jung et al. 2017). Roos-Jansaker et al. beobachteten über einen Zeitraum von 5 Jahren keine Vorteile bei Verwendung einer resorbierbaren Membran (Roos-Jansaker et al. 2014). Wegen des Risikos der Membranexposition und damit

verbundener Folgekomplikationen sowie erhöhten Zeitaufwandes und zusätzlicher Kosten lehnen einige Autoren das Vorgehen ab (Figuro et al. 2014, Chan et al. 2014). Für die Verwendung einer Membran lassen sich aus der Literatur keine allgemeingültigen Empfehlungen ableiten. Die Indikation sollte, abhängig von den vorhandenen Weichgewebslagen und vorliegenden Defektmorphologien, jeweils individuell geprüft werden (Boticelli et al. 2003, Jung et al. 2017, Schenk et al. 1994).

4.2.2 Implantate mit CaP-Beschichtung

Calciumphosphat ist der Hauptbestandteil der anorganischen Knochenmatrix. BONIT ist eine elektrochemisch abgeschiedene, lösliche CaP-Beschichtung für Titanimplantate. In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich raue Titanimplantate mit BONIT-Beschichtung inseriert (BONITex Implantate). Reigstad et al. sprachen der löslichen Beschichtung positive Einflüsse auf die frühe Osseointegration zu. Im Removal-Torque-Test wiesen die beschichteten Implantate eine stärkere ossäre Verankerung auf im Vergleich zu herkömmlichen gestrahlten Titanimplantaten (Reigstad et al. 2007). Eine Studie von Hwang et al. über die Vorgänge in unmittelbarer Umgebung von CaP-beschichteten Implantaten fand heraus, dass sich die Schicht frühzeitig auflöst und anschließend die Knochenbildung induziert wird. Laut Hwang et al. geschieht dies unabhängig von der primären mechanischen Verankerung (Hwang et al. 2013). Dieser Aspekt könnte interessant für eine frühzeitige Belastung solcher Implantate oder Implantationen im qualitativ kritischen Knochenlager sein. *In vitro* konnte darüber hinaus die Aktivierung von Osteoblasten durch eine lösliche CaP-Phase nachgewiesen werden (Becker et al. 2004).

4.2.3 Kollagenmatrix

Quallenkollagen wurde bereits erfolgreich für die Regeneration von Knorpelgewebe verwendet. Hoyer et al. erzeugten ein poröses dreidimensionales Gerüst aus einer Quallenkollagenlösung (*Rhopilema esculentum*). In dieses 3D-Gerüst wurden erfolgreich humane mesenchymale Stammzellen inkorporiert und ihre Differenzierung zu Chondroblasten stimuliert. Das enthaltene Kollagen ähnelt stark dem in der chondralen Extrazellulärmatrix von Säugetieren vorkommenden Kollagen Typ II. Für Knorpel-Tissue Engineering ist es somit gut geeignet (Hoyer et al. 2014). Untersuchungen zum osteogenen Regenerationspotential von Quallenkollagen fehlen bislang. Im Vergleich zu den anderen getesteten Materialien in unserem Versuch zeigte die Quallenkollagenmatrix (*Rhopilema spec.*) eine schlechtere knöcherne Einheilung. Die Unterschiede hinsichtlich BIC, NBH und NFB waren jedoch nur im Vergleich zum Kollagenpulver signifikant schlechter.

Song et al. beschrieben eine Verbesserung der Lebensfähigkeit von Zellen in Quallenkollagen-Gerüsten im Vergleich zu anderen natürlichen Biomaterialien, zum Beispiel bovinen Ursprungs. Die poröse, interkonnektierende Porenstruktur sei vorteilhaft für eine hohe Zelldichte und eine gute Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen innerhalb des Gerüsts. Es wurde jedoch auch eine provozierte Immunantwort beobachtet (Song et al. 2006). Trotz der beschriebenen positiven Eigenschaften für die Zellvitalität waren diese in unseren *in vitro*-Versuchen unbefriedigend. Nach 24 Stunden der gemeinsamen Inkubation von Kollagenmatrix und PDLSCs waren nur wenig lebende Zellen im Material nachweisbar. Andere Autoren berichteten ebenfalls von immunostimulatorischen Effekten (Morishige et al. 2011, Sugahara et al. 2006). Sugahara et al. beobachteten eine gesteigerte IgM-Produktion von humanen Hybridoma Zellen (HB4C5) sowie gesteigerte IgM- und IgG-Produktionen von humanen Lymphozyten (PBL). Die Entzündungsmediatoren TNF- α und IFN- γ wurden ebenfalls vermehrt exprimiert. Das Quallenkollagen aktiviert die angeborene Immunität durch eine Steigerung der Cytokinproduktion und Phagozytoseaktivität der Makrophagen (Putra et al. 2014). Dieser Umstand erklärt unsere Beobachtungen von vermehrten Resorptionszeichen und mehrkernigen Riesenzellen in den histologischen Schnitten von Kollagenmatrix und Kollagenmatrix/WF. Es liegt die Vermutung nahe, dass die durch Quallenkollagen hervorgerufene Immunantwort einer knöchernen Regeneration entgegen wirkt.

