

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie,  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. B. Frerich)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

**Experimentelle Herstellung geformter, granulärer, HHD-  
prozessierter, knöcherner Allografts zur gesteuerten  
Hartgeweberegeneration in der MKG-Chirurgie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin

(Dr. med. dent.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Rostock

2025

vorgelegt von: Dr. med. Constantin Leon Graw

geb. am: 06.09.1994

in: Recklinghausen

Dekan: Prof. Dr. med. Bernd Krause

1. Gutachter: PD Dr. med. Dr. med. dent Michael Dau (UMR Rostock)
2. Gutachter: PD Dr.-Ing. habil. Daniel Klüß (UMR Rostock)
3. Gutachter: PD Dr. med. Dr. med. dent. Stefan Kindler (UMG Greifswald)

Jahr der Einreichung: 2025

Tag der Disputation: 15.10.2025

Raum: Hörsaal Institut für Pathologie (3. Etage)

# Inhaltsverzeichnis

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Einleitung</b>                                     | 3  |
| 1.1 Kieferaugmentationen                                 | 6  |
| 1.2 Hydrostatische Hochdrucktherapie                     | 10 |
| 1.3 Molekulare Marker der Osteogenese                    | 12 |
| 1.4 Ziel der Arbeit                                      | 13 |
| <b>2. Material und Methoden</b>                          | 15 |
| 2.1 Herstellung der Knochenplatten                       | 15 |
| 2.2 In vitro Zytotoxizitätsprüfung                       | 21 |
| 2.3 Zellbesiedlung mit humanen adipogenen Stammzellen    | 22 |
| 2.4 Mechanische Charakterisierung                        | 23 |
| 2.5 Simulierte klinische Anwendung an einem Kiefermodell | 26 |
| 2.6 Statistische Methoden                                | 26 |
| <b>3. Ergebnisse</b>                                     | 27 |
| 3.1 Herstellung der Platten                              | 27 |
| 3.2 In vitro Zytotoxizitätsprüfung                       | 28 |
| 3.3 Zellbesiedlung mit humanen adipogenen Stammzellen    | 29 |
| 3.4 Mechanische Charakterisierung                        | 34 |
| 3.5 Simulierte klinische Anwendung an einem Kiefermodell | 35 |
| <b>4. Diskussion</b>                                     | 37 |
| <b>5. Zusammenfassung</b>                                | 44 |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>                           | i  |
| <b>7. Anhang</b>                                         | x  |

# Abkürzungsverzeichnis

|              |                                                                            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <i>ALP</i>   | Alkalische Phosphatase-Gen                                                 |
| <i>BGLAP</i> | Osteocalcin-Gen (engl. bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein) |
| BMPs         | Bone morphogenic Proteins                                                  |
| DMEM         | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                           |
| EZM          | Extrazellulärmatrix                                                        |
| FK           | Fibrinkleber                                                               |
| GBR          | Gesteuerte Knochenregeneration (engl. Guided Bone Regeneration)            |
| haDSC        | humane adipogene Stammzellen aus Lipoaspirat                               |
| HHD          | Hydrostatische Hochdrucktherapie                                           |
| IMDM         | Iscoe's Modified Dulbecco's Medium                                         |
| KEM          | Knochenersatzmaterialien                                                   |
| KG           | Kontrollgruppe                                                             |
| L408         | LOCTITE® 408                                                               |
| L4011        | LOCTITE® 4011                                                              |
| MTT          | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                 |
| NHDF         | Normale humane dermale Fibroblasten                                        |
| OPG          | Osteoprotegerin                                                            |
| PBS          | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                             |
| TGF- $\beta$ | Transforming growth factor $\beta$                                         |
| VG           | Versuchsgruppen                                                            |
| VGf          | Versuchsgruppe Fibrinkleber                                                |
| VGL          | Versuchsgruppe LOCTITE® 408                                                |

# 1. Einleitung

Zahnverlust und der Bedarf nach prothetischer Versorgung betreffen große Teile unserer Gesellschaft. Laut dem aktuellsten Gesundheitsbericht des Robert-Koch-Instituts sind bereits im Alter von 35-44 Jahren nur 12,6 % der Männer und 14,4 % der Frauen in Deutschland vollbezahnt [1]. Karies und Parodontitis stellen dabei die Hauptursachen für Zahnextraktionen, weitere Ursachen sind Trauma, kieferorthopädisch oder prothetisch indizierte Extraktionen [2]. Infolge des Zahnverlustes kommt es zu Veränderungen im Kiefer, der Knochen kann innerhalb eines Jahres nach der Zahnextraktion um bis zu 50 % in der bucco-lingualen Dimension reduziert werden [3]. Außerdem kann durch eine gestörte Kaufunktion infolge von Zahnverlust eine Einschränkung der Mundgesundheit resultieren [4]. In diesen Fällen ist ein Zahnersatz indiziert, um eine ausreichende Funktionstüchtigkeit des Kauorgans wiederherzustellen oder ihre Beeinträchtigung zu verhindern [5]. Die Versorgung kann beispielsweise durch Brücken oder herausnehmbare Teilprothesen erfolgen, bei vollständig unbezahnten Kiefern ist eine Behandlung mit einer Totalprothese möglich. Den Goldstandard für den Ersatz fehlender natürlicher Zähne stellen aber dentale Implantate dar [6]. Sie werden im Alveolarkamm positioniert und dienen als Verankerung für Zahnersatz in Form von Brücken oder Prothesen. Bei vollständig oder teilweise unbezahnten Kiefern sind dentale Implantate indiziert und zeigen gute klinische Ergebnisse [7]. Über Beobachtungszeiträume von 8-10 Jahren finden sich je nach Literatur Überlebensquoten von über 95 % [8, 9]. Durch die Verankerung im Knochen werden Kräfte, die etwa beim Kauen auf den Zahnersatz wirken direkt auf den Alveolarknochen übertragen und reduzieren die entlastungsbedingte Knochenatrophie. Grundlage für die guten klinischen Ergebnisse von dentalen Implantaten ist die postoperative Osseointegration, also die Herstellung einer belastungsstabilen Knochen-Implantat-Verbindung [6]. Die Entwicklung einer zufriedenstellenden Osseointegration ist dabei von vielen Faktoren abhängig, die sowohl das Implantat als auch den Patienten betreffen. Bezüglich des Knochenlagers werden mindestens 1-1,5 mm Knochen zu jeder Seite des Implantats empfohlen, um eine stabile Verankerung zu ermöglichen [10]. Um Implantate trotz Knochenatrophie korrekt positionieren zu können, ist häufig eine Augmentation, also ein chirurgischer Aufbau der reduzierten Knochensubstanz, notwendig. Dies kann mit verschiedenen Techniken und Materialien durchgeführt werden. Neben Materialien synthetischen

oder tierischen Ursprungs stehen autologer oder allogener Knochen für Augmentationen zur Verfügung [11]. Autologer Knochen vereint osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften und wird daher oft als Goldstandard für Augmentationen bezeichnet [12]. Bei der klinisch häufig angewandten und bewährten Schalentechnik nach Khoury wird beispielsweise eine Verbreiterung des Kiefers erreicht, indem autologe Knochenblöcke aus der retromolaren Region des Unterkiefers entnommen und mit Schrauben am Alveolarkamm befestigt werden. Anschließend wird der Raum zwischen dem Knochenblock und dem Alveolarkamm mit autologen Knochenspänen aufgefüllt [13]. Trotz einer Erfolgsquote von 95 % hat diese Technik auch Nachteile wie Infektionen oder Parästhesien an der Entnahmestelle [3, 13].

Bei alternativen Techniken unter Verwendung allogenen Knochens besteht kein Risiko für Morbidität an der Entnahmestelle. Das maxgraft® cortico (botiss biomaterials GmbH, Berlin, Deutschland) ist ein allogenes Knochentransplantat, das für Augmentationen im Kiefer unter Anwendung der Schalentechnik konzipiert ist (Abb.1). Die Knochenplatten haben ein osteokonduktives Potenzial und ermöglichen Augmentationen mit reduzierter Operationszeit und ohne Morbidität an der Entnahmestelle [14]. Ein weiterer grundlegender Vorteil von Allografts im Allgemeinen ist die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit im Vergleich zu autologem Knochen. Ein Nachteil von Allografts ist jedoch das Risiko von postoperativen Infektionen und Entzündungsreaktionen, die durch im Transplantat verbleibende Mikroorganismen, Proteine usw. verursacht werden können. Dieses Risiko kann durch Aufbereitung der Transplantate mit Hilfe von chemischen oder physikalischen Verfahren verringert werden. Diese etablierten Verfahren führen jedoch häufig zu einer Verringerung der mechanischen Stabilität der Transplantate [15].

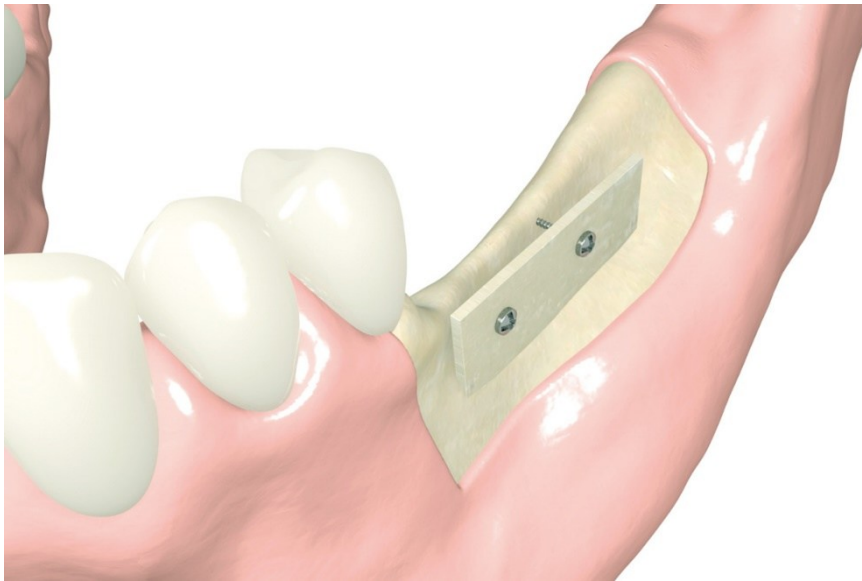


Abbildung 1: Schematisches Anwendungsbeispiel eines allogenen Knochentransplantats maxgraft® cortico bei der lateralen Augmentation mittels Schalentchnik. Die Knochenplatte wird zur bucco-lingualen Verbreiterung des Knochens über zwei Schrauben am Kiefer befestigt. Der Hohlraum wird mit Knochenersatzmaterial gefüllt, um eine schnelle Knochenregeneration zu fördern. [14]

Die Behandlung mit hydrostatischem Hochdruck (HHD) bietet einen alternativen Ansatz, um eine wirksame Devitalisierung von Allografts zu erreichen, ohne die mechanischen Eigenschaften des Knochens zu beeinträchtigen [16, 17]. Diese Behandlung wird häufig in der Lebensmittelverarbeitung eingesetzt und führt dort zu einer Inaktivierung von Mikroben, ohne den Geschmack oder die Vitamine zu beeinträchtigen [18, 19]. Eine effektive Devitalisierung von Säugetierzellen konnte in Versuchen an verschiedenen Zelllinien durch Behandlung mit HHD nachgewiesen werden [20–22]. Die HHD-Behandlung löst eine Apoptose der Zellen infolge einer Aktivierung von Caspase-3 aus. Ein wesentlicher Vorteil einer HHD-Behandlung gegenüber chemischen oder physikalischen Alternativen zur Devitalisierung von Transplantaten könnte darin bestehen, dass die extrazelluläre Matrix (EZM) und damit die biomechanischen Eigenschaften intakt bleiben. Dies konnte in Experimenten an verschiedenen humanen Geweben sowie auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden [23–26].

Ziel dieser Arbeit war es, Knochenplatten aus HHD-behandeltem Knochengranulat herzustellen, die vergleichbar mit autologen Knochenplatten (nach der Khoury-Technik) oder chemisch-prozessierten Knochenplatten (z.B. maxgraft® cortico) für die

Schalentechnik bei Augmentationen der Kiefer verwendet werden können. Um dies zu gewährleisten, müssen die Platten zum einen eine ausreichende mechanische Festigkeit aufweisen. Außerdem müssen die Platten biokompatibel sein und eine Zellbesiedlung und -differenzierung ermöglichen, um postoperativ eine stabile Osseointegration zu ermöglichen.

## 1.1 Kieferaugmentationen

Derartige operative Verfahren, welche dem Knochenaufbau nach stattgefundener Knochenatrophie dienen, werden als Augmentationen des Kieferknochens bezeichnet. Es existieren unterschiedliche Operationsverfahren unter Nutzung verschiedener Knochenersatzmaterialien, um einen Aufbau des Knochens zu erreichen. So erfordern die jeweiligen anatomischen Gegebenheiten von Ober- und Unterkiefer andere Techniken und auch innerhalb eines Kiefers können sich die Herausforderungen einer Augmentation je nach Ort und Ausdehnung der Knochenatrophie (z.B. Frontzahn- oder Molaren-Region, horizontale oder vertikale Atrophie) unterscheiden. Weiterhin stellen die geplante implantatgetragene prothetische Versorgung und patientenspezifische Begleiterkrankungen Limitationen dar, die eine individuelle Planung jeder Augmentation und damit auch verschiedenste Operationstechniken und Knochenersatzmaterialien erforderlich machen.

### 1.1.1 Techniken

Diverse Techniken mit dem gemeinsamen Ziel, das Knochenangebot in atrophierten Kiefern zu vergrößern, wurden in den vergangenen Jahrzehnten entwickelt und sind in der klinischen Praxis etabliert. Der Sinuslift beispielsweise beschreibt eine Technik, welche im Oberkiefer angewendet wird, um die Höhe und Breite des Knochens zu erweitern. Hierfür wird Knochenersatzmaterial über ein Knochenfenster in den Sinus maxillaris unter die Schneider'sche Membran eingebracht [27].

Eine weitere Technik stellt die gesteuerte Knochenregeneration (engl. Guided Bone Regeneration, GBR) nach dem PASS-Prinzip dar. Der Raum, der vorher durch die Zahnwurzel ausgefüllt war, wird mit Knochenersatzmaterial aufgefüllt und unter

Verwendung einer Membran verschlossen. Das Knochenersatzmaterial soll dabei die Bildung von körpereigenem Knochen fördern, die Membran verhindert ein Verdrängen des Knochens durch schneller wachsendes Weichgewebe [27]. Das PASS-Prinzip beinhaltet dabei vier elementare Faktoren für ein voraussagbares Gelingen der GBR: den spannungsfreien, primären Wundverschluss (engl. Primary Closure), die adäquate Blutversorgung (engl. Angiogenesis), den Ausschluss unerwünschter Zellen (engl. Space Creation) sowie die ausreichende Stabilität der Wunde und des Implantats (engl. Stability) [28].

Eine weitere Möglichkeit zur horizontalen Augmentation ist die Kieferkammspaltung (engl. Alveolar Ridge Splitting Technique, ARST). Hierbei wird der Kieferkamm vertikal per Osteotomie gespalten und anschließend aufgespreizt. Diese Technik ermöglicht eine simultane Implantation durch die Positionierung von dentalen Implantaten direkt in den entstandenen Spalt zwischen bukkaler und oraler Knochenlamelle. Anschließend erfolgt ein Auffüllen des periimplantären Knochendefektes mit Knochenersatzmaterial [29–31].

Die Schalentechnik bietet eine weitere Möglichkeit des Knochenaufbaus in Ober- oder Unterkiefer. Hierbei wird der Kiefer durch eine Platte verbreitert, welche meist mit Schrauben fixiert wird. Diese Platte, welche in der Regel aus allogenen oder autologem Knochen besteht, wirkt wie eine Verschalung. Der entstandene Spalt wird dann mit Knochenersatzmaterial gefüllt, welches postoperativ die Bildung von Knochen fördert. Bei der Schalentechnik nach Khoury wird ein autologer Knochenblock aus der retromolaren Region des Unterkiefers entnommen und in zwei dünne Lamellen gesägt. Diese Lamellen werden dann wie beschrieben zur Verbreiterung des Kiefers verwendet [3, 13]. Die Vorteile dieser Technik ergeben sich vor allem aus den optimalen Eigenschaften autologen Knochens. Nachteilig sind jedoch die verlängerte Operationszeit durch die Entnahme des Knochenblocks sowie die zusätzlichen Morbiditäten an der Entnahmestelle wie Infektionen oder Parästhesien [3].

Kortikale Knochenplatten (z.B. maxgraft® cortico) bestehen in der Mehrzahl aus prozessiertem, allogenen Spenderknochen. Sie wurden für Kieferaugmentationen unter Anwendung der Schalentechnik konzipiert und eignen sich für vertikale, horizontale und komplexe Augmentationen. Die industrielle Aufbereitung der Spenderknochenplatten erfolgt in mehreren Schritten, welche die Anwendung von

Ultraschallbad, Aufreinigung mit flüchtigen Reagenzien, oxidative Behandlung, Gefriertrocknung und Gamma-Bestrahlung beinhalten. Elementarer Vorteil gegenüber der Khoury-Technik ist die entfallende intraoperative, simultane Entnahme autologen Knochens. Hierdurch kommt es zu einer Verkürzung der Operationszeit und damit auch der Anästhesiezeit. Weiterhin entfallen alle Morbiditäten an der Entnahmestelle. Außerdem wird das postoperative Remodeling des Knochens durch osteokonduktive Eigenschaften der allogenen Knochentransplantate unterstützt [14]. Nachteilige Aspekte kortikaler Knochenplatten ergeben sich primär aus den Eigenschaften, die allogener Knochen per se mit sich bringt.

