

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**Einfluss eines nicht-viralen BMP-2-Gentransfers aus
PDLLA-beschichteten Titanimplantatoberflächen auf
die periimplantäre Knochenheilung – eine
experimentelle Studie am Minischwein**

Dr. Florian Andreas Probst

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. A. Kolk
2. Prof. Dr. H. Deppe

Die Dissertation wurde am 03.11.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.09.2016 angenommen.

Meiner Frau

Monika

und meinen Söhnen

Leopold und Valentin

1	Einleitung	1
1.1	Knochenregeneration und Implantateinheilung	1
1.2	Strategien zur Verbesserung der Osseointegration von Implantaten	5
1.3	Mikro-CT zur Evaluation des periimplantären Knochengewebes	13
2	Problem, Fragestellung und Zielsetzung	17
3	Material und Methoden	19
3.1	In Vitro-Phase	19
3.1.1	Herstellungsverfahren der Beschichtungswirkstoffe	19
3.1.1.1	Formulierung von Copolymer Protected Gene Vectors (COPROGs)	19
3.1.1.2	Rekombinantes humanes BMP-2-Protein (rhBMP-2)	19
3.1.1.3	Triclosan	19
3.1.2	Etablierung der Beschichtungstechnologie	20
3.1.2.1	Materialien	20
3.1.2.2	Herstellung der PDLLA – Lösung	20
3.1.2.3	Herstellung der PDLLA/ COPROG – Beschichtungslösung	20
3.1.2.4	Herstellung der PDLLA/ rhBMP-2 – Beschichtungslösung	21
3.1.2.5	Herstellung der PDLLA/ Triclosan – Beschichtungslösung	21
3.1.2.6	Beschichtungsverfahren	21
3.1.3	Bewertung der Beschichtung hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge und mechanischer Stabilität	24
3.2	In Vivo-Phase: Tiermodell	24
3.2.1	Tierversuchsaufbau und Gruppeneinteilung	24
3.2.2	Tierhaltung und Ernährung	27
3.2.3	Durchführung der Operationen und postoperative Nachsorge	27
3.2.4	Opferung und Präparation der Proben	29
3.2.5	Auswertung – konventionelle radiologische Darstellung	30
3.2.6	Auswertung – Mikro-Computertomographie (μ CT)	30
3.2.6.1	Knochenvolumen	35
3.2.6.2	Knochendichte	36
3.2.6.3	Korrelationen Knochenvolumen mit Knochendichte	37

3.2.7	Auswertung – Histologie und Korrelation zur μ CT	37
3.2.8	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	41
4.1	In Vitro-Phase	41
4.1.1	Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge	41
4.1.2	Mechanische Stabilität der Beschichtung	41
4.2	In Vivo-Phase: Tiermodell	42
4.2.1	Konventionelle radiologische Darstellung	44
4.2.2	μ CT – Darstellung	44
4.2.2.1	Knochenvolumen	44
4.2.2.2	Knochendichte	50
4.2.2.3	Korrelationen Knochenvolumen mit Knochendichte	52
4.2.3	Auswertung – Histologie und Korrelation zur μ CT	53
5	Diskussion	56
5.1	In Vitro-Phase: Biodegradierbare Beschichtung von Titanoberflächen	56
5.2	In Vivo-Phase	60
5.2.1	Diskussion Methodik – Tiermodell	60
5.2.2	Diskussion Methodik – Studiendesign	62
5.2.3	Diskussion Methodik – Mikrocomputertomographie	64
5.2.4	Diskussion Ergebnisse der in Vivo-Phase	71
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis	79
8	Danksagung	99
9	Curriculum vitae	100

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
μCT	Mikrocomputertomographie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
BA	Bone area
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BIC	Bone-implant-contact, Knochen-Implantat-Kontakt
BIV	Bone-implant-volume
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein 7
BS	Bone Surface, Knochenoberfläche
BV	Bone Volume, Knochenvolumen
BV/TV	Bone Volume / Total Volume, Verhältnis von Knochen- zu Totalvolumen
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CaP	Kalziumphosphat
CCD	Charge-coupled Device
ccm	Kubikzentimeter
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
COPROG	Copolymer Protected Gene Vector
CT	Computertomographie
d	Tag(e)
DA	Degree of Anisotropy
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
h	Stunde(n)
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin Eosin

HR	High Resolution
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
i.m.	intramuskulär
IPL	Image Processing Language
IT	Integration Time
i.v.	intravenös
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mikro-CT	Mikrocomputertomografie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MMA	Methylmetacrylat
mmol	Millimol
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P6YE5C	Peptid-Polyethylenglykol-Copolymer
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLLA	Poly (D,L-Laktid)
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
p.o.	per os
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
REM	Rasterelektronenmikroskop
rhBMP	rekombinantes humanes BMP
ROI	Region of Interest
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standard Deviation; Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
Sig.	Statistische Signifikanz
SMI	Structure Model Index
SRμCT	Synchrotron-Mikrocomputertomografie
s.o.	siehe oben
sog.	sogenante(r)(s)
Tb.Th.	Trabecular Thickness

TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TMD	Tissue Mineral Density
TNF	Tumornekrosefaktor
TU	Technische Universität
TV	Totalvolumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
VOI	Volume of Interest
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	REM-Darstellung der Implantatoberfläche nach Pipettieren der Beschichtungslösung PDLLA. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	21
Abb. 2	REM-Darstellung der Implantatoberfläche nach Sprühbeschichtung. <i>Bildmaterial der Fa. Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland.</i>	22
Abb. 3	Vorbereiteter Agarose-Tube. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	23
Abb. 4	Agarose-Pivot-Verfahren. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	23
Abb. 5	Positionierung der Implantat-Längsachse senkrecht zur Grundfläche des Mikro-CT-Probenbehälters. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	29
Abb. 6	Positionierungskontrolle der Implantatachse. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	30
Abb. 7	Schematische Darstellung des VOI 1. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	32
Abb. 8	Schematische Darstellung der drei Volume of Interest: VOI 1,2 und 3. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	32
Abb. 9	2D Schwellenwertadjustierung für VOI 1. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	34
Abb. 10	3D Schwellenwertadjustierung für VOI 1. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	34
Abb. 11	Schwellenwertadjustierung für VOI 2 und VOI 3. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	35
Abb. 12	Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	41
Abb. 13	Mechanische Stabilität der Beschichtung. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	42
Abb. 14	Osseointegration in Abhängigkeit von der therapeutischen Beschichtung. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	43
Abb. 15	Osseointegration in Abhängigkeit von der Implantatinsertionsstelle. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	43
Abb. 16	Konventionelle röntgenologische Darstellung. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	44
Abb. 17	Zielvariable ATT% – Säulendiagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	44
Abb. 18	Beispiele komplett segmentierter 3-dimensionaler μ CT-Darstellungen von Implantat und umgebenden Knochen. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	46
Abb. 19	Zielvariable BV/TV_6-30 – Säulendiagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	47
Abb. 20	Zielvariable BV/TV_55-100 – Säulendiagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	48
Abb. 21	Zielvariable TMD_6-30 – Säulendiagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	50
Abb. 22	Zielvariable TMD_55-100 – Säulendiagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	51
Abb. 23	Korrelation μ CT-Variable ATT% mit Histomorphometrie-Variable BIC. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	54
Abb. 24	Bland-Altman-Diagramm. <i>Eigenes Bildmaterial.</i>	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über alle 12 Versuchsgruppen.	26
Tab. 2	Übersicht über die festgelegten Zielvariablen.	37
Tab. 3	Zielvariable ATT% – Messwerte und Statistik.	45
Tab. 4	Zielvariable BV/TV_6-30 – Messwerte und Statistik.	48
Tab. 5	Zielvariable BV/TV_55-100 – Messwerte und Statistik.	49
Tab. 6	Zielvariable TMD_6-30 – Messwerte und Statistik.	51
Tab. 7	Zielvariable TMD_55-100 – Messwerte und Statistik.	52
Tab. 8	Korrelation der Zielvariablen untereinander – 28 Tage Gruppen.	53
Tab. 9	Korrelation der Zielvariablen untereinander – 56 Tage Gruppen.	53

1 Einleitung

1.1 Knochenregeneration und Implantateinheilung

Die erfolgreiche Einheilung enossal inserierter dentaler Implantate ist als Grundvoraussetzung für den langfristigen Erfolg einer implantat-getragenen prothetischen Rehabilitation anzusehen (Lutz und Neukam 2012). Dabei folgt die knöcherne periimplantäre Regeneration in Analogie zur knöchernen Frakturheilung (Branemark et al. 1986, Schenk und Buser 1998, Davies 2003). Grundsätzlich muss zwischen der fibroossären Einheilung und der Osseointegration unterschieden werden (Watzek et al. 2009). Bei erstgenannter kommt es zur Ausbildung einer bindegewebigen Kontaktzone zwischen Implantat und Knochenlager was letztlich einem Misserfolg hinsichtlich der Einheilung gleichkommt. Bei der Osseointegration dagegen erfolgt die „direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantates“ (Albrektsson et al. 1981, Branemark et al. 1986). Trotz der Analogie zur Frakturheilung muss beachtet werden, dass nicht Knochen mit Knochen sondern Knochen mit der Implantatoberfläche, also einem Fremdmaterial, zur Vereinigung kommt, was bedeutet, dass Implantateigenschaften bei der Osseointegration in besonderer Weise Berücksichtigung finden müssen (Schenk und Buser 1998). Aufgrund der spontanen Passivierung von Titanoberflächen durch eine sich oberflächlich ausbildende Titanoxidschicht gelten Titanimplantate als bioinert und ermöglichen eine Kontaktosteogenese (Kienapfel 1999).

Die knöcherne periimplantäre Regeneration läuft, ähnlich der allgemeinen Wundheilung, in mehreren Stadien ab (Stadelmann et al. 1998). Dies sind die Phase der Hämostase, die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Remodelling Phase. Dabei handelt es sich um koordinierte Prozesse des Körpers bei dem verschiedene Zellen mit spezifischen Oberflächenrezeptoren über Botenstoffe kommunizieren (Terheyden et al. 2012).

Hämostase

Im Rahmen der Implantatinsertion entsteht eine Knochenwunde mit freiliegender Knochenmatrix. Durch die Einblutung aus verletzten Blutgefäßen entsteht eine Art „Implantat-Blut-Interface“ (Begrifflichkeit übersetzt und modifiziert, aus Park und

Davies 2000) und es kommt innerhalb von Sekunden zur Interaktion von Wassermolekülen und Calciumionen mit der Implantatoberfläche. An der Implantatoberfläche folgt die Adsorption von Erythrozyten, Thrombozyten und verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix wie Vitronectin oder Fibronectin (Park und Davies 2000, Sodek et al. 1999) sowie die Ausbildung eines fibrinreichen Blutkoagels (Dimitriou et al. 2005). Dies kann als initiale periimplantäre Matrix verstanden werden (Terheyden et al. 2012). Während die Interaktion der Implantatoberfläche mit Fibrinogen vor allem für die Bildung des Blutkoagels und die Plättchenaktivierung eine Rolle spielt, so nehmen die in hohen Konzentrationen adsorbierten Adhäsivproteine wie Vitronectin oder Fibronectin eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration und der de novo Knochenproduktion an der Implantatoberfläche ein (Wilson et al. 2005). So enthält beispielsweise Fibronectin Bindungsstellen in Form spezifischer Aminosäuresequenzen wie der sogenannten RGD-Sequenz, welche mit Zelladhäsionsproteinen von knochenbildenden Zellen (Integrine) interagieren (Junker et al. 2009, Terheyden et al. 2012).

Inflammatorische Phase

Diese Phase beginnt nach etwa zehn Minuten und dauert einige Tage und ist im Wesentlichen gekennzeichnet durch (1) Dilatation von Gefäßen und eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie durch (2) ein leukozytäres Infiltrat (Stadelmann et al. 1998). Sie beginnt damit, dass Thrombozyten eine ganze Reihe an Wachstumsfaktoren und vasoaktiven Substanzen wie TGF- β , PDGF, bFGF bzw. Serotonin, Bradykinin, Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, und Histamin ausschütten (Lieberman et al. 2002). Die Wachstumsfaktoren nehmen eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Migration und Proliferation unterschiedlicher Zellen ein (Heldin und Westermark 1999, Dereka et al. 2006). Die Degranulation der Thrombozyten initiiert darüber hinaus das Komplementsystem. Eine wichtige Rolle übernehmen einwandernde Zellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, die später zu Makrophagen werden. Sie schützen die Wunde indem sie Bakterien eliminieren und bauen avitales Gewebe und Debris ab. Neutrophile Granulozyten werden im Verlauf durch Makrophagen ersetzt. Über Zytokine wie TGF- β , PDGF, Interleukine und TNF haben Makrophagen eine regulatorische Schlüsselrolle bei der anschließenden Chemotaxis, Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten und der darauffolgenden Kollagensynthese (Stadelmann et al. 1998).

Proliferative Phase

Die proliferative Phase dauert einige Wochen und ist durch Neoangiogenese und die Ausbildung einer neuen extrazellulären Matrix gekennzeichnet (Stadelmann et al. 1998). Wie bereits beschrieben wandern Fibroblasten in die Wunde ein. Über spezielle Zelloberflächenrezeptoren, sogenannte Integrine, können Fibroblasten an Proteinen der zellulären Matrix, wie Fibronectin oder Vitronectin, binden (Friedl & Brocker 2000). Fibroblasten produzieren unterschiedliche Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Glykosaminoglykane und Proteoglykane worauf sich zunächst eine amorphe Grundsubstanz bildet, die später eine wichtige Rolle bei der Ablagerung und Aggregation von Kollagenfasern spielt (Stadelmann et al. 1998, Terheyden et al. 2012).

Parallel zur Aktivierung von Fibroblasten läuft die Neoangiogenese ab (Carano und Filvaroff 2003). Makrophagen können in hypoxisches Gewebe rekrutiert werden und sind in der Lage in einem solchen hypoxischen Milieu VEGF zu exprimieren (Murdoch et al. 2004, Bosco et al. 2008). VEGF ist für die Chemotaxis und Proliferation endothelialer Vorläuferzellen verantwortlich. Im Zusammenspiel mit Perizyten und Metallo-Matrixproteasen bilden sich neue Gefäße aus, die an vorbestehende Gefäße Anschluss finden (Lansdown et al. 2001, Hitchon et al. 2002). Ebenfalls über Integrine verbinden sich Osteoprogenitorzellen, also Knochenvorläuferzellen, mit Proteinen wie beispielsweise Fibronectin, welche an die Titanoxidschicht der Implantatoberfläche haften (Wierzbicka-Patynowski und Schwarzbauer 2003). Die Osteoprogenitorzellen, die sich von mesenchymalen Stammzellen ableiten, differenzieren sich unter der Einwirkung von bone morphogenic proteins (BMPs) zu Osteoblasten (Ferguson et al. 1998). Osteoblasten exprimieren alkalische Phosphatase und Osteocalcin, welche als entsprechende molekulare Marker dienen können. BMPs werden im Rahmen des Traumas bei der Implantation aus der Knochenmatrix nach etwa drei Tagen freigesetzt und aktiviert. Circa eine Woche nach der Implantation beginnt die Osteogenese (Berglundh et al. 2003) und es kommt zur Geflechtknochenbildung, die dadurch charakterisiert ist, dass die Kollagenfasern in zufälliger Anordnung zueinander orientiert sind. Die Osteogenese beginnt mit der Ausbildung von Osteoid, einer noch nicht kalzifizierten Matrix, die zum Großteil aus Kollagen Typ I besteht. Weitere Bestandteile sind andere Proteine wie beispielsweise Proteoglykane, Osteocalcin oder Osteopontin.

Diese Matrix wird schließlich nach und nach durch Hydroxylapatit mineralisiert wodurch sich letztlich Geflechtknochen ausbildet.

Remodelling Phase

Nach einigen Wochen beginnt das Knochenremodelling und führt dazu, dass Geflechtknochen und residualer Knochen in Lamellenknochen umgewandelt wird (Kalfas 2001). Dies geschieht durch funktionelle Anpassung des Knochens und wird über das geordnete Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten durch das RANK/RANKL-System gesteuert (Perez-Sayans et al. 2010). Lamellenknochen ist dabei durch die parallele Anordnung von Kollagenfasern gekennzeichnet (Schenk und Buser 1998). Nach einer gewissen Zeit sind etwa zwei Drittel der Implantatoberfläche von Knochen bedeckt.

Neben der Osseointegration, die zuvor bereits beschrieben wurde, sind die Begriffe Osteokonduktion und Osteoinduktion hinsichtlich der Knochenregeneration bei implantierten Biomaterialien von Bedeutung. Sie spiegeln sich in Teilen der zuvor geschilderten periimplantären Regeneration wider und werden aufgrund ihrer Bedeutung im Folgenden separat erläutert.

Osteoinduktion umschreibt im Wesentlichen Vorgänge, bei denen mesenchymale Stammzellen, beispielsweise durch bone morphogenetic proteins (BMPs), in die osteogene Zelllinie differenziert werden (Urist 1965, Damien und Parsons 1991, Lane et al. 1999).

Osteokonduktion beschreibt die Zellverteilung und Anlagerung von osteogenetischen Zellen z.B. an die Oberfläche von Titanimplantaten bzw. deren Einwandern in und Anhaftung an als Leitschienen fungierende Biomaterialien mit nachfolgender Knochenneubildung (Davies 1998, Damien und Parsons 1991, Cornell und Lane 1998, Lane et al. 1999). Adhäsivproteine wie Fibronectin vermitteln, wie bereits erwähnt, in der proliferativen Phase der Implantateinheilung die Anlagerung von osteogenen Zellen (Potts und Campbell 1994).

Je nach Ort der Anlagerung osteogener Zellen kann bei der knöchernen periimplantären Regeneration zwischen Distanzosteogenese und Kontaktosteogenese unterschieden werden. Während es bei erstgenannter zur

Knochenneubildung vom ortständigen Knochen her in Richtung Implantatoberfläche kommt, ist die Kontaktosteogenese dadurch gekennzeichnet, dass eine primäre Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche stattfindet (Furlong 1991, Davies 2003, Cacaci et al. 2006). Das osteokonduktive Potential ist wesentlich von den Eigenschaften des Implantatmaterials abhängig (Albrektsson und Johansson 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass osteoinduktive und osteokonduktive Prozesse als Voraussetzung für eine erfolgreiche Osseointegration angesehen werden müssen (Kolk 2007). Der Erfolg der Osseointegration wird bei in vivo Untersuchungen in der Regel als Knochen-Implantat-Kontakt, den sogenannten Bone-Implant-Contact (BIC), angegeben und bemisst sich als der prozentuale Anteil der Implantatoberfläche, an dem es zur unmittelbaren Anlagerung von Knochen gekommen ist. Der Knochen-Implantat-Kontakt lässt sich mittels Histomorphometrie oder Mikro-Computertomographie bestimmen, worauf detailliert im Kapitel 1.3 eingegangen wird (Gahlert et al. 2012, Saulacic et al. 2012, Anil et al. 2013, Lee et al. 2014).

1.2 Strategien zur Verbesserung der Osseointegration von Implantaten

In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um die Osseointegration von dentalen Implantaten zu verbessern. Hierfür existieren unterschiedliche Strategien. Im Wesentlichen sind dies Modifikationen der Oberflächentextur oder der physikalisch-chemischen Eigenschaften, welche Veränderungen der osteokonduktiven Eigenschaften hervorrufen, sowie Oberflächenbeschichtungen, welche Veränderungen der osteokonduktiven oder osteoinduktiven Eigenschaften nach sich ziehen können.

Oberflächentextur

Die Beschaffenheit der Titanoberfläche kann einen positiven Einfluss auf das Osseintegrationsverhalten ausüben und mit dem BIC korreliert sein (Buser et al. 1991). So fokussierten in den letzten 20 Jahren zahlreiche Arbeiten auf Modifikationen der Oberflächenrauigkeit, welche aufgrund heterogener Methodiken nicht zufriedenstellend miteinander vergleichbar sind. Aus systematischen Reviews

lässt sich nur bedingt schließen, dass eine Korrelation zwischen Rauigkeit und Knochen-Implantat-Kontakt besteht (Shalabi et al. 2006, Wennerberg et al. 2009). Eine detaillierte Übersicht über die unterschiedlichen Verfahren und Testmodalitäten ist nicht Bestandteil dieser Arbeit und findet sich beispielsweise in einschlägigen Übersichtsartikeln (Shalabi et al. 2006, Esposito et al. 2007 und Wennerberg et al. 2009). In den letzten Jahren hat sich darüber hinaus ein Trend zur nanotopographischen Modifikation von Titanoberflächen, beispielsweise durch elektrochemische Anodisierung, gezeigt (Oh et al. 2006, Sjöström et al. 2009). Nanotubuläre Oberflächen konnten in vitro eine hohe Zelladhäsion- und Zellproliferation hervorrufen (Oh et al. 2006, Popat et al. 2007). In vivo zeigte sich, dass unterschiedliche Parameter der Nanostruktur einen Einfluss auf Zellreaktionen haben können (Park et al. 2009, Brammer et al. 2009).

Chemisch-physikalische Eigenschaften der Implantatoberfläche

Neben der Oberflächentextur bzw. -topographie sind Modifikationen in Bezug auf die chemische Beschaffenheit, die Hydrophilie oder die Oberflächenladungsdichte von Implantatoberflächen mögliche Ansatzpunkte zur Verbesserung des Osseointegrationsverhaltens (Ramazanoglu und Oshida 2001). Dabei ist von Bedeutung, dass durch die Veränderung der Oberflächentextur sekundär chemisch-physikalische Parameter gewünscht oder ungewünscht beeinflusst werden können (Wennerberg und Albrektsson 2009). Modifikationen der Kristallstruktur von Titandioxid beispielsweise zeigen veränderte Auswirkungen auf das Osseointegrationsverhalten (Sul et al. 2001, Sul et al. 2005). Auch die Veränderung der Oberflächenladungsdichte konnte einen Effekt auf die Oberflächeneigenschaften von Implantaten, mit Verbesserung der Osseointegration, erzielen (Nozaki et al. 2014). Hinsichtlich der Hydrophilie von Implantatoberflächen ist davon auszugehen, dass hydrophile Oberflächen einen Vorteil gegenüber hydrophoberen Oberflächen hinsichtlich des Osseointegrationsverhalten aufweisen. In mehreren Tierstudien konnte gezeigt werden, dass hydrophile Oberflächen besser osseointegriert werden, wobei sich dieser Effekt auf die frühe Einheilungsphase zu beziehen scheint (Buser et al. 2004, Ferguson et al. 2006, Schwarz et al. 2007, Bornstein et al. 2008, Schwarz et al. 2010).

Oberflächenbeschichtung

Beschichtungstechnologien spielen eine bedeutende Rolle bei der Beeinflussung der Implantatoberfläche und weisen ein enormes Potential auf. Prinzipiell können Oberflächenbeschichtungen osteokonduktive, osteoinduktive oder beide Eigenschaften (zur Erläuterung der Begrifflichkeiten im Kontext der periimplantären Knochenregeneration siehe oben) aufweisen.