4.2.4 Kollagenpulver

Im Vergleich zur Matrix aus Quallenkollagen und der Kollagenmatrix mit Wachstumsfaktoren zeigte das Kollagenpulver eine signifikant bessere knöcherne Regeneration. Die Anwendung des bovinen Pulvers aus fibrillärem Kollagen Typ I, III und V erfolgte zum ersten Mal in dieser Studie. In unseren vorangegangenen *in vitro*-Versuchen konnte das Überleben vieler PDLSCs in dem Pulver über 24 h nachgewiesen werden. Nach Pufferung des sauren pH-Wertes mit Kaliumphosphat wurde es als geeigneter Stammzellträger ausgewählt. Das Kollagenpulver und die Kombination von Kollagenpulver und PDLSCs erzeugten signifikant mehr neuen Knochen im Defektbereich als die Kombination von Kollagenmatrix und Wachstumsfaktoren. Neben der Unterstützung der Osseointegration und der Eignung als Trägermaterial für Stammzellen ließ sich das Pulver einfach verarbeiten und gut in die Defekte applizieren.

4.2.5 Kollagenvlies

Das Vlies aus Kollagen und granulärem BONITmatrix® wurde speziell für die vorliegende Vergleichsstudie angefertigt. In Untersuchungen von Müller et al. konnte bereits eine Förderung der Osteoblastendifferenzierung durch die speziellen Oberflächencharakteristika von BONITmatrix® nachgewiesen werden. Dazu wurde die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen auf verschiedenen Oberflächen untersucht. Im Vergleich zu normalen Zellkulturscheiben steigerte die Calciumphosphat-Oberfläche von BONITmatrix® das osteogene Differenzierungspotenzial der hMSCs. Selbst ohne Zusatz von Differenzierungsfaktoren zum Zellkulturmedium entwickelten sich die MSCs binnen 14 Tagen zu Osteoblasten. Eine gesteigerte alkalische Phosphatase-Aktivität lieferte dafür den Nachweis (Müller et al. 2008). Kunert-Keil et al. verglichen zwei verschiedene Applikationsformen von BONITmatrix®. Sowohl die granuläre Form als auch die Pastenform (fragmentiertes BONITmatrix) stimulierten die knöcherne Regeneration von Defekten im Rattenschädel. Die Pastenform zeigte eine schnellere Materialresorption und umfangreichere Ossifikation der Defekte nach acht Wochen (Kunert-Keil et al. 2009). Später wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass nur die granuläre Form die Expression von Kollagen Typ I, alkalischer Phosphatase und Osteocalcin steigert, was mit den Beobachtungen von Müller et al. übereinstimmt. Die pastöse Form (OSSA NOVA) hatte, außer einer vermehrten IGF-1-Bildung, keinen Einfluss auf die Genexpression. Die Autoren schlussfolgerten, dass nur die granuläre Form die Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung stimuliert und somit die Knochenregeneration und den physiologischen Umsatz steigert (Gredes et al. 2012a und 2012b). Schwarz et al. untersuchten die gesteuerte Regeneration von Dehiszenz-Defekten an Titanimplantaten unter Verwendung eines alloplastischen Knochenersatzmaterials auf HA/TCP-Basis (Bone Ceramic®) und eines kollagen-überzogenen, bovinen Minerals (BioOss Collagen®). Beide Materialien führten im Hundemodell zu einer nahezu vollständigen Regeneration der Defekte nach neun Wochen (Schwarz et al. 2007).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Eignung von BONITmatrix®/Kollagen als Knochenersatzmaterial für die Regeneration periimplantärer Defekte bewertet. Entgegen der positiven Erkenntnisse aus den beschriebenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit Materialien auf Calciumphosphat-Basis unterschied sich die Regeneration der mit BONITmatrix®-Vlies therapierten Defekte in unserem Versuch nur geringfügig und ohne statistische Signifikanz von derjenigen der Leerprobe. Eine gesteigerte Knochenregeneration konnte auch im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien nicht beobachtet werden.

4.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind für die Modulation von zellulären Aktivitäten verantwortlich. Sie beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, deren Migration und Adhäsion sowie die Genexpression (Alberts 2017). In unserer Studie wurde die Wirksamkeit eines Gemisches aus verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGF, b-FGF, IGF-1 und TGF- β 1), in Verbindung mit den bereits als Träger beschriebenen Kollagenen, untersucht. Der Extrakt wurde aus humanem Thrombozyten-Lyophilisat gewonnen. Andere Thrombozyten-Aufbereitungen, wie Platelet Rich Plasma, enthalten die gleichen Wachstumsfaktoren. Aus den darin angereicherten Thrombozyten werden neben VEGF, b-FGF, IGF-1 und TGF- β noch PDGF und EGF freigesetzt (Anitua 1999). Entsprechend der Vielzahl an Faktoren wurden PRP multiple positive Effekte zugeschrieben, zum Beispiel auf die Wundheilung, Angiogenese und Osteoblastendifferenzierung (Anitua 1999). Fuerst et al. beschrieben weiterhin eine signifikante Verbesserung der Implantatverankerung im kortikalen Schweineknochen sowie einen gesteigerten BIC bei Verwendung von PRP (Fuerst et al. 2003). Andere Studien gelangten zu dem Ergebnis, dass derlei Thrombozyten-Aufbereitungen keine zusätzliche positive Wirkung auf die knöcherne Regeneration periimplantärer Defekte haben (Casati et al. 2007), was mit unseren Beobachtungen übereinstimmt. Klinisch finden bisher lediglich die Wachstumsfaktoren PDGF, BMP-2 und 7 Anwendung (Stavropoulos & Wikesjö 2012). Obwohl PDGF in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien einen positiven Einfluss auf die Osseointegration von Implantaten (Lynch et al. 1991), Kieferkammaugmentationen (Simion et al. 2006), Sinusbodenelevationen (Kim 2009) und den Erhalt des Alveolarkamms nach Extraktionen (Wallace et al. 2013) hatte, gilt seine FDA-Zulassung bisher nur für den Einsatz in parodontalen Defekten (Suarez-Lopez del Amo et al. 2015). Die Verwendung von rhBMP-2, für Sinusbodenaugmentationen vor Implantation und zum Kieferkammerhalt, stellt eine Alternative zum autologen Knochentransplantat dar (Boyne et al. 1997, Suarez-Lopez del Amo et al. 2015). RhBMP-2 ermöglicht eine Knochenbildung durch Autoinduktion (Urist 1965, Ripamonti et al. 2007). BMP-7 wurde bisher lediglich für Sinusaugmentationen verwendet (Suarez-Lopez del Amo et al. 2015).