### 1.1.2 Knochenersatzmaterialien

Neben den beschriebenen Techniken existieren auch verschiedene Knochenersatzmaterialien (KEM), die jeweils Vor- und Nachteile beinhalten und sich je nach Situation besser oder schlechter eignen können. Für Kieferaugmentationen sind vor allem synthetische KEM, autogener, xenogener und allogener Knochen bedeutsam. Die Vor- und Nachteile dieser Materialien ergeben sich aus den Prozessen, die postoperativ ablaufen und die direkt durch das eingebrachte Material bestimmt werden. Postoperativ kommt es zunächst durch Verletzung von Gefäßen zur Einblutung und damit zur Hämatombildung. Neben Granulozyten, Monozyten und Mastzellen enthält das Hämatom pluripotente Stammzellen, die unter anderem zu Osteoprogenitorzellen differenzieren können. Das implantierte KEM wird anschließend im besten Fall metabolisiert und durch körpereigenen Knochen ersetzt, der dann eine ausreichende Größe aufweist, um eine dentale Implantation zu ermöglichen. Faktoren, die diese Prozesse beeinflussen und durch das jeweilige KEM bestimmt werden, sind unter anderem die Resorbierbarkeit, die Biokompatibilität, die Osteoinduktivität und Osteokonduktivität [32]. Osteoinduktion beschreibt hierbei die Förderung der Osteogenese durch enthaltene Wachstumsfaktoren [33], während Osteokonduktion durch die Prozesse des Einwachsens von Gefäßen, perivaskulärem Gewebe und Osteoprogenitorzellen aus dem bereits vorhandenen Knochenlager in die dreidimensionale Struktur des Transplantats charakterisiert wird [34]. Autologer Knochen, also aus dem eigenen Körper entnommener Knochen, gilt in dieser Hinsicht als Goldstandard [35–37]. Dies begründet sich darin, dass autologer Knochen in

hohem Maße biokompatibel ist, osteoinduktiv und -konduktiv wirkt und hierbei ein geringes immunologisches Potential bei adäquater mechanischer Festigkeit aufweist [38, 39]. Durch im autologen Knochen enthaltene, osteogene Zellen weist dieser weiterhin ein osteogenes Potential auf, da diese nach der Transplantation ausdifferenzieren und aus dem Transplantat heraus die Knochenheilung fördern [40]. Limitiert wird der Einsatz autologer Transplantate aber durch die Patientenbelastung während der Entnahme sowie durch die Verfügbarkeit [40]. Weiterhin kommt es in etwa 8,5 – 20 % der Knochenentnahmen zu Komplikationen wie Hämatomen, Infektionen, Herniationen oder chronischen Schmerzen [35]. Im Vergleich zum autologen Knochen sind synthetische Knochenersatzmaterialien wie Calciumphosphat-Keramiken quasi unlimitiert verfügbar. Diese wirken auch osteokonduktiv, können aber je nach Material im Vergleich zu autologem Knochen geringere osteoinduktive und osteogene Eigenschaften aufweisen und somit eine optimale Heilung erschweren [41]. Neben Autografts oder synthetischen Materialien können zur Rekonstruktion knöcherner Defekte auch Xeno- oder Allografts verwendet werden. Hierbei handelt es sich um Knochentransplantate anderer Individuen derselben (Allografts) oder einer anderen Spezies (Xenografts) [42]. Diese Transplantate weisen vergleichsweise gute Osteokonduktion und -induktion auf, im Vergleich zu Allografts sind Xenografts dabei in der Anschaffung günstiger und weniger limitiert [42]. Neben den biologischen Eigenschaften weisen Allo- und Xenografts gute mechanische Eigenschaften auf, so ist beispielsweise das Elastizitätsmodul vergleichbar mit dem des Empfängerknochens [42, 43]. Im Rahmen allo- und xenogener Transplantationen können jedoch postoperative Infektionen durch eine iatrogene Übertragung von Viren, Bakterien oder Proteinen auftreten, welche durch das Transplantat übertragen werden und lokale oder systemische Folgen haben können [15, 41, 44]. Neben der Gefahr durch mikrobielle Infektionen können gewebeeigene Zellen von Allo- oder Xenografts Immunreaktionen im Empfänger auslösen, die den Heilungsprozess verzögern können und sogar zu einem Abstoßen des Transplantats führen können [45, 46]. Damit Allo- und Xenografts aber keine Entzündungs- und Abstoßungsreaktion im Empfänger auslösen, ist neben der gezielten Auswahl an Spendern eine Aufbereitung der Transplantate notwendig [45, 47]. Im Rahmen der Devitalisierung werden die in den Transplantaten enthaltenen Zellen inaktiviert, bei der anschließenden Dezellularisierung werden Zellreste aus dem Material entfernt [48]. Eine Kontamination des Transplantats kann hierbei aus einer Infektion des Spenders resultieren, kann aber auch während der Entnahme oder im

Laufe der Prozessierung erfolgen [47]. Auch wenn durch die Aufbereitung keine vollständige Elimination allen mikrobiellen Lebens möglich ist, sollte jegliche Kontamination des Transplantats vermieden werden. Dies beinhaltet sowohl die Auswahl der Spender als auch die des Aufbereitungs- und Sterilisationsverfahrens [47]. Auch die Lagerung der Transplantate beeinflusst die Immunreaktion des Empfängers. Frische Transplantate werden aufgrund der hohen Gefahr einer Infektion oder Immunreaktion kaum verwendet. Durch Tiefkühlung oder Gefriertrocknung wird die Gefahr der Auslösung einer Immunreaktion bereits reduziert, wobei die mechanischen Eigenschaften nur teilweise beeinflusst werden [49, 50]. Für die Aufarbeitung allo- und xenogenen Knochens wurden in den vergangenen Jahrzehnten mehrere Verfahren etabliert, beispielsweise durch chemische Behandlung oder durch Gamma-Bestrahlung. Chemische Verfahren, beispielsweise mittels Ethylenoxids, sind aufgrund der unvollständigen Penetration des Gewebes in ihrer Wirksamkeit limitiert. Dadurch können tief im Gewebe befindliche Zellen und Mikroorganismen nicht sicher eliminiert werden [47]. Durch eine Bestrahlung werden zwar auch tief befindliche Zellen sicher erreicht, jedoch werden hierdurch nicht alle Mikroorganismen sicher eliminiert, beispielsweise für das HI-Virus besteht keine viruzide Wirkung [51]. Sowohl eine Bestrahlung als auch chemische Verfahren zur Behandlung von allogenen Transplantaten führen zu einer Abnahme der mechanischen Stabilität des Knochens [15, 52–54]. Weiterhin führt die Dezellularisierung zu einem Verlust des osteogenen Potentials. Dieser Umstand kann jedoch durch eine Revitalisierung des Transplantats mit Stammzellen des Spenders umgangen werden [15, 55].

## 1.2 Hydrostatische Hochdrucktherapie

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Verfahren, mit denen Transplantate aufbereitet werden können, bietet die hydrostatische Hochdrucktherapie (HHD) die Möglichkeit einer effektiven Devitalisierung, ohne dabei die mechanischen Eigenschaften der Transplantate zu beeinflussen. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das vor allem aus der Lebensmittelverarbeitung bekannt ist [56]. Durch Enzym-Inaktivierungen, Membran-Modifizierungen und durch Inhibition wichtiger metabolischer Prozesse, beispielsweise der Proteinbiosynthese, wird dort mittels HHD eine Inaktivierung von Mikroorganismen erreicht [19, 57]. Ein Vorteil der HHD-

Technologie gegenüber etablierten thermischen Verfahren zur Lebensmittelverarbeitung ist der, dass Vitamine, Aminosäuren und Geschmacksmoleküle weitgehend nicht beeinflusst werden [56]. In den vergangenen Jahren gewinnt die HHD-Technik in medizinischen und pharmazeutischen Bereichen Bedeutung. Rigaldie *et al.* zeigten beispielsweise, dass Medikamente wie Insulin durch HHD-Behandlung sterilisiert werden können und anschließend eine intakte molekulare Struktur aufweisen [58]. Auch die Wirkung einer HHD-Behandlung auf Zellen von Säugetieren wurde in den letzten Jahren untersucht. Anhand diverser Zelllinien konnte hierbei gezeigt werden, dass es bei applizierten Drücken im Bereich von 100 - 200 MPa durch Aktivierung von Caspase-3 zur Einleitung der Apoptose kommt. Dies wurde unter anderem an humanen Lymphoblasten, retinalen Ganglion-Zelllinien oder MEL-Zellen untersucht [20–22]. Während der Apoptose schrumpft die Zelle und es kommt zur Kondensation des Chromatins. Bei höheren Drücken ab etwa 300 MPa wird in Säugetierzellen hingegen eine Nekrose induziert [20, 59]. Im Gegensatz zum Vorgang der Apoptose wird die Nekrose nicht durch Caspasen aktiviert, stattdessen kommt es zum Anschwellen der Zellen und zur Zersetzung der Organellen. Dies resultiert in einer Disruption der Zellmembran und dem Freisetzen zellulären Inhalts, welcher eine lokale Entzündungsreaktion zur Folge hat [20, 21]. Die Angabe, bei welchem Druck es zur Apoptose oder Nekrose kommt, ist lediglich orientierend zu betrachten. Dies begründet sich in einer unterschiedlichen Resistenz verschiedener Zelltypen und -linien gegenüber einer HHD-Behandlung [25, 57, 60]. Ein entscheidender Vorteil von HHD gegenüber chemischen oder radiologischen Alternativen zur Devitalisierung von Transplantaten könnte sein, dass die Extrazellulärmatrix (EZM) und somit auch die biomechanischen Eigenschaften erhalten bleiben. Funamoto *et al.* führten an arteriellen Gefäßen eine HHD-Behandlung > 600 MPa durch und wiesen nach, dass die mechanischen Eigenschaften der Gefäße hierdurch unverändert blieben [25]. Aus uterinem Gewebe entfernten Santoso *et al.* erfolgreich Zellen mittels HHD und wiesen nach, dass die extrazelluläre Kollagenmatrix hierdurch unverändert blieb [24]. Für trabekulären und kortikalen Knochen stellten Steinhäuser *et al.* keine Veränderung des Elastizitätsmoduls und der maximalen Kraft in 4-Punkt-Biegeversuchen nach HHD-Behandlung fest [23]. Die hier getesteten mechanischen Eigenschaften von Knochen fundieren vor allem auf dessen mineralisierten Anteilen sowie den Typ-I-Kollagen-Fasern [61, 62]. Diehl *et al.* untersuchten die Wirkung einer HHD-Behandlung auf

Kollagen Typ I sowie weitere Proteine der EZM und verglichen deren Eigenschaften mit denen unbehandelter Proteine der EZM. Die Behandlung verursachte bei keinem der untersuchten Proteine eine messbare Wirkung auf deren Eigenschaften [26]. Dies erklärt die von Steinhauser *et al.* unveränderten mechanischen Eigenschaften von Knochen nach HHD-Behandlung [23].

Diese Ergebnisse decken sich mit unterschiedlichen Studien auf molekularer Ebene [63, 64]. Proteine sind komplex in einer Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur organisiert. Diese Strukturebenen werden dabei unterschiedlich durch eine HHD-Therapie beeinflusst [63, 64]. Die kovalenten Bindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren, die die Primärstruktur von Proteinen ausmachen, werden durch eine HHD-Behandlung nicht beeinflusst. Die räumliche Anordnung von benachbarten Aminosäuren zu  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern - also die Sekundärstruktur - wird vor allem durch Wasserstoffbindungen gewährleistet. Diese werden erst ab Drücken von etwa 700 MPa irreversibel geschädigt [65]. Die Tertiärstruktur verändert sich ab etwa 200 MPa durch Wirkungen auf hydrophobe Wechselwirkungen und ionische Bindungen. Ab 100-150 MPa wird die auf nicht kovalenten Bindungen basierende Quartärstruktur beeinflusst. Diese Veränderungen sind ab ca. 300 MPa irreversibel und können zur Proteindenaturierung führen [64].

Als Vorarbeit zu dieser Arbeit untersuchten Waletzko-Hellwig *et al.* die mechanische Steifigkeit und Stärke von Knochentrabekeln sowie Zylindern aus Knochengranulat, welche vorher mit HHD behandelt wurden. Die Vorbehandlung wurde bei Drücken von 250 und 300 MPa für 20 bzw. 30 min durchgeführt. In den durchgeführten Kompressions-Versuchen konnte kein Effekt einer HHD-Behandlung auf die mechanischen Eigenschaften von Knochen nachgewiesen werden [17].

### 1.3 Molekulare Marker der Osteogenese

Um eine erfolgreiche Augmentation der Kiefer zu gewährleisten, ist unabhängig von der gewählten Augmentationstechnik und dem Augmentationsmaterial die Durchbauung mit körpereigenem Knochen elementar. Nach der Augmentation kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms. Die in diesem Hämatom enthaltenen pluripotenten Stammzellen differenzieren über Osteoprogenitorzellen zu

Osteoblasten, welche die organische Grundsubstanz des Knochens bilden und anschließend auch an der Mineralisation des Knochens beteiligt sind [66]. Im Rahmen dieser Prozesse werden Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die über unterschiedliche Mechanismen den Knochenaufbau fördern. Die Messung der Expression spezifischer Gene und Proteine erlaubt daher im Rahmen von Experimenten Rückschlüsse auf die Osteogenese. Aufgrund teils gleicher Namen werden zur besseren Differenzierbarkeit im Folgenden Gene kursiv geschrieben.

Während der Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten - also in der frühen Phase der Osteogenese - wird vermehrt *ALP*, TGF- $\beta$ , Osteocalcin und BMP-2 exprimiert [67, 68]. TGF- $\beta$  und BMPs gehören zur TGF- $\beta$ -Superfamilie, einer Unterfamilie der Zytokine. Bone morphogenic Proteins (BMPs) wirken allgemein als multifunktionelle Regulatoren der Proliferation und Differenzierung während der Bildung von Knochen und Knorpel. Neben anderen BMPs fördert vor allem BMP-2 die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten [69]. Die anschließende Differenzierung der frühen Osteoblasten wird durch TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) gefördert [70, 71]. *ALP* kodiert alkalische Phosphatase und ist ebenfalls ein Indikator für die Differenzierung von Osteoblasten, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollends bekannt ist [72]. Osteocalcin wird unter anderem durch Osteoblasten gebildet. Es dient als Marker für die Bildung von Knochen und beeinflusst die Qualität des neu formierten Knochens [73]. Da Osteocalcin erst im Rahmen der Knochenbildung exprimiert wird, kann als früherer Indikator *BGLAP* bestimmt werden, dabei handelt es sich um das Gen, welches für Osteocalcin kodiert. Osteoprotegerin (OPG) ist ein Zytokinrezeptor, der zur Familie der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört. Es ist ein Rezeptor für RANKL und hemmt die Differenzierung von Osteoklasten. OPG hemmt damit Knochenabbau durch Osteoklasten [74]. Durch TGF- $\beta$  kommt es in Osteoblasten zur vermehrten Bildung von OPG [75].

## 1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Knochenplatten hergestellt werden, welche aus Knochengranulat bestehen, das mittels Hydrostatischem Hochdruck (HHD) behandelt wurde. Die Parameter für die Vorbehandlung des Knochengranulats beruhen dabei auf den Vorarbeiten von Waletzko-Hellwig *et. al.* [17]. Durch die Behandlung mit HHD

kann eine effektive Devitalisierung der Knochentransplantate erzielt werden, ohne deren EZM und somit die mechanischen Eigenschaften zu beeinflussen. Die Knochenplatten sollen im Rahmen von Augmentationen der Kiefer eingesetzt werden können. Vergleichbar mit kommerziell erhältlichen allogenen Knochenplatten (z.B. maxgraft® cortico, botiss biomaterials GmbH, Berlin, Deutschland) sollen sie mit Osteosyntheseschrauben im Kiefer eingebracht werden können (vgl. Abb. 1), um im Sinne der Schalentechnik als Verschalung zu dienen. Postoperativ sollen die Platten von körpereigenem Knochen durchbaut zu werden und langfristig das Knochenlager zu vergrößern, um final eine Implantation dentaler Implantate zu ermöglichen. Um hierfür geeignet zu sein, müssen derartige Platten einigen Anforderungen genügen. Grundsätzlich dürfen die Knochenplatten nicht zytotoxisch sein. Da im Prozess der Herstellung der Platten das Zufügen von Additiven notwendig wurde, dürfen diese kein Zytotoxizitätspotential innehaben. Weiterhin sollten die Platten die Bildung körpereigenen Knochens ermöglichen, damit sie postoperativ zeitnah durchbaut werden. Aus mechanischer Sicht müssen die Knochenplatten eine ausreichende mechanische Festigkeit mit sich bringen, damit das intraoperative Einbringen gelingt und die Funktion als Verschalung erfüllt werden kann. Neben der experimentellen Bestimmung der Herstellungsparameter sollten im Rahmen dieser Arbeit daher die aufgeführten Anforderungen an Knochenplatten zur Augmentation der Kieferknochen getestet werden.

Aus diesem Ansatz heraus ergeben sich folgende Leitfragen:

1. Sind die für die Knochenplatten verwendeten Inhaltsstoffe biokompatibel? Fördern die hergestellten Platten die Osteogenese, also den Aufbau körpereigenen Knochens?
2. Erfüllen die aus HHD-behandeltem Granulat hergestellten Knochenplatten die mechanischen Anforderungen, um für Augmentationen der Kieferknochen eingesetzt werden zu können?
3. Können Knochenplatten aus HHD-behandeltem Granulat eine Alternative zu etablierten, allogenen Knochenplatten darstellen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Herstellung der Knochenplatten

#### 2.1.1 Aufbereitung des Knochens

Zur Herstellung der Knochenplatten wurde humaner trabekulärer Knochen verwendet. Dieser wurde aus Hüftköpfen von Patienten gewonnen, welche sich einem operativen Gelenkersatz unterzogen. Hierbei ist operationstechnisch bedingt eine Entfernung von gesundem Knochen im Rahmen der Prothesenlagervorbereitung notwendig. Dieser Knochen, der sonst verworfen wird, wurde für die weiteren Versuche verwendet. Die Patienten gaben präoperativ ihre Einwilligung zur Verwendung der Knochenproben (Ethikantrag Nr. A 2010-0010). Die Femurköpfe wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (Sigma Aldrich, München, Deutschland) gespült. Es wurde 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt und die Proben bei -20 °C gelagert. Eine Verfälschung der mechanischen Eigenschaften durch interindividuelle Unterschiede der Knochenqualität wurde durch Messung der Knochendichte der Hüftköpfe per DXA-Scan (LUNAR Prodigy, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) ausgeschlossen. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die gefrorenen Knochenproben langsam bei 4 °C aufgetaut. Der aufgetaute Knochen wurde in Würfel von etwa 5 mm Kantenlänge gesägt. Aus diesen Würfeln wurde mithilfe einer Knochenmühle USTOMED Bone Mill (Ulrich Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) mit einem Schneidzylinder der Größe 2 mm (Ulrich Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) ein homogenes Knochengranulat hergestellt. Das Granulat wurde anschließend in PBS gespült. Die Hochdruckbehandlung erfolgte in Anlehnung an die Erkenntnisse aus den Vorarbeiten der interdisziplinären Forschungsgruppe MKG/Orthopädie der Universitätsmedizin Rostock (Waletzko-Hellwig *et al.* [17]) für 20 Minuten bei 20 °C und 250 MPa (206,797-Druckprüfanlage 6000 bar, Dustec Hochdrucktechnik GmbH, Wismar, Deutschland). Anschließend erfolgte eine erneute Spülung mit PBS. Durch die Spülung und Lagerung in PBS wies das Granulat noch einen Flüssigkeitsanteil auf. Um diesen zu reduzieren wurde es vor der weiteren Verarbeitung in einem Gefriertrockner (Alpha 1-4 LSCplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) bei -40 °C für 8 Stunden gefriergetrocknet.