Eine schon länger etablierte Methode stellen Calciumphosphat-Beschichtungen dar (Wong et al. 1995). Dabei wurden verschiedene Technologien zur Beschichtung beschrieben (Junker et al. 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass Adhäsivproteine, Osteoblasten und Vorläuferzellen besser an Hydroxylapatit haften als an Titanoberflächen (Kilpadi et al. 2001). Um eine „biomimetische Beschichtung“ (Junker et al. 2010, Ramazanoglu und Oshida et al. 2011) zu erlangen ist es möglich eine Art Gitterstruktur aus Hydroxylapatit auf der Titanoberfläche auszubilden (Liu et al. 2004). Somit wird am Implantat die natürliche knöcherne Umgebung dadurch imitiert, dass ein wesentlicher struktureller Bestandteil dieser Umgebung, in Form von Hydroxylapatit, am Implantat immobilisiert wird (Beutner et al. 2010).

Biomimetischen Beschichtungen gegenüberzustellen sind „biomolekulare Beschichtungen“ (Junker et al. 2010, Ramazanoglu und Oshida et al. 2011). Hier besteht die Strategie darin, dass natürlich vorkommende bioaktive Moleküle an der Implantatoberfläche immobilisiert werden (Beutner et al. 2010). Dafür existieren unterschiedlichste Möglichkeiten wie die kovalente Bindung bioaktiver Moleküle (Bagno et al. 2007), selbstassemblierende Monolayer (Heijink et al. 2008), physikalische Adsorptionsmechanismen (Wikesjö et al. 2008) oder elektrochemische Methoden (Beutner et al. 2010).

Ein gut untersuchter Ansatz ist die Immobilisierung einer Sequenz aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure, die RGD-Sequenz. Wie bereits in Kapitel 1.1. beschrieben ist die RGD-Sequenz Bestandteil von Adhäsivproteinen wie Fibronectin und nimmt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Osteoblasten ein. Die RGD-Sequenz wird kovalent an Titan gebunden (Bagno et al. 2007) und kann die Anheftung von Osteoblasten verbessern (Schuler et al. 2006). In vivo- Studien konnten jedoch nicht einheitlich belegen, dass hierdurch eine Verbesserung der Osseointegration erreicht werden kann (Broggini et al. 2011, Bell et al. 2011).

Neben der Immobilisierung besteht auch die Möglichkeit bioaktive Substanzen, insbesondere Signalmoleküle wie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, derart in eine Beschichtung einzubauen, dass diese möglichst kontrolliert freigesetzt werden und somit eine osteoinduktive Wirkung auf die periimplantäre Umgebung entfalten. Die wichtigste Gruppe hinsichtlich der knöchernen Regeneration innerhalb der Gruppe der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind bone morphogenetic proteins (BMPs). Die Erstbeschreibung dieser typischerweise osteoinduktiv wirkenden Proteine erfolgte durch Urist 1965 (Urist 1965, Damien und Parsons 1991, Lane et al. 1999). BMPs werden der TGF- β Superfamilie zugerechnet (Rosen und Thies 1992, Thies et al. 1992, Reddi 1995) und haben das Potential Knochenwachstum sowohl in knöchernen Defekten als auch ektop, d.h. extraskelettal, zu stimulieren (Teixeira und Urist 1998, Yamazaki et al. 1996; Yoshida et al. 1998, Zellin & Linde 1997). Neben der osteoinduktiven Wirkung haben BMPs eine chemotaktische Wirkung für mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum (Abe et al. 2000). Außerdem haben BMPs proliferative und chemotaktische Wirkungen auf Osteoklasten (Chen et al. 2004, Cowan et al. 2005). Hinsichtlich einer ausführlichen Beschreibung der Charakteristika von BMPs sei u.a. auf die Habilitationsschrift des Arbeitsgruppenleiters A. Kolk verweisen (Kolk 2007).

Es folgt im Weiteren die Darstellung einer Auswahl relevanter Tierstudien, welche die Wirkung von BMPs auf die periimplantäre Heilung untersuchen. In einem periimplantären Defektmodell am Hund konnte eine Knochenneubildung mit Osseointegration und vertikaler Knochenformation, bei Implantaten die mit rekombinantem humanem bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) unterschiedlicher Konzentrationen (0,75, 1,5 bzw. 3 mg/ml) beschichtet waren, nachgewiesen werden (Wikesjö et al. 2008). Interessanterweise war das Potential zur vertikalen Knochenneubildung bei den beschichteten Implantaten im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe höher, der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) jedoch in der Kontrollgruppe am höchsten. Die Gruppe mit der höchsten BMP-2 Konzentration (3 mg/ml) ging mit unerwünschten Effekten, wie der verstärkten Bildung unreifen trabekulären Knochens und einer höheren Rate an postoperativen Seromen, einher. Sowohl in einem murinen Tiermodell (Freilich et al. 2008) als auch in einem Hundemodell (Huh et al. 2011) ließ sich ein vertikaler Knochenzuwachs um Titanimplantate, die mit BMP-2 beschichtet waren, nachweisen. Im Hundemodell zeigten mit Kollagen I, Chondroitinsulfat und BMP-2 beschichtete Implantate keine

bessere Osseointegration, gemessen als Knochen-Implantat-Kontakt, als lediglich mit Kollagen I beschichtet Implantate (Schliephake et al. 2005). Liu et al. (2007a) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Freisetzungskinetiken von BMP-2 auf die Osteokonduktivität am Oberkiefer von Mischweinen. Es wurden Implantate verglichen, die a) unbeschichtet, b) direkt mit BMP-2 an der Titanoberfläche beschichtet c) mit Kalziumphosphat (CaP) beschichtet, d) mit an CaP absorbiertem BMP-2 beschichtet waren sowie Implantate, bei denen e) BMP-2 in die CaP-Beschichtung integriert wurde und f) Implantate bei denen sowohl BMP-2 an die CaP-Beschichtung absorbiert als auch in die CaP-Beschichtung integriert wurde. Die Evaluation der Osteokonduktivität erfolgt dabei sowohl durch die Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes als auch des Knochenvolumens in einem Bereich, der sich senkrecht von der Implantatoberfläche ausgehend bis zu 175 µm davon befand. Es zeigte sich, dass die Osteokonduktivität deutlich verringert war, wenn BMP-2 durch ein oberflächliches Depot aus der CaP-Beschichtung oder direkt von einer Titanoberfläche aus freigesetzt wurde. Die zu ruckartige Freisetzung, der sogenannte „burst release“, von BMPs führte zu einer unvorteilhaften zu hohen lokalen Wirkstoffkonzentration. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte in einem ähnlichen Modell den Einfluss von BMP-2 und unterschiedlicher Freisetzungskinetiken auf die Osteoinduktivität (Hunziker et al. 2012). Im Gegensatz zur Evaluation der Osteokonduktivität wurde die Osteoinduktivität in einem Bereich beginnend bei 175 µm und endend bei 375 µm senkrecht von der Implantatoberfläche aus gemessen. Die Ergebnisse lassen wie in der Vorstudie (Liu et al. 2007a) den großen Einfluss der Freisetzungskinetik auf die periimplantäre Knochenregeneration erkennen. Dabei bestätigte sich der Vorteil einer kontinuierlichen Freisetzung aus einem dreidimensionalen Reservoir in Form einer CaP-Beschichtung in welches BMP-2 integriert wurde. Darüber hinaus wird darauf hingewiesen, dass eine gewisse Feinabstimmung hinsichtlich der Wirkstoffkonzentration als notwendig erachtet wird, um eine optimale Balance zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption zu erreichen. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die proliferativen und chemotaktischen Wirkungen von BMPs auf Osteoklasten hingewiesen (Chen et al. 2004, Cowan et al. 2005).

In einem Schaaf-Modell zeigte sich ebenfalls, dass eine Testgruppe, bei der BMP-2 an einer CaP-Beschichtung absorbiert wurde, einen höheren Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) aufwies als eine Gruppe bei der das BMP-2 direkt auf der

Titanoberfläche absorbiert wurde (Yoo et al. 2014). Während in einer Tierstudie am Unterkiefer von Minischweinen (Stadlinger et al. 2008) BMP-4 beschichtete Implantate im Vergleich zu Kontrollen keinen positiven Einfluss auf den Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) hatten, zeigten Becker et al. 2006 einen Vorteil von BMP-2 Beschichtungen auf den BIC am Unterkiefer von Hunden. Kombinationsbeschichtungen aus Kollagen, Hydroxylapatit und BMP-2 zeigten in einem Tiermodell an der Tibia von Hasen einen nachteiligen Effekt auf die Osseointegration im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit einer Beschichtung, die lediglich aus Kollagen, Hydroxylapatit bestand (Lee et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass bioaktive Beschichtungen mit BMPs nicht generell zu einer Verbesserung der Osseointegration führen (Schliephake et al. 2005; Liu et al. 2007a; Stadlinger et al. 2008; Wikesjo et al. 2008, Lee et al. 2014). Der wesentliche Einflussfaktor auf die periimplantäre Reaktion scheint dabei die Höhe der lokalen Wirkstoffkonzentration im zeitlichen Verlauf zu sein (Liu et al. 2007a, Liu et al. 2007b, Hunziker et al. 2012, Yoo et al. 2014).

Ein vielversprechender Lösungsansatz um BMPs kontinuierlich über einen größeren Zeitraum im Bereich einer Implantatoberfläche freizusetzen, könnte die Etablierung von Gentransfer-Systemen sein. Dabei werden Implantate mit einem Vektor, welcher als Träger für BMP-2 kodierende DNA fungiert, beschichtet. Durch Transfektion von Zielzellen in der periimplantären Umgebung und Integration der DNA in deren Genom kann BMP-2 durch diese Zellen exprimiert werden.

Es liegen bisher nur wenige Arbeiten vor, welche die Wirkung von für BMP-2 kodierende Genvektoren auf die periimplantären Heilungsvorgänge untersuchen. Erste Studien bedienten sich eines kombinierten Implantatdefektmodells, bei dem a) der apikale Teil der Implantatwindung im ortsständigen Knochen konventionell inseriert wird und somit Primärstabilität erreicht werden kann und b) der koronale Teil der Implantatwindung von einem zirkulären Defektbereich umgeben ist, in welchen der Genvektor mit entsprechender Matrix eingebracht wird (Thorwarth et al. 2004, Dunn et al. 2005, Lutz et al. 2008). In einer Pilotstudie an Schweinen wiesen Thorwarth et al. 2004 die Wirksamkeit einer BMP-2-DNA-haltigen liposomalen Genvektorformulierung auf die Regeneration periimplantärer Defekte nach. Neben der Einbringung des Vektors mit einer Kollagenmatrix in den Defektbereich wurde ein zweiter Therapiearm etabliert, bei welchem die Implantatoberflächen direkt mit der Vektorformulierung beschichtet wurden. Es zeigte sich eine erhöhte BMP-2-Aktivität

am Knochen-Implantat-Interface und eine kontinuierliche Freisetzung von BMP-2 im Bereich der Implantatoberfläche.

In einem kombinierten Implantat-Defektmodell an Ratten zeigte sich für einen adenoviralen Gentransfer von BMP-7 eine anhaltende Genexpression über 10 Tage (Dunn et al. 2005). Eine knöcherne Regeneration im Bereich des periimplantären Defektes mit Knochenneubildung koronal und an der Implantatoberfläche ließ sich dabei nachweisen.

Ebenfalls einen positiven Effekt auf die periimplantäre Knochenregeneration, sowohl hinsichtlich der Mineralisationsrate als auch des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC), bestätigte sich in einem kombinierten Implantat-Defektmodell an Schweinen mit einem liposomalen Gentransfer für BMP-2 (Lutz et al. 2008).

Kürzlich wurde eine neuartige Technik zur Anheftung eines adenoviralen Gentransfersystems für BMP-7 an Titanimplantate beschrieben (Chen et al. 2013). Die adenovirale Genformulierung wurde über hexon-spezifische Antikörper in einem Kollagen-Avidin-Gel an eine Titanoberfläche angeheftet. In vitro ließ sich die Adhärenz des Genvektorsystems, eine Genexpression durch Osteoblasten sowie eine erhöhte ALP-Aktivität von Osteoblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Genformulierung nachweisen.

Zwei weitere aktuelle Studien nutzen die Technik eines nicht-viralen Gensystems bei dem auf Implantatoberflächen in einem „Layer-by-Layer“ Verfahren schichtweise abwechselnd ein kationischer Lipid-Plasmid-Komplex sowie anionische Hyaluronidase aufgebracht wurden (He et al. 2013, Jiang et al. 2013). Bei beiden Studienmodellen wurden die Implantate, im Gegensatz zu den bereits erwähnten Defektmodellen, vollständig knöchern inseriert. Als Zielvariablen wurden sowohl BIC als auch das Knochenvolumen zum Totalvolumen einer definierten ROI in der Umgebung des Implantates („Bone area“, „BA“) ausgewertet. Bei beiden Studien (He et al. 2013, Jiang et al. 2013) konnte jedoch hinsichtlich des BIC kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Plasmid-Testgruppen und den Kontrollgruppen gezeigt werden. Bei Jiang et al. 2013 zeichnete sich tendenziell sogar ab, dass bei den unbeschichteten Kontrollgruppen das BIC höher ausfiel als in den Plasmid-Testgruppen. Für die „Bone Area“ zeigte sich lediglich in der Auswertung nach 4 Wochen ein statistisch signifikant höherer Wert in der Plasmid-Testgruppe verglichen mit der unbeschichteten Kontrollgruppe (Jiang et al. 2013). He et al. (2013) verzeichneten nicht nur hinsichtlich des BIC sondern auch in Bezug auf

die „Bone Area“ keinen signifikanten Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe.

Durch in vitro- und in vivo- Vorarbeiten der Arbeitsgruppe A. Kolk der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München wurde bereits ein mit metallischen Oberflächen fest verbundener, biodegradierbarer Medikamententräger für den lokal begrenzten, nicht-viralen Gentransfer etabliert und validiert (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011, Schulze 2011). Als gentechnische Basis diente hierfür der bereits durch C. Plank und Mitarbeiter im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München entwickelte nicht-virale, geschützte Genvektor COPROG (Kolk 2007, Kolk et al. 2011).

In vitro wurde der Genvektor COPROG mit den verschiedenen Plasmiden „mittels eines schonenden Homogenisationsverfahrens stabil in PDLLA auf Titanoberflächen integriert“ (Kolk 2007). Nach erfolgreich nachgewiesener Transfektion wurde die DNA-Freisetzungskinetik aus PDLLA sowie deren Toxizität und Einfluss auf die Zellproliferationsrate überprüft. Zusätzlich wurde die effektivste therapeutische Dosis durch Anwendung unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse des Genvektors zur PDLLA-Trägersubstanz ermittelt. Es zeigte sich in vitro eine Expressionsabhängigkeit von der COPROGs/PDLLA-Konzentration mit den besten Ergebnissen hinsichtlich Komplexstabilität und Expression bei einem Verhältnis von 0,4 % (w/w) $\text{COPROG}_{\text{DNA}}/\text{PDLLA}$. Die Freisetzung der COPROGs erfolgte kontinuierlich, wobei die Freisetzungskinetik von der Intensität der PDLLA-Beschichtung abhing. Die Zelltoxizität erwies sich bis zu einer bestimmten COPROG-Konzentration als sehr gering (Kolk 2007).

Nach Optimierung des Konzentrationsverhältnisses $\text{COPROG}_{\text{DNA}}/\text{PDLLA}$ in vitro wurde der therapeutische Effekt in vivo durch die Implantation plasmid-beschichteter Titanfolien über Critical size Defekten der Unterkieferregion bei Ratten validiert. Als Kontrolle fungierten Gruppen mit Titanimplantaten, auf deren Oberfläche natives PDLLA, PDLLA mit integriertem rhBMP-2 Protein oder der Vektor mit Reportergenen aufgetragen wurde. Sowohl histomorphometrisch als auch mikrocomputertomographisch ließ sich eine gegenüber den nativen Kontrollgruppen signifikant gesteigerte und im zeitlichen Verlauf kontinuierliche Zunahme der Durchbauung der Critical size Defekte nachweisen. Jedoch führten hohe DNA-Konzentrationen zu einer geringeren Knochenneubildung, was möglicherweise auf toxische Nebeneffekte zurückzuführen war. Änderungen der Polymer- und Genvektorkonzentrationen

beeinflussten die Genexpressionen sowie die metabolische Aktivität transfizierter Zellen. Tierexperimentell wurde in den Plasmidgruppen ein gegenüber der Kontrollgruppe verstärkter osteoinduktiver Effekt nachgewiesen, während die durch das rekombinante Protein geförderte Knochenneubildung signifikant stärker als in den Plasmidgruppen, jedoch unkontrolliert sowie nicht beschleunigt erfolgte (Kolk 2007).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der nicht-virale Gentransfer von BMP-2 aus einer biodegradierbar beschichteten Titanoberfläche erfolgreich in vitro und in vivo etabliert werden konnte. Dabei schützen COPROGs wie auch PDLLA-Oberflächen den Vektor im Vergleich zu konventionellen Genvektoren vor proteinbedingter Destabilisierung wie auch vor zu schneller Deaktivierung durch kontinuierliche Freisetzung aus der Metalloberfläche (Kolk 2007, Kolk et al. 2011). Auf detaillierte Grundlagen zu gentherapeutischen Optionen für die Knochenregeneration, die genaue Methodik und detaillierte Ergebnisse mitsamt Diskussion sei abermals auf die Habilitationsschrift des Arbeitsgruppenleiters A. Kolk verweisen (Kolk 2007).

1.3 Mikro-CT zur Evaluation des periimplantären Knochengewebes

Es existieren verschiedene klinische und radiologische Methoden zur Evaluierung der Osseointegration von Implantaten (Papaspolidakos et al. 2012). Die Begrifflichkeit Osseointegration beschreibt dabei einen auf mikroskopischer Ebene nachweisbaren direkten Kontakt zwischen einem Implantat und Knochen, welcher Knochen-Implantat-Kontakt, im Englischen Bone-Implant-Contact (BIC) genannt wird. Auf der Basis der Säge-Schliff-Technik nach Donath und Breuner (1982), welche die Herstellung von 20-30 µm messenden Dünnschliffen durch Knochen und Implantate erlaubt, haben sich histomorphometrische Methoden zur Bestimmung des BIC als Standardverfahren im Rahmen wissenschaftlicher Studien etabliert (Bernhardt et al. 2012, von Wilmsky et al. 2014).

Histomorphometrische Verfahren sind destruktive Verfahren, bei denen in der Regel maximal drei bis vier Schnitte entlang der Implantatachse angefertigt werden können. Somit kann nur ein Teil des periimplantären Knochengewebes ausgewertet werden. Demgegenüber ist es mit radiologischen Verfahren prinzipiell möglich nicht-destruktiv eine Aussage zur Osseointegration in der gesamten Umgebung des Implantates zu

gewinnen. Ein hierzu geeignetes Verfahren ist die Mikrocomputertomografie (abgekürzt Mikro-CT oder μ CT), ein hochauflösendes dreidimensionales röntgenologisches Verfahren, mit dem die Mikrostruktur des Knochens untersucht werden kann. Nach der erstmaligen Beschreibung von Feldkamp et al. 1989 konnte in weiteren Studien eine hohe Korrelation zur konventionellen Histomorphometrie des Knochens gezeigt werden (Kuhn et al. 1990, Uchiyama et al. 1997, Müller et al. 1998, Bissinger 2011). Bald darauf wurde die Mikrocomputertomografie auch zur Beurteilung der periimplantären Knochensituation herangezogen (Van Oossterwyck et al. 2000, Rebaudi et al. 2004, Akca et al. 2005, Park et al. 2005, Stoppie et al. 2005, Butz et al. 2006, Stadlinger et al. 2007). Zur Validierung von Mikro-CT-Befunden können konventionelle histologische Schnitte mit den korrespondierenden Schichten des Mikro-CT verglichen werden. Dabei zeigten sich hinsichtlich der Beurteilung der periimplantären Knochensituation teils gute Korrelationen zwischen den beiden Methoden (Park et al. 2005, Stoppie et al. 2005, Butz et al. 2006). Eine bedeutende Einschränkung von Mikro-CT Verfahren bezieht sich auf die Beurteilung des unmittelbaren Implantat-Knochen-Interface und ist durch Metallartefakte im direkten periimplantären Bereich, in den ersten 50 μ m radialwärts von der Titanoberfläche aus gerechnet, bedingt (Stoppie et al. 2005, Butz et al. 2006, Schouten et al. 2009, Song et al. 2013). Diese Metallartefakte entstehen aus einer Kombination verschiedener radiologischer Effekte wie Aufhärungsartefakte, Streuartefakte, Rauschartefakte oder Partialvolumeneffekte (Kachelrieß 1998, Suetens 2002, Gupta et al. 2015).

Modifikationen der Mikro-CT Technik mit Optimierung von Auflösung, Schwellenwertsetzung, den Einsatz von Filtern oder die Verwendung von Synchrotron-Strahlung basierten Mikro-CT Geräten konnten bis zu einem gewissen Grad zur Reduktion der Artefakte beitragen (Van Oossterwyck et al. 2000, Stoppie et al. 2005, Bernhardt et al. 2012). Da trotz der genannten Bemühungen zur Artefaktreduktion weiterhin ein kleiner nicht bzw. eingeschränkt valide beurteilbarer, direkt an die Titanoberfläche angrenzender Bereich verbleibt, ist es üblich diesen Bereich, der je nach Studie zwischen 0-18 μ m bis 0-60 μ m senkrecht von Implantatoberfläche aus gewählt wird, bei der Beurteilung insbesondere des Knochen-Implantat-Kontaktes auszuschließen (Rebaudi et al. 2004, Dayer et al. 2007, Cha et al. 2009, Maimoun et al. 2010, Butz et al. 2011, Walker et al. 2012, Bernhardt et al. 2012, Stadlinger et al. 2013, Li, X. et al. 2014). Als Knochen-

Implantat-Kontakt (BIC) wird dabei beispielsweise das Verhältnis der Knochenvoxel zu den Gesamtvoxel, welche sich in direktem Kontakt mit dem Implantat befinden, definiert (Gabet et al. 2006, Gao et al. 2009, Li, Y.F. et al. 2013, Li, J.P. et al. 2014). Alternativ wird der Knochen-Implantat-Kontakt als Verhältnis der an der Implantatoberfläche als Knochen detektieren Voxel zu den Voxel welche die Implantatoberfläche repräsentieren, angegeben (Rebaudi et al. 2004, Dayer et al. 2007, Maimoun et al 2010, Qi et al. 2012, Stadlinger et al. 2013, Li, X. et al. 2014). Häufig wird der Knochen-Implantat-Kontakt nur in einem 1 Voxel breiten Band um die Implantatoberfläche herum gemessen (Dayer et al. 2007, Maimoun et al 2010, Bernhardt et al. 2012, Stadlinger et al. 2013). Kritiker verweisen darauf, dass genau der Bereich, in dem der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) zu messen ist, ausgeblendet wird und damit eine BIC-Bestimmung im eigentlichen Sinne, wie sie bei der konventionellen Histomorphometrie durchgeführt wird, nur eingeschränkt möglich ist (Liu et al. 2012, von Wilmowsky et al. 2014). Dennoch zeigten sich in etlichen Studien nicht nur hinsichtlich der Werte für das Verhältnis von Knochen- zu Totalvolumen (Bone Volume / Total Volume, BV/TV) sondern auch hinsichtlich der BIC-Werte hohe Korrelationen zwischen Histomorphometrie und Mikro-CT (u.a. Stoppie et al. 2005, Park et al. 2005, Butz et al. 2006, Li, Y.F. et al. 2013, Stadlinger et al. 2013, Vandeweghe et al. 2013). Ebenso sind signifikante Korrelationen zwischen mittels Mikro-CT gemessenen BIC- und BV/TV-Werten und biomechanischen Parametern belegt (Akca et al. 2005, Gabet et al. 2006, Gao et al. 2009, Hsu et al. 2013, Li, Y.F. et al. 2013, Stadlinger et al. 2013). Eine methodische Variante zur BIC Bestimmung mittels Mikro-CT ist es, statt in einem 1 Voxel breitem periimplantären Bereich als VOI, in einem radialwärts 3 Voxel breitem Bereich das Verhältnis von Knochen- zu Totalvolumen (Bone Volume / Total Volume, BV/TV) zu messen (Butz et al. 2011, Walker et al. 2012). Dieses Vorgehen ermöglicht es, eine Auswertung relativ nahe an der Implantatoberfläche durchzuführen und zudem ein repräsentativeres VOI zur Auswertung heranzuziehen. Der auf diese Weise ermittelte Parameter, der einer Volumenbestimmung entspricht, wird beispielsweise als Knochen-Implantat-Volumen (bone-implant-volume, BIV) bezeichnet (Bernhardt et al. 2012) und gibt eine Information über die Dichte des neu formierten periimplantären Knochens. Das BIV eignet sich insbesondere bei der Auswertung des Einflusses von bioaktiven Implantatbeschichtungen mit Wachstumsfaktoren auf die periimplantäre Knochenneubildung (Bernhardt et al. 2012).