Der Wachstumsfaktor-Cocktail, der Gegenstand dieser Untersuchung war, hatte in Verbindung mit den verschiedenen Kollagenen keinen steigernden Einfluss auf die Osseointegration der Implantate. Die histomorphometrische Analyse zeigte geringere Werte für die Kombination aus Kollagen und Wachstumsfaktoren im Vergleich zu dem jeweiligen Kollagen allein. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In einer Literaturstudie von Tayalia und Mooney wurden die Schwierigkeiten bei der Verabreichung von Wachstumsfaktoren beschrieben und geeignete Trägersysteme vorgestellt.

Die Faktoren werden darin als relativ große Moleküle mit einer kurzen Halbwertszeit beschrieben. Sie können langsam das Gewebe penetrieren, vom Applikationsort weg diffundieren und somit unerwünschte Nebeneffekte verursachen. Lösliche Wachstumsfaktoren werden im Gewebe schnell abgebaut und von Enzymen deaktiviert. Matrix-gebunden sind sie oft physiologisch inaktiv, bis eine proteolytische Aktivierung stattfindet. Infolge der Aktivierung kommt es lokal zu einer gesteigerten Signaltransduktion ohne Proteinsynthese, was sich hemmend auf die Heilung beschädigter Gewebe auswirken kann. Eine lokal kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren kann beispielsweise durch die Kopplung mit verschiedenen Polymeren erreicht werden (Tayalia & Mooney 2009). Das von uns verwendete Lyophilisat wurde zunächst in steriler Kochsalzlösung gelöst und dann mittels Einwegspritze in die Defekte, mit den bereits eingebrachten Kollagenen, appliziert. Es besteht die Möglichkeit, dass die Wachstumsfaktoren in unserem Fall ihre Wirkung nicht am gewünschten Ort entfalten konnten, da sie nach der Applikation entweder weg diffundierten oder inaktiviert wurden. In weiterführenden Untersuchungen sollten deshalb Wachstumsfaktoren schon vorab mit den Trägerstoffen gekoppelt werden.

4.4 Stammzellen aus dem parodontalen Ligament

In der Parodontologie gilt der Einsatz von PDLSCs als vielversprechend. Ihr regeneratives Potenzial wurde bereits in mehreren präklinischen Studien nachgewiesen (Ding et al. 2010, Liu et al. 2008, Park et al. 2011). Autologe PDLSCs konnten nachweislich die komplexen Strukturen des Zahnhalteapparates regenerieren, einschließlich alveolären Knochens, Wurzelzements, Desmodonts, Bindegewebes und Blutgefäßen. Im gleichen Zusammenhang wurde auch die Möglichkeit der Differenzierung zu knochenmatrix-bildenden Osteoblasten und zementbildenden Zementoblasten bewiesen (Menicanin et al. 2013). Auch klinisch lieferte die Anwendung parodontaler Stammzellen bereits gute Ergebnisse in der humanen Parodontitis-Therapie (Feng et al. 2010).

Trotz dieser Ergebnisse ist die Verwendung von PDLSCs für die Regeneration periimplantärer Defekte bisher nur Gegenstand weniger Studien mit mäßigem Erfolg. Kim et al. untersuchten den Einfluss von PDLSCs und Knochenmarksstammzellen, in Verbindung mit einem HA/TCP-Gerüst, auf die Heilung von sattelförmigen periimplantären Defekten an Beagle-Hunden. Nach acht Wochen zeigten die Proben mit beiden Stammzellpopulationen signifikant mehr neu gebildeten Knochen als die Kontrollgruppe. Nach 16 Wochen traf das jedoch nur noch für die Probe mit BMSCs zu (Kim et al. 2009). PDLSCs scheinen also vor allem die frühe Knochenbildung zu beeinflussen. Park et al. führten einen *ex vivo* BMP-2-Gentransfer mittels PDLSCs am Hund durch. Dazu wurden

autologe parodontale Stammzellen vorab mit adenoviralen Vektoren transduziert und periimplantäre Defekte mit Ligaturen erzeugt. Es erfolgte die Implantation von PDLSCs und PDLSCs/BMP-2 jeweils in einem Kollagengel mit HA-Partikeln und nur das Kollagengel als Kontrollprobe. Alle Defekte wurden zusätzlich mit einer resorbierbaren Membran abgedeckt. Nach 3 Monaten zeigte nur die PDLSCs/BMP-2-Gruppe signifikant mehr neu gebildeten Knochen und Reosseointegration im Vergleich zu PDLSCs allein und der Kontrollgruppe (Park et al. 2015). Die Steigerung der Knochenbildung geht hier wahrscheinlich auf BMP-2 zurück. Der alleinige Nutzen der PDLSCs für die Reosseointegration scheint gering zu sein.