### 2.1.2 Pressung der Knochenplatten

Die Knochenplatten wurden in einer eigens hergestellten, individuellen Pressform an einer Material-Prüfmaschine Zwick Roell Z050 (Zwick Roell, Ulm, Deutschland) unter Verwendung der Software testXpert II (Zwick Roell, Ulm, Deutschland) gepresst. Die Messung der Kraft erfolgte über eine Kraftmessdose mit einer Maximalkraft von 50 kN. Zunächst wurde eine Pressform aus Teflon hergestellt, welche ein Befüllen und Pressen über die kurze Kante der Platten ermöglichte, sich aber als suboptimal erwies (Abb. 2). Zum einen war die Handhabung dieser Form impraktikabel. Außerdem war aufgrund der Pressung über die kurze Seite davon auszugehen, dass sich der Pressdruck nicht gleichmäßig über die Länge der Platten verteilte. Auch zugefügte Additive, deren Nutzung sich in Vorversuchen als notwendig erwies, verteilten sich hier nicht gleichmäßig.

Daher wurde eine zweite Pressform aus einem Aluminiumblock hergestellt. In diesen Block wurde eine Mulde von 10 x 25 mm gefräst (Abb. 3, Markierung \*), sodass die entstehenden Platten dieselbe Länge und Breite wie die klinisch etablierten kortikalen Knochenplatten (maxgraft® cortico) aufwiesen. Um die Platten nach der Herstellung

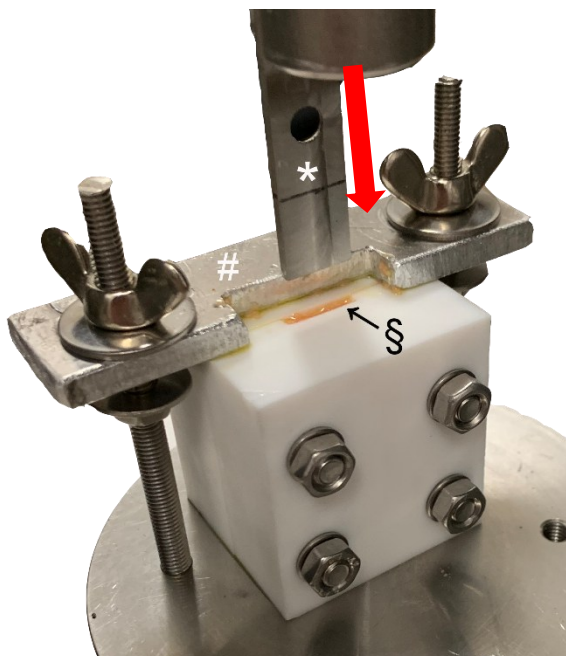


Abbildung 2: Erste Pressform aus Teflon. Die Form wurde mittels Bügel mit zwei Schrauben (#) exakt unter dem Stempel (\*) fixiert. Die Befüllung der Form erfolgte von oben (§), anschließend wurden die Platten durch den Stempel gepresst. Die Kraftapplikation erfolgte in Richtung des roten Pfeils.

ohne Beschädigung aus der Mulde entfernen zu können, wurde eine Bodenplatte hergestellt, welche auf den Boden der Mulde gelegt wurde und über die Unterseite des Blocks mittels einer Schraube aus der Mulde eleviert werden konnte. Einer möglichen Verklebung der Bodenplatte mit der Pressform wurde durch Benetzung des Muldenbodens mit einem Trennmittel (Devcon Liquid Release Agent, ITW Performance Polymers, Danvers, Massachusetts, USA) entgegengewirkt. Die Pressung erfolgte durch einen Stempel (Abb. 3, Markierung #), welcher passgenau in die Mulde eingeführt wurde. Der Block wurde hierfür genau unter dem Stempel platziert und mittels eines Bügels mit 2 Schrauben fixiert (Abb. 4).

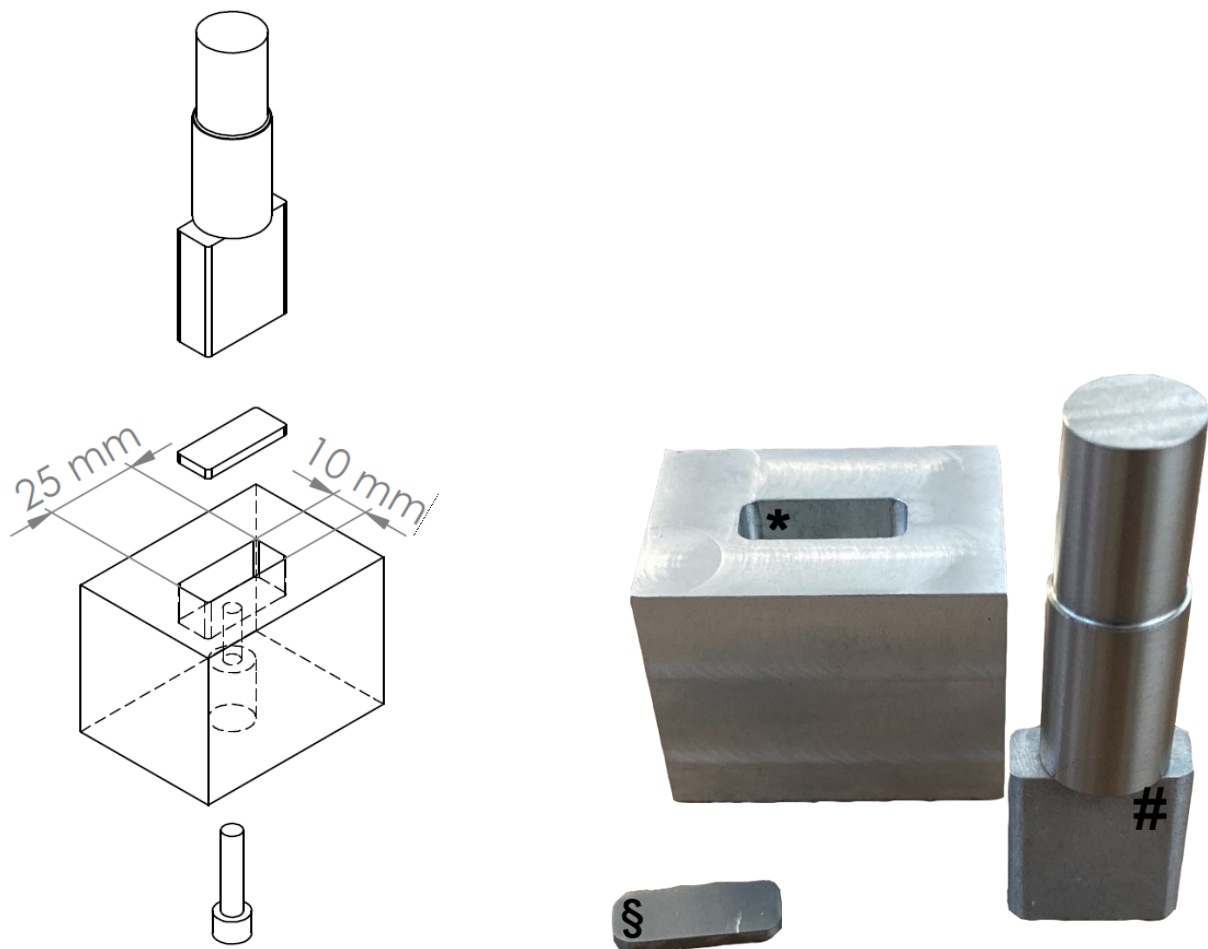


Abbildung 3: Links: Skizze der Herstellungsapparatur. Über die unten abgebildete Schraube wurde nach der Pressung die Bodenplatte mit der Knochenplatte aus der Mulde eleviert, um die Knochenplatte unbeschadet aus der Pressmulde entfernen zu können. Rechts: Herstellungsapparatur aus Aluminium mit Stempel (#), Pressmulde (\*) und Bodenplatte (§).



Abbildung 4: Aufgebaute Apparatur. Nach dem Befüllen der Mulde (\*) mit Knochengranulat und Klebstoff erfolgte die Pressung der Platten mithilfe des Stempels (#). Die Kraftapplikation erfolgte in Richtung des roten Pfeils.

Angelehnt an die Vorarbeit durch Waletzko-Hellwig et al. [17] wurde ein Pressprotokoll verwendet, bei dem zunächst eine Setzphase mit 500 N (Abb. 5, Markierung #), und anschließend eine Belastungsphase mit 10 kN erfolgte (Abb. 5, Markierung \*). Die Kraft, die in der Belastungsphase appliziert wurde, wurde experimentell bestimmt. Im Rahmen von Vorversuchen wurde die Kraft beginnend mit 1 kN sukzessive erhöht und mit steigender Kraft konnten immer dünnere und subjektiv stabilere Platten hergestellt werden. Oberhalb von 10 kN ließ sich keine relevante Optimierung in dieser Hinsicht beobachten, sodass diese Kraft zur Herstellung verwendet wurde.

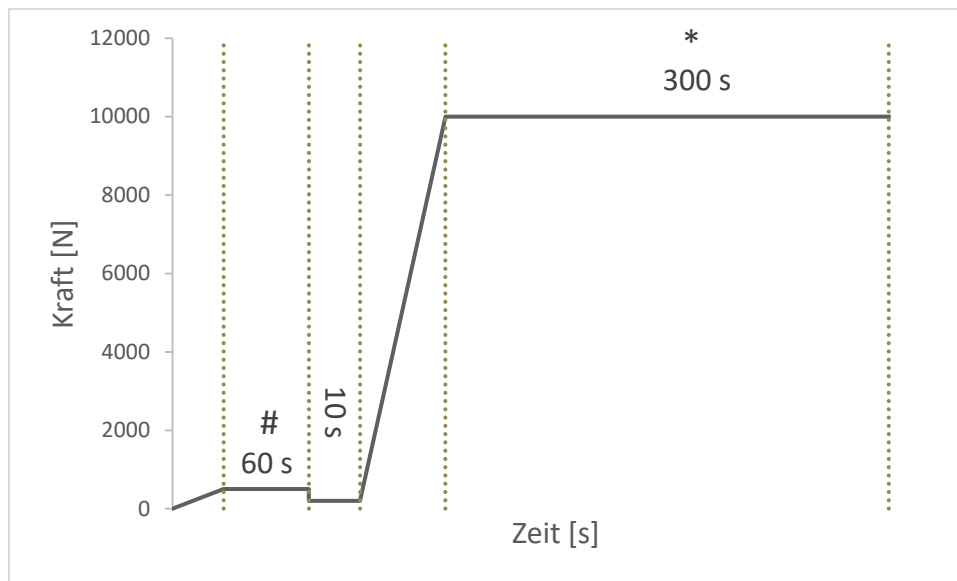


Abbildung 5: Kraft-Zeit-Diagramm des verwendeten Pressprotokolls mit Setzphase (#) und Belastungsphase (\*).

Die Dicke der Platten ließ sich über die Menge des verwendeten Granulats und über den während der Pressung ausgeübten Druck variieren. Die an die kommerzielle Vorlage maxgraft® cortico angelehnte, gewünschte Dicke von 1 mm ließ sich nicht umsetzen, da sich bei dieser Dicke keine stabilen Platten herstellen ließen. Mit 0,9 g Granulat und 10 kN Pressdruck ließen sich Platten mit einer Dicke von durchschnittlich 1,7 mm herstellen, was als Kompromiss zwischen einer möglichst dünnen Dicke bei ausreichender Stabilität und einer guten Reproduzierbarkeit zu sehen ist.

### 2.1.3 Zugefügte Additive

Zunächst wurde versucht, Platten vollständig aus Knochen herzustellen, welche alleine durch die Kompression während der Herstellung einen Verbund ergeben. Erste Versuche zeigten aber, dass auf diese Weise keine ausreichende Stabilität der Platten erzielt werden kann. Bereits geringste mechanische Beanspruchung führte zur Desintegration der Platten. Daher wurde die Zugabe eines Klebstoffs notwendig. Als grundlegende Voraussetzungen für einen klinischen Einsatz wurden dabei eine ausreichende Festigkeit und Biokompatibilität definiert. Anhand dieser Überlegungen

wurden Vorversuche mit verschiedenen Additiven durchgeführt. Platten, die mit Agarose (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und ChondroFiller® liquid (meidrix biomedical GmbH, Esslingen, Deutschland) hergestellt wurden zeigten keine ausreichende Festigkeit. Weitere Platten, die unter Zugabe von Tensospray (BSN medical, Hamburg, Deutschland) hergestellt wurden, waren nach der Herstellung ausreichend fest, aufgrund der Wasserlöslichkeit des Klebstoffs lösten sich diese Platten beim Einlegen in PBS aber auf. ADA-Gel, ein Hydrogel aus Alginat und Gelatine, das Einsatz in der Gewebekonstruktion findet [76], erwies sich als nicht praktikabel in der Handhabung. Die Aushärtung erfolgte sofort nach dem Anrühren, sodass die Befüllung der Mulde und der Beginn des Pressvorgangs vor der Aushärtung nicht möglich waren. Weiterhin wurden Versuche mit LOCTITE® 4011 (im Folgenden L4011) (Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland) einem Sofortklebstoff auf Ethylbasis sowie LOCTITE® 408 (im Folgenden L408) (Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland), einem Sofortklebstoff auf Alkoxyethylbasis durchgeführt. Für einen potentiellen späteren klinischen Anwendungszweck schien der L4011 zunächst besser geeignet, da es nach ISO 10993 auf Biokompatibilität zertifiziert ist [77]. Für die Herstellung der Platten zeigte es sich dennoch als ungeeignet, durch die vergleichsweise hohe Viskosität verteilte sich der Kleber nicht homogen in der Platte. Durch die sehr niedrige Viskosität des L408 verteilte sich der Kleber während des Pressvorgangs deutlich besser und wenngleich es keine Biokompatibilitätsnorm erfüllt, konnten mit 150 µl L408 reproduzierbar stabile Platten hergestellt werden. Ebenfalls ließen sich Platten unter Zugabe von 200 µl TISSEEL Fibrinkleber (im Folgenden FK) (Baxter, Deerfield, Illinois, USA) herstellen. Dabei handelt es sich um einen Zweikomponentenkleber, der aus Bestandteilen der Gerinnungskaskade besteht und beispielsweise zur Verklebung von Wundrändern verwendet wird [78]. Da sowohl die Vorversuche mit L408 als auch mit FK vielversprechende Ergebnisse lieferten wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt, in der sowohl Knochenplatten mit L408 als auch Platten mit FK hergestellt wurden. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung der Klebstoffe innerhalb der Platten wurde eine histologische Untersuchung durchgeführt (VGF, VGL, jeweils  $n = 2$ ).

## 2.2 *In vitro* Zytotoxizitätsprüfung

Die verwendeten Klebstoffe (L408 und FK) wurden nach DIN EN ISO 10993-5:2009-10 auf Zytotoxizität geprüft [79]. Diese Prüfung beruht auf der Messung der Lebensfähigkeit von Zellen über deren Stoffwechselaktivität [80]. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), welches eine gelbe Färbung aufweist, wird durch lebensfähige Zellen zu blau-violetter wasserunlöslichem Formazan metabolisiert. Die durch photometrische Messung bestimmte Farbtintensität nach dem Lösen des Formazans in Alkohol korreliert mit der Anzahl lebensfähiger Zellen, da eine Abnahme lebender Zellen zu einer Abnahme der Stoffwechselaktivität in der Probe führt [79]. Hierfür wurden normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) verwendet. Zunächst wurden die einzelnen Klebstoffe (L408 und FK,  $n = 5$ ) für 24 Stunden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Je 40.000 Fibroblasten wurden anschließend mit 25  $\mu$ l Überstand der Proben für 24 Stunden bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> behandelt. Eine Gruppe erhielt als Kontrollgruppe Medium ohne Zusatz der für die Platten verwendeten Klebstoffe. Nach Entfernen des Mediums wurde je 150  $\mu$ l MTT, 1:10 mit DMEM verdünnt, hinzugefügt und die Zellen wurden für 45 Minuten bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Anschließend wurden die Überstände entfernt und es wurde bei 570 nm Wellenlänge der Absorptionsgrad mit einem Platten-Reader Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Berechnung der Lebensfähigkeit erfolgte gemessen an der Kontrollgruppe:

$$Viab. \% = \frac{100 \times OD570e}{OD570B}$$

Dabei entspricht

*OD570e* dem Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der Probe;

*OD570B* dem Mittelwert der gemessenen optischen Dichte der Kontrollprobe.

Je höher der ermittelte Wert für *Viab. %* ist, desto geringer ist das zytotoxische Potential der gemessenen Probe. Bei einer Lebensfähigkeit von < 70 % im Vergleich zur Kontrollprobe weist die Probe ein zytotoxisches Potential auf [79].