Bezüglich der Bestimmung von volumenunabhängigen Strukturparametern, welche die Beschreibung und Quantifizierung der Mikroarchitektur des Knochens ermöglichen, scheint die Mikro-CT Untersuchung gegenüber histomorphometrischen Verfahren überlegen zu sein, da trabekuläre Strukturen dreidimensional erfasst werden und Parameter der Mikroarchitektur des Knochens wie trabecular thickness (Tb.Th.), degree of anisotropy (DA), bone surface (BS) oder structure model index (SMI) mit entsprechender Software vollautomatisch quantifiziert werden können (Cooper et al. 2004, Chappard et al. 2005, Bissinger 2011, von Wilmowsky et al. 2014).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Mikro-CT trotz der erwähnten Einschränkungen mittlerweile routinemäßig zur wissenschaftlichen Auswertung der Osseointegration von Implantaten ex vivo eingesetzt wird. Häufig erfolgen jedoch parallel histologische Untersuchungen, da bei diesen im unmittelbaren Knochen-Implantat-Interface keine strahlungsbedingten Metallartefakte induziert werden, ebenfalls nicht mineralisierte Knochenvorstufen detektiert werden können und immunhistologische Verfahren durchführbar sind (von Wilmowsky et al. 2014). Dabei bleibt zu beachten, dass histologische Verfahren nicht die komplette periimplantäre Situation wiedergeben und auch hier prinzipiell verfahrensabhängig Artefakte möglich sind (Bernhardt et al. 2012).

2 Problem, Fragestellung und Zielsetzung

Die Insertion enossaler Titanimplantate, im Rahmen der kaufunktionellen implantatgetragenen Rehabilitation, kann mittlerweile als Routineverfahren in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie angesehen werden. Langzeiterfolgsraten von weit über 90% konnten dabei in retrospektiven und prospektiven klinischen Multizenter-Studien nachgewiesen werden (Henry et al. 1996, Jemt et al. 1996, Bianco et al. 2000).

Trotzdem gibt es eine Reihe an klinischen Konstellationen, bei denen nachgewiesene oder diskutierte Risikofaktoren bezüglich der erfolgreichen Einheilung von Implantaten auftreten. Dies betrifft im Wesentlichen Patienten mit Radiatio im Kieferbereich, systemischer Einnahme von Bisphosphonaten, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus sowie Patienten mit Nikotinabusus oder Patienten mit Parodontalerkrankungen (Baig und Rajan et al. 2007, Safii et al. 2010, Katyayan et al. 2013, Liddelow und Klineberg 2011, Chadha et al. 2013, Chambrone et al. 2013). Dabei können komplikationsbehaftete Osseointegrationsprozesse zum frühzeitigen oder langfristigen Implantatverlust führen, was mit erheblichen negativen medizinischen und wirtschaftlichen Folgen assoziiert sein kann.

Um eine erfolgreiche Einheilung enossaler Implantate auch bei den vorgenannten schwierigen Situationen vorhersehbar zu gewährleisten, sind eine Vielzahl an Lösungsstrategien denkbar, welche im Wesentlichen Modifikationen der Implantatoberfläche beinhalten (siehe Kapitel 1.2). Ein möglicher Ansatz besteht dabei in der Anwendung von Mediatoren der Knochenregeneration, allen voran den „bone morphogenetic proteins“ (BMPs). Hierbei ergeben sich jedoch nach wie vor Probleme hinsichtlich ungünstiger Freisetzungskinetiken oder kurzer Halbwertszeiten der Proteine (Sellers et al. 2000).

Denkbar ist, eine kontrollierte und konstante periimplantäre Wirkstoffkonzentration von BMPs durch einen gentherapeutischen Ansatz zu erreichen. Dabei soll beispielsweise für BMP-2 kodierende DNA lokale Zellen zur Produktion und Ausschüttung von BMP-2 anregen und somit, statt für einen einmaligen hochdosierten Proteinlevel, für eine stetige Proteinkonzentration am gewünschten Wirkort sorgen (Baltzer und Lieberman 2004).

Durch in vitro- und in vivo- Vorarbeiten der Arbeitsgruppe A. Kolk der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München wurde bereits ein mit metallischen Oberflächen fest verbundener, biodegradierbarer Medikamententräger für den lokal begrenzten, nicht-viralen Gentransfer etabliert und validiert (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011, Schulze 2011). Als gentechnische Basis diente hierfür der bereits durch C. Plank und Mitarbeiter im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München entwickelte nicht-virale, geschützte Genvektor COPROG (Kolk 2007, Kolk et al. 2011).

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, in vivo zu zeigen welchen Einfluss dentale Implantate, die mit dem in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kolk etablierten nicht-viralen, geschützten und für BMP-2 kodierenden Genvektor COPROG in Kombination mit der Trägersubstanz PDLLA beschichtet waren, auf die Implantateinheilung haben.

Folgende Aufgaben und Fragestellungen wurden im Einzelnen bearbeitet:

- Etablierung einer Methodik zur Beschichtung humaner Titanimplantate mit der Arzneimittelträgersubstanz PDLLA in Kombination mit dem Genvektor COPROG
- Bewertung der Beschichtungsmethodik hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge und mechanischer Stabilität
- Etablierung eines geeigneten Tiermodells
- Beurteilung des periimplantären Knochengewebes mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) nach Etablierung eines entsprechend geeigneten radiologischen Algorithmus und Vergleich mit einem histomorphometrischen Verfahren zur Validierung
- Beurteilung des Einflusses einer Implantatbeschichtung bestehend aus dem nicht-viralen, geschützten und für BMP-2 kodierenden Genvektor COPROG, in Kombination mit der Trägersubstanz PDLLA auf die Implantateinheilung

3 Material und Methoden

3.1 In Vitro-Phase

Vor Beginn der in Vivo-Phase war es das wesentliche Ziel eine homogene, voraussehbar abriebstabile Beschichtung der Implantate mit den jeweiligen Wirkstoffen bzw. Wirkstoffträgern zu etablieren. Entsprechende Reagenzien und Test Kits sowie die Herstellung des Genvektors und die Beschichtungstechnologie werden im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Herstellungsverfahren der Beschichtungswirkstoffe

3.1.1.1 Formulierung von Copolymer Protected Gene Vectors (COPROGs)

Als Genvektor diente der nicht-virale, geschützte und für BMP-2 kodierende Genvektor COPROG (Copolymer Protected Gene Vector). Die Formulierung erfolgte analog zur den Vorarbeiten von Kolk 2007, Drechsler 2010 und Schulze 2011. Zusammengefasst erfolgte die Vereinigung negativ geladener Plasmid-DNA (pDNA) mit dem Polykation Polyethylenimin (PEI) zu kompakten Partikeln, welche anschließend durch das Hüllpolymer P6YE5C (protective copolymer, PROCOP) ummantelt wurden. Sowohl hinsichtlich der Evaluation der Transfektionseffizienz und des Expressionsverhaltens von BMP-2, als auch der Bewertung der Biokompatibilität und des Proliferationsverhaltens sei auf die Arbeiten von Kolk (2007), Drechsler (2010) und Schulze (2011) verwiesen.

3.1.1.2 Rekombinantes humanes BMP-2-Protein (rhBMP-2)

Das rekombinante humane BMP-2-Protein (rhBMP-2) wurde vom DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg (Prof. Dr. Walter Sebald) bezogen.

3.1.1.3 Triclosan

Der Wirkstoff Triclosan wurde in lyophilisierter Form aus der Apotheke des Klinikums rechts der Isar bezogen und kam in fünfprozentiger Konzentration, in Bezug auf die PDLLA-Menge, zur Anwendung.

3.1.2 Etablierung der Beschichtungstechnologie

3.1.2.1 Materialien

Als Beschichtungsgrundlage und Arzneimittelträger wurde das unter dem Handelsnamen Resomer® R 203 (Fa. Boehringer Ingelheim AG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) vertriebene synthetische Polymer Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) mit einem Molekulargewicht von 30000 Dalton verwendet. Ethylacetat fungierte als organisches Lösungsmittel (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland). Es wurden stets Konzentrationen von 50 mg/ml verwendet.

Sowohl in vitro als auch in vivo dienten als Trägermaterial handelsübliche dentale Titan-Implantate. Dies waren Implantate mit einem Durchmesser von 4,1 mm und einer Länge von 8,0 mm des Oktagon Implantatsystems der Fa. Hager & Meisinger (Neuss, Deutschland). Die Implantate entsprechen der Geometrie des Straumann Standard Plus® Implantatsystems (Fa. Straumann, Freiburg, Deutschland).

3.1.2.2 Herstellung der PDLLA – Lösung

Zunächst wurde eine PDLLA – Lösung der Konzentration 50 mg/ml hergestellt. Dazu wurde in einem lösungsmittelbeständigen Reaktionsgefäß mit Deckel eine entsprechende Menge Resomer R 203 auf einer Präzisionswaage eingewogen. Ethylacetat wurde dann als Lösungsmittel mit einer Glaspipette zugegeben bis die oben genannte Konzentration von 50 mg/ml erreicht war. Nachdem das Gefäß verschlossen wurde, wurden beide Komponenten unter Vortexen solange vermischt, bis das Resomer vollständig aufgelöst war. Für den weiteren Einsatz (in vitro und in vivo) wurde die PDLLA – Lösung steril filtriert (lösungsmittelbeständiger Sterilfilter mit Porengröße 0,2 µm). Das Reaktionsgefäß wurde zwischen einzelnen Arbeitsschritten geschlossen gehalten, womit das Abdampfen des Lösungsmittels verhindert wurde.

3.1.2.3 Herstellung der PDLLA/ COPROG – Beschichtungslösung

Sterile PDLLA – Lösung wurde zu lyophilisierten COPROGs in einem Homogenisator (Mikropotter „VWR™ Pellet Mixer“ mit Aufsätzen „VWR™ Disposable Pestle“, Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) pipettiert und homogenisiert. Das Homogenisieren erfolgt dabei maschinell durch Rotationsbewegungen und

zusätzlich durch manuelle Auf- und Abwärtsbewegungen (Rotationsgeschwindigkeit konstant bei 200 rpm) über 120 sec. Vor der Entnahme mit der Pipette erfolgte mehrmaliges Durchmischen der Lösung mit der Pipettenspitze. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe (Kolk 2007) zeigte sich in vitro eine Expressionsabhängigkeit von der COPROGs/PDLLA - Konzentration mit den besten Ergebnissen hinsichtlich Expression und Komplexstabilität bei einem Verhältnis von 0,4 % COPROGs:PDLLA. Dieses Verhältnis wurde in dieser Arbeit übernommen.

3.1.2.4 Herstellung der PDLLA/ rhBMP-2 – Beschichtungslösung

Das Protein, das in Pulverform vorlag, wurde in Aqua injectabile gelöst und mit Hilfe eines modifizierten Potters (vgl. Drechsler 2010 und Schulze 2011) in einer sterilen PDLLA-Lösung der Konzentration 50 mg/ml homogenisiert.

3.1.2.5 Herstellung der PDLLA/ Triclosan – Beschichtungslösung

Es wurde eine PDLLA-Lösung mit der Konzentration 50 mg/ml verwendet und Triclosan in fünfprozentiger Konzentration beigemischt.

3.1.2.6 Beschichtungsverfahren

Es wurden unterschiedliche Verfahren zur Beschichtung der Implantatoberflächen mit Beschichtungslösungen auf PDLLA-Basis getestet. Zunächst erfolgte die Beschichtung mittels Eintauchverfahren und Pipettieren. Bereits bei der makroskopischen Begutachtung fiel eine ungleichmäßige Verteilung der Beschichtung über die Implantatoberflächen auf. Dieser Eindruck bestätigte sich bei der Darstellung im Rasterelektronenmikroskop (REM) und ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

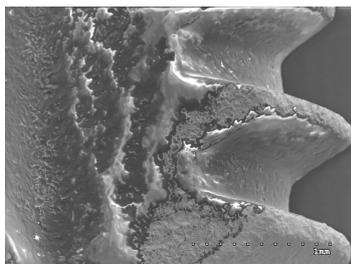


Abb. 1. REM-Darstellung der Implantatoberfläche nach Pipettieren der Beschichtungslösung PDLLA.

10fache Vergrößerung. Erkennbar ist die inhomogene Oberflächenbeschichtung.

Um eine homogenere Beschichtung zu erreichen, wurden weitere Verfahren getestet. Dies war zum einen ein Sprühverfahren wie es auch bei der biokompatiblen Beschichtung von kardialen Stents zur Anwendung kommt (Fa. Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland). Hierdurch konnte eine makroskopisch und mikroskopisch sehr homogene Beschichtung erreicht werden (Abb. 2). Nachteile dieses Verfahrens waren neben finanziellen Aspekten und der Abhängigkeit von einem externen Partner, dass sich im vorliegenden experimentellen Setting keine sterile Applikation der Beschichtungslösungen gewährleisten ließ. Zudem bestand die Gefahr, dass es aufgrund des hohen Drucks bei der Applikation zu Schäden an den COPROGs kommen könnte.

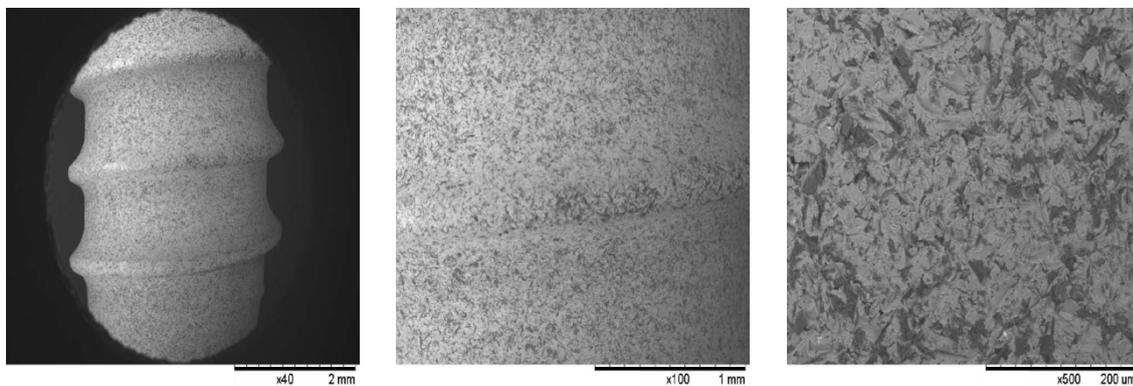


Abb. 2. REM-Darstellung der Implantatoberfläche nach Sprühbeschichtung.

Von links nach rechts: 40-, 100- und 500fache Vergrößerung. Erkennbar ist eine homogene Oberflächenbeschichtung. Bildmaterial der Fa. Translumina GmbH, Hechingen, Deutschland.

Deshalb fiel die Entscheidung zugunsten eines weiteren Verfahrens, welches mit bereits der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Mitteln praktikabel durchführbar war und zu ebenfalls, der Sprühbeschichtung vergleichbaren, homogenen Beschichtungsergebnissen führte. Hierfür wurde zunächst Agarose (Fa. Sigma-Aldrich®, Deisenhofen, Deutschland) erhitzt und im flüssigen Zustand in 1,5 ml Eppendorf Tubes mit Deckel (Fa. Sigma-Aldrich®, Deisenhofen, Deutschland) eingebracht. Unmittelbar danach, also noch während sich die Agarose im flüssigen Aggregatzustand befand, wurden zuvor erstellte, sterilisierbare Implantat-Mockups aus Kunststoff in die Reaktionsgefäße eingebracht. Diese dienten als Platzhalter für die später zu beschichtenden Implantate und hatten einen etwas größeren Durchmesser als die letztlich verwendeten Implantate. Nach Aushärtung der Agarose

wurden die Platzhalter wieder entfernt und es entstand ein „Agarose-Tube“ (Abb. 3).



Abb. 3. Vorbereiteter Agarose-Tube.

Anschließend erfolgte das Einpipettieren von jeweils 50 μl der Arzneimittel-trägerlösung in die vorbereiteten Agarose-Tubes. Um eine homogene Verteilung zu erreichen, wurde ein Mikro-Potter für ca. 20 sec eingesetzt. Anschließend wurde unter einem sterilen Abzug die zu beschichtenden steril verpackten Implantate in die unverschlossenen Tubes eingesetzt und die Tubes in ein entsprechendes Mischgerät (Eppendorf Thermomixer, Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gesetzt. Die Tubes wurden dabei offen gelassen und unter der Laminar Flow kontrolliert mit einer Frequenz von 300 rpm (rounds per minute) über 24 Stunden kreisförmig bewegt. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels resultierte, entsprechend der Sprühbeschichtungstechnik, ein gleichmäßiger Polymerfilm auf den Titanoberflächen der Implantate (Abb. 2). Die Methodik wurde als Agarose-Pivot-Verfahren bezeichnet und kam, aufgrund der erzielten homogenen Beschichtungen, bei allen in vitro und in vivo eingesetzten Implantaten zur Anwendung (Abb. 4). Für den Tierversuch wurden COPROGs mit 6,25 μg und 12,5 μg DNA-Menge sowie 50 μg und 150 μg rhBMP-2 in die Agarose-Tubes eingebracht.



Abb. 4. Agarose-Pivot-Verfahren.

Links: Einpipettieren der Beschichtungslösung, Mitte: Einsatz des Mikro-Potters. Rechts: Einsetzen eines Implantates in den Agarose-Tube.

3.1.3 Bewertung der Beschichtung hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge und mechanischer Stabilität

Nach der Etablierung des Beschichtungsverfahrens sollte die Reproduzierbarkeit der aufgetragenen Beschichtungsmenge sowie die mechanische Stabilität der Beschichtung getestet werden.

Hierfür wurden Genvektoren (COPROGs) mit radioaktiv markierter Plasmid DNA hergestellt. Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte mit radioaktivem Iod-125 nach der von Terebesi et al. (1998) und nachfolgend Mykhaylyk et al. (2007) modifizierten Methode von Commerford (1971). Anschließend wurde eine PDLLA/COPROG – Beschichtungslösung hergestellt (siehe oben) und die Implantate des erwähnten Oktagon Systems wie beschrieben durch das Agarose-Pivot-Verfahren beschichtet. Die Messungen der jeweils auf den Implantaten befindlichen Jod-125 Aktivität (Absorption im Überstand bei 260 nm) erfolgten im Gamma Counter „Wallac 1480 Wizard 3“ der (Fa. Perkin Elmer, Boston, USA).

Bei 12 Implantaten wurde die jeweils aufgetragene Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA (COPROGs) gemessen und das Verhältnis zur jeweils insgesamt eingesetzten Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA in Prozent bestimmt.

Um die mechanische Stabilität der Beschichtung zu bewerten wurden 10 Implantate, welche mit radioaktiv markierter Plasmid DNA (COPROGs) beschichtet waren (Agarose-Pivot-Verfahren), in eine Rinderrippe ein- und ausgedreht. Die Implantate wurden vollständig, entsprechend humanmedizinischen Standards, in den Knochen der Rinderrippe inseriert. Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte mit radioaktivem Iod-125. Die Aktivität auf den Implantaten nach dem Ein- und Ausdrehen (counts per minute, cpm) wurde durch die ursprüngliche Aktivität auf den Implantaten (cpm) dividiert und das Verhältnis in Prozent als Maß für die verbliebene Menge COPROG errechnet.

3.2 In Vivo-Phase: Tiermodell

3.2.1 Tierversuchsaufbau und Gruppeneinteilung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, in vivo zu untersuchen, welchen Einfluss dentale Titanimplantate, die mit einer für BMP-2 kodierenden Genformulierung beschichtet waren, auf die periimplantäre Knochenheilung haben.

Die Hauptzielvariable des Tierversuches war das Ausmaß der mikro-computertomographisch ermittelten periimplantären knöchernen Regeneration in Form des Verhältnisses von Knochenvolumen zu Totalvolumen (Bone Volume / Total Volume, BV/TV). Nebenzielvariable des vorliegenden Projektes war die Auswertung der mikro-computertomographisch ermittelten Knochendichte im periimplantären Bereich. Darüber hinaus war im Kontext des Gesamtprojektes vorgesehen als weitere Zielgrößen konventionelle histologische, histomorphometrische und immunhistologische Parameter zu bestimmen, welche detailliert in einer folgenden Dissertationsarbeit thematisiert werden sollten.

Für das Versuchsvorhaben wurden ausgewachsene Göttinger Miniaturschweine gewählt, um eine dem erwachsenen, gesunden Menschen entsprechende Knochenheilung zu simulieren. Es lag eine Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die zuständige Behörde, die Regierung von Oberbayern, vor.

Für die Tierversuche wurden sechs unterschiedliche Beschichtungen ausgewählt, mit denen die oben genannten dentalen Implantate durch das beschriebene Agarose-Pivot-Verfahren (siehe Kapitel 3.1) beschichtet wurden. Die sechs therapeutischen Gruppen waren im Einzelnen:

- PDLLA
- PDLLA / Triclosan
- PDLLA / COPROG 12,5 µg
- PDLLA / COPROG 6,25 µg
- PDLLA / rhBMP-2 150 µg
- PDLLA / rhBMP-2 50 µg

Dabei wurden als Messzeitpunkte je therapeutischer Gruppe der 28. und 56. postoperative Tag gewählt, so dass insgesamt 12 Gruppen resultierten (Tab. 1).

Gruppennummer	Beschichtung bzw. therapeutische Gruppe	Kurzbezeichnung	Einheitszeit
(1)	PDLLA	PDLLA	28 Tage
(2)	PDLLA / Triclosan	Triclosan	
(3)	PDLLA / COPROG 12,5 µg	COPROG 12	
(4)	PDLLA / COPROG 6,25 µg	COPROG 6	
(5)	PDLLA / rhBMP-2 150 µg	BMP 150	
(6)	PDLLA / rhBMP-2 50 µg	BMP 50	
(7)	PDLLA	PDLLA	56 Tage
(8)	PDLLA / Triclosan	Triclosan	
(9)	PDLLA / COPROG 12,5 µg	COPROG 12	
(10)	PDLLA / COPROG 6,25 µg	COPROG 6	
(11)	PDLLA / rhBMP-2 150 µg	BMP 150	
(12)	PDLLA / rhBMP-2 50 µg	BMP 50	

Tab. 1. Übersicht über alle 12 Versuchsgruppen.