In unseren Untersuchungen zeigte die Gruppe Kollagenpulver/PDLSCs zwar durchschnittlich am meisten Knochenbildung im Defektbereich, der entsprechende Parameter (NFB) unterschied sich jedoch nur von der Kollagenmatrix/WF-Gruppe signifikant. Im Vergleich zum Kollagenpulver ohne Stammzellen wurde nur unwesentlich mehr neuer Knochen gebildet und vergleicht man die Werte mit denen der Leerprobe, so sind sie nicht signifikant besser. Zusammengefasst handelt es sich bei PDLSCs um multipotente Zellen, die alle Strukturen des Zahnhalteapparates regenerieren können (Menicanin et al. 2013). Im Rahmen dieser Studie zeigte sich, dass sie auf die Regeneration knöcherner Defekte, in unmittelbarer Umgebung von Titanimplantaten, keinen entscheidenden Einfluss haben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Periimplantitis ist eine Komplikation, die unbehandelt zum späten Implantatverlust führen kann. Unter der Vielzahl an Therapiekonzepten hat sich bis heute keine Methode als überlegen und für alle klinischen Situationen geeignet dargestellt. In der vorliegenden *in vivo*-Studie wurden verschiedene Ansätze zur Unterstützung der gesteuerten Knochenregeneration am Minischwein untersucht.

Die unteren 1. und 2. Prämolaren von 15 Göttinger Miniaturschweinen wurden extrahiert. Aus ihrem Desmodont wurden PDLSCs isoliert und kultiviert. 90 Tage später wurden 46 SLA-Implantate mit CaP-Beschichtung im III. und IV. Quadranten inseriert und zirkuläre Defekte geschaffen. Die Defekte wurden mit 1. BONITmatrix®-Vlies (BV), 2. BONITmatrix®-Vlies + Wachstumsfaktoren (BV/WF), 3. Kollagenmatrix (KM), 4. Kollagenmatrix + Wachstumsfaktoren (KM/WF), 5. Kollagenpulver (KP), 6. Kollagenpulver + PDLSCs (KP/PDLSCs) gefüllt oder unbehandelt gelassen (7. Leerprobe). Alle periimplantären Defekte wurden zusätzlich mit einer semipermeablen Kollagenmembran abgedeckt. Während der Heilungsphase wurden verschiedene fluorochrome Farbstoffe appliziert (14, 28 und 84 Tage post implantationem). Nach 120 Tagen wurde die knöcherne Regeneration histomorphometrisch und fluoreszenzmikroskopisch evaluiert (BIC, NBH, NFB).

In allen Gruppen wurde nach der Einheilzeit eine periimplantäre Knochenbildung im Defektbereich beobachtet. Im Vergleich zur Leerprobe führte jedoch weder die Anwendung der verschiedenen Kollagene noch deren Kombination mit xenogenen Wachstumsfaktoren oder der Zusatz von autologen Stammzellen zu einer signifikanten Steigerung der Osseointegration. Die Kollagenpulver-Gruppe zeigte eine signifikant bessere Regeneration der Defekte (BIC und NBH) als die Kollagenmatrix- und die Kollagenmatrix/WF-Gruppe. Das Pulver und die Kombination von Kollagenpulver und PDLSCs erzeugten insgesamt signifikant mehr neuen Knochen im Defektbereich (NFB) als die Kombination von Kollagenmatrix und Wachstumsfaktoren.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Anwendung der gesteuerten Knochenregeneration mittels Kollagenmembran zu einer gesteigerten Regeneration periimplantärer Defekte führen kann. Die Anwendung kollagener Füllstoffe, Wachstumsfaktoren oder Stammzellen kann die Knochenbildung zusätzlich unterstützen. Sie führte in der vorliegenden Untersuchung jedoch zu keiner signifikanten Steigerung der Osseointegration im Vergleich zu derjenigen innerhalb der Kontrollgruppe. Insgesamt unterliegen die Ergebnisse großen individuellen Schwankungen, welche potenziell positive Effekte der getesteten Materialien überlagern und eine Reproduzierbarkeit erschweren.

6 THESEN

1. Die gesteuerte Knochenregeneration unter Verwendung einer semipermeablen Kollagenmembran führt zu einer Osteoneogenese in periimplantären Defekten.
2. Die zusätzliche Anwendung verschiedener Kollagene führt zu keiner signifikanten Steigerung der Regeneration entsprechender Defekte.
3. Die Verwendung xenogener Wachstumsfaktoren und autologer PDLSCs hat keinen signifikanten Einfluss auf die Osseointegration von Titanimplantaten.
4. Das Kollagenpulver eignet sich nach Neutralisation des pH-Wertes als Trägermaterial für parodontale Stammzellen und ermöglicht ihre Applikation in Knochendefekte.
5. Verschiedenste individuelle Faktoren beeinflussen das Ergebnis von *in vivo*-Studien. Potenzielle Effekte untersuchter Materialien vermögen sich manchmal klinisch nicht durchzusetzen.

Literaturverzeichnis

1. Albanese, A., Licata, M. E., Polizzi, B., & Campisi, G. (2013). Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Ageing*, *10*(1), 23.
2. Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. Garland science.
3. Albrektsson, T., & Jacobsson, M. (1987). Bone-metal interface in osseointegration. *The Journal of prosthetic dentistry*, *57*(5), 597-607.
4. Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *International journal of Oral and maxillofacial Implants*, *14*(4), 529-535.
5. Athanasiou, K. A., Niederauer, G. G., & Agrawal, C. M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, *17*(2), 93-102.
6. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *16*(5), 585-601.
7. de Barros, R. R. M., Novaes, A. B., Queiroz, A., & de Almeida, A. L. G. (2012). Early peri-implant endosseous healing of two implant surfaces placed in surgically created circumferential defects. A histomorphometric and fluorescence study in dogs. *Clinical oral implants research*, *23*(12), 1340-1351.
8. Bartold, P. M., Xiao, Y., Lyngstaadas, S. P., Paine, M. L., & Snead, M. L. (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, *41*(1), 123-135.
9. Becker, P., Neumann, H. G., Nebe, B., Lüthen, F., & Rychly, J. (2004). Cellular investigations on electrochemically deposited calcium phosphate composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *15*(4), 437-440.