## 2.3 Zellbesiedlung mit humanen adipogenen Stammzellen

Neben der reinen Zytotoxizität der verwendeten Klebstoffe wurde zudem untersucht, inwieweit die Knochenplatten die Osteogenese direkt auf den Platten begünstigen. Hierfür wurde die Differenzierungsfähigkeit von humanen adipogenen Stammzellen aus Lipoaspirat (hADSC) untersucht, die auf den hergestellten Platten kultiviert wurden. Zunächst wurden die Zellen isoliert und nach einem standardisierten Protokoll expandiert [81]. Pro Gruppe wurden 12 Knochenplatten mit 50.000 hADSC von vier verschiedenen Spendern besiedelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne Knochenplatte auf dem Boden einer Wellplatte kultiviert wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und 7, 14 und 21 Tage lang in einem Stammzellkulturmedium mit F12 und IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ernährt. Alle sieben Tage wurden die Überstände gesammelt und das Medium gewechselt. Vier Platten pro Gruppe und Zeitraum wurden hinsichtlich der Genexpression (*ALP*, *OPG*, *BGLAP*) und Proteinexpression (*OPG*, TGF-β, BMP-2) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Knochenplatten über Nacht mit 1 ml Kollagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verdaut. Anschließend wurden die Proben bei 1.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt, die Pellets wurden mit 400 µl Lysis Buffer (innuPREP RNA Mini Kit, Analytik Jena, Jena, Deutschland) resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen der Kontrollgruppe, die ohne Knochenproben inkubiert wurden, wurden mit der gleichen Menge Lysispuffer für die gleiche Zeitspanne direkt in den Wellplatten behandelt. Anschließend wurden die Proben entweder bei -80 °C für die weitere Verwendung gelagert oder die RNA wurde direkt nach dem Herstellerprotokoll isoliert (innuPREP RNA Mini Kit, Analytik Jena, Jena, Deutschland). Die RNA-Menge wurde mit dem Tecan Infinite Reader Pro unter Verwendung einer Nano Quant™-Platte quantifiziert (beide: Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz). Für die Transkription der RNA in cDNA wurden 100 ng RNA pro Probe eingesetzt und RNase freies Wasser hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erhalten. Zu jeder Probe wurden 10 µl MasterMix hinzugefügt und die reverse Transkription wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

(10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C, 15 s bei 85 °C). Anschließend wurden jeder Probe 20 µl RNase-freies Wasser zugesetzt, und die cDNA wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die quantitative PCR wurde zu je 1 µl Probe ein Mastermix aus 3 µl RNase freiem Wasser, 0,5 µl Forward Primer, 0,5 µl Reverse Primer und 5 µl innuMIX qPCR DS Green hinzugefügt. Die Proben wurden zweifach pipettiert und die qPCR mit einem qTOWER unter Verwendung des folgenden Protokolls durchgeführt: 2 min bei 95 °C, 40 Zyklen für 5 s bei 95 °C und 25 s bei 60 °C. Die Ergebnisse wurden mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert, wobei als Zyklusschwelle ein  $C_t$ -Wert von 30 festgelegt wurde. Zunächst wurden die  $C_t$ -Werte mit dem Housekeeping-Gen *gapDH* in Beziehung gesetzt ( $\Delta C_t = C_{t\text{target}} - C_{t\text{gapDH}}$ ). Anschließend wurde der  $\Delta\Delta C_t$ -Wert auf den  $\Delta C_t$ -Wert der nicht stimulierten Kontrolle bezogen ( $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t\text{control}}$ ).

Die für die Proteinquantifizierung verwendeten Überstände wurden bei -20 °C gelagert. Zur Analyse wurden sie aufgetaut, und der Proteingehalt wurde mit einem speziell entwickelten LEGENDplex™ (BioLegend, San Diego, CA, USA) quantifiziert. Die Proben wurden unverdünnt mit einer Gesamtmenge von 18 µl pro Probe verwendet. Die weitere Aufbereitung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll und die Messung wurde mit dem BD FACS Verse™ (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden auf den Gesamtproteingehalt bezogen, der mit dem Qubit Protein Assay Kit und dem Qubit 1.0 (beide: Invitrogen, Waltham, MA, USA) analysiert wurde.

## 2.4 Mechanische Charakterisierung

Die mechanische Charakterisierung der Knochenplatten erfolgte über einen 3-Punkt-Biegeversuch, der an einer Material-Prüfmaschine (Zwick Roell Z1.0, Zwick Roell, Ulm, Deutschland) mit der Software testXpert II (Zwick Roell, Ulm, Deutschland) durchgeführt wurde. Der Radius der Finnen, auf denen die Knochenplatte auflag, betrug 1,5 mm, die Stützweite lag bei 20 mm. Zunächst wurden die Platten mit einer Vorkraft von 0,02 N belastet und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 0,05 mm/s bis zum Brechen belastet (Abb. 6). Hierbei wurden Kraft und Weg mit einer Frequenz von 20 Messungen pro Sekunde gemessen. Zur mechanischen

Charakterisierung wurde angelehnt an die DIN EN ISO 178 zunächst die Biegefestigkeit [N/mm<sup>2</sup>] bestimmt, welche sich aus der Formel

$$\sigma = \frac{3 F L}{2 b d^2}$$

berechnet [82].

Dabei entspricht

$F$  der maximalen Kraft bis zum Brechen

$L$  der Stützweite

$b$  der Breite der Platten

$d$  der Dicke der Platten.

Über den Anstieg des linearen Abschnitts des Kraft-Weg-Diagramms ließ sich die Biegesteifigkeit der Platten ermitteln (Abb. 7, rot markiert). Die Biegefestigkeit ist ein Maß für die maximale Belastung, die ein Material im Rahmen einer Durchbiegung aufnehmen kann, bevor es bricht. Die Steifigkeit hingegen vermittelt den Zusammenhang zwischen der Belastung eines Körpers und dessen Verformung und hängt dabei sowohl vom Werkstoff als auch der Geometrie des Körpers ab [83]. Getestet wurden Platten der Versuchsgruppen LOCTITE® 408 (VGL) und Fibrinkleber (VGF). Als Kontrollgruppe (KG) dienten Platten derselben Größe, welche aus trabekulärem Knochen gesägt wurden ( $n = 15$  (VGL),  $n = 14$  (VGF, KG)).

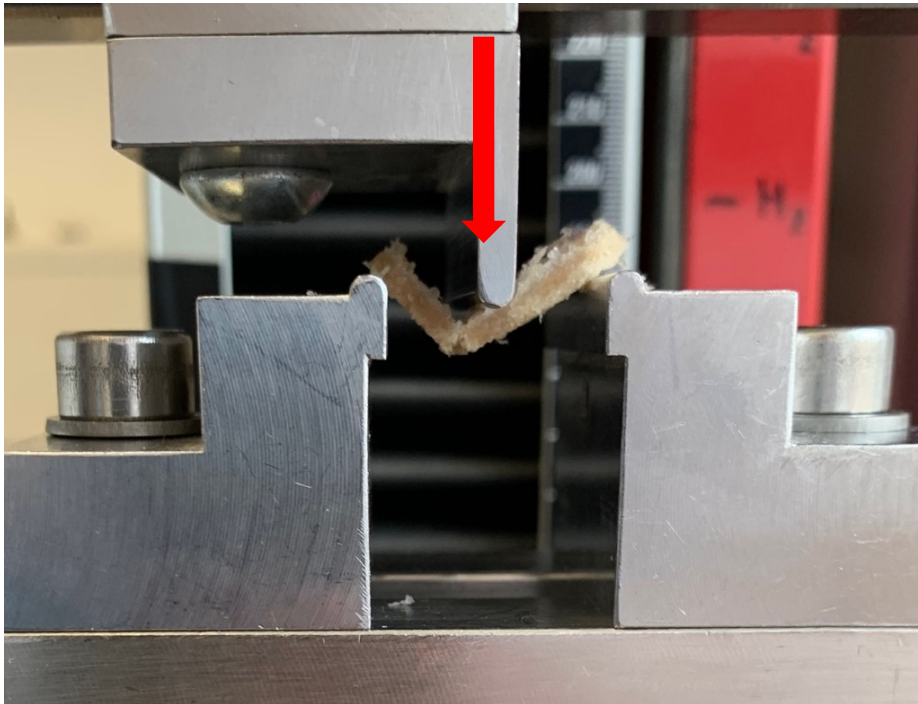


Abbildung 6: Versuchsaufbau des 3-Punkt-Biegeversuchs. Die Platten wurden bis zum Brechen senkrecht belastet. Die Kraftapplikation erfolgte in Richtung des roten Pfeils.

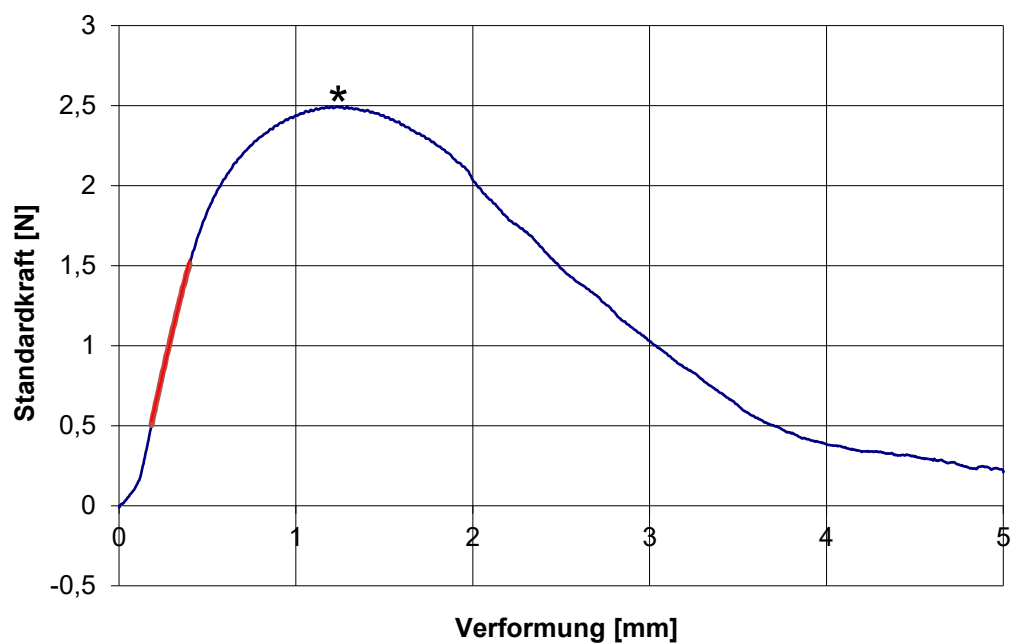


Abbildung 7: Auswertung der 3-Punkt-Biegeversuche einer Platte der VGF mittels Kraft-Verformungs-Diagramm. Die Biegefestigkeit wurde unter anderem mithilfe der maximalen Kraft ( $F_{max}$ , \*) berechnet, die Biegesteifigkeit wurde über den Anstieg des linearen Abschnitts (rot markiert) der Kurve bestimmt.

## 2.5 Simulierte klinische Anwendung an einem Kiefermodell

Die Untersuchung der geplanten klinischen Anwendung, also der Augmentation eines Kiefers, wurde exemplarisch an einem Kunststoff-Unterkiefermodell in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Rostock simuliert. Hierfür wurden je zwei Löcher unter Verwendung eines dentalen Bohrers mit 1,5 mm Durchmesser für 2 mm Schrauben (KLS Martin Group, Tuttlingen, Deutschland) in die Platten gebohrt. Durch diese Löcher wurden die Platten mit 2 mm Osteosynthese-Schrauben (Modus® Trauma 2.0, Medartis AG, Basel, Schweiz) im Kiefermodell fixiert.

## 2.6 Statistische Methoden

Die Erfassung und Aufarbeitung der Rohdaten erfolgten tabellarisch mit Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Statistische Tests wurden mit GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt.

Die statistische Testung für die Biegefestigkeit und die Biegesteifigkeit erfolgte bei fehlendem Vorliegen einer Normalverteilung über einen Kruskal-Wallis Test, wobei diese Voraussetzung vorab mittels Shapiro-Wilk Test getestet wurde.

Gemessene Unterschiede der Ergebnisse der Zytotoxizitätsprüfung mit MTT wurden mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests auf Signifikanz geprüft. Zuvor wurden die einzelnen Gruppen per Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft.

Die Ergebnisse der Gen- und Protein-Expression wurden mithilfe eines Two way ANOVA Tests geprüft. Die Voraussetzungen auf Normalverteilung erfolgten mittels Shapiro-Wilk Test.

Alle Ergebnisse wurden gegen ein  $\alpha$ -Niveau von 5% geprüft. Um einer Alphafehlerkumulierung entgegenzuwirken wurde die Bonferroni Korrektur angewendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung der Platten

Mit den beschriebenen, experimentell bestimmten Parametern ließen sich mit beiden verwendeten Klebstoffen reproduzierbar Knochenplatten von vergleichbarer Qualität und Größe herstellen. Die Ausmaße der Platten betrugen 25 x 10 x 1,7 mm, wobei die Dicke um  $\pm 0,1$  mm variierte. Insgesamt wurden für beide Gruppen je 25 Platten produziert. Während in der VGL die Herstellung aller Platten problemlos ablief, mussten zwei Platten der VGF verworfen und neu hergestellt werden. Grund hierfür waren Probleme mit der Applikation des Fibrinklebers durch das Zwei-Komponenten-System. Abb. 8 zeigt Bilder der Platten der Versuchsgruppen (VG) sowie der für die mechanische Charakterisierung verwendeten KG. Die Platten der VGF wirkten in der manuellen Handhabung eher weich und flexibel, die Platten der KG hingegen wirkten hart und starr. Die Platten der VGL waren deutlich flexibler als die der KG, dagegen aber härter als die Platten der VGF.

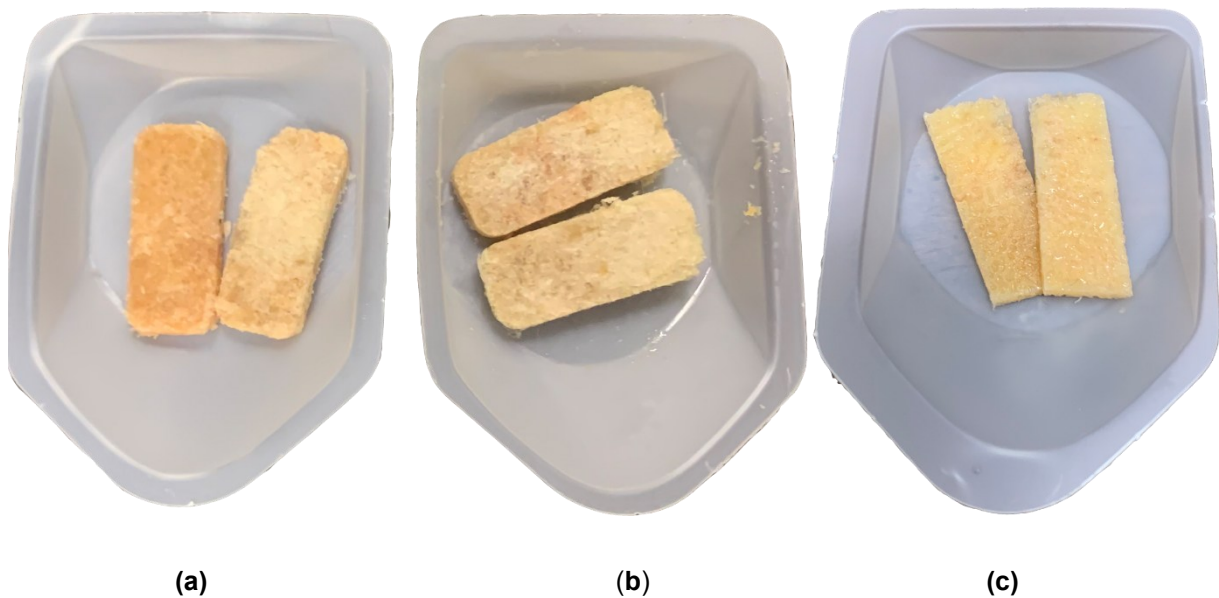


Abbildung 8: Je zwei Knochenplatten der VGL (a), VGF (b) und KG (c) in einer Wägeschale.

### 3.2 *In vitro* Zytotoxizitätsprüfung

Als quantitatives Maß für das zytotoxische Potential der Klebstoffe wurde eine Prüfung der Zellaktivität mit MTT durchgeführt. Gemessen an der Kontrolle erreichte der FK eine vollständige Zellaktivität. Der L408 hingegen erzielte mit 82,5 % im Durchschnitt signifikant weniger Zellaktivität als der FK ( $p = 0,002$ ), blieb damit aber oberhalb der Zytotoxizitätsschwelle von 70 %. Einzelne Proben des L408 blieben jedoch mit minimal 61,8 % unterhalb dieser Schwelle (Abb. 9).

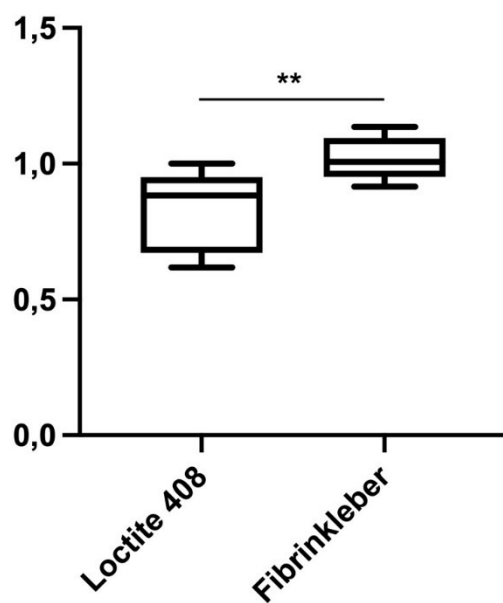


Abbildung 9: Ergebnisse der *in vitro* Zytotoxizitätsprüfung mit MTT. (\*\*  $p < 0,01$ )

### 3.3 Zellbesiedlung mit humanen adipogenen Stammzellen

#### 3.3.1 Ergebnisse der Genexpression

Es wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um die Fähigkeit der Platten zu bewerten, die osteogene Differenzierung von hADSC zu induzieren. Dazu wurde die Menge der mRNA-Transkripte charakteristischer Gene analysiert, die während der osteogenen Differenzierung auftreten. Die *ALP*-Expression nahm im Laufe der Zeit von 7 bis 21 Tagen der Inkubation ab. Diese Abnahme zeigte sich in beiden Gruppen und war dabei für die VGF signifikant ( $p < 0,01$ ). Während in der VGF an Tag 7 eine signifikante Überexpression von *ALP* im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wurde ( $p < 0,001$ ), wurden an Tag 14 und 21 keine Unterschiede beobachtet. Außerdem zeigten hADSC, die mit Platten der VGF inkubiert wurden, eine höhere *ALP*-Expression als Zellen, die auf L408-Platten ausgesät wurden, wobei dieser Unterschied nur nach 7 Tagen statistisch signifikant war ( $p = 0,0126$ ). Die Expression von *BGLAP* nahm ebenfalls mit der Zeit ab. In diesem Fall wurden jedoch weder zwischen den Klebstoffen noch im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede festgestellt. Auffallend ist, dass die mRNA-Transkripte von *BGLAP* bereits am siebten Tag der Inkubation nicht mehr signifikant über dem Kontrollniveau exprimiert wurden. Mit längerer Inkubationszeit fiel die Expression unter das Kontrollniveau. Damit unterscheidet sich *BGLAP* von den anderen analysierten Genen *ALP* und *OPG*, deren Expression nicht unter das Kontrollniveau fiel. Sowohl *OPG* als auch *ALP* zeigten bereits an Tag 7 eine signifikante Überexpression im Vergleich zur Kontrolle. Dies wurde sowohl in der VGL und VGF beobachtet. Darüber hinaus zeigten hADSC, die mit Platten der VGF inkubiert wurden, wie auch bei *ALP* eine höhere *OPG*-Expression als hADSC, die auf L408-Platten ausgesät wurden. Im Laufe der Zeit nahm die *OPG*-Expression in beiden Gruppen auf das Kontrollniveau ab, stieg aber am 21. Tag der Inkubation wieder an. Die Ergebnisse der Genexpression sind in den Abb. 10 - 12 sowie tabellarisch im Anhang in Abschnitt 7.1 dargestellt.