Die 12 Versuchsgruppen resultieren aus 6 therapeutischen Gruppen mit jeweils 2 Messzeitpunkten. Blau hinterlegte 28 Tage Gruppen (1) bis (6), und grün hinterlegte 56 Tage Gruppen (7) bis (12).

Insgesamt waren Gruppengrößen von jeweils 7 Implantatinsertionsstellen vorgesehen, so dass eine Gesamtzahl von $12 \times 7 = 84$ zu inserierenden Implantaten geplant war. Alle Implantatinsertionsstellen sollten im Oberkiefer der Minischweine lokalisiert sein. Um Versuchstiere zu sparen, erfolgte die Studie im sogenannten Split-Mouth-Design. Zusätzlich wurden auch innerhalb der Kieferhälften Implantatinsertionsstellen als voneinander unabhängige Variablen ausgewertet. Um die Unabhängigkeit innerhalb der Kieferhälften zu gewährleisten, wurde zwischen den Insertionsstellen mindestens ein natürlicher Zahn belassen. Es wurden 3 Implantate pro Kieferhälfte und somit insgesamt 6 Implantate pro Tier inseriert. Die Verteilung der unterschiedlichen Versuchsgruppen auf die Minischweine erfolgte in einem Rotationsverfahren, so dass bei jedem Tier 6 verschiedene Gruppen inseriert wurden.

Vor den eigentlichen Implantationen wurde in einer ersten Operation im Oberkiefer, sofern vorhanden, der erste Prämolare (P1), der dritte Prämolare (P3) sowie der erste

Molar (M1) extrahiert. Die Implantatinsertionsstellen sollten also in regio P1, P3 und M1 zu liegen kommen und durch die Zähne P2 und P4 getrennt bleiben.

3.2.2 Tierhaltung und Ernährung

Die Haltung der Tiere und die Durchführung der geplanten Versuche fand im Zentrum für präklinische Forschung des Klinikum rechts der Isar der TU München statt. Die Haltung der Tiere erfolgte im Gruppenverband als Bodenhaltung in speziellen Tierhaltungsräumen (personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Temperatur und Luftfeuchte reguliert, Hell/Dunkel-Lichtprogramm mit Dämmerlichtphasen) unter konventionellen Hygienebedingungen. Die Fütterung erfolgte mit speziellem Schweinefutter ad libitum in pelletierter Form. Beschäftigungsmöglichkeiten (Bälle, Beißketten, leere Kanister) standen ebenso jederzeit zur Verfügung wie frisches Leitungswasser über handelsübliche Nippeltränken. Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

3.2.3 Durchführung der Operationen und postoperative Nachsorge

Die Tiere wurden in Vollnarkose operiert, wobei die üblichen chirurgisch-operativen technischen Bedingungen dabei eingehalten wurden. Die Dauer der ersten Eingriffe bei denen die Zahnextraktionen erfolgten betrug etwa 75 Minuten, die zweiten Eingriffe zur Implantatinsertion dauerten etwa 120 Minuten. Es wurde eine steuerbare, reflexfreie Allgemeinanästhesie mit künstlicher Beatmung im halbgeschlossenen Kreislaufsystem durchgeführt. Die Tiere wurden vor dem Eingriff für 12 Stunden nüchtern gesetzt. Die Prämedikation erfolgte mit 2mg/kg Azaperon und 10-15 mg/kg Ketamin und 0,02 mg/kg Atropin in einer Mischspritze i.m.. Am sedierten Tier erfolgte das Legen einer Venenverweilkanüle in einer der Ohrrendvenen, über die mit 1%-igem Propofol (3-5mg/kg) nach Wirkung (bis zur Intubationsfähigkeit) die Allgemeinanästhesie eingeleitet werden konnte. Nach Intubation wurden die Tiere künstlich beatmet. Die Narkoseerhaltung erfolgte mit 2%-igem Propofol als Dauertropfinfusion (~ 7mg/kg/h). Bei Bedarf wurde Fentanyl halbstündig als Bolus nachgegeben (ca. 1,5 ml/ Bolus). Vor Beginn aller chirurgischen Manipulationen wurde Fentanyl nach Wirkung i.v. verabreicht. Während des gesamten Eingriffs wurden die Tiere über Kapnometrie, Pulsoximetrie,

EKG und Temperatursonde überwacht. Bei Bedarf wurden Beatmung und Anästhesietiefe nachreguliert. Intraoperativ wurde den Tieren Carprofen (4 mg/kg) i.m. und Metamizol 40mg/kg (verdünnt) i.v.) verabreicht, um eine durchgehende analgetische Abdeckung während des gesamten Eingriffs sowie unmittelbar post operationem zu erreichen. Intraoperativ erfolgte eine Infusion mit Ringerlösung 10 ml/kg.

Die Zahnextraktionen erfolgten in einem ersten operativen Eingriff unter entsprechenden humanmedizinischen Standards. Es wurde, falls vorhanden, der erste Prämolaren (P1), der dritte Prämolare (P3) sowie der erste Molar (M1) auf beiden Seiten des Oberkiefers entfernt. In den Folgeeingriffen, die etwa zwei Monate nach den Extraktionen erfolgten, wurden pro Tier sechs humane, zahnärztliche Implantate mit verschiedenen Beschichtungen im Oberkiefer in den Region P1, P3 und M1 beidseits inseriert. Die Zähne P2 und P4 wurden belassen um gegenseitige Wachstumsbeeinträchtigungen auszuschließen. Die Insertion erfolgte entsprechend den Standardprotokollen des Herstellers nach krestaler Inzision und Mobilisierung eines Mukoperiostlappens. Abschließend erfolgten die Readaptation des Mukoperiostlappens und der dichte Wundverschluss mit Vicryl 4.0 Nahtmaterial (Fa. Ethicon / Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland), um eine geschlossene Einheilung zu gewährleisten. Post operationem wurden die Tiere über einen Zeitraum von 3 Tagen durch die Gabe von Carprofen (4 mg/kg) p.o. in Form von Kautabletten analgetisch behandelt. Die Tötung der Tiere erfolgt jeweils 28 und 56 Tage post operationem, um den Einfluss der therapeutischen Gruppen im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Die Tiere wurden während der Untersuchungszeit von 28 bzw. 56 Tagen in ihrem gewohnten Gruppenverband gehalten. Während dieser Zeit fanden keine Eingriffe mehr statt. Es wurden verschiedene Abbruchkriterien definiert, wie Anzeichen von Schmerzen, die nicht durch Schmerzmittelgabe beseitigt werden können bzw. nicht direkt postoperativ auftreten, (Apathie/Hyperaktivität, Selbstverstümmelung, Isolation von der Gruppe, verminderte Futter und/oder Wasseraufnahme), Verlust von mehr als 20% des Ausgangskörpergewichts, Auftreten von unerwarteten, schweren therapierefraktären Infektionen oder jede therapierefraktäre Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Alle Tiere konnten bis zum Ende des vorgesehenen Tötungszeitpunktes beobachtet werden.

3.2.4 Opferung und Präparation der Proben

Die Tötung der Tiere erfolgte in Narkose. Zuerst erfolgte die Vertiefung dieser Narkose mit Pentobarbital (100mg/kg i.v.), anschließend führte die i.v. Gabe von Kaliumchlorid (>2mmol/kg), zum Herzstillstand.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde pro Implantat ein ca. 3 x 3 x 2 cm großer periimplantärer Bereich mit einer oszillierenden Säge unter Kühlung mittels physiologischer Kochsalzlösung entfernt und in 4% neutral gepufferter Formalinlösung (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) fixiert. Es folgte die Einbettung in Technovit® 9100 (Fa. Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland), einem Kunststoffeinfettssystem auf Basis von MMA (Methylmethacrylat), entsprechend Herstellerprotokoll. Alle Proben wurden fotodokumentiert.

Nach der Kunststoffeinfettung mussten die Proben so getrimmt, dass jeweils die Implantatlängsachse senkrecht zur Grundfläche Probenbehälter des Mikro-Computertomographen positioniert werden konnte. Hierfür wurden die Proben anfangs mit Hilfe einer wassergekühlten Mikrosäge zunächst in eine Quaderform gebracht (Abb. 5). Die Implantatlängsachse wurde dabei senkrecht zur Grundfläche des Quaders ausgerichtet. Die exakte Ausrichtung der Implantatachse erfolgte durch ein handelsübliches zahntechnisches Trimmgerät unter Wasserkühlung unter intermittierender Röntgenkontrolle mit Hilfe eines handelsüblichen digitalen intraoralen Röntgengerätes (Fa. Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Deutschland). Abschließend erfolgte die Positionierungskontrolle in drei Ebenen (Abb. 6). Abweichungen der Längsachse von der Senkrechten zur Grundfläche von 3° oder weniger wurden als akzeptabel betrachtet.

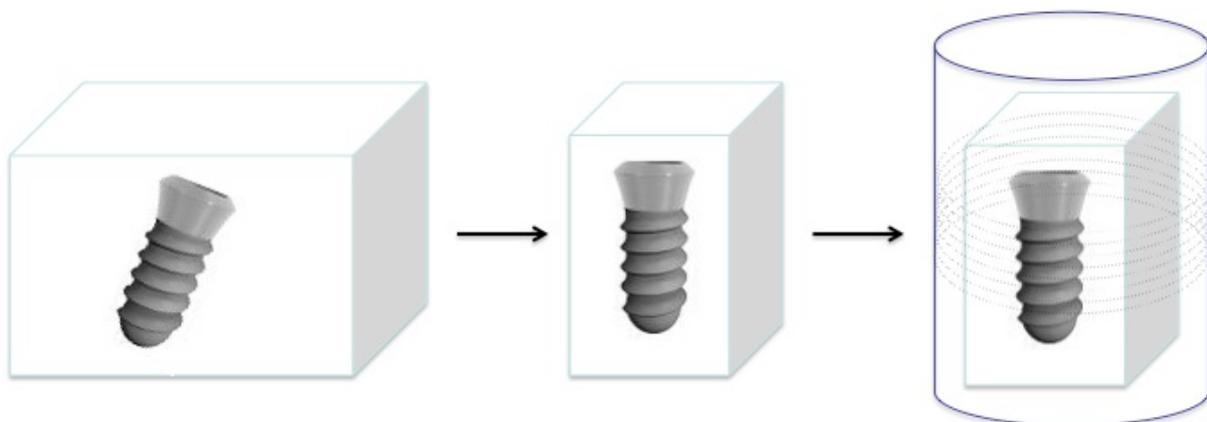


Abb. 5. Positionierung der Implantat-Längsachse senkrecht zur Grundfläche des Mikro-CT-Probenbehälters.

Links: Ungetrimmte Probe. Mitte: Die Längsachse des Implantates ist senkrecht zur Grundfläche der getrimmten Probe. Rechts: Positionierung innerhalb des Mikro-CT-Probenbehälters senkrecht zu dessen Grundfläche.

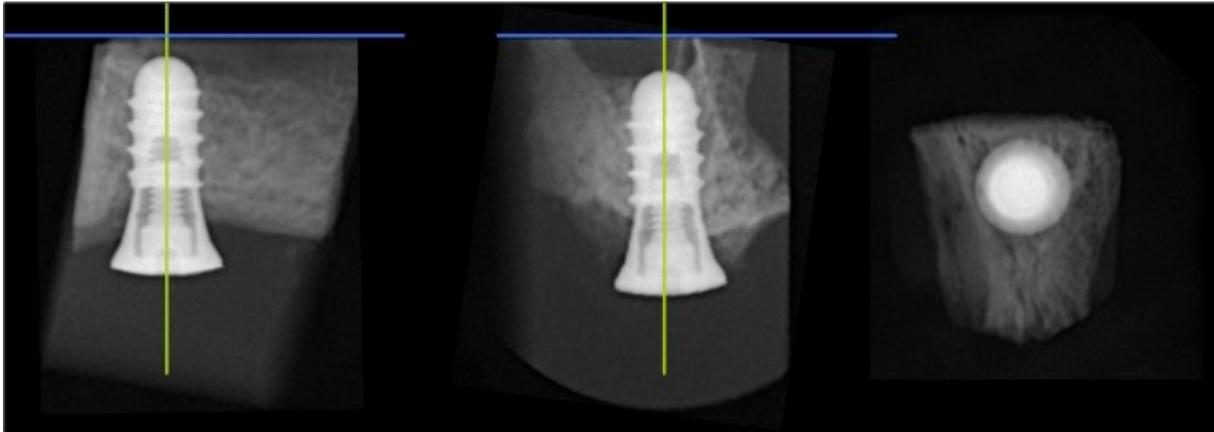


Abb. 6. Positionierungskontrolle der Implantatachse.

Blaue Linie entspricht Grundfläche der Probe, grüne Linie entspricht Längsachse des Implantates und steht senkrecht zur Grundfläche.

3.2.5 Auswertung – konventionelle radiologische Darstellung

Wie unter 3.2.4 beschreiben wurden alle Proben bereits im Rahmen der Achsenpositionierung der Implantate konventionell radiologisch dargestellt. Dadurch war eine erste Einschätzung des Grades der Osseointegration der Proben möglich. Die konventionelle Radiologie kam als zusätzliche bildgebende Information zum Einsatz und wurde zur unterstützenden qualitativen Einschätzung bei unklaren Verhältnissen vergleichend bzw. ergänzend zur Mikro-CT hinzugezogen.

3.2.6 Auswertung – Mikro-Computertomographie (μ CT)

Ziel vorliegender Studie war es, in vivo zu zeigen, welchen Einfluss dentale Implantate, die mit einem nicht-viralen, geschützten und für BMP-2 kodierenden Genvektor in Kombination mit der Trägersubstanz PDLLA beschichtet waren, auf die periimplantäre Knochenheilung haben. Die Hauptzielvariable war dabei die Bestimmung des Verhältnisses von Knochen- zu Totalvolumen (Bone Volume / Total Volume, BV/TV) in unterschiedlichen periimplantären Bereichen, genannt „Region of Interest, ROI“ beziehungsweise „Volume of Interest, VOI“. Nebenzielvariable war die periimplantäre Knochendichte (Tissue Mineral Density, TMD).

Verwendet wurde das Mikrocomputertomographie-Gerät μ CT 40 (Fa. Scanco Medical® AG, Brüttisellen, Schweiz). Dabei handelt es sich um ein μ CT-Tischgerät bestehend aus einer Fächerstrahl-/Kegelstrahl-Mikrofokusröhre mit einer Fokusgröße von 5 μ m als Quelle und einem CCD-Sensor als Detektor. Während der Aufnahme wird die dazwischenliegende Probenhalterung gedreht und ein planarer

Rohdatensatz aufgezeichnet. Anschließend wird durch die im System implementierte Software der dreidimensionale Datensatz errechnet und steht zur Auswertung zur Verfügung.

Es wurden Probenhalter mit einem Durchmesser von 16,4 mm verwendet. Aufgrund des zuvor geschilderten Trimmens der Proben konnten diese so in den Probenhalter platziert werden, dass der Implantatapex zur Grundfläche des Probenhalters orientiert war und die Implantatlängsachse senkrecht bezüglich der Grundfläche des Probenhalters stand. Die Proben wurden durch einen sie umgebenden Schwamm innerhalb des Probenbehälters fixiert (siehe auch Dissertation Bissinger 2013). Vor den eigentlichen μ CT-Aufnahmen erfolgte innerhalb des μ CT-Gerätes eine konventionelle Röntgenaufnahme, welche als „Scout View“ im Systemprogramm dargestellt wird (vgl. Bissinger 2011, Bissinger 2013). Hier wurde der zu scannende Bereich der Probe in koronal-apikaler Ausrichtung festgelegt. Dieser begann koronal bei allen Implantaten 0,3 mm unterhalb (d.h. apikal) der Grenze zwischen Zylinder- und Konusform der Implantate und verlief 3 mm apikalwärts. Gescannt wurden im Durchschnitt je Probe 301 Schichten mit Schichtdicken von jeweils 10 μ m, entsprechend einer durchschnittlichen Höhe von 3,01 mm. Die Hochspannung betrug 70kV, der Röhrenstrom 114 μ A. Die Integrationszeit, also die Zeit welche die Röntgenstrahlung pro Projektion auf den Detektor einwirkt, betrug 5 x 300 ms. Dies entsprach 1000 Projektionen pro Schicht mit jeweils 2048 Messpunkten pro Schicht über einen Winkel von 180°.

Die Analyse der periimplantären Knochensituation erfolgte nach Rekonstruktion der Daten „offline“ mit der Software IPL (Image processing language) (Fa. Scanco Medical® AG, Brüttsellen, Schweiz).

Um die periimplantären Knochenverhältnisse zu evaluieren wurden drei unterschiedliche Probenbereiche bzw. Volumina, „Volume of interest, VOI“, definiert. Zunächst wurde dabei Schicht für Schicht ein periimplantärer, ringartiger Bereich festgelegt, der senkrecht zur Implantatlängsachse gemessen, eine bestimmte Zone einschließt. Die Zone von 0-20 μ m um die Implantatoberfläche wurde dabei aufgrund der Artefaktbeeinflussung ausgeschlossen. Eine erste Zone von 20-50 μ m radiär um die Implantatoberfläche beschrieb ein 30 μ m breites Band, welches über alle Schichten gesehen das VOI 1 bildete (Abb. 7). Eine zweite Zone 60-300 μ m radiär um die Implantatoberfläche wurde, über alle Schichten betrachtet, als VOI 2 definiert.

VOI 3 wurde, über alle Schichten betrachtet, durch eine Zone von 550-1000µm zirkulär um die Implantatoberfläche festgelegt.

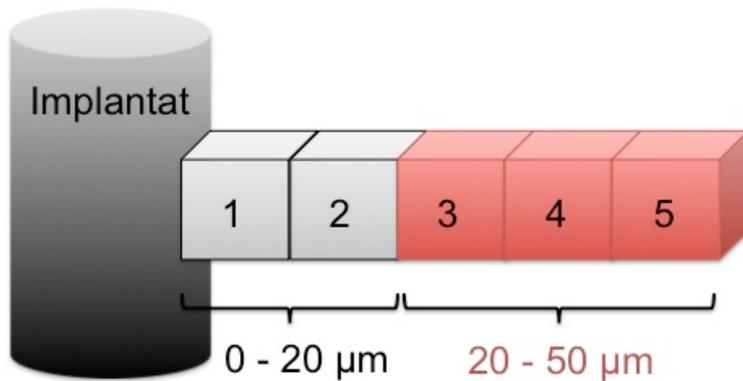


Abb. 7. Schematische Darstellung des VOI 1.

VOI 1 (rot dargestellt), entspricht den Voxeln 3,4 und 5 bzw. einem Abstand von 20 – 50 µm von der Implantatoberfläche aus. Die Voxel 1 und 2 und somit die ersten 20 µm von der Implantatoberfläche aus wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Bei einer isotropen Auflösung von 10 µm gilt, dass VOI 1 einem 3 Voxel breiten Band entspricht, VOI 2 einem 24 Voxel breiten Band und VOI 3 einem 45 Voxel breitem Band. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der drei Volume of Interest (VOI 1,2 und 3) innerhalb einer Schicht senkrecht zur Implantatachse. Die Algorithmen zur Bestimmung der genannten VOI wurden in einem Skript der Fa. Scanco Medical® AG (Brüttsellen, Schweiz) festgelegt und automatisch durch die Software IPL berechnet. Die Volumina können geometrisch am ehesten mit einem Hohlzylinder verglichen werden, weichen jedoch aufgrund der Gewindestruktur der Implantatoberfläche von einem solchen ab.

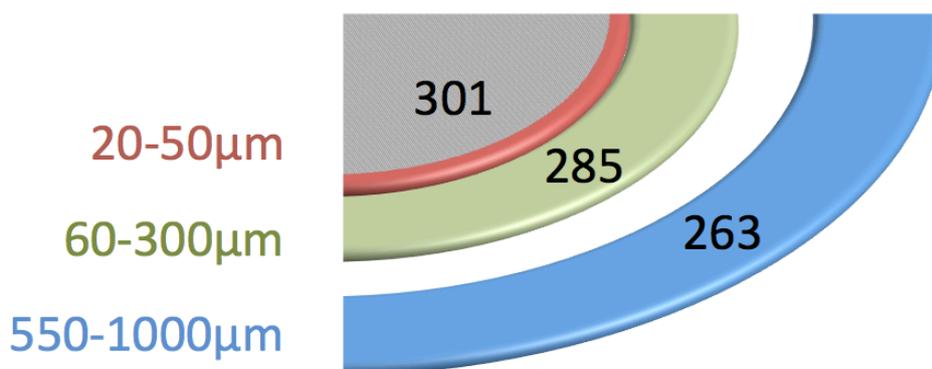


Abb. 8. Schematische Darstellung der drei Volume of Interest: VOI 1,2 und 3.

VOI 1 (rot), VOI 2 (grün) und VOI 3 (blau) mit entsprechenden radiären Abständen zur Implantatoberfläche (Schrift farblich den jeweiligen VOI entsprechend) und den jeweils herangezogenen Schwellenwerten (schwarze Schrift). Das Implantat ist grau dargestellt.

Nach Festlegung der VOI erfolgte die Festlegung von Schwellenwerten und speziellen Filtern zur Definition des periimplantären Knochengewebes. Der Gauß Sigma lag für Knochen bei 1,2 und für Titan bei 2,0, der Gauß Support lag für Knochen bei 2 und für Titan bei 3. Die optimalen Schwellenwerte wurden visuell durch zwei unabhängige Untersucher an allen Proben ermittelt (vgl. Walker et al. 2012, Bissinger 2013, Stadlinger et al. 2013). Zur Minimierung des Einflusses von Metallartefakten im direkten periimplantären Bereich erfolgte die Schwellenwertbestimmung spezifisch für die einzelnen VOI in Bezug auf die Abnahme der Artefakte zur Peripherie hin (Abb. 8):

- VOI 1, 20-50 µm periimplantäre Zone:
Schwellenwertbereich Knochen 301-700 (pro Mille vom maximalen Grauwert)
- VOI 2, 60-300 µm periimplantäre Zone:
Schwellenwertbereich Knochen 285-700 (pro Mille vom maximalen Grauwert)
- VOI 3, 550-1000 µm periimplantäre Zone:
Schwellenwertbereich Knochen 263-700 (pro Mille vom maximalen Grauwert).

Die Zuordnung eines Pixels bzw. Voxels zu den Kategorien Implantat (Schwellenwertbereich >700 pro Mille vom maximalen Grauwert), Knochengewebe (Schwellenwertbereiche spezifisch für VOI, siehe oben) oder nicht knöchernes Gewebe (Schwellenwertbereiche jeweils unterhalb der spezifischen Knochen-Schwellenwertbereiche) erfolgte durch den Vergleich von reinen Grauwert-Bildern mit Bildern gleichen Schnittes, bei denen eine Segmentierung anhand von Schwellenwerten durchgeführt wurde. Nach vielfacher Adjustierung unter Verwendung unterschiedlicher Schwellenwerte war es möglich, je nach VOI spezifische Intervalle festzulegen. Als zusätzliches Hilfsmittel wurden Histogramme verwendet, mit denen Häufigkeitsverteilungen dimensionsloser Grauwerte und metrischer Dichtewerte (mg HA/ccm) dargestellt werden konnten (vgl. Bissinger 2013).