10. Benatti, B. B., Silvério, K. G., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H. (2007). Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(1), 1-6.
11. Berglundh, T., Lindhe, J., Marinell, C., Ericsson, I., & Liljenberg, B. (1992). Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*, 3(1), 1-8.
12. Botticelli, D., Berglundh, T., Buser, D., & Lindhe, J. (2003). The jumping distance revisited. *Clinical Oral Implants Research*, 14(1), 35-42.
13. Boyne, P. J., Marx, R. E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E., Lilly, L. C., ... & Nummikoski, P. (1997). A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *International journal of periodontics & restorative dentistry*, 17(1).
14. Branemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *The Journal of prosthetic dentistry*, 50(3), 399-410.
15. Brånemark, P. I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B. O., Lindström, J., & Ohlsson, Å. (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, 3(2), 81-100.
16. Bunyaratavej, P., & Wang, H. L. (2001). Collagen membranes: a review. *Journal of periodontology*, 72(2), 215-229.
17. Buser, D., Brägger, U., Lang, N. P., & Nyman, S. (1990). Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clinical oral implants research*, 1(1), 22-32.
18. Canalis, E., McCarthy, T., & Centrella, M. (1988). Growth factors and the regulation of bone remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 81(2), 277.
19. Casati, M. Z., de Vasconcelos Gurgel, B. C., Gonçalves, P. F., Pimentel, S. P., da Rocha Nogueira Filho, G., Nociti, F. H., & Sallum, E. A. (2007). Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects—a pilot study in dogs. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 36(2), 132-136.

20. Chan, H. L., Lin, G. H., Suarez, F., MacEachern, M., & Wang, H. L. (2014). Surgical management of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis of treatment outcomes. *Journal of periodontology*, *85*(8), 1027-1041.
21. Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., & Nyman, S. (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and reconstructive surgery*, *81*(5), 672-676.
22. Dahlin, C., Sennerby, L., Lekholm, U., Linde, A., & Nyman, S. (1989). Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *4*(1).
23. Daugela, P., Cicciù, M., & Saulacic, N. (2016). Surgical Regenerative Treatments for Peri-Implantitis: Meta-analysis of Recent Findings in a Systematic Literature Review. *Journal of oral & maxillofacial research*, *7*(3).
24. Derks, J., & Tomasi, C. (2015). Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of clinical periodontology*, *42*(S16).
25. Ding, G., Liu, Y., Wang, W., Wei, F., Liu, D., Fan, Z., ... & Wang, S. (2010). Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem cells*, *28*(10), 1829-1838.
26. Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317.
27. Dong, J., Kojima, H., Uemura, T., Kikuchi, M., Tateishi, T., & Tanaka, J. (2001). In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *57*(2), 208-216.
28. Dong, J., Uemura, T., Shirasaki, Y., & Tateishi, T. (2002). Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials*, *23*(23), 4493-4502.
29. Easterbrook, C., & Maddern, G. (2008). Porcine and bovine surgical products: Jewish, Muslim, and Hindu perspectives. *Archives of Surgery*, *143*(4), 366-370.

30. Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources. *Journal of prosthodontic research*, 56(3), 151-165.
31. Estrela, C., Alencar, A. H. G. D., Kitten, G. T., Vencio, E. F., & Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian dental journal*, 22(2), 91-98.
32. Farndale, R. W., Sixma, J. J., Barnes, M. J., & De Groot, P. G. (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(4), 561-573.
33. Feng, F., Akiyama, K., Liu, Y., Yamaza, T., Wang, T. M., Chen, J. H., ... & Shi, S. (2010). Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral diseases*, 16(1), 20-28.
34. Figuero, E., Graziani, F., Sanz, I., Herrera, D., & Sanz, M. (2014). Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 66(1), 255-273.
35. Fortino, V., Chen, R., Pelaez, D. & Cheung, H. (2014). Neurogenesis of Neural Crest-Derived Periodontal Ligament Stem Cells by EGF and bFGF. *Journal of Cellular Physiology*, 229(4).
36. Fuerst, G., Gruber, R., Tangl, S., Sanroman, F., & Watzek, G. (2003). Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(5).
37. Fu, S., Ni, P., Wang, B., Chu, B., Zheng, L., Luo, F., ... & Qian, Z. (2012). Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 33(19), 4801-4809.
38. Glowacki, J., & Mizuno, S. (2008). Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89(5), 338-344.
39. Gradinger, R., & Gollwitzer, H. (2006). *Ossäre Integration* (pp. 62-68). Heidelberg: Springer.