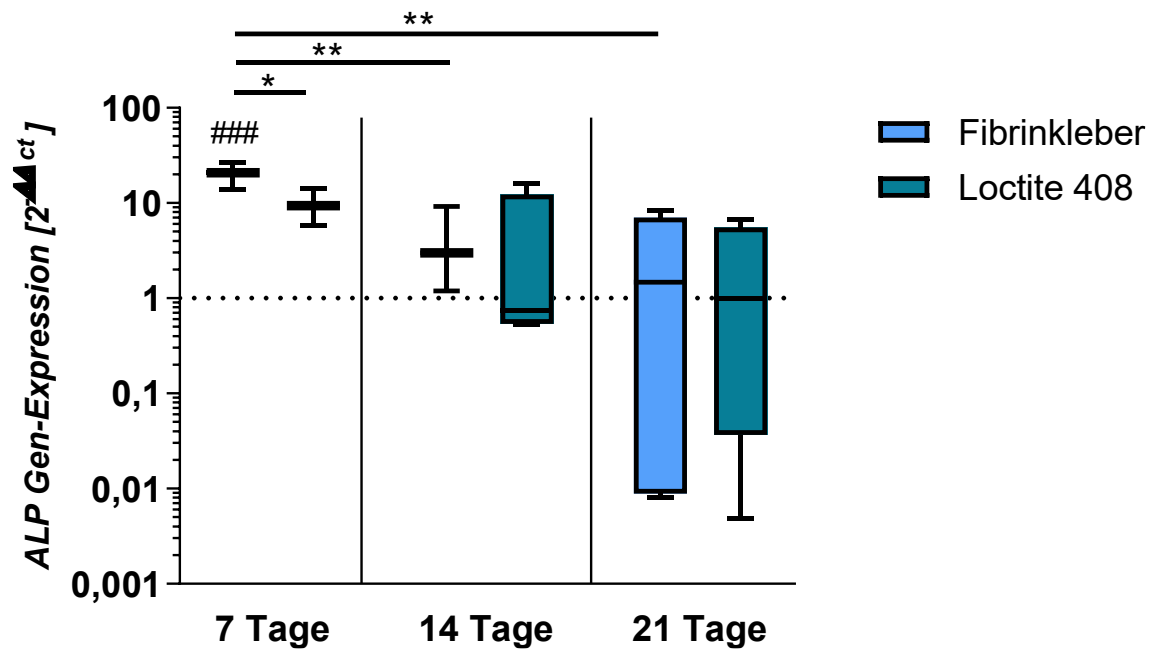


Abbildung 10: Ergebnisse der Genexpression von *ALP*. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ )

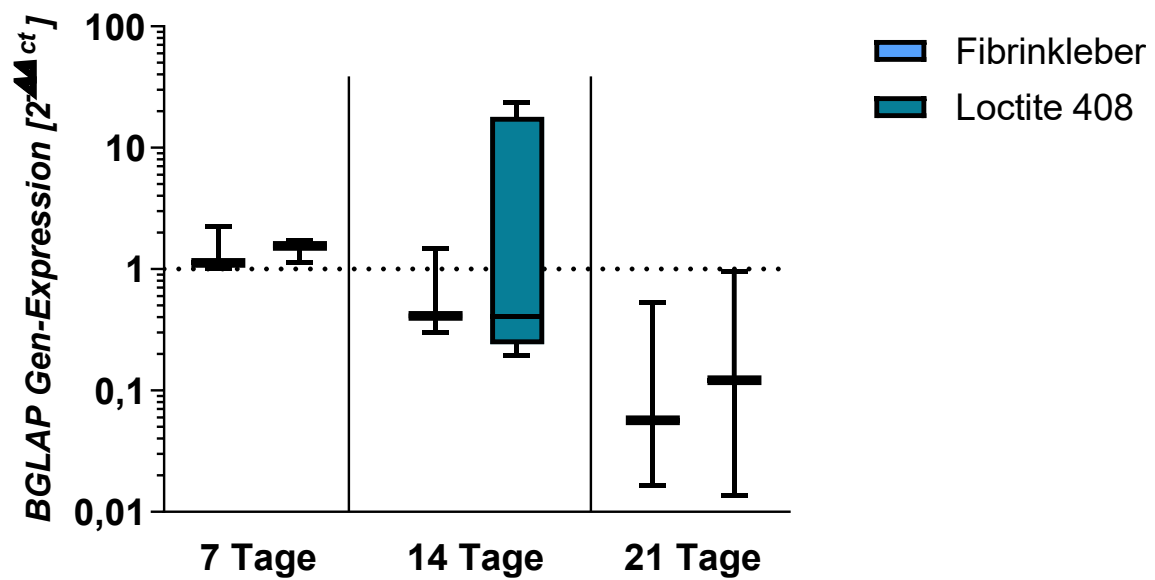


Abbildung 11: Ergebnisse der Genexpression von *BGLAP*.

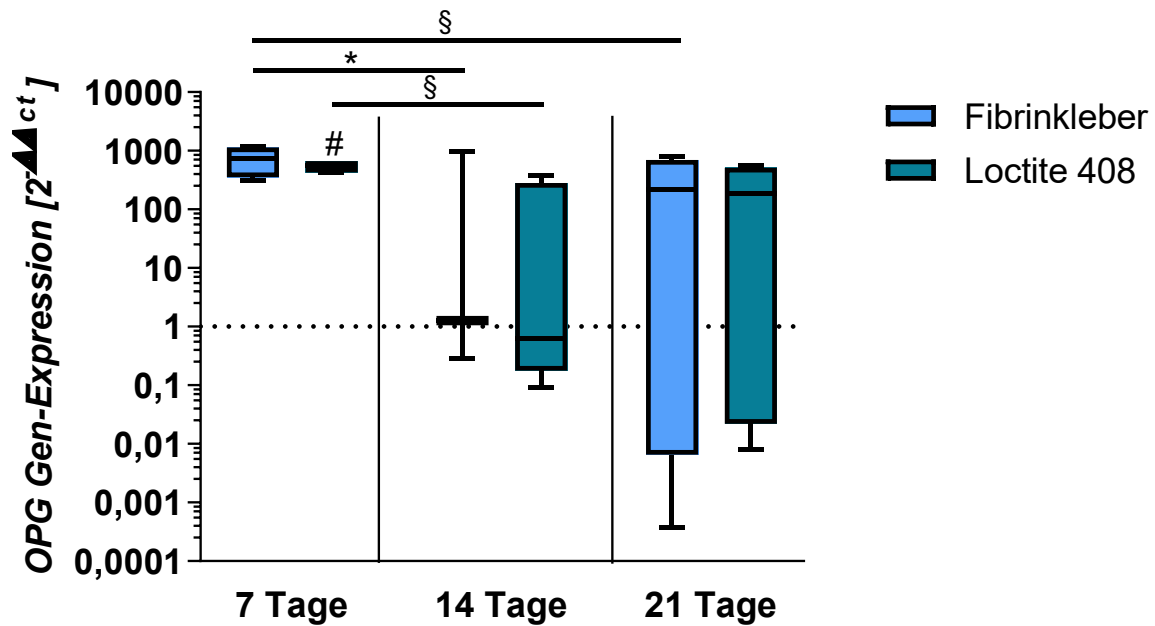


Abbildung 12: Ergebnisse der Genexpression von *OPG*. (§ p 0,05 - 0,1; \* p < 0,05; # p < 0,05)

### 3.3.2 Ergebnisse der Proteinexpression

Neben der zuvor ausgeführten Analyse der Genexpression wurde zusätzlich die Expression mehrerer Proteine untersucht, welche während der Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten überexprimiert werden und somit als Marker der Osteblastendifferenzierung zu sehen sind. Durch diese Untersuchung sollte die tatsächliche Entwicklung der hADSC zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten nachgewiesen werden. In der VGF wurde zu allen Zeitpunkten OPG nachgewiesen. Dabei nahm der Spiegel nach 14 Tagen im Vergleich zu 7 Tagen zunächst ab, stieg aber an Tag 21 wieder an. Dieser Trend war bei hoher Standardabweichung statistisch nicht signifikant. In den Überständen der VGL war OPG nur in den ersten beiden Zeiträumen messbar, hier zeigten sich jeweils vergleichbare Werte wie in der VGF. Im Gegensatz dazu wurde OPG in der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. TGF- $\beta$  konnte nach sieben Tagen in beiden Versuchsgruppen und in der Kontrolle nachgewiesen werden. Dabei war der Wert für die VGL signifikant höher als in der VGF oder der Kontrolle (jeweils  $p < 0,0001$ ). Nach 14 Tagen nahm der TGF- $\beta$ -Spiegel innerhalb der VGL signifikant ab ( $p < 0,0001$ ), wohingegen der Wert in der VGF leicht anstieg. Zum späten Messzeitpunkt konnte TGF- $\beta$  nur noch in der VGL

nachgewiesen werden, wobei der Wert im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten weiter sank. Verglichen mit dem Wert nach sieben Tagen zeigte sich dieser Abfall statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). BMP-2 wurde in allen Proben zu allen Zeitpunkten nachgewiesen. Der Peak lag entweder im frühen (VGL) oder im mittleren Zeitraum (VGF, KG). Zum späten Zeitpunkt nahm die gemessene Konzentration von BMP-2 in allen Gruppen ab, in der VGL zeigte sich dieser Abfall statistisch signifikant ( $p = 0,047$  (7 vs. 14 Tage),  $p = 0,041$  (7 vs. 21 Tage)). Zwischen 14 und 21 Tagen war die Signifikanz dieses Unterschieds auch in der VGF gegeben ( $p = 0,002$ ). Gemessen an den BMP-2-Konzentrationen in der Kontrolle zeigten sich zu allen Zeitpunkten sowohl in der VGL als auch in der VGF höhere Werte. Die Ergebnisse der Proteinexpression sind in den Abb. 13 - 15 sowie tabellarisch im Anhang in Abschnitt 7.1 dargestellt.

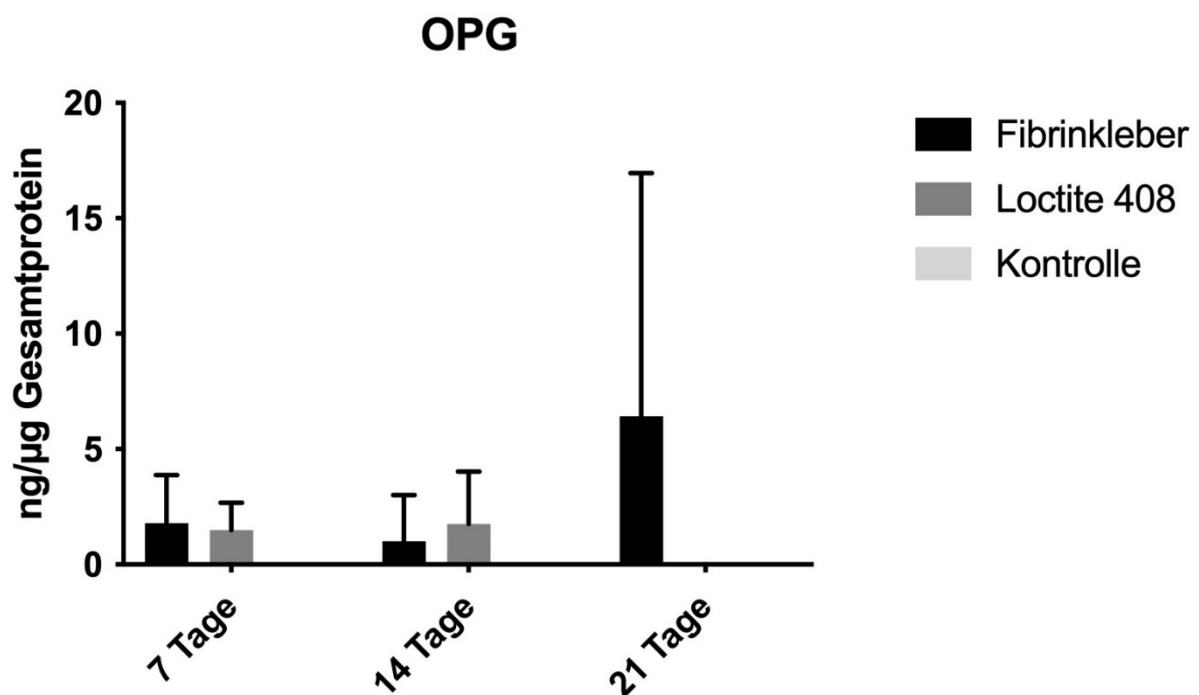


Abbildung 13: Ergebnisse der Proteinexpression von OPG.

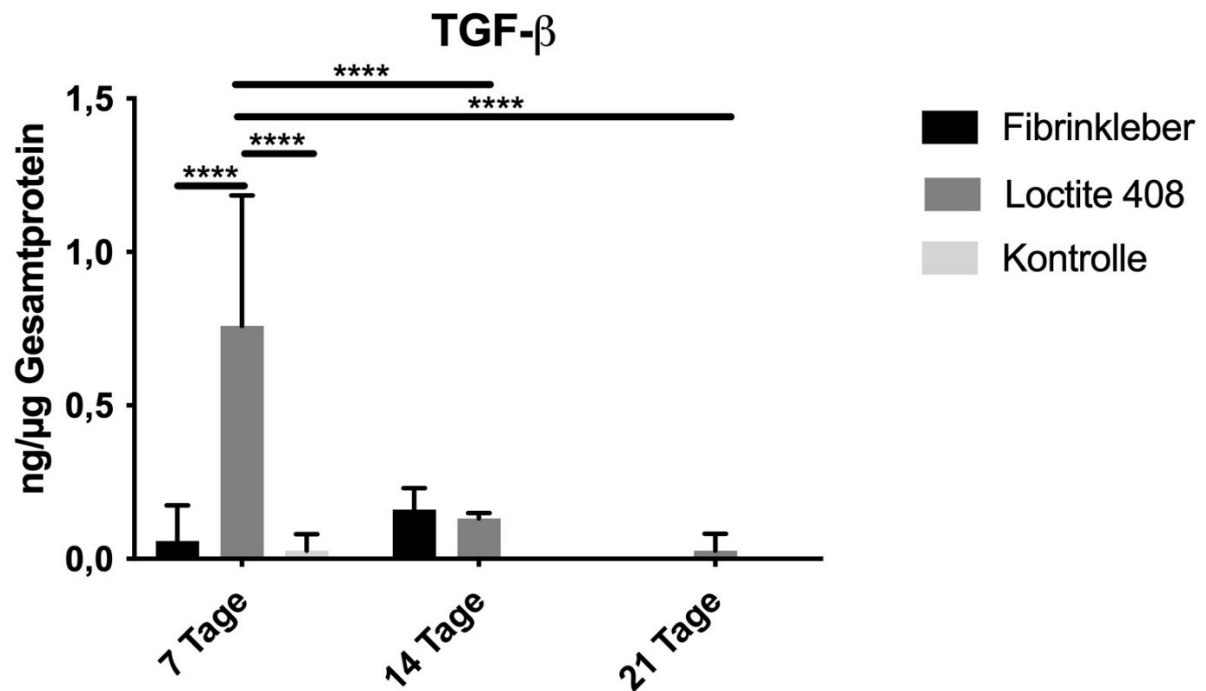


Abbildung 14: Ergebnisse der Proteinexpression von TGF- $\beta$ . (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

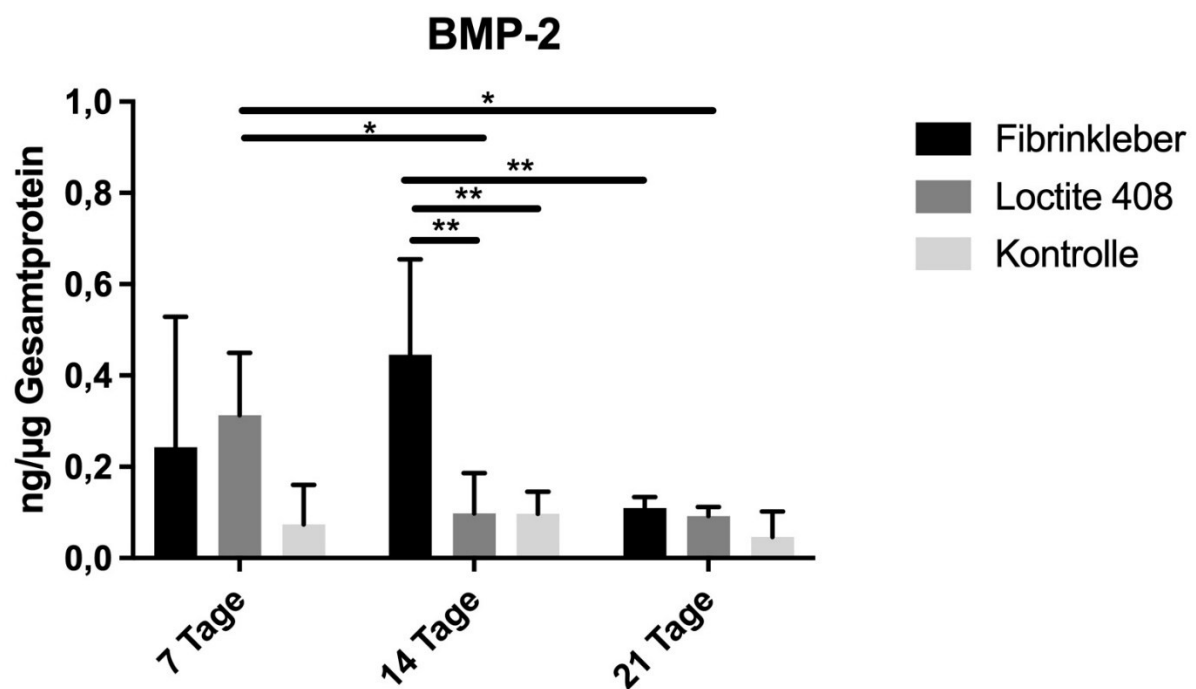


Abbildung 15: Ergebnisse der Proteinexpression von BMP-2. (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001)

### 3.4 Mechanische Charakterisierung

Um die Platten mechanisch zu charakterisieren, wurden die Biegesteifigkeit und die Biegefestigkeit in einem 3-Punkt-Biegeversuch bestimmt. Als Kontrolle dienten native Knochenplatten derselben Ausmaße, welche aus trabekulärem Knochen gesägt wurden. Bezüglich der Biegesteifigkeit wurden in der KG signifikant höhere Werte als in der VGL ( $p = 0,028$ ) und VGF ( $p < 0,0001$ ) gemessen (Abb. 16). Im Vergleich zur VGF zeigte sich im Durchschnitt in der VGL eine signifikant höhere Biegesteifigkeit ( $p = 0,044$ ), allerdings war dieser Unterschied weniger deutlich als der zwischen VGF und KG. Diese Beobachtungen lassen sich auf die Untersuchung der Biegefestigkeit übertragen (Abb.16). Auch hier konnten signifikante Unterschiede zwischen der KG und der VGF ( $p < 0,0001$ ) bzw. VGL ( $p = 0,019$ ) festgestellt werden. Der direkte Vergleich von VGL und VGF zeigte auch hier signifikant höhere Werte für die VGL ( $p = 0,008$ ), jedoch in geringerem Maße als beim Vergleich zwischen KG und VGF. Die gemessenen Mittelwerte mit Standardabweichung sind tabellarisch im Anhang in Abschnitt 7.1 dargestellt.