Für die Schwellenwertadjustierung des VOI 1 erfolgte ein Abgleich von 2-dimensionalen Grauwertbildern mit korrespondierenden 2- und 3-dimensionalen Bildern, bei denen die knöchernen Bereiche segmentiert waren. Es handelte sich jeweils um koronare Schnitte, also Schnitte, die parallel zur Implantat Längsachse ausgerichtet waren. Auf den segmentierten 2-dimensionalen Bildern waren die als

Knochen detektierten Areale außerhalb des VOI 1 (20-50 µm periimplantäre Zone) einheitlich grau dargestellt und innerhalb des VOI 1 weiß dargestellt (Abb. 9). Auf den segmentierten 3-dimensionalen Bildern waren die als Knochen detektierten Areale außerhalb des VOI 1 grau-bläulich dargestellt. Innerhalb des VOI 1 wurden als knöchernes Gewebe detektierte Bereiche rot dargestellt, als nicht knöchernes Gewebe detektierte Bereiche grün (Abb. 10). Somit war ersichtlich, über welchen Anteilen der Implantatoberfläche unmittelbar, d.h. in einer Zone von 20-50 µm perpendicular zur Implantatachse (entsprechend VOI 1), Knochen anlag.

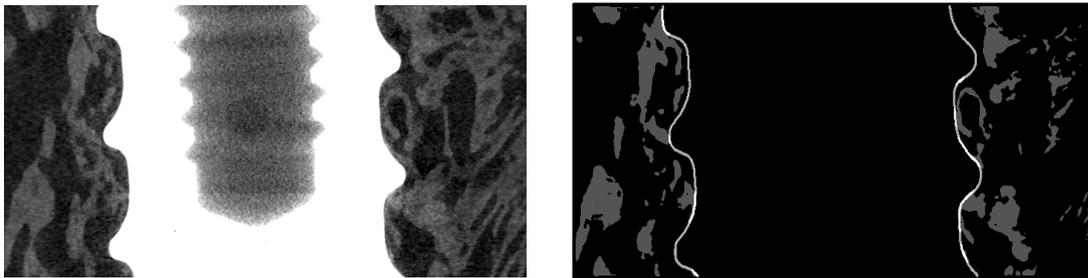


Abb. 9. 2D Schwellenwertadjustierung für VOI 1.

Links: Koronarer 2-dimensionaler µCT-Schnitt mit Grauwertdarstellung. Implantatmaterial weiß dargestellt. Rechts: entsprechender segmentierter koronarer Schnitt mit Detektion des Knochengewebes, welches außerhalb des VOI 1 einheitlich grau dargestellt ist und innerhalb des VOI 1, also unmittelbar an der Implantatoberfläche, weiß erscheint. Implantatmaterial schwarz dargestellt

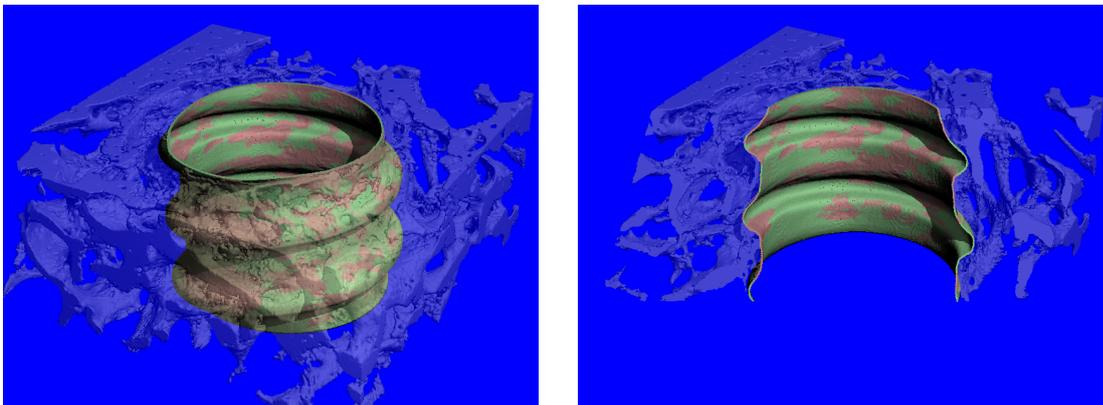


Abb. 10. 3D Schwellenwertadjustierung für VOI 1.

Links: Komplette segmentierte 3-dimensionale Darstellung von Implantat und umgebenden Knochen. Rechts: Koronarer Querschnitt der segmentierten 3-dimensionalen Darstellung. Innerhalb des VOI 1 wurden als knöchernes Gewebe detektierte Bereiche rot dargestellt, als nicht knöchernes Gewebe detektierte Bereiche grün. Das Implantatmaterial kommt nicht zur Darstellung.

Bezüglich VOI 2 und 3 erfolgte die Adjustierung der jeweiligen Schwellenwerte anhand von axialen Schichten auf denen die Implantatlängsachse senkrecht ausgerichtet war. Als Knochen detektierte Bereiche wurden rot dargestellt, als

Implantat detektierte Bereiche weiß und die restlichen Areale schwarz. Hier erfolgte analog zum Vorgehen von Bissinger 2013 und Walker et al. 2012 der Abgleich mit den Grauwertbilder und die Festlegung geeigneter Schwellenwerte (Abb. 11). Dabei sollte weder nicht knöchernes Gewebe als Knochen segmentiert werden (falsch positiv) noch knöchernes Gewebe nicht als solches detektiert werden (falsch negativ).



Abb. 11. Schwellenwertadjustierung für VOI 2 und VOI 3.

Links: Axialer 2-dimensionaler μ CT-Schnitt als Grauwertbild. Unten: entsprechender segmentierter axialer Schnitt mit Detektion des Knochengewebes, welches rot dargestellt ist. Implantatmaterial weiß dargestellt.

Letztlich konnten bestehende Skripte der Fa. Scanco derart modifiziert werden, dass die oben beschriebenen VOI vollautomatisch erstellt wurden und Knochen vollautomatisch detektiert und von Titan und nicht knöchernem Gewebe differenziert werden konnte. Auf Basis der vollautomatischen VOI-Bestimmung und Schwellenwertdetektion, erfolgte die Bestimmung des Knochenvolumens und der Knochendichte. Eine Übersicht über die festgelegten Zielvariablen mit jeweiliger Zuordnung zu den entsprechenden Volume of Interest (VOI) findet sich in Tab. 2.

3.2.6.1 Knochenvolumen

Die Hauptzielvariable der Untersuchung war das Verhältnis des Volumens des Knochens (bone volume, BV) zum gesamten Volumen (total volume, TV) innerhalb eines definierten periimplantären Probenbereiches, eines sogenannten „Volume of Interest, VOI“. Das Knochenvolumen (BV) wird in $[\text{mm}^3]$ angegeben und ist abhängig vom definierten Schwellenwert (Helligkeit der Voxel). Ebenso wird das Totalvolumen in $[\text{mm}^3]$ angegeben. BV/TV ist dann das Verhältnis des Knochenvolumens (BV) zum Totalvolumen (TV) innerhalb des untersuchten Probenvolumenanteils (VOI) in %

(Goulet et al. 1994). Es handelt sich um eine von der American Society of Bone and Mineral Research anerkannte Definition (Parfitt et al. 1987, Amling et al. 1996).

Folgende Knochenvolumen-Variablen wurden bestimmt (siehe auch Tab. 2):

- **ATT%**

ATT% bedeutet am Implantat anhaftender (englisch „attached“) bzw. unmittelbar an der Implantatoberfläche befindlicher Knochen, vergleichbar mit der histomorphometrischen Variablen Knochen-Implantat-Kontakt (Bone-Implant-Contact, BIC) bzw. mit dem mittels Micro-CT gemessenen BIC in anderen Studien. ATT% („Attachedpercent“) wurde folgendermaßen definiert: Verhältnis des Knochenvolumens (BV) zum Totalvolumen (TV) in % innerhalb des VOI 1 (20-50 µm periimplantäre Zone).

- **BV/TV_6-30**

Verhältnis des Knochenvolumens (BV) zum Totalvolumen (TV) in % innerhalb des VOI 2 (60-300 µm periimplantäre Zone).

- **BV/TV_55-100**

Verhältnis des Knochenvolumens (BV) zum Totalvolumen (TV) in % innerhalb des VOI 3 (550-1000 µm periimplantäre Zone).

3.2.6.2 Knochendichte

Neben BV/TV wurde für die VOI 2 und 3 die Knochendichte bestimmt. Dabei wurde nur die Dichte der als Knochengewebe detektierten Bereiche gemessen. Dementsprechend handelt es sich um die Messung der schwellenwertabhängigen Variablen Tissue Mineral Density, TMD. Die Zielvariablen lauten entsprechend (siehe auch Tab. 2):

- **TMD_6-30**

- **TMD_55-100**

Wie bei Bissinger 2013 beschrieben, wurde die Messung mit Hilfe eines 5-stufigen Hydroxylapatit-Phantoms in aufsteigender Konzentration (0,0/99,4/199,3/399,9/802,0 mg HA/cm³) kalibriert. Die Umrechnung in den Knochendichtewert (mg HA/cm³) erfolgte anhand des jeweiligen Hounsfield-Unit-Wertes. Da die TMD vom Schwellenwert und von Partialvolumeneffekten abhängig ist, wurden zwei Pixel von

jeder Seite der Oberfläche abgezogen (vgl. Bissinger 2013).

	VOI 1 20-50 µm	VOI 2 60-300 µm	VOI 3 550-1000 µm
Knochenvolumen BV/TV	ATT%	BV/TV_6-30	BV/TV_55-100
Knochendichte TMD	--	TMD_6-30	TMD_55-100

Tab. 2. Übersicht über die festgelegten Zielvariablen (grün hinterlegt).

3.2.6.3 Korrelationen Knochenvolumen mit Knochendichte

Es erfolgte eine Korrelation der Zielvariablen ATT%, BV/TV_6-30, BV/TV_55-100, TMD_6-30 und TMD_55-100 untereinander mit entsprechender Korrelationsanalyse nach Pearson.

3.2.7 Auswertung – Histologie und Korrelation zur µCT

Im Rahmen des Gesamtprojektes der Arbeitsgruppe Kolk war nach der computertomographischen Auswertung die histologische Aufarbeitung - mit qualitativ histologischer, histomorphometrischer sowie immunhistologischer Auswertung - geplant. Diese Untersuchungen waren zentraler Inhalt einer nachfolgenden Dissertationsarbeit. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit war bereits ein Teil der Proben orientierend histomorphometrisch ausgewertet. Um die Ergebnisse der Mikro-CT Untersuchungen vorläufig zu validieren, wurden bei insgesamt 24 Proben die Messdaten der Mikro-CT Zielvariablen ATT% (Attachedpercent) mit der histomorphometrischen Zielvariablen BIC (Bone-Implant Contact) korreliert. Die Methodik der vorläufigen histologischen Untersuchungen wird im Folgenden skizziert und in der nachfolgenden Dissertation, bei der die Methodik weiter modifiziert und an die Fragestellung angepasst werden soll, entsprechend detaillierter beschrieben werden.

Die histologischen Schnitte wurden nach der Trenn-Dünnschlifftechnik angefertigt. Die bereits zugetrimmten Technovit® 9100 – Präparate (s.o.) wurden auf einem runden Beracryl-Sockel (Fa. W. Troller AG, Feulenbach, Schweiz) aufgebracht und befestigt. Die Präparate wurden anschließend in die Halterung einer Innenlochsäge

(Sägemikrotom SP1600, Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) gespannt und unter permanenter Wasserkühlung parallel zur Implantatlängsachse in annähernd oro-vestibulärer Richtung zersägt. Dabei resultierten 300 µm dicke Schnitte, wobei bei jedem Sägevorgang ein Substanzverlust von ca. 250 µm entstand. Jeweils ein Schnitt wurde dann auf einen Kunststoffobjektträger aufgeklebt (Klebstoff Cyanolit®) und mittels eines Mikroschleifgerätes (Mikroschleifsystem® Typ AW-110, Fa. Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) auf eine Dicke von ca. 100 µm reduziert und poliert. Sämtliche Schleifvorgänge erfolgten unter ständiger Wasserkühlung. Für die histomorphometrische Auswertung wurde jeweils der Schnitt verwendet, bei dem der größte Durchmesser des eingebetteten Implantates zur Darstellung kam.

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Giemsa-Eosin Färbung nach folgendem Schema:

1. Kurzes Eintauchen der Schnitte in Methanol und Anätzen der Schnitte mit 0,1% Ameisensäure für 15 Minuten.
2. Färbung in Giemsa-Lösung (Giemsa-Farbstoff, modifiziert, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in feuchter Kammer bei 60°C für 60 Minuten
3. Kurzes Eintauchen der Schnitte in 0,1% Essigsäure und Spülung mit destilliertem Wasser
4. Schnitte in 0,1% Eosinlösung (Eosin G gelblich, Fa. Merck Millipore, © Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 1 Tropfen Eisessig eintauchen für 10 Minuten
5. Spülung mit destilliertem Wasser
6. Lufttrocknung

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte durch das Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. Michael Amling). Hierfür wurden die gefärbten Schnitte mit einem Axioskop® Mikroskop (Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einer AxioCam® Kamera (Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung der Software AxioVision 3.1® (Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Anschließend erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogramms Bioquant Osteo® (Fa. Bioquant Image Analysis Corp., Nashville, USA)

die Ausmessung des Knochen-Implantat-Kontaktes in Prozent der Implantatoberfläche zur histomorphometrischen Erfassung der Osseointegration. Die Region of Interest (ROI) war die unmittelbare Implantatoberfläche und begann, analog zur Mikro-CT Methodik, koronal bei allen Implantaten 0,3 mm unterhalb (d.h. apikal) der Grenze zwischen Zylinder- und Konusform der Implantate und verlief 3 mm apikalwärts. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde auf beiden Seiten der Schnitte gemessen.

Übereinstimmung μ CT und Histomorphometrie

Abschließend erfolgte die Korrelation (n=24) der beiden Messmethoden μ CT und Histomorphometrie zur Beurteilung der Osseointegration an der unmittelbaren Implantatoberfläche, d.h. der Mikro-CT Zielvariablen ATT% (Attachedpercent) mit der histomorphometrischen Zielvariablen BIC (Bone-Implant Contact). Es erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Pearson und eine Darstellung als Streudiagramm mit Regressionsgerade. Zudem werden der Korrelationskoeffizient und die statistische Signifikanz auf dem Niveau von 0,01 (zweiseitig) angegeben. Mittels Bland-Altman-Diagramm erfolgte eine Konkordanzanalyse um eine weiterführende Beurteilung der Übereinstimmung der beiden Messverfahren μ CT und Histomorphometrie hinsichtlich der Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes zu erlauben.

3.2.8 Statistische Auswertung

Im Rahmen der deskriptiven Statistik erfolgte die Angabe von Mittelwerten \pm Standardabweichungen (MW \pm SD) zur Beschreibung der Verteilung stetiger Daten. Statistische Signifikanzen lagen dann vor, wenn diese ausdrücklich erwähnt wurden. Mittels Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest wurde untersucht, ob die Häufigkeitsverteilung der nominalskalierten Variablen Osseointegration (ja/nein) stochastisch unabhängig von den nominalskalierten Variablen Art der Beschichtung, Implantatinsertionsstelle und Einheilzeit war (Signifikanzniveau 0,05).

Vergleiche zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der mittleren Datenlage wurden mit Hilfe von einfaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA, analysis of variance) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte gegebenenfalls die Durchführung eines Fisher LSD Testes (Fisher's Least Significant Difference) als Post Hoc Test zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen Gruppenmittelwerten. Diese Tests erfolgten explorativ auf einem Signifikanzniveau von 0,05 (zweiseitig). Es wurde

jeweils die Nullhypothese zugrunde gelegt und getestet, dass kein Unterschied bezüglich der Mittelwerte der Zielvariablen in den zu vergleichenden Gruppen vorliegt.

Zur Beurteilung der Übereinstimmung von μ CT und Histomorphometrie erfolgten eine Korrelationsanalyse nach Pearson und eine Darstellung als Streudiagramm mit Regressionsgerade. Dabei wurden der Korrelationskoeffizient und die statistische Signifikanz auf dem Niveau von 0,01 (zweiseitig) angegeben. Darüber hinaus erfolgte eine Konkordanzanalyse mittels Bland-Altman-Diagramm.

Die Aufzeichnung, Speicherung und Archivierung der ermittelten Daten und Messergebnisse sowie einfachere Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2010 (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die statistischen Auswertungen und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes IBM SPSS Statistics 22 (Fa. IBM, Corporation, New York, USA).

4 Ergebnisse

4.1 In Vitro-Phase

4.1.1 Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge

Die durchschnittlich auf den Implantaten aufgebrauchte Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA (COPROGs), betrug bei 12 Wiederholungen, $38,53 \% \pm 12,33 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der beim Agarose-Pivot-Verfahren insgesamt pro Implantat eingesetzten Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA. Das Minimum betrug $21,72 \%$ und das Maximum $59,38 \%$ (Abb. 12). Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte mit radioaktivem Iod-125.

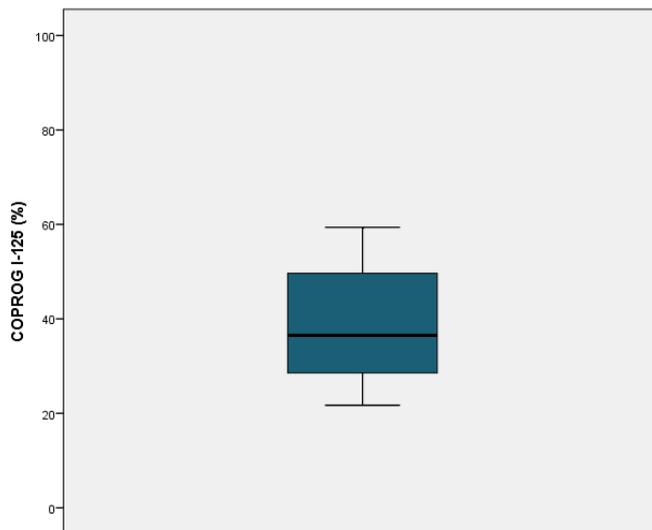


Abb. 12. Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge.

Boxplot mit Darstellung der initial auf die Implantate aufgebrauchten radioaktiv (Iod-125) markierten Plasmid DNA (COPROGs) in Prozent (y-Achse) der beim Agarose-Pivot-Verfahren insgesamt pro Implantat eingesetzten Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA (n=12).

4.1.2 Mechanische Stabilität der Beschichtung

Um die mechanische Stabilität der Beschichtung zu bewerten wurden 10 Implantate, welche mit radioaktiv markierter Plasmid DNA (COPROGs) beschichtet waren (Agarose-Pivot-Verfahren), in eine Rinderrippe ein- und ausgedreht. Die Implantate wurden vollständig, entsprechend humanmedizinischen Standards, in den Knochen der Rinderrippe inseriert. Die Markierung der Plasmid-DNA erfolgte mit radioaktivem Iod-125. Die durchschnittlich auf den Implantaten verblieben Menge betrug $58,01 \% \pm 8,56 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit einem Minimum von $44,47 \%$ und einem Maximum von $66,57 \%$ (Abb. 13).

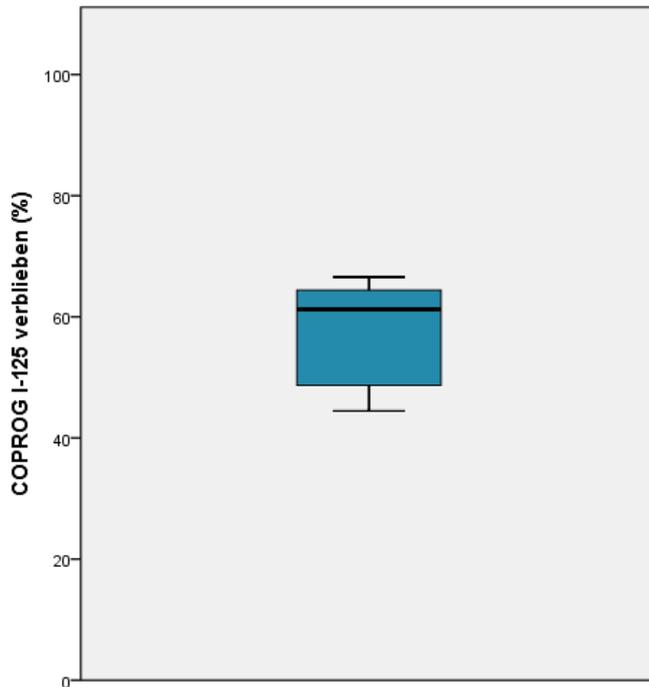


Abb. 13. Mechanische Stabilität der Beschichtung.

Boxplot mit Darstellung der auf den Implantaten verbliebenen mit radioaktiv (Iod-125) markierten Plasmid DNA (COPROGs) in Prozent (y-Achse) nach Ein- und Ausdrehen bei einer Rinderrippe (n=10).

4.2 In Vivo-Phase: Tiermodell

Bei insgesamt 14 Minischweinen wurden jeweils 6 Implantate unterschiedlicher Beschichtung inseriert (n=84). 22 Implantate gingen dabei in vivo postoperativ komplett verloren. Acht Implantate heilten ausschließlich bindegewebig ein und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Zwei dieser Implantate wurden dabei in unmittelbarer Nähe zu einem residualen Zahn bzw. Wurzelrest gesetzt. Betrachtet man alleine die in vivo verloren gegangenen Implantate betrug die Verlustrate primär 26,2 % (n=22/84). Schließt man zusätzlich die nur bindegewebig eingehelten Implantate ein, so beträgt die Rate nicht osseointegrierter Implantate 35,7 % (n=30/84). In den Abbildungen 14 und 15 sind Häufigkeitsverteilungen der osseointegrierten sowie der nicht osseointegriert eingehelten Implantate in Abhängigkeit von der Beschichtung (Abb. 14) sowie der Insertionsstelle (Abb. 15) dargestellt. Sowohl die Art der Beschichtung (p=0,50) sowie die Implantatinsertionsstelle (p=0,87) waren unabhängig von der Variablen Osseointegration (ja/nein). Dagegen zeigte sich, in Abhängigkeit von der Einheilzeit, ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Osseointegration (p=0,0228),

wobei in den 28 Tage Gruppen 32/42 (76,2%) Implantate osseointegriert waren und in den 56 Tage Gruppen 22/42 (52,4%).

Letztlich wurden insgesamt 54 osseointegrierte Implantate in die mikro-computertomographische Auswertung eingeschlossen.