40. Gredes, T., Heinemann, F., Dominiak, M., Mack, H., Gedrange, T., Spassov, A., ... & Kunert-Keil, C. (2012). Bone substitution materials on the basis of BONITmatrix® up-regulate mRNA expression of IGF1 and Col1a1. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(2), 179-184.
41. Gredes, T., Kracht, T., Gedrange, T., & Kunert-Keil, C. (2012). Influence of BONITmatrix® and OSSA NOVA on the expression of bone specific genes. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(6), 524-528.
42. Gronthos, S., Mrozik, K., Shi, S., & Bartold, P. M. (2006). Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcified tissue international*, 79(5), 310-317.
43. Haddouti, E. M., Skroch, M., Zippel, N., Müller, C., Birova, B., Pansky, A., ... & Tobiasch, E. (2009). Human dental follicle precursor cells of wisdom teeth: isolation and differentiation towards osteoblasts for implants with and without scaffolds. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 40(10), 732-737.
44. Hollinger, J. O., Hart, C. E., Hirsch, S. N., Lynch, S., & Friedlaender, G. E. (2008). Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *JBJS*, 90(Supplement_1), 48-54.
45. Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395.
46. Hoyer, B., Bernhardt, A., Lode, A., Heinemann, S., Sewing, J., Klinger, M., ... & Gelinsky, M. (2014). Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(2), 883-892.
47. Hutmacher, D., Hürzeler, M. B., & Schliephake, H. (1996). A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 11(5).
48. Hwang, J. W., Lee, E. U., Lee, J. S., Jung, U. W., Lee, I. S., & Choi, S. H. (2013). Dissolution behavior and early bone apposition of calcium phosphate-coated machined implants. *Journal of periodontal & implant science*, 43(6), 291-300.

49. Jung, R. E., Herzog, M., Wolleb, K., Ramel, C. F., Thoma, D. S., & Hämmerle, C. H. (2017). A randomized controlled clinical trial comparing small buccal dehiscence defects around dental implants treated with guided bone regeneration or left for spontaneous healing. *Clinical oral implants research*, 28(3), 348-354.
50. Kämmerer, P. W., Schiegnitz, E., Alshihri, A., Draenert, F. G., & Wagner, W. (2014). Modification of xenogenic bone substitute materials—effects on the early healing cascade in vitro. *Clinical oral implants research*, 25(7), 852-858.
51. Kay, S. A., Wisner-Lynch, L., Marxer, M., & Lynch, S. E. (1997). Guided bone regeneration: integration of a resorbable membrane and a bone graft material. *Practical periodontics and aesthetic dentistry: PPAD*, 9(2), 185-94.
52. Kim, D. M. (2009). Human histologic evaluation of anorganic bovine bone mineral combined with recombinant human platelet-derived growth factor BB in maxillary sinus augmentation: case series study. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 29(6), 583-591.
53. Kim, S. H., Kim, K. H., Seo, B. M., Koo, K. T., Kim, T. I., Seol, Y. J., ... & Lee, Y. M. (2009). Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *Journal of periodontology*, 80(11), 1815-1823.
54. Kunert-Keil, C., Gredrange, T., Mai, R., Spassov, A., Lucke, S., Klinker, T., ... & Gredes, T. (2009). Morphological evaluation of bone defect regeneration after treatment with two different forms of bone substitution materials on the basis of BONITmatrix. *J. Physiol. Pharmacol*, 60(Suppl 8), 57-60.
55. Lang, N. P., & Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(s11), 178-181.
56. Lang, N. P., Brägger, U., Walther, D., Bearner, B., & Kornman, K. S. (1993). Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. Clinical and radiographic findings. *Clinical oral implants research*, 4(1), 2-11.
57. Lang, N. P., Wilson, T. G., & Corbet, E. F. (2000). Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clinical oral implants research*, 11(s1), 146-155.

58. Leonhardt, Å., Adolfsson, B., Lekholm, U., Wikström, M., & Dahlen, G. (1993). A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clinical oral implants research*, 4(3), 113-120.
59. Leonhardt, Å., Berglundh, T., Ericsson, I., & Dahlén, G. (1992). Putative periodontal and teeth in pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 3(3), 112-119.
60. Lesaffre, E., Philstrom, B., Needleman, I., & Worthington, H. (2009). The design and analysis of split-mouth studies: What statisticians and clinicians should know. *Statistics in medicine*, 28(28), 3470-3482.
61. Lin, N. H., Gronthos, S., & Mark Bartold, P. (2009). Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 51(1), 239-251.
62. Lind, M. (1998). Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 69(sup283), i-37.
63. Lindhe, J., & Meyle, J. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 35(s8), 282-285.
64. Listgarten, M. A., Lang, N. P., Schroeder, H. E., & Schroeder, A. (1991). Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clinical oral implants research*, 2(1), 1-19.
65. Liu, J., & Kerns, D. G. (2014). Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. *The Open Dentistry Journal*, 8(1).
66. Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P. M., ... & Wang, S. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem cells*, 26(4), 1065-1073.
67. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandez, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fox, C. H., & Williams, R. C. (1991). Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, 62(11), 710-716.

68. Mahato, N., Wu, X., & Wang, L. (2016). Management of peri-implantitis: a systematic review, 2010–2015. *Springerplus*, 5(1), 1-9.
69. Marinello, C. P., Berglundh, T., Ericsson, I., Klinge, B., Glantz, P. O., & Lindhe, J. (1995). Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(6), 475-479.
70. Melcher, A. H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of periodontology*, 47(5), 256-260.
71. Mellado-Valero, A., Buitrago-Vera, P., Solá-Ruiz, M. F., & Ferrer-García, J. C. (2013). Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: A literature review. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 18(6), e869.
72. Menicanin, D., Mroziak, K. M., Wada, N., Marino, V., Shi, S., Bartold, P. M., & Gronthos, S. (2013). Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. *Stem cells and development*, 23(9), 1001-1011.
73. Meyer, S., Espinoza, S., Rychly, J., Peters, K. (2010). Articular cartilage tissue engineering based on marine collagen of jelly-fish *Rhopilema spec.*
74. Misch, C. E., & Dietsh, F. (1993). Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant dentistry*, 2(3), 158-166.
75. Mohamed, S., Polyzos, I., Renvert, S., & Claffey, N. (2010). Effect of surface contamination on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. *Clinical oral implants research*, 21(5), 513-519.
76. Mombelli, A., Feloutzis, A., Brägger, U., & Lang, N. P. (2001). Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. *Clinical Oral Implants Research*, 12(4), 287-294.
77. Mombelli, A., & Lang, N. P. (1992). Antimicrobial treatment of peri-implant infections. *Clinical oral implants research*, 3(4), 162-168.
78. Mombelli, A., Müller, N., & Cionca, N. (2012). The epidemiology of peri-implantitis. *Clinical oral implants research*, 23(s6), 67-76.