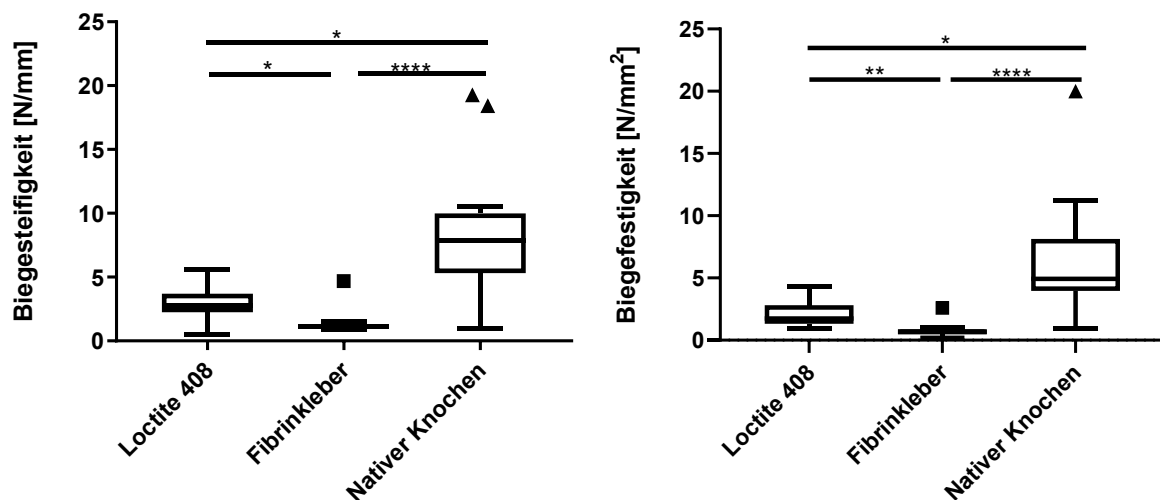


Abbildung 16: Ergebnisse der Biegesteifigkeit und Biegefestigkeit. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

### 3.5 Simulierte klinische Anwendung an einem Kiefermodell

Um die mögliche klinische Anwendung, also die laterale Augmentation zur Verbreiterung eines Kiefers zu simulieren, wurde getestet, ob sich die Platten mit Schrauben an einem Unterkiefermodell befestigen lassen. In die L408-Platten konnten zwei Löcher für die Osteosyntheseschrauben gebohrt werden. Auch die anschließende Befestigung am Modell über Schrauben ließ sich im Sinn der klinischen Anwendung durchführen (Abb. 17). Die Platten konnten fest mit dem Kiefer verbunden werden, ohne anschließende Bewegungen zuzulassen und gleichzeitig ohne Fraktur der angefertigten Knochenplatte.

Die FK-Platten hingegen konnten nicht am Kiefermodell befestigt werden. Aufgrund zu geringer mechanischer Festigkeit rissen die Bohrlöcher aus, sodass eine stabile Befestigung mithilfe der Osteosyntheseschrauben nicht erfolgen konnte.

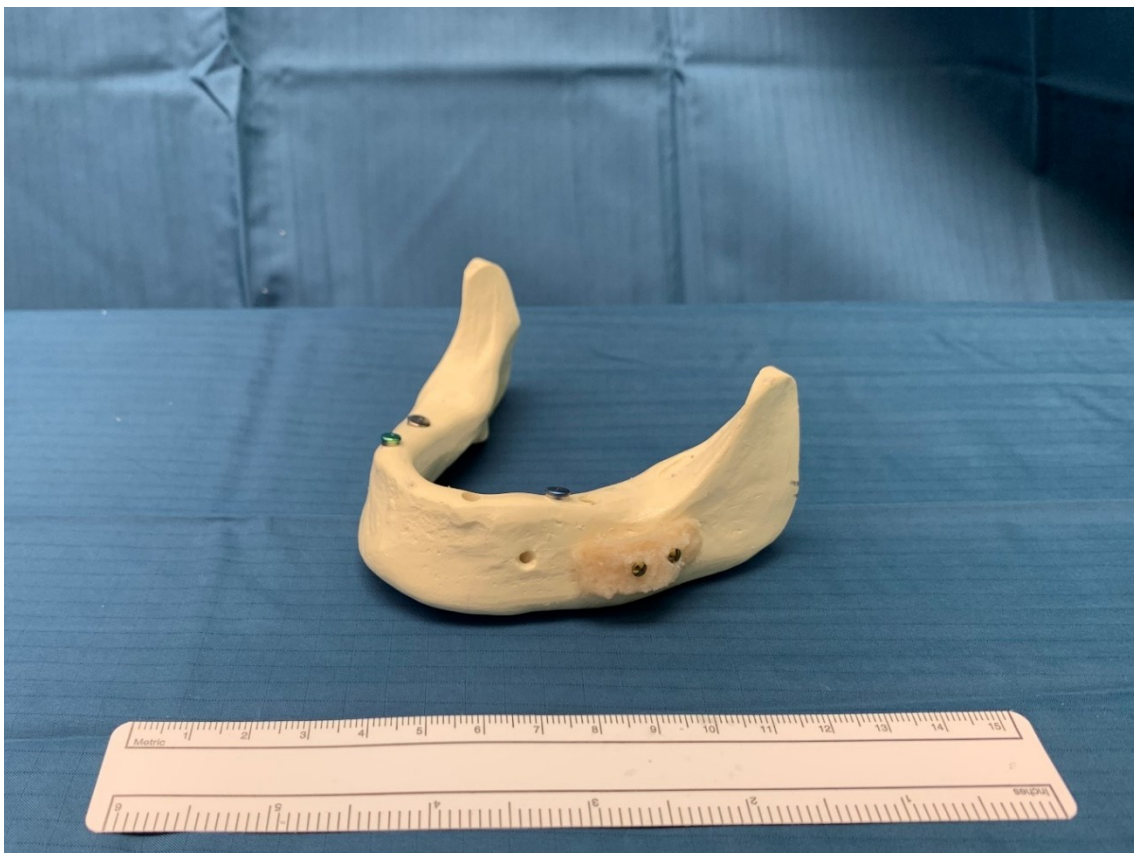




Abbildung 17: Platte der VGL, mit zwei 2 mm-Schrauben an einem Unterkiefermodell befestigt.

## 4. Diskussion

Nach Zahnverlust ist häufig eine Augmentation des Kieferknochens erforderlich, um ein ausreichend großes Knochenlager für eine anschließende dentale Implantation zu schaffen [3]. Hierfür existieren verschiedene Techniken. Unter anderem sind sowohl die Khoury-Technik, die mit körpereigenen Knochenblöcken arbeitet, als auch die die Schalentchnik mit allogenen Knochenplatten (z.B. maxgraft® cortico) etablierte Verfahren [3, 13, 14]. Ein großer Nachteil des autologen Knochens ist die begrenzte Verfügbarkeit und die lokalen Nebenwirkungen an der Entnahmestelle, während die mechanischen Eigenschaften allogener Materialien durch etablierte Aufbereitungsverfahren beeinflusst werden [15, 40]. Daher könnte hydrostatischer Hochdruck, eine ursprünglich aus der Lebensmittelindustrie stammende Methode, eine Alternative zur Prozessierung allogener Knochentransplantate sein, ohne dabei die mechanischen Eigenschaften zu verändern [19]. Durch die Anwendung von HHD kann eine wirksame Devitalisierung der Zellen im Gewebe erreicht werden, ohne die Komponenten der EZM zu beeinträchtigen [16, 23–26].

Die allogenen Knochenplatten, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sollten die Anforderungen für einen klinischen Einsatz im Bereich der Kieferaugmentationen erfüllen. Zu diesem Zweck wurde Granulat aus humanem, trabekulären Knochen mit HHD behandelt und anschließend zu Knochenplatten gepresst. Um eine ausreichende mechanische Festigkeit zu gewährleisten, wurden zwei verschiedene Klebstoffe - Fibrinkleber und Loctite® 408 - hinzugefügt. Da beide Additive unterschiedliche Vor- und Nachteile mit sich bringen, wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt. Zur Beantwortung der ersten beiden Leitfragen wurden daher Untersuchungen zur Biokompatibilität und zur osteogenen Differenzierung, sowie eine mechanische Charakterisierung der Knochenplatten durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse soll anschließend die dritte Leitfrage dieser Arbeit - ob die vorgestellten Knochenplatten eine Alternative zu etablierten allogenen Knochenplatten darstellen können - beantwortet werden.

Der Zytotoxizitätstest mit MTT zeigte kein zytotoxisches Potential für FK. Dies war zu erwarten, da der Klebstoff seit Jahren regelmäßig im klinischen Alltag eingesetzt wird und der Hersteller eine ausgezeichnete Verträglichkeit und keine Hinweise auf Zytotoxizität für Fibroblasten *in vitro* angibt [84]. Da L408 nicht für medizinische

Zwecke bestimmt ist, existieren seitens des Herstellers keine Angaben zur Biokompatibilität [85]. Im durchgeführten Zytotoxizitätstest konnten nach Inkubation mit L408 zwischen 61 % und 100 % Zellaktivität gemessen werden, wobei der Durchschnitt bei 82,5 % lag. Nach DIN EN ISO 10993-5:2009-10 hat ein Stoff ein zytotoxisches Potenzial, wenn der Grenzwert von 70 % Zellaktivität unterschritten wird [79]. Obwohl sich der gemessene Mittelwert mit 82,5 % oberhalb dieser Grenze befindet, liegen einige der Einzelproben unter diesem Grenzwert. Neben einer möglicherweise zytotoxischen Wirkung des Klebstoffs könnte diese Beobachtung auch auf unterschiedliche Proliferationsraten oder unterschiedliche Aktivitätsniveaus der Zellen zurückzuführen sein. Eine eindeutige Aussage, ob L408 biokompatibel oder zytotoxisch ist, ist daher auf Basis der vorliegenden Daten schwer zu treffen. Im direkten Vergleich zum FK ist das L408 jedoch deutlich weniger biokompatibel.

Um langfristig ein ausreichend dimensioniertes Knochenlager für anschließend einzubringende dentale Implantate zu schaffen, müssen die Knochenplatten nach der Implantation einheilen und mit körpereigenem Knochen durchbaut werden. Neben einer optimalen Biokompatibilität sollten Knochentransplantate daher die Migration von Stammzellen sowie die Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten fördern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse der Expression von spezifischen Genen und Proteinen untersucht, die für diese Differenzierungsprozesse charakteristisch sind. Im Vergleich zur Kontrolle wurde in beiden Versuchsgruppen überwiegend eine Überexpression von Genen und Proteinen festgestellt, die die Knochenbildung fördern. *ALP*, *BMP-2* und *TGF- $\beta$*  gelten als Marker für die frühen Stadien der Differenzierung, da sie die Entwicklung von Stammzellen über Osteoblasten-Vorläuferzellen zu aktiven Osteoblasten fördern [68–71]. Die drei genannten Marker wurden in den durchgeführten Untersuchungen in den frühen gemessenen Zeitpunkten nachgewiesen, was auf eine Induktion der osteogenen Differenzierung hindeutet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Expression von *ALP*-Transkripten in beiden Gruppen nach hohen Werten an Tag 7 im Laufe der Zeit auf das Niveau der Kontrolle sank. Diese Beobachtung sowie der Nachweis hoher *BMP-2*- und *TGF- $\beta$* -Spiegel am 7. und 14. Tag der Inkubation mit anschließendem Abfall auf das Kontrollniveau weisen ebenfalls auf die Induktion der Osteogenese hin. Hinsichtlich der Expression von *BMP-2* und *TGF- $\beta$*  variierten die Unterschiede zwischen FG und L408 und zeigten keine klare Tendenz zu einem der beiden Klebstoffe.

OPG und *BGLAP* werden bekanntermaßen von aktiven Osteoblasten exprimiert und gelten im Gegensatz zu den zuvor genannten Mediatoren als eher späte Marker der Knochenbildung [86, 87]. Für diese gab es gemessen an der Kontrolle jedoch keine Unterschiede in beiden Versuchsgruppen. Während *BGLAP* anfänglich in ähnlichen Konzentrationen wie in der Kontrolle gemessen wurde, fiel es nach 21 Tagen unter den Kontrollwert. *BGLAP* ist ein Vertreter der nicht-kollagenen Knochenmatrixproteine und die Expression wird durch die Inkubation mit Knochenplatten offenbar nicht stimuliert. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass keine Notwendigkeit für die Expression von *BGLAP* besteht, da die Matrix aufgrund der Klebstoffe und der damit verbundenen Festigkeit der Proben stabil ist. Außerdem könnten diese Ergebnisse aus einer nicht ausreichenden Differenzierung der Stammzellen während der beobachteten Inkubationszeit resultieren. Dies wird auch durch eine Untersuchung von Wang *et al.* gestützt, in der nur die Inkubation von Osteoblasten mit weiteren Additiven zum Nachweis von *BGLAP* führte [38].

Aufgrund des Nachweises von OPG kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich haDSC, welche auf den hergestellten Knochenplatten inkubiert wurden, zu Osteoblasten differenzieren. OPG ist für den Erhalt der Knochenmatrix verantwortlich, indem es die Osteoklastenreifung hemmt [88]. Interessanterweise stieg das OPG-Protein in der FK-Gruppe nach 21 Tagen an, während es in der L408-Gruppe nur nach 7 und 14 Tagen nachweisbar war. Andererseits wurde für die Genexpression an Tag 21 eine Überexpression in beiden VG im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Aufgrund der zeitlichen Verschiebung von Genexpression und Proteinsekretion hätte die Inkubationszeit möglicherweise verlängert werden müssen, um OPG auch in der L408-Gruppe auf Proteinebene nachzuweisen. Während die Gene und Proteine, die typischerweise während der frühen Differenzierung zu Osteoblasten auftreten, auch in dieser Studie in den frühen Zeiträumen vermehrt gemessen wurden, waren die Ergebnisse für die späten Marker nicht konsistent. Grundsätzlich ist hier zu beachten, dass das für die Platten verwendete Knochengranulat selbst noch knochentypische, und den Knochenaufbau fördernde Proteine enthält und diese mit der Zeit aus den Knochenplatten freigesetzt werden können. Das Ausmaß dieser Freisetzung kann dabei unter anderem durch die Klebstoffe beeinflusst werden. Da die Platten der VGL einen stärkeren Verbund als die der VGF ergaben, ist es somit denkbar, dass Knochenplatten, die mit L408 hergestellt wurden, auch Proteine zurückhalten.

Für die abschließende Beantwortung der ersten Leitfrage müssen die verwendeten Klebstoffe separat betrachtet werden. Die erste Teilfrage zur Biokompatibilität lässt sich für den FK klar beantworten. Die optimale Biokompatibilität ist vom Hersteller bestätigt und konnte auch in den durchgeführten Untersuchungen nachgewiesen werden. Über die Biokompatibilität des L408 hingegen kann auf Basis der durchgeführten Untersuchungen abgesehen von der Beobachtung, dass sie geringer ist als die des FK, keine eindeutige Aussage getroffen werden. Bezogen auf die zweite Teilfrage ist unabhängig vom Kleber festzuhalten, dass die Platten die osteogene Differenzierung von Stammzellen und somit auch grundsätzlich die Bildung körpereigenen Knochens unterstützen. Auch wenn nicht alle Marker vollständig wie erwartet auftraten, zeigen die Ergebnisse, dass die hergestellten Knochenplatten sowohl mit L408 als auch mit FK die osteogene Differenzierung von haDSC fördern. Dieser Effekt kann auf die osteoinduktiven Eigenschaften des allogenen Knochens zurückgeführt werden, die ihrerseits auf die im Knochen vorhandenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen sind [89, 90].