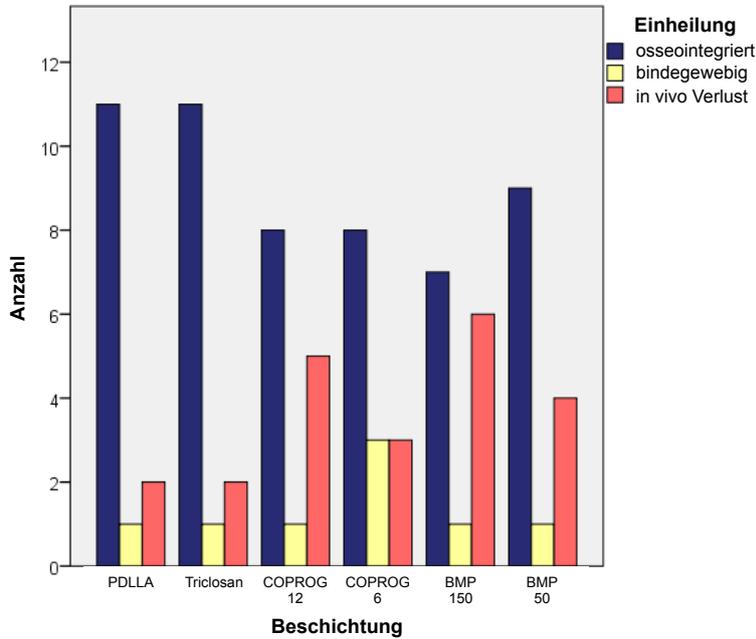


Abb. 14. Osseointegration in Abhängigkeit von der therapeutischen Beschichtung.

Häufigkeit (y-Achse) der osseointegrierten (blau), bindegewebig eingehielten (gelb) und in vivo verloren gegangenen Implantate (rot) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse).

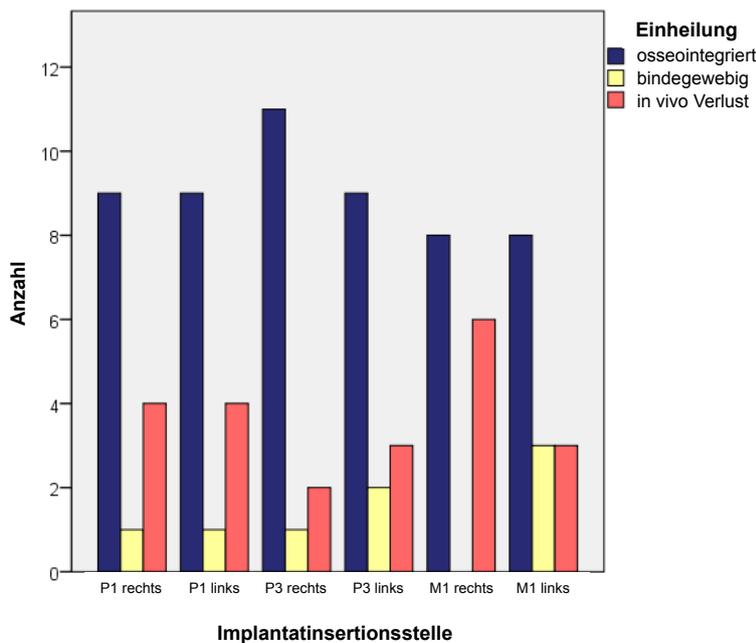


Abb. 15. Osseointegration in Abhängigkeit von der Implantatinsertionsstelle.

Häufigkeit (y-Achse) der osseointegrierten (blau), bindegewebig eingehielten (gelb) und in vivo verloren gegangenen Implantate (rot) in Abhängigkeit von der Implantationsstelle (x-Achse).

4.2.1 Konventionelle röntgenologische Darstellung

Bei sämtlichen eingebetteten Präparaten erfolgte initial die konventionelle radiologische Darstellung in drei Ebenen. Sie erfolgte einerseits um die Präparate entsprechend der Implantatachse trimmen zu können (siehe Material und Methoden). Zudem war es möglich eine erste Einschätzung der Implantateinheilung vorzunehmen (Abb. 16).

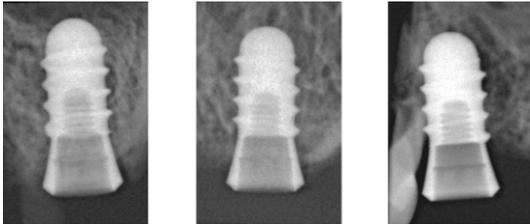


Abb. 16. Konventionelle röntgenologische Darstellung.

Links und Mitte: gute Einheilung. Rechts: bindegewebige Einheilung mit Zahn in unmittelbarer Nähe.

4.2.2 μ CT – Darstellung

4.2.2.1 Knochenvolumen

- **ATT%**

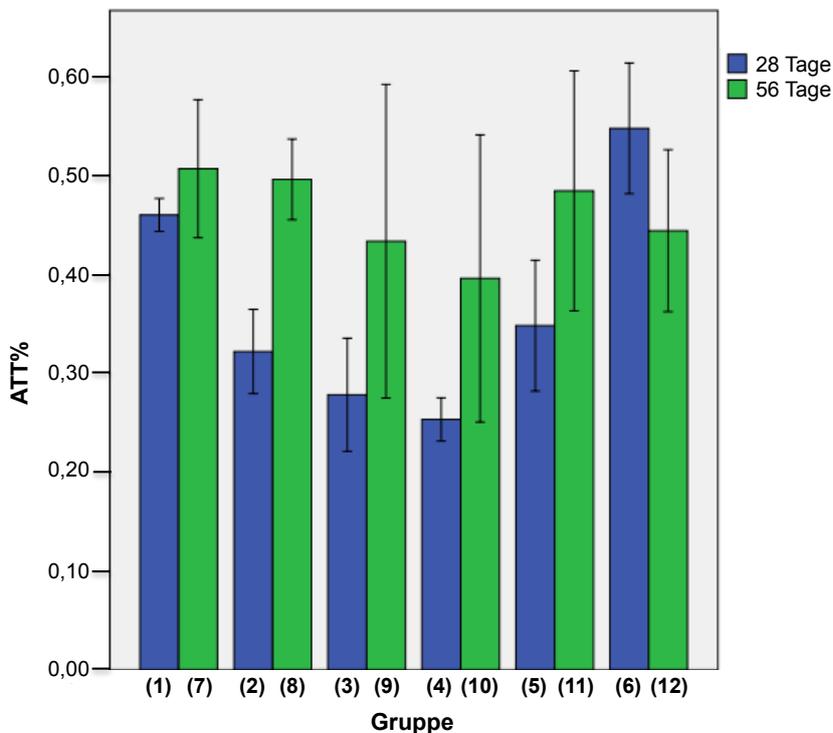


Abb. 17. Zielvariable ATT% – Säulendiagramm.

Variable ATT% (y-Achse) mit Darstellung des Mittelwerts (Oberkante der jeweiligen Säule) und Fehlerbalkens (+/- eines Standardfehlers) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse). Blaue Balken entsprechen 28 Tagen Einheilzeit, grüne Balken 56 Tage Einheilzeit.

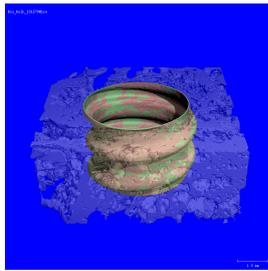
Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Mittelwerte der Variablen ATT% konnten nach 28 Tagen Einheilzeit ($p=0,01$) jedoch nicht nach 56 Tagen Einheilzeit ($p=0,955$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den therapeutischen Gruppen festgestellt werden (Signifikanzniveau 0,05). Insbesondere die 28 Tage Kontrollgruppe PDLLA und die Testgruppe BMP 50 wiesen signifikant höhere Werte auf als die 28 Tage Testgruppen Triclosan, COPROG 12 und COPROG 6 bzw. auch die BMP 150-Gruppe (Abb. 17, Tab. 3).

Die Beurteilung der Zielvariablen ATT% im zeitlichen Verlauf bei gleicher Beschichtung ergab, dass bei 5 von 6 Gruppen eine teils statistisch signifikante Zunahme (Signifikanzniveau $p=0,05$) des Knochenvolumens erkennbar war (Abb. 17, Tab. 3).

ATT%							
28 Tage	Gruppen-Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	6	6	5	5	5	5
	MW (\pm SD)	0,460 ($\pm 0,040$)	0,322 ($\pm 0,104$)	0,278 ($\pm 0,128$)	0,253 ($\pm 0,049$)	0,348 ($\pm 0,148$)	0,550 ($\pm 0,148$)
	Sig.*	*(2)(3)(4)	*(1)(6)	*(1)(6)	*(1)(6)	*(6)	*(2)(3)(4)(5)
56 Tage	Gruppen-Nr.	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	5	5	3	3	2	4
	MW (\pm SD)	0,507 ($\pm 0,156$)	0,496 ($\pm 0,091$)	0,433 ($\pm 0,275$)	0,396 ($\pm 0,251$)	0,484 ($\pm 0,172$)	0,444 ($\pm 0,164$)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
Differenz 56 Tage – 28 Tage	Gruppen-Nr.	(1) / (7)	(2) / (8)	(3) / (9)	(4) / (10)	(5) / (11)	(6) / (12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	MW	0,047	0,174*	0,155	0,143	0,136	-0,104
	Sig.*	--	*	--	--	--	--

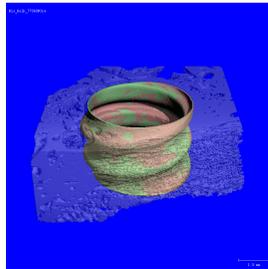
Tab. 3. Zielvariable ATT% – Messwerte und Statistik.

Gruppenmittelwerte (\pm SD) und statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen (*Signifikanzniveau $p=0,05$). Blau: 28 Tage Gruppen (1) bis (6). Grün: 56 Tage Gruppen (7) bis (12). Weiß: Differenzen zwischen Gruppenmittelwerten der 56 Tage Gruppen und der 28 Tage Gruppen jeweils gleicher Beschichtung (*Signifikanzniveau $p=0,05$).



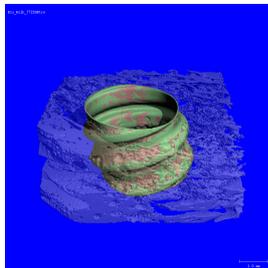
ATT% = 0,710

PDLLA / COPROG 12,5 µg
Tag 28



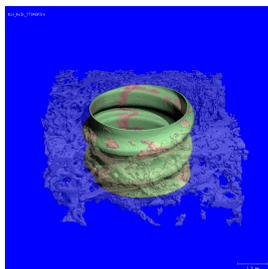
ATT% = 0,575

PDLLA / COPROG 6,25 µg
Tag 56



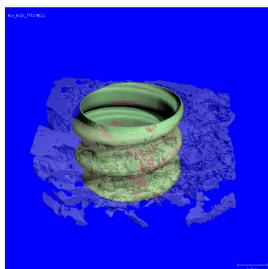
ATT% = 0,422

PDLLA / rhBMP-2 150 µg
Tag 28



ATT% = 0,255

PDLLA / COPROG 6,25 µg
Tag 28



ATT% = 0,108

PDLLA / Triclosan
Tag 28



ATT%
Knochen Implantat Kontakt

Abb. 18. Beispiele komplett segmentierter 3-dimensionaler µCT-Darstellungen von Implantat und umgebenden Knochen.

Rot markiert sind Anteile der Implantatoberfläche über welcher unmittelbar, d.h. in einer Zone von 20-50 µm perpendicular zur Implantatachse (VOI 1), Knochen anliegt. Die entsprechenden Werte für ATT% sowie die Beschichtung und Einheilzeit sind je Beispiel angegeben. ATT% nimmt von unten nach oben zu.

▪ **BV/TV_6-30**

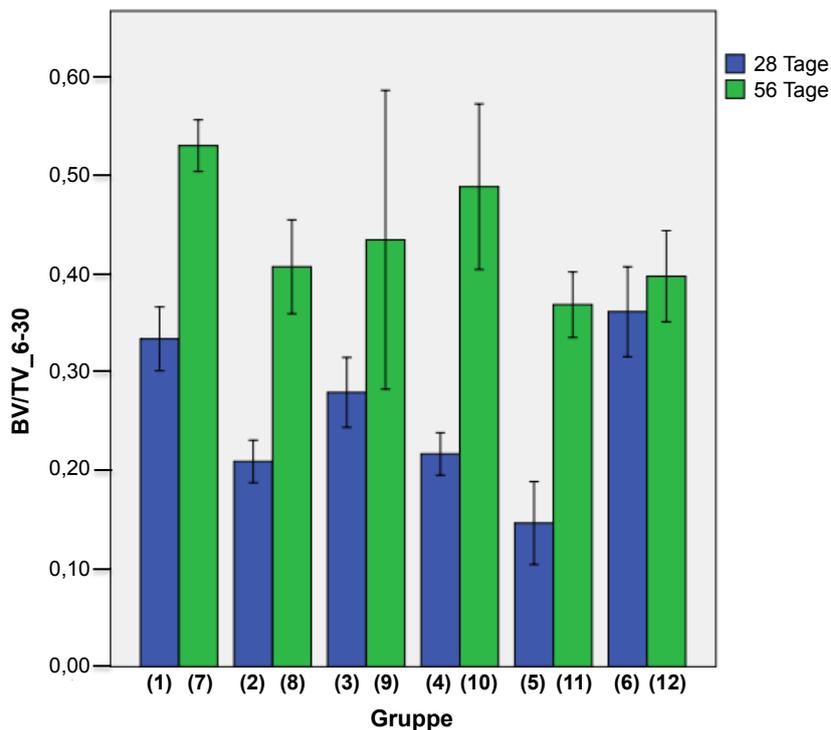


Abb. 19. Zielvariable BV/TV_6-30 – Säulendiagramm.

Variable BV/TV_6-30 (y-Achse) mit Darstellung des Mittelwerts (Oberkante der jeweiligen Säule) und Fehlerbalkens (+/- eines Standardfehlers) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse). Blaue Balken entsprechen 28 Tagen Einheilzeit, grüne Balken 56 Tage Einheilzeit.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Mittelwerte der Variablen BV/TV_6-30 konnten bei 28 Tagen Einheilzeit ($p=0,01$) jedoch nicht bei 56 Tagen Einheilzeit ($p=0,542$) signifikanten Unterschiede (Signifikanzniveau $p=0,05$) zwischen den therapeutischen Gruppen festgestellt werden. Insbesondere die 28 Tage Kontrollgruppe PDLLA sowie die 28 Tage Gruppe BMP 50 wiesen signifikant höhere BV/TV-Werte auf als die 28 Tage Triclosan-, COPROG 6- und BMP 150-Gruppe. Die BV/TV-Werte der 28 Tage COPROG 12-Gruppe waren gegenüber der 28 Tage BMP 150-Gruppe signifikant erhöht (Abb. 19, Tab. 4).

Die Beurteilung der Zielvariablen BV/TV_6-30 im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer therapeutischen Gruppe (28 Tage Gruppe vs. 56 Tage Gruppe) ergab, dass bei allen Gruppen eine Zunahme des Knochenvolumens erkennbar war. Lediglich bei der BMP 50-Gruppe war die Differenz gering und nicht statistisch signifikant (Signifikanzniveau $p=0,05$) (Abb. 19, Tab. 4).

BV/TV_6-30							
28 Tage	Gruppen-Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	6	6	5	5	5	5
	MW (±SD)	0,333 (±0,079)	0,209 (±0,053)	0,279 (±0,078)	0,217 (±0,048)	0,146 (±0,094)	0,361 (±0,102)
	Sig.*	*(2)(4)(5)	*(1)(6)	*(5)	*(1)(6)	*(1)(3)(6)	*(2)(4)(5)
56 Tage	Gruppen-Nr.	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	5	5	3	3	2	4
	MW (±SD)	0,530 (±0,059)	0,407 (±0,107)	0,434 (±0,263)	0,488 (±0,146)	0,368 (±0,047)	0,397 (±0,092)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
Differenz 56 Tage – 28 Tage	Gruppen-Nr.	(1) / (7)	(2) / (8)	(3) / (9)	(4) / (10)	(5) / (11)	(6) / (12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	MW	0,197*	0,198*	0,155*	0,271*	0,222*	0,036
	Sig.*	*	*	*	*	*	--

Tab. 4. Zielvariable BV/TV_6-30 – Messwerte und Statistik.

Gruppenmittelwerte (±SD) und statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen (*Signifikanzniveau $p=0,05$). Blau: 28 Tage Gruppen (1) bis (6). Grün: 56 Tage Gruppen (7) bis (12). Weiß: Differenzen zwischen Gruppenmittelwerten der 56 Tage Gruppen und der 28 Tage Gruppen jeweils gleicher Beschichtung (*Signifikanzniveau $p=0,05$).

▪ BV/TV_55-100

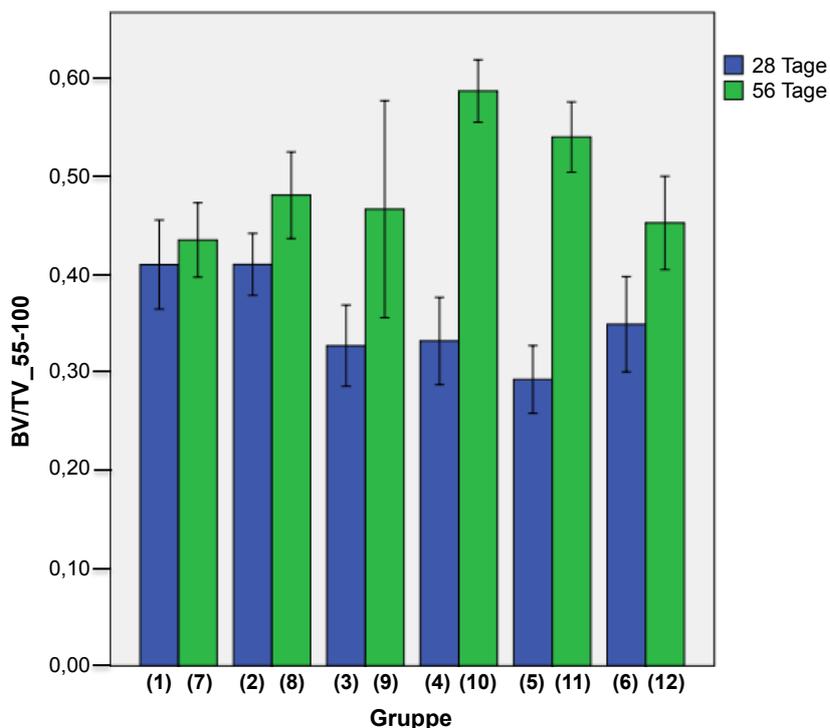


Abb. 20. Zielvariable BV/TV_55-100 – Säulendiagramm.

Variable BV/TV_55-100 (y-Achse) mit Darstellung des Mittelwerts (Oberkante der jeweiligen Säule) und Fehlerbalkens (+/- eines Standardfehlers) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse). Blaue Balken entsprechen 28 Tagen Einheitszeit, grüne Balken 56 Tage Einheitszeit.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Mittelwerte der Variablen BV/TV_55-100 konnten sowohl bei 28 Tagen Einheilzeit ($p=0,270$) als auch bei 56 Tagen Einheilzeit ($p=0,481$) keine signifikanten Unterschiede (Signifikanzniveau $p=0,05$) zwischen den therapeutischen Gruppen festgestellt werden. In der Tendenz war zu beobachten, dass beide COPROG- und BMP-Gruppen nach 28 Tagen eher geringere BV/TV-Werte aufweisen, nach 56 Tagen jedoch eher höhere Werte als die PDLLA-Kontrollgruppe und die Triclosan-Gruppe (Abb. 20, Tab. 5).

Die Beurteilung der Zielvariablen BV/TV_55-100 im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer therapeutischen Gruppe (28 Tage Gruppe vs. 56 Tage Gruppe) ergab, dass bei allen Gruppen eine Zunahme des Knochenvolumens erkennbar war. Diese war, wie bereits erwähnt, insbesondere bei den beiden COPROG- und BMP-Gruppen stark ausgeprägt und teils statistisch signifikant (Signifikanzniveau $p=0,05$) (Abb. 20, Tab. 5).

BV/TV_55-100							
28 Tage	Gruppen-Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	6	6	5	5	5	5
	MW (\pm SD)	0,409 ($\pm 0,112$)	0,410 ($\pm 0,077$)	0,327 ($\pm 0,093$)	0,331 ($\pm 0,099$)	0,292 ($\pm 0,077$)	0,349 ($\pm 0,109$)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
56 Tage	Gruppen-Nr.	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	5	5	3	3	2	4
	MW (\pm SD)	0,435 ($\pm 0,085$)	0,480 ($\pm 0,099$)	0,466 ($\pm 0,192$)	0,587 ($\pm 0,055$)	0,540 ($\pm 0,051$)	0,452 ($\pm 0,095$)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
Differenz 56 Tage – 28 Tage	Gruppen-Nr.	(1) / (7)	(2) / (8)	(3) / (9)	(4) / (10)	(5) / (11)	(6) / (12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	MW	0,026	0,070	0,139*	0,256*	0,248*	0,103
	Sig.*	--	--	*	*	*	--

Tab. 5. Zielvariable BV/TV_55-100 – Messwerte und Statistik.

Gruppenmittelwerte (\pm SD) und statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen (*Signifikanzniveau $p=0,05$). Blau: 28 Tage Gruppen (1) bis (6). Grün: 56 Tage Gruppen (7) bis (12). Weiß: Differenzen zwischen Gruppenmittelwerten der 56 Tage Gruppen und der 28 Tage Gruppen jeweils gleicher Beschichtung (*Signifikanzniveau $p=0,05$).

4.2.2.2 Knochendichte

▪ TMD_6-30

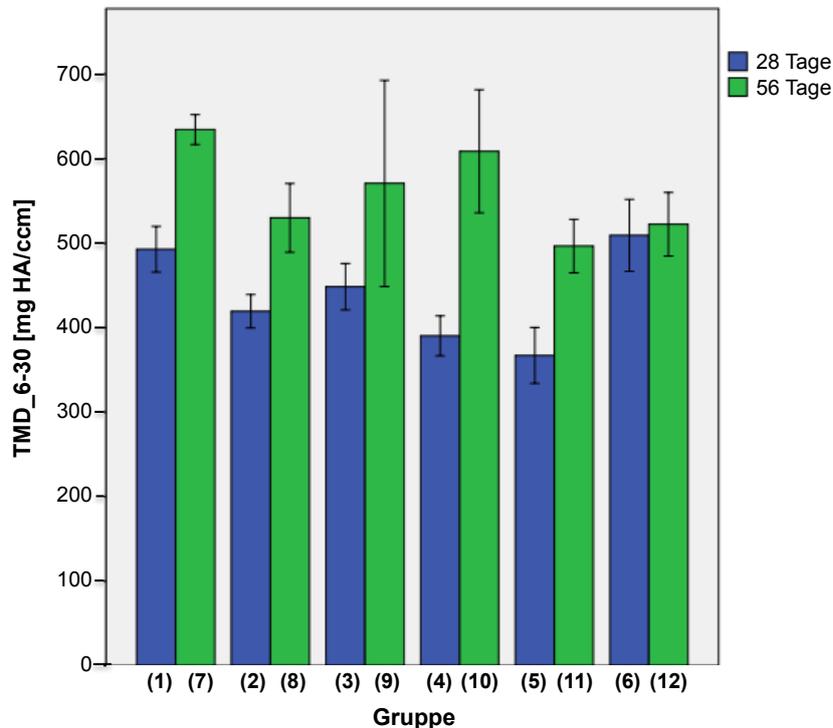


Abb. 21. Zielvariable TMD_6-30 – Säulendiagramm.