79. Morishige, H., Sugahara, T., Nishimoto, S., Muranaka, A., Ohno, F., Shiraishi, R., & Doi, M. (2011). Immunostimulatory effects of collagen from jellyfish in vivo. *Cytotechnology*, 63(5), 481.
80. Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068-1074
81. Müller, P., Bulnheim, U., Diener, A., Lüthen, F., Teller, M., Klinkenberg, E. D., ... & Rychly, J. (2008). Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 281-291.
82. Murphy, K. G. (1995). Postoperative healing complications associated with Gore-Tex Periodontal Material. Part I. Incidence and characterization. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 15(4).
83. Murphy, K. G. (1995). Postoperative healing complications associated with Gore-Tex Periodontal Material. Part II. Effect of complications on regeneration. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 15(6).
84. Nociti, F. H., Cesco de Toledo, R., Machado, M. A., Stefani, C. M., Line, S. R., & Gonçalves, R. B. (2001). Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clinical oral implants research*, 12(4), 295-300.
85. Nyman, S. (1991). Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(6), 494-498.
86. Ortolani, E., Guerriero, M., Coli, A., Di Giannuario, A., Minniti, G., & Polimeni, A. (2014). Effect of PDGF, IGF-1 and PRP on the implant osseointegration. An histological and immunohistochemical study in rabbits. *Annali di stomatologia*, 5(2), 66.
87. Page, R. C., Ammons, W. F., Schectman, L. R., & Dillingham, L. A. (1974). Collagen fibre bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset. *Archives of oral biology*, 19(11), 1039IN251043-1042IN26.

88. Park, J. Y., Jeon, S. H., & Choung, P. H. (2011). Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell transplantation*, 20(2), 271-286.
89. Park, S. Y., Kim, K. H., Gwak, E. H., Rhee, S. H., Lee, J. C., Shin, S. Y., ... & Seol, Y. J. (2015). Ex vivo bone morphogenetic protein 2 gene delivery using periodontal ligament stem cells for enhanced re-osseointegration in the regenerative treatment of peri-implantitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(1), 38-47.
90. Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., & Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 13(1), 1-10.
91. Persson, L. G., Berglundh, T., Lindhe, J., & Sennerby, L. (2001). Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 12(6), 595-603.
92. Pontoriero, R., Tonelli, M. P., Carnevale, G., Mombelli, A., Nyman, S. R., & Lang, N. P. (1994). Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical oral implants research*, 5(4), 254-259.
93. Postlethwaite, A. E., Seyer, J. M., & Kang, A. H. (1978). Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(2), 871-875.
94. Putra, A. B. N., Nishi, K., Shiraishi, R., Doi, M., & Sugahara, T. (2014). Jellyfish collagen stimulates production of TNF- α and IL-6 by J774. 1 cells through activation of NF- κ B and JNK via TLR4 signaling pathway. *Molecular immunology*, 58(1), 32-37.
95. Rahn, B. A. (1976). Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. *Acta Novo Leopoldina*, 44, 249-255.
96. Ramanauskaite, A., Daugela, P., de Almeida, R. F., & Saulacic, N. (2016). Surgical Non-Regenerative Treatments for Peri-Implantitis: a Systematic Review. *Journal of oral & maxillofacial research*, 7(3).

97. Rastogi, S., Modi, M., & Sathian, B. (2009). The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa: a prospective study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(8), 1600-1606
98. Reigstad, O., Franke-Stenport, V., Johansson, C. B., Wennerberg, A., Røkkum, M., & Reigstad, A. (2007). Improved bone ingrowth and fixation with a thin calcium phosphate coating intended for complete resorption. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 83(1), 9-15.
99. Ripamonti, U., Heliotis, M., & Ferretti, C. (2007). Bone morphogenetic proteins and the induction of bone formation: from laboratory to patients. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics*, 19(4), 575-589.
100. Rocuzzo, M., Lungo, M., Corrente, G., & Gandolfo, S. (1996). Comparative study of a bioresorbable and a non-resorbable membrane in the treatment of human buccal gingival recessions. *Journal of periodontology*, 67(1), 7-14.
101. Romanos, G. E., & Weitz, D. (2012). Therapy of peri-implant diseases. Where is the evidence?. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 12(3), 204-208.
102. Romeo, E., Ghisolfi, M., Murgolo, N., Chiapasco, M., Lops, D., & Vogel, G. (2005). Therapy of peri-implantitis with resective surgery. *Clinical Oral Implants Research*, 16(1), 9-18.
103. Romeo, E., Lops, D., Chiapasco, M., Ghisolfi, M., & Vogel, G. (2007). Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), 179-187.
104. Roos-Jansåker, A. M., Persson, G. R., Lindahl, C., & Renvert, S. (2014). Surgical treatment of peri-implantitis using a bone substitute with or without a resorbable membrane: a 5-year follow-up. *Journal of clinical periodontology*, 41(11), 1108-1114.
105. Rothamel, D., Schwarz, F., Sculean, A., Hertel, M., Scherbaum, W., & Becker, J. (2004). Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clinical Oral Implants Research*, 15(4), 443-449.