Neben der Biokompatibilität und Induktion der osteogenen Differenzierung müssen die Knochenplatten im Hinblick auf den geplanten klinischen Einsatz auch eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen, um die intraoperative Verarbeitung und Implantation zu ermöglichen. Sowohl die 3-Punkt-Biegeversuche als auch der Versuch, die Platten exemplarisch an einem Kiefermodell zu befestigen, zeigten, dass die L408-Platten stabiler sind als die FK-Platten. Darüber hinaus zeigte der Vergleich mit Platten aus nativem Knochen in den Biegetests, dass diese stabiler sind als die beiden hergestellten Platten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die trabekuläre Anordnung der nativen Platten nicht zerstört wird, wie es bei den mit L408 und FK hergestellten Platten durch das Mahlen des Knochens der Fall ist. Die beobachtete geringere Stabilität bedeutet jedoch nicht zwingend eine geringere Eignung für den vorgesehenen Verwendungszweck. Da die Platten im Rahmen der eingangs erläuterten Schalentchnik eingesetzt werden sollen, tragen sie keine direkte Last [14]. Die geringere Biegesteifigkeit könnte hierfür sogar ein Vorteil sein, da die Platten dadurch flexibler und leichter zu modellieren sind und sich somit besser an die individuelle Kieferform anpassen können. Deutlich wichtiger als eine möglichst hohe Biegesteifigkeit und -festigkeit ist, dass die Platten fest mit dem Kiefer verschraubt werden und gleichzeitig eine stabile Form (Außenkontur) geben. Dadurch kann der Spalt mit partikulären Knochenaufbaumaterialien gefüllt werden, sodass ein

postoperatives Remodeling mit der Bildung von Eigenknochen stattfinden kann. Diese praktische Anwendung wurde in der vorliegenden Arbeit durch ein Bohren der Platten mit anschließender Befestigung an einem Kiefermodell simuliert. Mit der Knochenplatte der VGF war dies nicht möglich. Für die mit Fibrinkleber hergestellten Knochenplatten lässt sich die zweite Leitfrage daher insofern beantworten, dass sie die mechanischen Anforderungen, um für Kieferaugmentationen eingesetzt zu werden, nicht erfüllen. Die mit L408 hergestellten Knochenplatten zeigten in den Biegeversuchen ebenfalls eine geringere Festigkeit als die native Kontrolle, ließen sich aber gut am Kiefermodell befestigen. Bezogen auf die zweite Leitfrage erfüllen die mit L408 hergestellten Knochenplatten anhand der vorliegenden Ergebnisse damit die mechanischen Anforderungen für die klinische Anwendung.

Die primäre Maßgabe dieser Arbeit war es, Knochenplatten herzustellen, die erstens biokompatibel und zweitens mechanisch für Augmentationen des Alveolarkamms geeignet sind. Die nativen Knochenplatten, die in den hier durchgeführten mechanischen Versuchen als Kontrolle dienten, erfüllen diese Anforderungen auf den ersten Blick deutlich besser als die mit L408 und FK hergestellten Platten. Sie kommen vollständig ohne Additive - welche potentiell negative Wirkungen mit sich bringen - aus und weisen durch die erhaltene trabekuläre Struktur eine höhere mechanische Festigkeit auf. Wie bereits aufgeführt ist die höhere mechanische Festigkeit nicht zwingend ein Vorteil, für eine bessere intraoperative Handhabung kann die geringere Biegesteifigkeit der Platten der VG mit einhergehender höherer Flexibilität von Vorteil sein. Zusätzlich bringen die nativen Knochenplatten einen weiteren Nachteil mit sich. Eine Behandlung mit HHD wirkt devitalisierend, indem es bei Drücken von 100-200 MPa eine Apoptose einleitet [20–22]. Die potentiell immunogenen Zellreste verbleiben jedoch im Transplantat und können so zu Entzündungen führen. Im schlimmsten Fall kann dies zu einer Abstoßung der Transplantate führen. Neben der Devitalisierung mit HHD ist also auch eine Dezellularisierung der Transplantate, also das Entfernen der verbliebenen Zellreste sinnvoll. Dies ist durch die erhaltene trabekuläre Struktur der nativen Knochenplatte nicht effektiv möglich. Das Knochengranulat hingegen kann nach der HHD-Behandlung besser gespült werden, um so Zellreste zu entfernen. Für einen kommerziellen Einsatz dieser Technologie ist jedoch eine standardisierte Spülung der Transplantate notwendig, die eine effektive Dezellularisierung gewährleistet. Lorenz *et al.* präsentierten bereits ein Design und die Herstellung einer 3D-gedruckten Spülkammer, welche speziell für HHD-behandelte allogene

Transplantate entwickelt wurde [91]. Durch eine derartige Technologie kann somit nach erfolgter Devitalisierung der Zellen die verbliebenen potentiell immunogenen Zellreste aus Transplantaten entfernt werden.

Zur Beantwortung der dritten Leitfrage, inwiefern die für diese Arbeit entwickelten Knochenplatten eine Alternative für etablierte Augmentationstechniken darstellen, ist eine Zusammenschau der bisher diskutierten Ergebnisse notwendig. Die hergestellten Knochenplatten sollten die positiven Eigenschaften etablierter allogener und autologer Knochentransplantate vereinen. Konkret beinhaltet dies eine optimale Bioverfügbarkeit und mechanische Eigenschaften, die den intra- und postoperativen Anforderungen gerecht werden. Zudem sollen die Knochenplatten möglichst das Einwandern und die Differenzierung knochenbildender Zellen fördern, um ein zeitnahes Durchbauen mit körpereigenem Knochen zu ermöglichen. Wenngleich weder die mit L408 noch die mit FK hergestellten Platten alle benötigten Anforderungen vereinen konnten, zeigen die Ergebnisse, dass der hier dargestellte Ansatz zielführend sein kann. Während der FK eine hervorragende Biokompatibilität aufweist, zeigten die Platten mit L408 geeignete mechanische Eigenschaften für den klinischen Einsatz. Für die weiter notwendige Forschung an Platten aus mit HHD behandeltem Knochengranulat wäre daher die Suche nach einem Klebstoff erforderlich, der sich mechanisch wie L408 verhält, aber genauso biokompatibel ist wie FK. Mit einem derartigen Klebstoff würden die Knochenplatten eine optimale Biokompatibilität mit geeigneten mechanischen Eigenschaften vereinen, und durch die Förderung der Migration und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen könnten diese die postoperative Einheilung optimal unterstützen. Der Vorteil gegenüber bisher kommerziell verfügbaren allogenen Transplantaten liegt dabei zum einen in der durch die HHD-Behandlung erhaltenen EZM, welche durch etablierte Aufbereitungsverfahren negativ beeinflusst wird [15]. Weiterhin bietet die Herstellung aus Knochengranulat den Vorteil einer verbesserten Spülbarkeit und die Möglichkeit, Knochenplatten in unterschiedlicher Form und Größe herzustellen. Diese würden es dem Operateur erlauben, je nach Defekt und Lokalisation aus einer Vielzahl unterschiedlicher Knochenplatten zu wählen. Um diese Vision zu erreichen, sollte daher zunächst ein Klebstoff gefunden werden, der die Eigenschaften von FG und L408 vereint. Medizinische Klebstoffe, wie beispielsweise der Fibrinkleber, haben sich in einigen Bereichen der Medizin innerhalb der letzten Jahrzehnte fest etabliert. Mit einem steten Voranschreiten der Forschung ist auch in diesem Bereich mit der

Innovation neuartiger Werkstoffe zu rechnen, die die bereits aufgeführten wünschenswerten Eigenschaften vereinen können.

Wie bereits aufgeführt liefern die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen einige lehrreiche Erkenntnisse. Für abschließende Aussagen bezüglich der Eignung als Knochentransplantat sind jedoch nach Finden eines geeigneten Klebstoffs weitere Untersuchungen notwendig, welche sich aus den Limitationen der durchgeführten Untersuchungen ergeben. Die Übertragbarkeit dieser *in-vitro*-Experimente auf eine klinische Anwendung ist begrenzt. Zu den Einschränkungen der durchgeführten Untersuchungen gehört die vereinfachte Gestaltung der Versuchsaufbauten. Obwohl die Biegeversuche einen relevanten Hinweis auf die mechanischen Eigenschaften der Platten geben, können sie die tatsächliche klinische Anwendung, bei der komplexere Kräfte auf die Transplantate einwirken, nicht vollständig wiedergeben. Auch die Zytotoxizitätstests und die Bestimmung der Gen- und Proteinexpression wurden unter vereinfachten Bedingungen durchgeführt. An der Einheilung von Transplantaten im menschlichen Körper sind weitere Zelltypen wie Osteoklasten beteiligt und es handelt sich um einen komplexen Prozess, der durch die durchgeführten Versuche nur stark vereinfacht dargestellt werden kann. Für weitere Studien wären daher unter anderem Zellexperimente notwendig, die nicht nur die Wirkung der Knochenplatten auf Osteoblasten, sondern auch auf Osteoklasten untersuchen. Da diese während des Knochenremodellings eine wichtige Rolle spielen, sind sie für die postoperative Einheilung von großer Bedeutung [37]. Für eine abschließende Bewertung bezüglich der klinischen Anwendbarkeit sind jedoch experimentelle Untersuchungen an Tiermodellen notwendig. Hierfür würden sich bereits etablierte Modelle für laterale Kieferaugmentationen wie ein Schweine- oder Hundemodell eignen [92–94]. Ein solches Modell würde wichtige Ergebnisse hinsichtlich des klinischen Outcomes, der intraoperativen Handhabung sowie der Biokompatibilität liefern.

## 5. Zusammenfassung

Die Schalentchnik unter Verwendung allogener oder autologer Knochentransplantate ist ein etabliertes Verfahren, um Kieferknochen vor geplanter Implantation zu augmentieren. Während autologer Knochen vor allem eine Morbidität der Entnahmestelle mit sich bringt, werden die mechanischen Eigenschaften allogenen Knochens durch die notwendigen Aufbereitungsmaßnahmen negativ beeinflusst. Die Hydrostatische Hochdruck-Behandlung (HHD) bietet ein alternatives Aufbereitungsverfahren, das eine effektive Devitalisierung ohne Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften möglich macht. In dieser experimentellen Arbeit wurde ein Herstellungsverfahren für Knochenplatten entwickelt, die sich für Kieferaugmentationen eignen. Die Platten bestanden aus Knochengranulat, welches mit HHD behandelt wurde sowie aus zwei verschiedenen Klebstoffen, die für die mechanische Festigkeit benötigt wurden. Nach der Herstellung wurden die Knochenplatten auf mechanische Stabilität sowie die Unterstützung der osseogenen Differenzierung von humanen Stammzellen überprüft, die auf den Platten inkubiert wurden. Weiterhin wurden die verwendeten Klebstoffe Fibrinkleber (FK) sowie Loctite® 408 (L408) auf ihre Biokompatibilität getestet. Während die mit L408 hergestellten Knochenplatten bessere mechanische Eigenschaften aufwiesen, war die Biokompatibilität der mit FK hergestellten Knochenplatten besser. Es konnte gezeigt werden, dass Knochenplatten aus Knochengranulat, welches mit HHD behandelt wurde, hergestellt werden können, die die grundlegenden Anforderungen an eine Augmentation der Kieferknochen erfüllt. Für einen tatsächlichen klinischen Einsatz derartiger Platten sind weitere Untersuchungen sowie ein Klebstoff notwendig, der die Eigenschaften der hier getesteten Klebstoffe vereint.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut. Gesundheit in Deutschland.: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2015. Zuletzt aufgerufen am 12.01.2025.
2. Glockmann E, Panzner K-D, Huhn P, Sigusch BW, Glockmann K. Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland – Dokumentation einer bundesweiten Erhebung (2007) 2011.
3. Sánchez-Sánchez J, Pickert FN, Sánchez-Labrador L, Gf Tresguerres F, Martínez-González JM, Meniz-García C. Horizontal Ridge Augmentation: A Comparison between Khoury and Urban Technique. *Biology (Basel)* 2021. doi:10.3390/biology10080749.
4. Schützhold S, Holtfreter B, Schiffner U, Hoffmann T, Kocher T, Micheelis W. Clinical factors and self-perceived oral health. *Eur J Oral Sci.* 2014;122:134–41. doi:10.1111/eos.12117.
5. Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses für eine ausreichende, zweckmäßige und wirtschaftliche vertragszahnärztliche Versorgung mit Zahnersatz und Zahnkronen; 2016.
6. AlOtaibi NM, Dunne M, Ayoub AF, Naudi KB. A novel surgical model for the preclinical assessment of the osseointegration of dental implants: a surgical protocol and pilot study results. *J Transl Med.* 2021;19:276. doi:10.1186/s12967-021-02944-w.
7. Díaz-Castro CM, Lázaro Calvo P, Gil FJ, Fernández-Palacín A, Ríos-Santos J-V, Herrero-Climent M. A Non-Interventional Study Documenting Use and Success of Tissue Level Implants. *Int J Environ Res Public Health* 2020. doi:10.3390/ijerph17134816.
8. Ferrigno N, Laureti M, Fanali S, Grippaudo G. A long-term follow-up study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten-year life table analysis of a prospective multicenter study with 1286 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:260–73. doi:10.1034/j.1600-0501.2002.130305.x.
9. Chiapasco M, Gatti C. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a 3- to 8-year prospective study on 328 implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5:29–38. doi:10.1111/j.1708-8208.2003.tb00179.x.

10. DelBalso AM, Greiner FG, Licata M. Role of diagnostic imaging in evaluation of the dental implant patient. *Radiographics*. 1994;14:699–719. doi:10.1148/radiographics.14.4.7938761.
11. Benic GI, Hämmerle CHF. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000*. 2014;66:13–40. doi:10.1111/prd.12039.
12. Khoury F, Antoun H, Missika P. *Bone Augmentation in Oral Implantology*: Quintessenz Verlags-GmbH; 2006.
13. Khoury F, Hanser T. Mandibular bone block harvesting from the retromolar region: a 10-year prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30:688–97. doi:10.11607/jomi.4117.
14. botiss biomaterials GmbH. Produktbroschüre. <https://botiss-dental.com/de/products/maxgraft-cortico-de/>. Zuletzt aufgerufen am 12.01.2025.
15. Mikhael MM, Huddleston PM, Zobitz ME, Chen Q, Zhao KD, An K-N. Mechanical strength of bone allografts subjected to chemical sterilization and other terminal processing methods. *J Biomech*. 2008;41:2816–20. doi:10.1016/j.jbiomech.2008.07.012.
16. Waletzko J, Dau M, Seyfarth A, Springer A, Frank M, Bader R, Jonitz-Heincke A. Devitalizing Effect of High Hydrostatic Pressure on Human Cells-Influence on Cell Death in Osteoblasts and Chondrocytes. *Int J Mol Sci* 2020. doi:10.3390/ijms21113836.
17. Waletzko-Hellwig J, Saemann M, Schulze M, Frerich B, Bader R, Dau M. Mechanical Characterization of Human Trabecular and Formed Granulate Bone Cylinders Processed by High Hydrostatic Pressure. *Materials (Basel)* 2021. doi:10.3390/ma14051069.
18. Yamamoto K. Food processing by high hydrostatic pressure. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017;81:672–9. doi:10.1080/09168451.2017.1281723.
19. Masson P, Tonello C, Balny C. High-Pressure Biotechnology in Medicine and Pharmaceutical Science. *J Biomed Biotechnol*. 2001;1:85–8. doi:10.1155/S1110724301000158.
20. Takano KJ, Takano T, Yamanouchi Y, Satou T. Pressure-induced apoptosis in human lymphoblasts. *Exp Cell Res*. 1997;235:155–60. doi:10.1006/excr.1997.3666.

21. Yamaguchi T, Hashiguchi K, Katsuki S, Iwamoto W, Tsuruhara S, Terada S. Activation of the intrinsic and extrinsic pathways in high pressure-induced apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2008;13:49–57. doi:10.2478/s11658-007-0034-x.
22. Agar A, Li S, Agarwal N, Coroneo MT, Hill MA. Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure. *Brain Res*. 2006;1086:191–200. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.061.
23. Steinhauser E, Diehl P, Hadaller M, Schauwecker J, Busch R, Grading R, Mittelmeier W. Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;76:130–5. doi:10.1002/jbm.b.30343.
24. Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, et al. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. *PLoS One*. 2014;9:e103201. doi:10.1371/journal.pone.0103201.
25. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31:3590–5. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.073.
26. Diehl P, Schmitt M, Schauwecker J, Eichelberg K, Gollwitzer H, Grading R, et al. Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins. *Int J Mol Med* 2005. doi:10.3892/ijmm.16.2.285.
27. Zohrabian VM, Sonick M, Hwang D, Abrahams JJ. Dental Implants. *Semin Ultrasound CT MR*. 2015;36:415–26. doi:10.1053/j.sult.2015.09.002.
28. Wang H-L, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent*. 2006;15:8–17. doi:10.1097/01.id.0000204762.39826.0f.
29. Arora V, Kumar D. Alveolar ridge split technique for implant placement. *Med J Armed Forces India*. 2015;71:S496-8. doi:10.1016/j.mjafi.2013.12.013.
30. Çelebi Bektaş A, Yalçın M. Evaluation of deformation in the buccal lamellar bone with finite element analysis in alveolar ridge-splitting/expansion technique. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2021;122:578–82. doi:10.1016/j.jormas.2020.09.013.

31. Duttenehoefer F, Varga P, Jenni D, Grünwald L, Thiemann L, Gueorguiev B, Stricker A. The Alveolar Ridge Splitting Technique on Maxillae: A Biomechanical Human Cadaveric Investigation. *Biomed Res Int.* 2020;2020:8894471. doi:10.1155/2020/8894471.
32. Chavda S, Levin L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *J Oral Implantol.* 2018;44:74–84. doi:10.1563/aaid-joi-D-17-00053.
33. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101. doi:10.1007/s005860100282.
34. Weber FE. Reconsidering Osteoconduction in the Era of Additive Manufacturing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25:375–86. doi:10.1089/ten.TEB.2019.0047.
35. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20-7. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.
36. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S77-81. doi:10.1016/j.injury.2011.06.014.
37. Stumbras A, Krukis MM, Januzis G, Juodzbals G. Regenerative bone potential after sinus floor elevation using various bone graft materials: a systematic review. *Quintessence Int.* 2019;50:548–58. doi:10.3290/j.qi.a42482.
38. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2:224–47. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
39. Giannoudis PV, Chris Arts JJ, Schmidmaier G, Larsson S. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S1-2. doi:10.1016/j.injury.2011.06.001.
40. Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma.* 2010;24 Suppl 1:S36-40. doi:10.1097/BOT.0b013e3181cec4a1.
41. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;81:112–21. doi:10.1016/j.bone.2015.07.007.