Variable TMD_6-30 (y-Achse) mit Darstellung des Mittelwerts (Oberkante der jeweiligen Säule) und Fehlerbalkens (+/- eines Standardfehlers) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse). Blaue Balken entsprechen 28 Tagen Einheitszeit, grüne Balken 56 Tage Einheitszeit.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Mittelwerte der Variablen TMD_6-30 konnten bei 28 Tagen Einheitszeit ($p=0,013$) jedoch nicht bei 56 Tagen Einheitszeit ($p=0,481$) signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau $p=0,05$) zwischen den therapeutischen Gruppe festgestellt werden.

Ähnlich zur Auswertung der Zielvariablen BV/TV_6-30 konnten bei der 28 Tage Kontrollgruppe PDLLA sowie der 28 Tage Gruppe BMP 50 signifikant höhere BV/TV-Werte im Vergleich zur 28 Tage COPROG 6- und BMP 150-Gruppe bzw. auch Triclosan-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 21, Tab. 6).

Die Beurteilung der Zielvariablen TMD_6-30 im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer therapeutischen Gruppe (28 Tage Gruppe vs. 56 Tage Gruppe) ergab, dass bei allen Gruppen eine Zunahme der Knochendichte erkennbar war. Diese war bei den Beschichtungsgruppen PDLLA, Triclosan und COPROG 6 statistisch signifikant (Signifikanzniveau $p=0,05$) (Abb. 21, Tab. 6).

TMD_6-30							
28 Tage	Gruppen-Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	6	6	5	5	5	5
	MW (±SD)	492,9 (±66,2)	419,4 (±48,8)	448,4 (±61,7)	390,3 (±52,9)	367,1 (±73,9)	509,3 (±95,4)
	Sig.*	*(4)(5)	*(6)	--	*(1)(6)	*(1)(6)	*(2)(4)(5)
56 Tage	Gruppen-Nr.	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	5	5	3	3	2	4
	MW (±SD)	634,6 (±39,7)	530,0 (±90,9)	570,8 (±211,3)	608,8 (±126,4)	496,6 (±44,9)	522,4 (±75,2)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
Differenz 56 Tage – 28 Tage	Gruppen-Nr.	(1) / (7)	(2) / (8)	(3) / (9)	(4) / (10)	(5) / (11)	(6) / (12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	MW	141,7*	110,6*	122,4	218,5*	129,5	13,1
	Sig.*	*	*	--	*	--	--

Tab. 6. Zielvariable TMD_6-30 – Messwerte und Statistik.

Gruppenmittelwerte (±SD) und statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen (*Signifikanzniveau p=0,05). Blau: 28 Tage Gruppen (1) bis (6). Grün: 56 Tage Gruppen (7) bis (12). Weiß: Differenzen zwischen Gruppenmittelwerten der 56 Tage Gruppen und der 28 Tage Gruppen jeweils gleicher Beschichtung (*Signifikanzniveau p=0,05).

▪ **TMD_55-100**

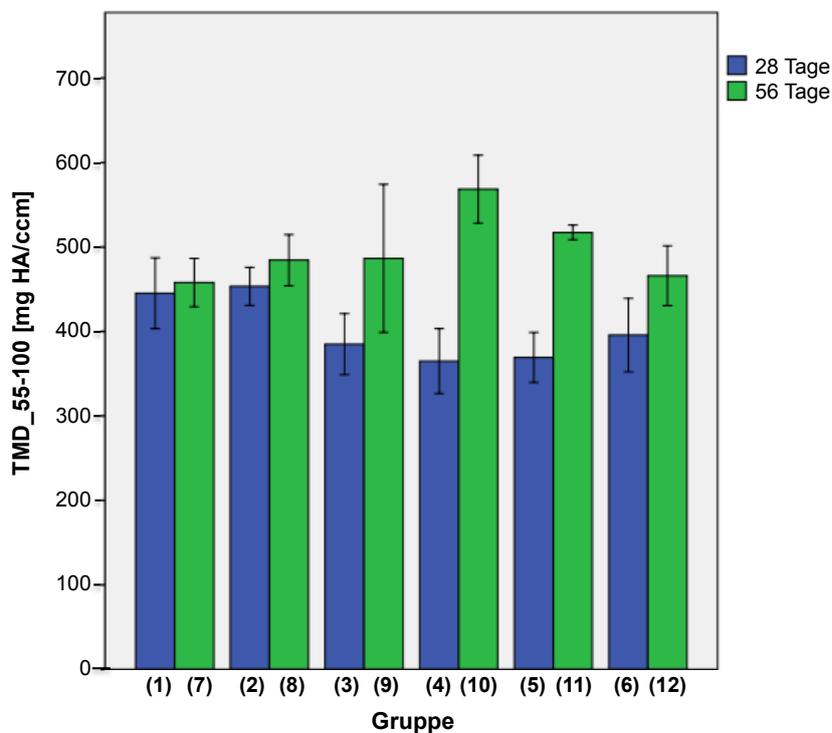


Abb. 22. Zielvariable TMD_55-100 – Säulendiagramm.

Variable TMD_55-100 (y-Achse) mit Darstellung des Mittelwerts (Oberkante der jeweiligen Säule) und Fehlerbalkens (+/- eines Standardfehlers) in Abhängigkeit von der Beschichtung (x-Achse). Blaue Balken entsprechen 28 Tagen Einheitszeit, grüne Balken 56 Tage Einheitszeit.

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Mittelwerte der Variablen TMD_55-100 konnten sowohl bei 28 Tagen Einheilzeit ($p=0,344$) als auch bei 56 Tagen Einheilzeit ($p=0,542$) keine signifikanten Unterschiede (Signifikanzniveau $p=0,05$) zwischen den therapeutischen Gruppe festgestellt werden. In der Tendenz war zu beobachten, dass die COPROG- und BMP-Gruppen nach 28 Tagen eher geringere BV/TV-Werte aufweisen, nach 56 Tagen jedoch eher höhere Werte als die PDLLA-Kontrollgruppe und die Triclosan-Gruppe (Abb. 22, Tab. 7).

Die Beurteilung der Zielvariablen TMD_55-100 im zeitlichen Verlauf innerhalb jeweils einer therapeutischen Gruppe (28 Tage Gruppe vs. 56 Tage Gruppe) ergab, dass bei allen Gruppen eine Zunahme der Knochendichte erkennbar war. Diese war bei den Beschichtungsgruppen COPROG 6 und BMP 150 statistisch signifikant (Signifikanzniveau $p=0,05$) (Abb. 22, Tab. 7).

TMD_55-100							
28 Tage	Gruppen-Nr.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	6	6	5	5	5	5
	MW (\pm SD)	445,4 (\pm 102,6)	453,4 (\pm 55,1)	385,0 (\pm 80,9)	364,9 (\pm 85,9)	369,2 (\pm 66,1)	395,8 (\pm 97,3)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
56 Tage	Gruppen-Nr.	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	n	5	5	3	3	2	4
	MW (\pm SD)	457,9 (\pm 63,9)	484,4 (\pm 67,6)	486,6 (\pm 151,9)	568,6 (\pm 69,7)	517,3 (\pm 12,4)	466,0 (\pm 70,8)
	Sig.*	--	--	--	--	--	--
Differenz 56 Tage – 28 Tage	Gruppen-Nr.	(1) / (7)	(2) / (8)	(3) / (9)	(4) / (10)	(5) / (11)	(6) / (12)
	Beschichtung	PDLLA	Triclosan	COPROG 12	COPROG 6	BMP 150	BMP 50
	MW	12,5	31,005	101,6	203,7*	148,1*	70,2
	Sig.*	--	--	--	*	*	--

Tab. 7. Zielvariable TMD_55-100 – Messwerte und Statistik.

Gruppenmittelwerte (\pm SD) und statistischen Signifikanz zwischen den Gruppen (*Signifikanzniveau $p=0,05$). Blau: 28 Tage Gruppen (1) bis (6). Grün: 56 Tage Gruppen (7) bis (12). Weiß: Differenzen zwischen Gruppenmittelwerten der 56 Tage Gruppen und der 28 Tage Gruppen jeweils gleicher Beschichtung (*Signifikanzniveau $p=0,05$).

4.2.2.3 Korrelationen Knochenvolumen mit Knochendichte

Beim Vergleich der Messwerte der Volumensvariablen (BV/TV) mit den Messwerten der Knochendichtevariablen (TMD) zeigten sich sowohl innerhalb der 60-300 μ m-Zone (28 Tage Gruppen: Korrelationskoeffizient = 0,957, $p<0,01$ und 56 Tage Gruppen: Korrelationskoeffizient = 0,994, $p<0,01$) als auch der 550-1000 μ m-Zone (28 Tage Gruppen: Korrelationskoeffizient = 0,968, $p<0,01$ und 56 Tage Gruppen:

Korrelationskoeffizient = 0,978, $p < 0,01$) jeweils eine sehr starke positive Korrelationen (Tab. 8 und 9).

28 Tage Gruppen (n=32)					
	ATT%	BV/TV_6-30	TMD_6-30	BV/TV_55-100	TMD_55-100
ATT%	1	0,651*	0,700*	0,273	0,310
BV/TV_6-30	0,651*	1	0,957*	0,432*	0,381*
TMD_6-30	0,700*	0,957*	1	0,434*	0,436*
BV/TV_55-100	0,273	0,432*	0,434*	1	0,968*
TMD_55-100	0,310	0,381*	0,436*	,968*	1

Tab. 8. Korrelation der Zielvariablen untereinander – 28 Tage Gruppen.

Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und statistischer Signifikanzen (*Signifikanzniveau $p=0,05$).

56 Tage Gruppen (n=22)					
	ATT%	BV/TV_6-30	TMD_6-30	BV/TV_55-100	TMD_55-100
ATT%	1	0,642*	0,642*	-0,365	-0,276
BV/TV_6-30	0,642*	1	0,994*	-0,056	0,056
TMD_6-30	0,642*	0,994*	1	-0,063	0,058
BV/TV_55-100	-0,365	-0,056	-0,063	1	0,978*
TMD_55-100	-0,276	0,056	0,058	0,978*	1

Tab. 9. Korrelation der Zielvariablen untereinander – 56 Tage Gruppen.

Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und statistischer Signifikanzen (*Signifikanzniveau $p=0,05$).

4.2.3 Auswertung – Histologie und Korrelation zur μ CT

Bei der Korrelation der Mikro-CT Zielvariablen ATT% mit der histomorphometrischen Zielvariablen BIC zeigte sich anhand von 24 Proben eine lineare und statistisch signifikante ($p < 0,01$) Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,783. Die durchschnittliche Differenz der μ CT-Variablen ATT% und der Histomorphometrie-Variablen BIC betrug $-0,209 \pm 0,112$ ($p < 0,01$). Nach linearer Regression ergab sich folgende Regressionsgleichung: $y = 16,1 + 1,1 * x$ (Abb. 23).

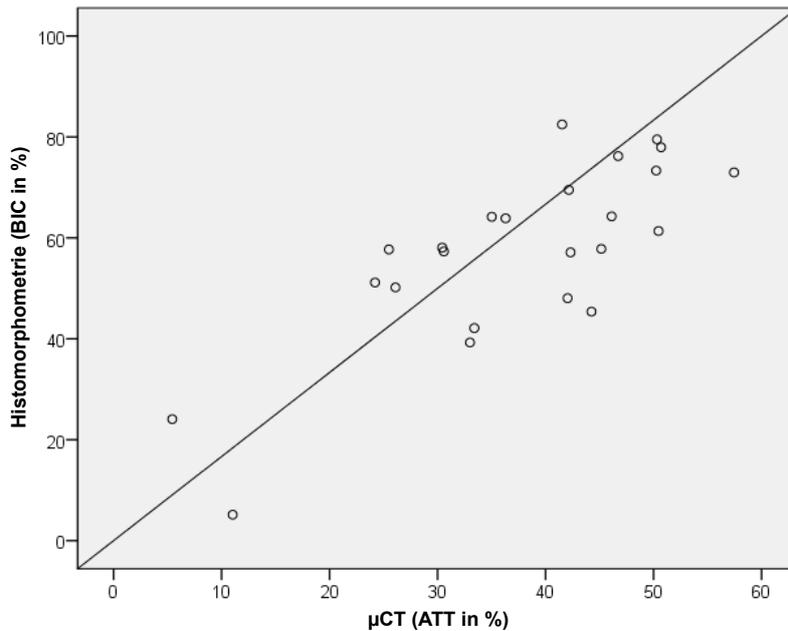


Abb. 23. Korrelation μ CT-Variable ATT% mit Histomorphometrie-Variable BIC.

Darstellung als Streudiagramm mit Regressionsgerade. Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,783 ($p < 0,01$).

Das Bland-Altman-Diagramm zeigt die durchschnittliche Differenz der μ CT-Variablen ATT% und der Histomorphometrie-Variablen BIC von -0,209 als rote horizontale Mittelwertlinien an sowie die Begrenzungen des Übereinstimmungsbereiches, „limits of agreement“ als obere und untere gestrichelte Linien (Fig. X). Die Lage der Mittelwertlinie bei -0,209 stellt einen systematischen und statistisch signifikanten ($p < 0,01$) Messfehler dar. Es zeigt sich eine moderate Schwankungsbreite der Abweichungen (siehe Übereinstimmungsbereich) vom Mittelwert der Differenzen (Abb. 24).

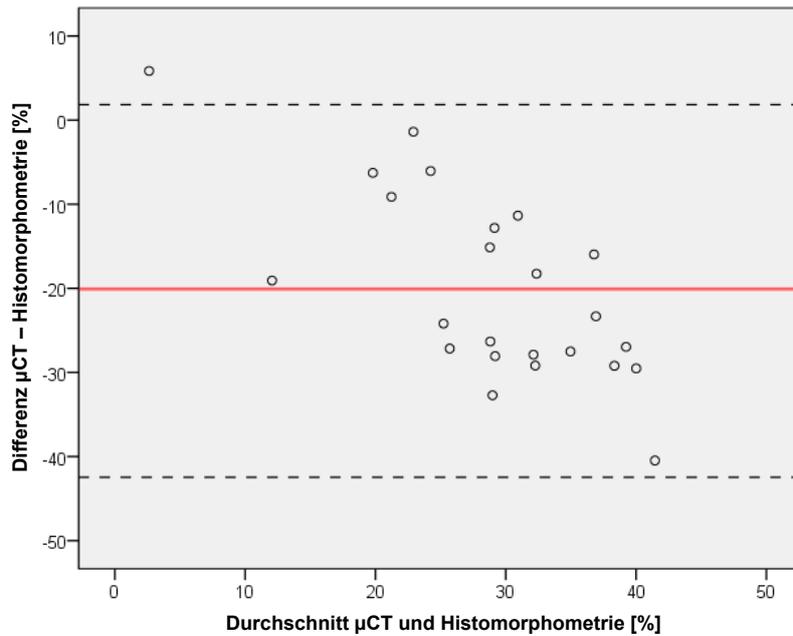


Abb. 24. Bland-Altman-Diagramm.

Vergleich der beiden Messmethoden μ CT und Histomorphometrie zur Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes. Darstellung der Durchschnittswerte von μ CT- und Histomorphometrie-Werten je Implantatmessung (x-Achse in %) sowie der Differenzen von μ CT- und Histomorphometrie-Werten je Implantatmessung (y-Achse, in %). Die horizontale rote Linie entspricht der Mittelwertlinie, die gestrichelten Linien entsprechen den Begrenzungen des Übereinstimmungsbereiches, „limits of agreement“.

5 Diskussion

5.1 In Vitro-Phase: Biodegradierbare Beschichtung von Titanoberflächen

Wachstums- und Differenzierungsfaktoren spielen bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der Regeneration knöchernen Gewebes (Devescovi et al. 2008, Santo et al. 2013a). Im Schrifttum finden sich eine Reihe unterschiedlichster Strategien um diese Faktoren, insbesondere beim Vorliegen kompromittierender Einflüsse, gewinnbringend einzusetzen (Santo et al. 2013b). Dabei ist es nicht nur von grundlegender Bedeutung, welche Botenstoffe in welchen Situationen Anwendung finden, sondern auch wie die Botenstoffe an ihren Wirkort gebracht werden. Gewünscht ist eine Applikationsform, welche die Wirkung von Faktoren bestmöglich gewährleistet und Nebenwirkungen weitestgehend minimiert (Schmidmaier 2002). Entscheidend ist, am richtigen Ort über eine geeignet lange Zeit den Wirkstoff in der richtigen Konzentration vorhalten zu können (Santo et al. 2013a).

Wie in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Kolk ausführlich beschrieben und diskutiert (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011, Schulze 2011) nehmen BMPs eine herausragende Stellung unter den Zytokinen hinsichtlich der Förderung der Knochenregeneration ein. Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Möglichkeiten um BMPs zur Verbesserung der periimplantären Knochenheilung bzw. Osseointegration bereitzustellen.

Zum einen können BMPs in Trägern wie Kollagenschwämmen oder anderen Matrices in der unmittelbaren Umgebung um ein Implantat herum appliziert werden (Sigurdsson et al. 1997, Welch et al. 1998 Jones et al. 2006, Smeets et al. 2009, Lee et al. 2013, Lu et al. 2013). Trotz nachweisbarer Effekte auf die Knochenregeneration scheinen solche Techniken für den klinischen Einsatz nur bedingt geeignet zu sein (Schmidmaier 2002). Eine andere Möglichkeit der Applikation besteht darin, BMPs an der Titanoberfläche von orthopädischen und mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Implantaten zu immobilisieren und somit diese Titanoberflächen zu funktionalisieren.

Die Immobilisierung auf Titanoberflächen kann am einfachsten durch eine direkte Adsorption von BMP auf Titan erreicht werden (Jennissen et al. 1999, Becker et al. 2006, Freilich et al. 2008, Wikesjö et al. 2008, Huh et al. 2011). Zwar sind

Adsorptionsbeschichtungen unkompliziert durchführbar und die Bioaktivität von BMPs wird kaum abgeschwächt, es ist jedoch zu beachten, dass nur schwache Bindungskräfte zwischen BMPs und der Titanoberfläche herrschen und eine eher unkontrollierte Desorption von der Titanoberfläche aus zu erwarten ist (De Jonge et al. 2008). Durch die Verwendung einer Abdeckschicht kann die direkte Exposition adsorbierter Proteine zum periimplantären Bereich hin vermindert werden. Solche Abdeckschichten können als einfache Beschichtungsergänzung fungieren und zu einer kontrollierten Proteinabgabe ins umgebende Milieu beitragen (Kim et al. 2013).

Kovalente Verbindungen sind eine weitere gebräuchliche Möglichkeit der Immobilisierung von BMPs an Titanoberflächen (Jennissen et al. 1999, Voggenreiter et al. 2001, Puleo et al. 2002, Becker et al. 2006, Lorenz et al. 2011). Dabei wird die Titanoberfläche derart modifiziert, dass funktionelle Gruppen wie Amino- oder Aldehydgruppen an der Titanoberfläche erzeugt werden, über welche dann Proteine wie BMP-2 kovalent binden können (Böing 2003, Duan und Wang 2006). Hierbei wirken stärkere Bindungskräfte zwischen BMPs und Titanoberflächen als bei nicht-kovalenten Bindungen wie sie bei Adsorptionsverfahren zum Tragen kommen (De Jonge et al. 2008). Ein gut untersuchtes und gebräuchliches weiteres Prinzip zur Immobilisierung von BMP-2 auf Titanoberflächen ist dessen Adsorption auf biomimetischen Beschichtungen wie Calciumphosphat- oder Kollagenbeschichtungen oder die Inkorporation in solche Beschichtungen (Freilich et al. 2008, Cole et al. 1997, Vehof et al. 2001, Liu et al. 2005, Sachse et al. 2005, Schliephake et al. 2005, Liu et al. 2007a, Liu et al. 2007b, Wen et al. 2011, Bae et al. 2012, He et al. 2012, Hunziker et al. 2012, Lee et al. 2014, Yoo et al. 2014).

Eine weitere Methode zur Immobilisation und späteren Abgabe von BMPs in die periimplantäre Umgebung ist die Inkorporation von BMPs in biodegradierbare Polymerbeschichtungen wie beispielsweise die in vorliegender Arbeit verwendete PDLLA-Beschichtungstechnologie (Schmidmaier et al. 2001, Kolk 2007, Kolk et al. 2011) oder Chitosan-Beschichtungen (Abarategi et al. 2009, Poth et al. 2015).

Darüber hinaus haben sich Multilayer- beziehungsweise „Layer-by-Layer“- Konzepte zur Immobilisierung von BMP-2 bewährt. Dabei wird abwechselnd eine positiv geladene und eine negativ geladene Schicht mit dem Ziel aufgebracht, einen ultradünne mehrschichtigen Polyelektrolytfilm zu erzeugen (Crouzier et al. 2009, Macdonald et al. 2011, Shah et al. 2011, Guillot et al. 2013). Vorteil dieses

Verfahrens ist die Möglichkeit eine gleichmäßige dünne Beschichtung auch auf eine komplexe Oberflächengeometrie aufbringen zu können, wobei die gewünschten Proteineigenschaften aufgrund des schonenden Verfahrens beibehalten werden (Wood et al. 2006, Macdonald et al. 2010).

Wie in der Einleitung beschrieben, bieten auch gentransfer-assoziierte Strategien erfolgsversprechende Lösungsansätze um BMPs kontinuierlich über einen größeren Zeitraum im Bereich einer Implantatoberfläche freizusetzen. Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten der Implementierung eines Genvektors in ein Kollagen-Avidin-Gel (Chen et al. 2013) und „Layer-by-Layer“ Verfahren, bei denen sich schichtweise kationische Lipid-Plasmid-Komplexe mit anionischer Hyaluronidase abwechseln (He et al. 2013, Jiang et al. 2013), besteht die Möglichkeit der Integration von Genvektoren in degradierbare Polymere wie durch Qiao et al. (2013) oder durch Kolk und Mitarbeiter in Vorstudien zur vorliegenden Arbeit (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011, Kolk et al. 2011) demonstriert.

Während man bei den ersten in vitro- und in vivo- Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kolk das als Arzneimittelträger fungierende PDLLA auf Titanfolien aufbrachte (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011), wurden in einer folgenden Arbeit von Schulze (2011) erstmalig dentale Titanimplantate mit PDLLA beschichtet. Die Beschichtungen erfolgten hierbei im Tauchverfahren, einer Kaltbeschichtungstechnologie, bei dem Implantate in eine PDLLA-Lösung eingetaucht und anschließend getrocknet werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte ebenfalls zunächst ein Eintauchverfahren analog zur Vorarbeit von Schulze (2011). Hierdurch resultierte jedoch eine ungleichmäßige Beschichtung der Implantatoberflächen. Das alternativ gewählte Pipettierverfahren führte zu einem ebenso inhomogenen Beschichtungsergebnis. Dies gab den Anlass über weitere Beschichtungsverfahren nachzudenken. In Kooperation mit einem externen Partner wurde ein Sprühverfahren getestet, wie es bei der Beschichtung kardialer Stents verwendet wird. Die hierdurch erreichte Beschichtung war sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch als sehr gleichmäßig über die komplette Titanoberfläche verteilt einzustufen. Da mit diesem Verfahren, unter den Bedingungen des vorliegenden Studiensettings, keine sterile Applikation der Beschichtung sicher zu bewerkstelligen war und es nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die COPROGs durch die Druckverhältnisse während des Sprühvorgangs ihre biologischen Eigenschaften einbüßen, wurde, für alle Fragestellungen der Studie, das im Methodenteil beschriebene Agarose-Pivot-

Verfahren verwendet. Dieses kostengünstige Verfahren war mit den der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Mitteln praktikabel durchführbar. Es resultierten, analog zum Sprühverfahren, deutlich homogenere Beschichtungen als durch die Eintauch- oder Pipettiermethode. Da es sich um ein Kaltbeschichtungsverfahren handelt, ist es für den gentherapeutischen Einsatz und den Einsatz von Wachstums- und Differenzierungsverfahren geeignet, weil es nicht zur hitzebedingten Denaturierung von Proteinen oder enzymatischer Schädigung kommt (Schmidmaier et al. 2001). Zudem entsteht, anders als bei einem Sprühverfahren, kein nennenswerter mechanischer Stress, welcher möglicherweise die biologische Aktivität der Wirkstoffe einschränken könnte.