106. Schenk, R. K., & Buser, D. (1998). Osseointegration: a reality. *Periodontology 2000*, 17(1), 22-35.
107. Schenk, R. K., Buser, D., Hardwick, W. R., & Dahlin, C. (1994). Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 9(1).
108. Schroeder, A., van der Zypen, E., Stich, H., & Sutter, F. (1981). The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *Journal of Maxillofacial Surgery*, 9, 15-25.
109. Schwarz, F., Herten, M., Ferrari, D., Wieland, M., Schmitz, L., Engelhardt, E., & Becker, J. (2007). Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite+ beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 36(12), 1198-1206.
110. Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., & Becker, J. (2007). Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *Journal of clinical periodontology*, 34(1), 78-86.
111. Schwarz, F., Sahm, N., Schwarz, K., & Becker, J. (2010). Impact of defect configuration on the clinical outcome following surgical regenerative therapy of peri-implantitis. *Journal of clinical periodontology*, 37(5), 449-455.
112. Schwarz, F., Sculean, A., Rothamel, D., Schwenzer, K., Georg, T., & Becker, J. (2005). Clinical evaluation of an Er: YAG laser for nonsurgical treatment of peri-implantitis: a pilot study. *Clinical oral implants research*, 16(1), 44-52.
113. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ... & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429), 149-155.
114. Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?. *PloS one*, 8(10), e76195.

115. Silva, T. H., Moreira-Silva, J., Marques, A. L., Domingues, A., Bayon, Y., & Reis, R. L. (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Marine drugs*, 12(12), 5881-5901.
116. Simion, M., Baldoni, M., Rassi, P., & Zaffe, D. (1994). A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 14(2).
117. Simion, M., Rocchietta, I., Kim, D., Nevins, M., & Fiorellini, J. (2006). Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: a histologic study in a dog model. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 26(5).
118. Song, E., Kim, S. Y., Chun, T., Byun, H. J., & Lee, Y. M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951-2961.
119. Stavropoulos, A., & Wikesjö, U. M. E. (2012). Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *Journal of periodontal research*, 47(5), 545-553.
120. Štembírek, J., Kyllar, M., Putnova, I., Stehlik, L., & Buchtova, M. (2012). The pig as an experimental model for clinical craniofacial research. *Laboratory Animals*, 46(4), 269-279.
121. Street, J., Bao, M., Bunting, S., Peale, F. V., Ferrara, N., Steinmetz, H., ... & Redmond, H. P. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(15), 9656-9661.
122. Suárez-López del Amo, F., Monje, A., Padiál-Molina, M., Tang, Z., & Wang, H. L. (2015). Biologic agents for periodontal regeneration and implant site development. *BioMed research international*, 2015.
123. Sugahara, T., Ueno, M., Goto, Y., Shiraishi, R., Doi, M., Akiyama, K., & Yamauchi, S. (2006). Immunostimulation effect of jellyfish collagen. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(9), 2131-2137.

124. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
125. Tayalia, P., & Mooney, D. J. (2009). Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Advanced Materials*, 21(32-33), 3269-3285.
126. Tempro, P. J., & Nalbandian, J. (1993). Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations. *Journal of periodontology*, 64(3), 162-168.
127. Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.
128. De Vicente, J. C., Recio, O., Martin-Villa, L., Junquera, L. M., & Lopez-Arranz, J. S. (2006). Histomorphometric evaluation of guided bone regeneration around implants with SLA surface: an experimental study in beagle dogs. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 35(11), 1047-1053.
129. Wallace, S. C., Snyder, M. B., & Prasad, H. (2013). Postextraction ridge preservation and augmentation with mineralized allograft with or without recombinant human platelet-derived growth factor BB (rhPDGF-BB): a consecutive case series. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 33(5).
130. Wang, H. L., & Boyapati, L. (2006). "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant dentistry*, 15(1), 8-17.
131. Wang, S., Liu, Y., Fang, D., & Shi, S. (2007). The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral diseases*, 13(6), 530-537.
132. Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-870.
133. Wetzel, A. C., Vlassis, J., Caffesse, R. G., Hämmerle, C. H., & Lang, N. P. (1999). Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clinical oral implants research*, 10(2), 111-119.
134. Xiao, Y., Qian, H., Young, W. G., & Bartold, P. M. (2003). Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue engineering*, 9(6), 1167-1177.

135. Yamada, S., Yamamoto, K., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., & Hayashi, Y. (2014). Potency of fish collagen as a scaffold for regenerative medicine. *BioMed research international*, 2014.
136. Zitzmann, N. U., Berglundh, T., Marinello, C. P., & Lindhe, J. (2001). Experimental peri-implant mucositis in man. *Journal of clinical periodontology*, 28(6), 517-523.
137. Zitzmann, N. U., Walter, C., & Berglundh, T. (2006). Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis–eine Übersicht. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 61(12), 642-649.
138. Alphatech®. (k.A.). Abgerufen am 31. Oktober 2017, von fmz-gmbh: <http://www.fmz-gmbh.de/index.php?id=58>
139. Advanced-cryo-safe-method. (k.A.). Abgerufen am 31. Oktober 2017, von medskin-suwelack: <http://www.medskin-suwelack.com/en/advanced-cryosafe-method.html>
140. BONITmatrix®-Zusammensetzung und Eigenschaften. (2017). Abgerufen am 31. Oktober 2017, von dot-coating: <http://www.dot-coating.de/index.php/biomaterialien/bonitmatrix/bonitmatrix-zusammensetzung>
141. Stem Cell Basics I. (2016). Abgerufen am 30.12.2017, von National Institutes of Health: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus den Quellen direkt oder inhaltlich übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 24.04.2018

Maria Baudisch