42. Battafarano G, Rossi M, Martino V de, Marampon F, Borro L, Secinaro A, Del Fattore A. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2021. doi:10.3390/ijms22031128.
43. Zhuang Z, John JV, Liao H, Luo J, Rubery P, Mesfin A, et al. Periosteum Mimetic Coating on Structural Bone Allografts via Electrospray Deposition Enhances Repair and Reconstruction of Segmental Defects. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6:6241–52. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00421.
44. Centers for Disease Control and Prevention. Update: allograft-associated bacterial infections--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51:207–10.
45. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9:18. doi:10.1186/1749-799X-9-18.
46. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med*. 2002;48:142–8.
47. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol*. 2016;8:355–69. doi:10.4329/wjr.v8.i4.355.
48. Sutherland AJ, Beck EC, Dennis SC, Converse GL, Hopkins RA, Berkland CJ, Detamore MS. Decellularized cartilage may be a chondroinductive material for osteochondral tissue engineering. *PLoS One*. 2015;10:e0121966. doi:10.1371/journal.pone.0121966.
49. Gomes KU, Carlini JL, Biron C, Rapoport A, Dedivitis RA. Use of allogeneic bone graft in maxillary reconstruction for installation of dental implants. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:2335–8. doi:10.1016/j.joms.2008.06.006.
50. Malinin T, Temple HT. Comparison of frozen and freeze-dried particulate bone allografts. *Cryobiology*. 2007;55:167–70. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.05.007.
51. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S16-21. doi:10.1016/j.injury.2011.06.199.
52. Nguyen H, Morgan DAF, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Bank*. 2007;8:93–105. doi:10.1007/s10561-006-9020-1.

53. Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied J-P. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials*. 2004;25:2105–10. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.067.
54. Keating JF, McQueen MM. SUBSTITUTES FOR AUTOLOGOUS BONE GRAFT IN ORTHOPAEDIC TRAUMA. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*. 2001;83-B:3–8. doi:10.1302/0301-620X.83B1.0830003.
55. Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S22-5. doi:10.1016/j.injury.2011.06.008.
56. Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44:1251–60. doi:10.1016/j.lwt.2010.11.001.
57. Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnol Adv*. 2010;28:659–72. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.001.
58. Rigaldie Y, Largeteau A, Lemagnen G, Ibalot F, Pardon P, Demazeau G, Grislain L. Effects of high hydrostatic pressure on several sensitive therapeutic molecules and a soft nanodispersed drug delivery system. *Pharm Res*. 2003;20:2036–40. doi:10.1023/B:PHAM.0000008054.80136.5a.
59. Frey B, Janko C, Ebel N, Meister S, Schlücker E, Meyer-Pittroff R, et al. Cells under pressure - treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death. *Curr Med Chem*. 2008;15:2329–36. doi:10.2174/092986708785909166.
60. Le TM, Morimoto N, Ly NTM, Mitsui T, Notodihardjo SC, Munisso MC, et al. Hydrostatic pressure can induce apoptosis of the skin. *Sci Rep*. 2020;10:17594. doi:10.1038/s41598-020-74695-5.
61. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006;17:319–36. doi:10.1007/s00198-005-2035-9.
62. Le BQ, Nurcombe V, Cool SM, van Blitterswijk CA, Boer J de, LaPointe VLS. The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration. *Materials (Basel)* 2017. doi:10.3390/ma11010014.

63. Breda A, Valadares NF, Souza ON de, Garratt RC. Bioinformatics in Tropical Disease Research: A Practical and Case-Study Approach: Chapter A06. Protein Structure, Modelling and Applications 1. Why Is It Important to Study Proteins? 2. Explosion of Biological Sequence and Structure Data; 2006
64. Rodiles-López JO, Arroyo-Maya IJ, Jaramillo-Flores ME, Gutiérrez-López GF, Hernández-Arana A, Barbosa-Cánovas GV, et al. Effects of high hydrostatic pressure on the structure of bovine alpha-lactalbumin. *J Dairy Sci.* 2010;93:1420–8. doi:10.3168/jds.2009-2786.
65. Balny C, Masson P. Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International.* 1993;9:611–28. doi:10.1080/87559129309540980.
66. Pavelka M, Roth J. Funktionelle Ultrastruktur: Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben. Wien: Springer; 2005.
67. Kim IS, Song YM, Lee B, Hwang SJ. Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli. *J Dent Res.* 2012;91:1135–40. doi:10.1177/0022034512465291.
68. Lee J-M, Kim M-G, Byun J-H, Kim G-C, Ro J-H, Hwang D-S, et al. The effect of biomechanical stimulation on osteoblast differentiation of human jaw periosteum-derived stem cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2017;39:7. doi:10.1186/s40902-017-0104-6.
69. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:1544–52. doi:10.2106/00004623-200308000-00017.
70. Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, Vega S de, Kulkarni AB, Iwamoto Y, Yamada Y. Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev Biol.* 2009;332:325–38. doi:10.1016/j.ydbio.2009.06.002.
71. Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF-β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4:16009. doi:10.1038/boneres.2016.9.
72. Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524:702–9. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.136.

73. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci* 2020. doi:10.3390/ijms21207513.
74. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*. 1997;89:309–19. doi:10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
75. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem*. 2001;276:36241–50. doi:10.1074/jbc.M104319200.
76. Distler T, McDonald K, Heid S, Karakaya E, Detsch R, Boccaccini AR. Ionically and Enzymatically Dual Cross-Linked Oxidized Alginate Gelatin Hydrogels with Tunable Stiffness and Degradation Behavior for Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6:3899–914. doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00677.
77. Henkel AG & Co. KGaA. LOCTITE®4011™: Technisches Datenblatt 2022.
78. Brennan M. Fibrin glue. *Blood Reviews*. 1991;5:240–4. doi:10.1016/0268-960X(91)90015-5.
79. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten: Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität, Anhang D 2009.
80. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 1988;48:4827–33.
81. Kämmerer PW, Engel V, Plocksties F, Jonitz-Heincke A, Timmermann D, Engel N, et al. Continuous Electrical Stimulation Affects Initial Growth and Proliferation of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomedicines* 2020. doi:10.3390/biomedicines8110482.
82. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Kunststoffe - Bestimmung der Biegeeigenschaften 2019.
83. Seidel WW, Hahn F. Werkstofftechnik: Werkstoffe - Eigenschaften - Prüfung - Anwendung : mit 389 Bildern sowie zahlreichen Tabellen, Beispielen, Übungen und Testaufgaben. 11th ed. München: Hanser; 2018.

84. Baxter International. TISSEEL 2ml/4ml/10ml: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels; 2018.
85. Henkel AG & Co. KGaA. LOCTITE® 408™: Technisches Datenblatt; 2012.
86. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol* 2020. doi:10.3390/jdb8030019.
87. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11:219–27. doi:10.1007/s11154-010-9153-1.
88. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013;54:258–63. doi:10.1016/j.bone.2012.08.121.
89. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*. 2007;8:107–14. doi:10.1007/s10561-006-9021-0.
90. Block J, Miller LE. Perspectives on the clinical utility of allografts for bone regeneration within osseous defects: a narrative review. *ORR*. 2011:31. doi:10.2147/ORR.S18397.
91. Lorenz M, Drobek C, Schwerdt D, Bader R, Seitz H. Design and 3D-printing of a rinsing chamber for hydrostatic high-pressure treated allogeneic tissues 2021. doi:10.18416/AMMM.2021.2109522.
92. Yeo A, Cheok C, Teoh SH, Zhang ZY, Buser D, Bosshardt DD. Lateral ridge augmentation using a PCL-TCP scaffold in a clinically relevant but challenging micropig model. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:1322–32. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02366.x.
93. Yamashita M, Nevins M, Jones AA, Schoolfield J, Cochran DL. A pilot experimental lateral ridge augmentation study using bone morphogenetic protein 2 in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2010;30:457–69.
94. Song YW, Jung H-J, An Y-Z, Jung U-W, Lee J-S. Addition of autogenous bone chips to deproteinized bovine bone mineral does not have additional benefit in lateral ridge augmentation-A preclinical in vivo experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:1105–14. doi:10.1111/clr.13805.

## 7. Anhang

### 7.1 Ergebnistabellen

| <b>Gruppe</b> | <b><i>n</i></b> | <b>Durchschnitt</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|---------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
| VGL           | 15              | 3,0                 | 1,3                       |
| VGF           | 14              | 1,4                 | 1,0                       |
| KG            | 14              | 8,6                 | 5,2                       |

Tabelle 1: Ergebnisse Biegesteifigkeit [N/mm]

| <b>Gruppe</b> | <b><i>n</i></b> | <b>Durchschnitt</b> | <b>Standardabweichung</b> |
|---------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
| VGL           | 15              | 2,0                 | 1,0                       |
| VGF           | 14              | 0,8                 | 0,5                       |
| KG            | 14              | 6,3                 | 4,6                       |

Tabelle 2: Ergebnisse Biegefestigkeit [N/mm<sup>2</sup>]

| <b>Zeitraum</b> | <b>Fibrinkleber</b> | <b>Loctite® 408</b> | <b>Kontrolle</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 7 Tage          | 1,79                | 1,48                | 0                |
| 14 Tage         | 1,0                 | 1,75                | 0                |
| 21 Tage         | 6,42                | 0                   | 0                |

Tabelle 3: Mittelwert OPG[ng/mg Gesamtprotein]

| <b>Zeitraum</b> | <b>Fibrinkleber</b> | <b>Loctite® 408</b> | <b>Kontrolle</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 7 Tage          | 0,06                | 0,76                | 0,03             |
| 14 Tage         | 0,16                | 0,13                | 0                |
| 21 Tage         | 0                   | 0,03                | 0                |

Tabelle 4: Mittelwert TGF-β [ng/mg Gesamtprotein]

| <b>Zeitraum</b> | <b>Fibrinkleber</b> | <b>Loctite® 408</b> | <b>Kontrolle</b> |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 7 Tage          | 0,24                | 0,31                | 0,07             |
| 14 Tage         | 0,45                | 0,1                 | 0,1              |
| 21 Tage         | 0,11                | 0,09                | 0,05             |

Tabelle 5: Mittelwert BMP-2 [ng/mg Gesamtprotein]

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 314,082554                    | 484,381515                    | 1184,4487                     | 1006,40829                    |
| 14 Tage         | 1,27456063                    | 975,50131                     | 0,28519093                    | 0                             |
| 21 Tage         | 0,00037914                    | 786,880093                    | 0,02503343                    | 436,549065                    |

Tabelle 6: Mittelwerte *OPG* der VGF

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 463,042241                    | 418,765854                    | 657,11406                     | 663,981852                    |
| 14 Tage         | 0,80944222                    | 0,44442134                    | 0,09055888                    | 376,10717                     |
| 21 Tage         | 0,06381326                    | 558,339959                    | 0,00792156                    | 373,509208                    |

Tabelle 7: Mittelwerte *OPG* der VGL

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 26,9086853                    | 14,0743852                    | 0                             | 20,8937566                    |
| 14 Tage         | 1,1974787                     | 9,25350547                    | 2,9896985                     | 0                             |
| 21 Tage         | 0,00800435                    | 2,94853843                    | 0,01155771                    | 8,45614432                    |

Tabelle 8: Mittelwerte *ALP* der VGF

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 5,87667453                    | 9,4152539                     | 0                             | 14,2214829                    |
| 14 Tage         | 0,55671081                    | 0,92338231                    | 0,53588673                    | 16,055548                     |
| 21 Tage         | 0,13212726                    | 1,86606598                    | 0,00482585                    | 6,75052637                    |

Tabelle 9: Mittelwerte *ALP* der VGL

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 1                             | 2,25011697                    | 0                             | 1,1289644                     |
| 14 Tage         | 0,41179551                    | 1,47938751                    | 0,30040901                    | 0                             |
| 21 Tage         | 0,01668852                    | 0,53218509                    | 0,05671995                    | 0                             |

Tabelle 10: Mittelwerte *BGLAP* der VGF

| <b>Zeitraum</b> | <b>Spender 1<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 2<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 3<br/>(n = 12)</b> | <b>Spender 4<br/>(n = 12)</b> |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 7 Tage          | 1,13681697                    | 1,73507737                    | 0                             | 1,55832916                    |
| 14 Tage         | 0,38689125                    | 0,43376934                    | 0,19277635                    | 23,7523771                    |
| 21 Tage         | 0,12158187                    | 0,95594532                    | 0,01379223                    | 0                             |

Tabelle 11: Mittelwerte *BGLAP* der VGL

## 7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 1: Anwendungsbeispiel eines allogenen Knochentransplantats .....      | 5   |
| Abbildung 2: Erste Pressform aus Teflon. ....                                   | 16  |
| Abbildung 3: Herstellungsapparatur aus Aluminium .....                          | 17  |
| Abbildung 4: Aufgebaute Herstellungsapparatur .....                             | 18  |
| Abbildung 5: Kraft-Zeit-Diagramm des verwendeten Pressprotokolls.....           | 19  |
| Abbildung 6: Versuchsaufbau des 3-Punkt-Biegeversuchs .....                     | 25  |
| Abbildung 7: Kraft-Verformungs-Diagramm der 3-Punkt-Biegeversuche. ....         | 25  |
| Abbildung 8: Knochenplatten der VGL, VGF und KG .....                           | 27  |
| Abbildung 9: Ergebnisse der <i>in vitro</i> Zytotoxizitätsprüfung mit MTT ..... | 28  |
| Abbildung 10: Ergebnisse der Genexpression von <i>ALP</i> .....                 | 30  |
| Abbildung 11: Ergebnisse der Genexpression von <i>BGLAP</i> .....               | 30  |
| Abbildung 12: Ergebnisse der Genexpression von <i>OPG</i> .....                 | 31  |
| Abbildung 13: Ergebnisse der Proteinexpression von OPG. ....                    | 32  |
| Abbildung 14: Ergebnisse der Proteinexpression von TGF- $\beta$ .....           | 33  |
| Abbildung 15: Ergebnisse der Proteinexpression von BMP-2 .....                  | 33  |
| Abbildung 16: Ergebnisse der Biegesteifigkeit und Biegefestigkeit .....         | 34  |
| Abbildung 17: Platte der VGL an einem Unterkiefermodell.....                    | 36  |
| Tabelle 1: Ergebnisse Biegesteifigkeit.....                                     | x   |
| Tabelle 2: Ergebnisse Biegefestigkeit.....                                      | x   |
| Tabelle 3: Mittelwert OPG.....                                                  | x   |
| Tabelle 4: Mittelwert TGF- $\beta$ .....                                        | x   |
| Tabelle 5: Mittelwert BMP-2.....                                                | xi  |
| Tabelle 6: Mittelwerte <i>OPG</i> der VGF .....                                 | xi  |
| Tabelle 7: Mittelwerte <i>OPG</i> der VGL .....                                 | xi  |
| Tabelle 8: Mittelwerte <i>ALP</i> der VGF .....                                 | xi  |
| Tabelle 9: Mittelwerte <i>ALP</i> der VGL .....                                 | xii |
| Tabelle 10: Mittelwerte <i>BGLAP</i> der VGF .....                              | xii |
| Tabelle 11: Mittelwerte <i>BGLAP</i> der VGL .....                              | xii |

## 7.3 Thesen

1. Um dentale Implantate zur Befestigung von Zahnersatz sicher im Knochen zu verankern, wird ein ausreichend dimensioniertes knöchernes Lager benötigt.
2. Bei atrophierten Kieferknochen ist eine Knochenaugmentation indiziert, um ein ausreichend großes Implantatlager zu schaffen.
3. Allogener Knochen ist ein geeignetes Augmentationsmaterial, wenngleich durch die etablierten Verfahren zur Prozessierung die mechanischen Eigenschaften des Knochens beeinflusst werden.
4. Durch Prozessierung mit Hydrostatischem Hochdruck (HHD) kann eine effektive Devitalisierung allogener Transplantate erzielt werden, ohne dabei die mechanischen Eigenschaften zu verändern.
5. Die experimentelle Herstellung von granulären, HHD-prozessierten Allografts liefert reproduzierbare Ergebnisse unter Zufügen zweier verschiedener Klebstoffe (Loctite® 408 und Fibrinkleber).
6. Beide Klebstoffe zeigen in *in vivo* Zellversuchen eine gute bis sehr gute Biokompatibilität.
7. Die Allografts beider Versuchsgruppen ermöglichen die Differenzierung von humanen Stammzellen zu Osteblastenvorläufern.
8. Die mit Loctite® 408 hergestellten Allografts erfüllen die mechanischen Anforderungen an Augmentationen in der MKG-Chirurgie.
9. Allografts aus HHD-prozessiertem Knochengranulat stellen eine Alternative zu etablierten, konventionell prozessierten Knochentransplantaten dar.

## 7.4 Danksagung

Allen voran danke ich Herrn **PD Dr. Dr. Michael Dau** für die erneute Möglichkeit der Promotion und stets uneingeschränkte Unterstützung bei Problemen und Fragestellungen innerhalb der Arbeit. Danke, dass du nach meiner ersten Promotion auch meine zweite Promotion betreut hast. Auch wenn ich eine weitere Promotion mit recht hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen kann, freue ich mich auf weitere gemeinsame Forschungsprojekte.

Für vielfältigste Unterstützung bei inhaltlichen Fragestellungen, Hilfe bei Versuchsdurchführung und Statistik danke ich Frau **Dr. Janine Waletzko-Hellwig**. Die Zusammenarbeit mit dir war immer eine Freude und ohne dich wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Ein weiterer Dank geht an **Mario Jackszis** und **Dr. Jan-Oliver Saß**, die mir im Rahmen der mechanischen Versuche mit ihrer Zeit sowie Expertise zur Seite standen.

Für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie in Rostock, sowie die Nutzung der Laboratorien und Ressourcen, danke ich Herrn **Prof. Dr. Dr. Bernhard Frerich**.

Ebenfalls möchte ich Herrn **Prof. Dr. Dipl.-Ing. Rainer Bader** dafür danken, die Versuche im Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie durchführen zu dürfen.

## 7.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferne erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die in der Promotionsschrift angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, 01.02.2025

## 7.6 Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht verfügbar.