Bei der Evaluation der Reproduzierbarkeit der Beschichtungsmenge auf den Titanoberflächen kam ein nuklearmedizinisches Verfahren zur Anwendung. Hierfür wurde das durchschnittliche Verhältnis der auf den Implantaten aufgetragenen Menge radioaktiv markierter Plasmid DNA (COPROGs) zu der, beim Agarose-Pivot-Verfahren insgesamt eingesetzten Menge an radioaktiv markierter Plasmid DNA, ermittelt. Insgesamt verblieb eine Menge von $38,53 \% \pm 12,33 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) auf der Titanoberfläche. Die als relativ hoch zu bewertende Standardabweichung deutet daraufhin, dass die Reproduzierbarkeit und Vorhersehbarkeit der aufgetragenen Plasmidmenge limitiert ist. Durch alternative Verfahren zur Applikation biodegradierbarer Polymer-Beschichtungen, wie etwa dem getesteten Sprühverfahren, könnte die Reproduzierbarkeit der auf die Implantatoberflächen aufgetragenen Beschichtungs- und letztlich Wirkstoffmenge verbessert und so die lokale Wirkstoffkonzentration besser kontrolliert werden. Zuvor sollte jedoch, insbesondere bei einem Sprühverfahren, getestet werden, ob es zur Beeinträchtigung der biologischen Aktivität von BMPs oder Plasmiden kommt. Darüber hinaus erscheinen generelle Alternativen zu degradierbaren Beschichtungen, wie die beschriebenen „Layer-by-Layer“ Verfahren als vielversprechender Lösungsansatz um homogene Beschichtungen mit reproduzierbarer Beschichtungsmenge auf Implantatoberflächen zu erreichen (He et al. 2013, Jiang et al. 2013).

Bei der Auswertung der mechanischen Stabilität der radioaktiv markierten COPROG-Beschichtung verblieben nach Ein- und Ausdrehvorgang an einer Rinderrippe auf den Implantaten durchschnittlich $58,01 \% \pm 8,56 \%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) der initial aufgetragenen Beschichtung. Es kann als

zufriedenstellend angesehen werden, dass mehr als die Hälfte der eingebrachten Beschichtung auf den Implantaten verbleibt. Beim alleinigen Eindrehen der Implantate ist von einem noch höheren Mittelwert auszugehen. Die Standardabweichung ist dabei als moderat hoch einzustufen, was die Vorhersehbarkeit der letztlich vorhandenen Beschichtungsmenge einschränkt, jedoch für eine klinische Anwendung noch akzeptabel erscheinen lässt. Während also die vorliegende Varianz bei der Beschichtungsmenge der Titanoberflächen vom Beschichtungsverfahren abhängt und prinzipiell durch oben genannte andere Beschichtungsvorgänge (z.B. Sprühverfahren) oder Beschichtungsarten („Layer-by-Layer“) verbesserbar erscheint, ist die Varianz der verbliebenen Menge COPROG nach dem Eindrehen der Implantate durch die mechanische Stabilität der Beschichtung als solche bedingt und im Wesentlichen nur durch eine generell andere Beschichtungsart modifizierbar.

5.2 In Vivo-Phase

5.2.1 Diskussion Methodik – Tiermodell

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war, in vivo zu zeigen, welchen Einfluss dentale Implantate, die mit dem in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kolk (Kolk 2007, Stöhrer 2008, Drechsler 2010, Bissinger 2011, Kolk et al. 2011, Schulze 2011) etablierten nicht-viralen, geschützten und für BMP-2 kodierenden Genvektor COPROG in Kombination mit der Trägersubstanz PDLLA beschichtet waren, auf die Implantateinheilung haben.

Es existieren eine Reihe unterschiedlicher Tiermodelle zur in vivo Beurteilung der periimplantären Knochenregeneration bzw. Osseointegration von dentalen Implantaten. Zu unterscheiden sind grundsätzlich Kleintiermodelle, bei welchen als Versuchstiere insbesondere Hasen und Ratten eingesetzt werden von Großtiermodellen, bei denen vor allem Hunde, Ziegen, Schweine, Miniaturschweine und Schafe verwendet werden (Stadlinger et al. 2012). Während Kleintiermodelle für eine erste Einschätzung zahlreicher unterschiedlicher Parameter nützlich sind, können im Rahmen von Großtierversuchen einige wenige, zuvor als geeignet taxierte Parameter unter menschenähnlicheren Bedingungen untersucht werden (Stadlinger et al. 2012).

Nachdem die Wirksamkeit des verwendeten Gentransfersystem auf die Knochenregeneration in einem Kleintierexperiment mit Sprague-Dawley-Ratten prinzipiell gezeigt werden konnte, sollte für die vorliegende Studie ein sowohl physiologisch als auch anatomisch menschenähnlicheres Tiermodell etabliert werden, um die periimplantäre Regeneration im Kieferknochen unter Verwendung handelsüblicher Implantate simulieren zu können. Somit musste ein Großtiermodell zum Einsatz kommen, das es ermöglichte, entsprechend der humanmedizinischen klinischen Anwendung, realistisch dimensionierte Implantate in der regulären Position, dem Kieferknochen, mit einem handelsüblichen humanmedizinischen Instrumentarium einzusetzen.

Aus mehreren weiteren, im Folgenden aufgeführten Gründen, fiel die Entscheidung Miniaturschweine als Versuchstiere bei vorliegender Arbeit einzusetzen. Miniaturschweine weisen dem Menschen vergleichbare physiologische, pathophysiologische und anatomische Eigenschaften auf (Laiblin et al. 1979, Eitel et al. 1981, Swindle et al. 1988, Hönig und Merten 1993, Wang et al. 2007). Insbesondere Ähnlichkeiten der Knochenphysiologie, der Knochenarchitektur und der Knochenheilung zeichnen Miniaturschweine aus. So wird über eine menschenähnliche Knochenregenerationsrate von ca. 1,2 – 1,5 mm pro Tag (Laiblin et al. 1979, Aerssens et al. 1998) sowie über eine, dem Menschen ähnliche Knochenstruktur berichtet (Beddoe 1978, Aerssens et al. 1998).

Nicht zuletzt wurden Schweine bzw. Minischweine in einer Reihe von Studien, welche die Wirkung von BMP-2 (Liu et al. 2007a, Stadlinger et al. 2007, Hunziker et al. 2012) oder entsprechenden Gentransfersystemen (Thorwarth et al. 2004, Lutz et al. 2008) auf die periimplantäre Heilung untersuchen, als Versuchstiere verwendet, was der Vergleichbarkeit der in der vorliegenden Arbeit gewonnen Daten zugutekommt.

Letztlich wurden für dieses Versuchsvorhaben Göttinger Miniaturschweine gewählt, die zum Zeitpunkt der Implantation ausgewachsen waren, um eine dem erwachsenen, gesunden Menschen entsprechende Knochenheilung zu simulieren. In der gängigen Literatur werden in der überwiegenden Mehrzahl ausgewachsene Minischweine verwendet (Buser et al. 2004, Ferguson et al. 2006, Liu et al. 2007a, Hunziker et al. 2012).

5.2.2 Diskussion Methodik – Studiendesign

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, den Einfluss dentaler Implantate, die mit einer für BMP-2 kodierenden Genformulierung beschichtet waren, auf die periimplantäre Knochenregeneration in vivo zu untersuchen. Da die Insertion der dentalen Implantate möglichst analog zu einem humanmedizinischen Eingriff ablaufen sollte und auch weitere Parameter wie Knochenheilung, Knochenstruktur und Physiologie menschenähnlich sein sollten, fiel die Wahl der Versuchstiere auf Miniaturschweine (vgl. Kapitel zuvor).

Zuerst erfolgten die Extraktionen des, soweit vorhanden, ersten Prämolaren, des dritten Prämolaren sowie der ersten Molaren. Nach einer Heilungsphase von zwei Monaten konnte von einer fortgeschrittenen knöchernen Regeneration der Alveolen ausgegangen werden. Hierbei ist anzumerken, dass einige Autoren Ausheilungsphasen von bis zu sechs Monaten vor der eigentlichen Implantation bevorzugen (Buser et al. 2004, Ferguson et al. 2006, Liu et al. 2007a, Hunziker et al. 2012).

Es wurden zwei Messzeitpunkte festgelegt, um die Zielvariablen der Arbeit auch in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf bewerten zu können. Der 28. und 56. postoperative Tag sind gängige Zeitpunkte um die frühe Einheilphase abzubilden und werden in einer Reihe anderer Studien verwendet (Buser et al. 1998, 1999, 2004, Li et al. 2002, Ferguson et al. 2006, Ferguson et al. 2008, Lutz et al. 2008).

Um die Ergebnisse nicht durch Erkrankung oder Tod eines einzelnen Versuchstieres zur beeinflussen, wurden die unterschiedlichen therapeutischen Gruppen gleichmäßig in einem Rotationsverfahren auf die Minischweine verteilt. Bei jedem Tier kamen sechs unterschiedliche Gruppen zur Anwendung. Ebenso erfolgte eine entsprechende Verteilung im Rotationsprinzip auf die unterschiedlichen Implantatinsertionsstellen. Um eine gegenseitige Beeinflussung durch die Wirkstoffe ausschließen und somit die einzelnen beschichteten Implantate als voneinander unabhängige Variablen auswerten zu können, wurde zwischen den Insertionsstellen mindestens ein natürlicher Zahn belassen. Die Osseointegrationrate zeigte sich statistisch als unabhängig von der Implantatinsertionsstelle, so dass alle Implantationsorte prinzipiell als geeignet erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Implantate mit einem Durchmesser von 4,1 mm und einer Länge von 8,0 mm des Oktagon Implantatsystems der Fa. Hager & Meisinger (Neuss, Deutschland) verwendet. Durchmesser und Länge entsprechen

Maßen, welche in der humanmedizinischen klinischen Routine häufig zum Einsatz kommen. Die Implantate entsprechen der Geometrie des, insbesondere im deutschsprachigen Raum, weit verbreiteten Straumann Standard Plus® Implantatsystems (Fa. Straumann, Freiburg, Deutschland).

Die Insertion der Implantate erfolgte im Oberkiefer der Minischweine, da hier mit einem höheren Anteil trabekulären Knochens und somit verminderter Dichte bzw. einer minderen Knochenqualität im Vergleich zum Unterkiefer auszugehen war und somit potentiell ein größerer Effekt der neuartigen Beschichtungen auf die periimplantäre Umgebung erwartet wurde. Der Oberkiefer von Miniaturschweinen ist darüber hinaus ein geschätztes Defektmodell zur Untersuchung periimplantärer Heilungsvorgänge (Buser et al. 1998, 1999, 2004, Li et al. 2002, Gahlert et al. 2007, Ferguson et al. 2006, Liu et al. 2007a, Hunziker et al. 2012).

Bei der intraoralen Insertion von Implantaten im Rahmen von Großtiermodellen, wie bei Schweinen, Minischweinen und Schafen ist eine gute Mundhygiene nicht ohne Weiteres zu verwirklichen (Smeets et al. 2009, Stadlinger et al. 2012). Deshalb erscheint eine geschlossene Implantateinheilung von Vorteil zu sein. Ein weiterer Aspekt für die ungestörte Implantateinheilung ist eine angepasste und nicht zu harte Nahrung, durch die unkontrollierbare mechanische Reize auf die Wundgebiete und die Bereiche der Implantationsstellen vermieden werden können.

Als möglicher Faktor für die relativ hohe Anzahl nicht osseointegrierter Implantate mag die in diesem Versuch mangelnde Mundhygiene der Versuchstiere in Kombination mit mechanischer Reizung der Mundschleimhaut durch Nahrung oder Gegenständen wie Beißketten, die als Beschäftigungsmöglichkeiten dienten, verantwortlich sein. Um Mundhygienemaßnahmen durchführen zu können müssten Versuchstiere regelmäßig sediert werden, was jedoch in Bezug auf eine zusätzliche Belastung der Tiere fragwürdig erscheint. Denkbar wäre prinzipiell die Insertion und Fixierung von Verbandplatten, welche relevante Schleimhautareale vor inadäquater Belastung schützen könnten. Es kann jedoch gemutmaßt werden, dass sich die Hygienesituation durch die Verwendung von Verbandplatten aufgrund möglicher Nahrungsretentionen sogar eher verschlechtern würde. Zudem bestünde die Gefahr einer erhöhten mechanischen Belastung im Bereich der Implantatinsertionsstellen sowie die Gefahr der Entstehung von Drucknekrosen. Deshalb wurde im vorliegenden Tierversuch von der Verwendung von Verbandplatten abgesehen.

In einem periimplantären Defektmodell am Hund, bei dem die Defekte mit an CaP

absorbiertem und in CaP integriertem BMP-2 aufgefüllt wurden, ergab sich eine noch höhere Rate nicht osseointegrierter Implantate als in der vorliegenden Studie (Smeets et al. 2009). Als entscheidender Grund wird der transgingivale Einheilungsmodus der Implantate gesehen und auf die kritische mechanische Belastungssituation im Tiermodell verwiesen. Das in dieser Studie verwendete Großtiermodell mit orthotoper Implantatpositionierung im Kieferbereich muss schlussfolgernd als vulnerabel eingestuft werden und schränkt Rückschlüsse auf das Osseointegrationsverhalten beim Menschen ein. Dies sollte bei der Auswahl des Tiermodelles in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Als alternative Implantatinsertionsregionen bei Schweinen stehen prinzipiell die Schädel- bzw. Stirnregion zur Verfügung (Schlegel et al. 2006, Lutz et al. 2010).

5.2.3 Diskussion Methodik – Mikrocomputertomographie

Der Knochen-Implantat-Kontakt, BIC, ist der wichtigste Parameter bei der Beurteilung der Osseointegration von Implantaten. Nach wie vor ist dabei die histomorphometrische Analyse der Goldstandard zur Evaluation des BIC (Bernhardt et al. 2012). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, bedient sich mittlerweile eine Reihe an Studien der mikrocomputertomographischen Auswertung zur Bestimmung des BIC, wobei sich teils gute Übereinstimmungen zwischen Histomorphometrie und Mikro-CT belegen lassen. Für die vorliegende Studie fiel die Wahl des Auswerteverfahrens, nicht zuletzt aufgrund der ermutigenden Ergebnisse der bereits zitierten Studien, auf die Mikro-CT. Um die Validität des Verfahrens einordnen zu können, wurde eine Konkordanzanalyse zum Vergleich der Übereinstimmung beider Methoden durchgeführt.

Zunächst erfolgten die Darstellung der beobachteten Messwertpaare von Histomorphometrie und Mikro-CT mittels Streudiagramm sowie die Darstellung einer Regressionsgeraden wobei sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen erkennen ließ. Der errechnete Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug hierbei 0,783. Im Bland-Altman-Diagramm wurden Differenzen der beiden Methoden gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen. Dabei wurden auch der Mittelwert aller Differenzen sowie der Mittelwert der Differenz plus/minus 1,96 mal die Standardabweichung der Differenzen („limits of agreement“) als drei horizontale Linien eingezeichnet (Kwiecien et al. 2011). Es ergab sich eine statistisch signifikante durchschnittliche Differenz der μ CT-Variablen ATT% und der Histomorphometrie-

Variablen BIC von -0,209, erkennbar an der entsprechenden Abweichung der Mittelwertlinie der Differenzen deutlich von 0 und somit eine systematische Abweichung für die beiden Messmethoden. Da zwischen den Methoden ein funktionaler Zusammenhang besteht, ist dieser systematische Messfehler jedoch, unter Verwendung der entsprechenden Regressionsgleichung, korrigierbar. Die Standardabweichung der Differenzen lag bei 0,112 und somit kann davon ausgegangen werden, dass die Differenzen in 95 % der Fälle betragsmäßig kleiner waren als 0,224, d.h. dass der Übereinstimmungsbereich („limits of agreement“) einem Intervall von [-0,220; 0,220] entsprach. Es bestand daher eine eher hohe Schwankungsbreite. Dieser Bereich ist im Gegensatz zur o.g. systematischen Abweichung der Messwerte nicht korrigierbar.

Vergleich Mikro-CT und Histomorphometrie in der Literatur

Es liegen mittlerweile einige Studien vor, welche die mikrocomputertomographische mit der histomorphometrischen Auswertung und/oder mit biomechanischen Parametern statistisch korrelieren. Butz et al. (2006) zeigten in einem Rattenmodell hinsichtlich spongiösen Knochens im unmittelbaren periimplantären Bereichs von 0-24 μm um Implantate einen signifikanten Unterschied der Mikro-CT Messwerte zu den Messwerten der Histomorphometrie, der Korrelationskoeffizient betrug -0,101. In einem periimplantären Bereich von 24-80 μm , der durchaus dem Parameter ATT% in der vorliegenden Studie (20-50 μm) ähnlich ist, fand sich eine Korrelation von 0,817. In den Bereichen von 80-160 μm und 160-240 μm ergaben sich noch höhere Korrelationen von 0,898 und 0,933. Hierbei sei angemerkt, dass seitens der Histomorphometrie für jeden Abschnitt ebenfalls die BV/TV-Werte ermittelt wurden. Li, Y.F. et al. (2013) vergleichen im Rattenmodell klassische histomorphometrische BIC-Werte sowie BV/TV-Werte mit entsprechenden Mikro-CT Werten. Dabei wird dem BIC der sogenannte Wert „percent osseointegration (%OI)“ als mikrocomputertomographisches Pendant gegenübergestellt. Dieser beschreibt das Verhältnis der Knochenvoxel zu den Gesamtvoxel, sprich BV/TV, welche sich in direktem Kontakt mit dem Implantat befinden: „The %OI was calculated as the ratio between bone and total voxels in direct contact with the implant“ (Li, Y.F. et al. 2013). Die Definition von „%OI“ bezieht sich auf die Beschreibung von Gabet et al. 2006 und wird auch bei Gao et al. 2009 herangezogen, es geht jedoch nicht eindeutig daraus hervor, welcher periimplantäre Bereich genau gemessen wird und ob ein kleiner, sich

unmittelbar an die Implantatoberfläche anschließender Artefaktbereich ausgeschlossen wurde, was anzunehmen ist. Es wurden Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,775 hinsichtlich des unmittelbaren Knochen-Implantat-Kontaktes - BIC und %OI - sowie von 0,802 bezüglich der BV/TV-Werte ermittelt (Li, Y.F. et al. 2013).

Ebenfalls im Rattenmodell stellen Stadlinger et al. 2013 klassische histomorphometrische BIC- und BV/TV-Werte den entsprechenden Mikro-CT Werten gegenüber. Dabei wird explizit ein „mikrocomputer-tomographisches BIC“ ermittelt. Dieses entspricht definitionsgemäß einem 1 Voxel breiten Ring im Abstand von 30 µm von der Implantatoberfläche und wird gemessen als Anzahl der Oberflächenvoxel die in dieser Entfernung mit Knochen in Berührung stehen geteilt durch die Gesamtzahl der Voxel der Implantatoberfläche: „The number of surface voxels attached to bone at this distance divided by the total number of implant surface voxels was used to derive the BIC in percentage“. Ein weiterer mikrocomputertomographisch bestimmter periimplantärer Bereich von 30-100 µm wird als BV/TV benannt. Dabei zeigen sich nach einer Einheilzeit von 4 Wochen Korrelationen von 0,807 bezüglich Histomorphometrie-BIC und Mikro-CT-BIC sowie von 0,764 bezüglich Histo-BIC und Mikro-CT-BV/TV.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Korrelation der Mikro-CT Zielvariablen ATT% mit der histomorphometrischen Zielvariablen BIC betrug 0,783 und ist den zuvor beschriebenen Korrelationen zwischen histomorphometrischem BIC und den jeweiligen mikrocomputertomographischen Entsprechungen von 0,817 (Butz et al. 2006), 0,775 (Li, Y.F. et al. 2013) und 0,807 (Stadlinger et al. 2013) sehr ähnlich. Bei allen Studien wurden ähnliche Messbereiche festgelegt und jeweils das Mikro-CT-System µCT 40 oder µCT 80 (Fa. Scanco Medical® AG, Brüttsellen, Schweiz) sowie Auflösungen zwischen 8 und 18 µm verwendet, so dass eine gute Vergleichbarkeit mit vorliegender Arbeit besteht.

Einen dezidierten Methodenvergleich zwischen µCT und Histomorphometrie führen Bernhardt et al. 2012 durch. Dabei wird kein handelsübliches Mikro-CT Tischgerät, wie beispielsweise das Scanco 40 (Fa. Scanco Medical® AG, Brüttsellen, Schweiz) verwendet sondern ein Synchrotron-Mikro-CT (SRµCT, Berliner Elektronensynchrotron BESSY II) mit einer Auflösung von 3,58 µm. Dieses hat den Vorteil, metallinduzierte Artefakte in der periimplantären Umgebung durch Verwendung monoenergetische Röntgenstrahlung hoher Intensität, zu reduzieren (Bernhardt et al.

2012). Durch die äußerst hohe räumliche Auflösung werden beispielsweise Partialvolumeneffekte minimiert was sich auf die Schwellenwertbestimmung günstig auswirkt. Je Implantat wurden BIC- und BV/TV-Werte von 3-4 histologischen Schnitten mit den exakt korrespondierenden μ CT-Schichten verglichen, wobei sich eine sehr hohe Übereinstimmung der Werte ergibt. Zudem wurden die 2-dimensionalen histomorphometrischen Daten mit den jeweiligen gesamten 3-dimensionalen Datensätzen der μ CT verglichen. Hier zeigt sich eine geringere Übereinstimmung als beim Vergleich entsprechender Schichten und die Autoren kommen zu dem interessanten Schluss, dass für eine valide histomorphometrische Bestimmung mindestens 3-4 Schnitte pro Implantat anzufertigen seien und dass aufgrund der hohen Variabilität innerhalb der Proben in Bezug auf histologische BIC-Werte von bis zu $\pm 35\%$ die Auswahl von lediglich 1-2 Schnitten pro Implantat die BIC-Werte deutlich beeinflusst (Bernhardt et al. 2012). Als nachteilig muss die eingeschränkte Verfügbarkeit von Synchrotron-Mikro-CT Geräten angeführt werden.

In weiteren Arbeiten werden μ CT und Histomorphometrie parallel zueinander durchgeführt, wobei die Methoden nicht explizit miteinander verglichen bzw. korreliert werden, jedoch die statistisch signifikanten Kernaussagen der Studien mit beiden Methoden untermauert werden können (Cha et al. 2009, Qi et al. 2012, Vandeweghe et al. 2013, Li, X. et al. 2014)

Neben der Bestimmung des BIC sind auch biomechanische Parameter wie Versuche zur Ermittlung des Ausdrehmomentes, englisch removal torque, oder Push-out-Versuche gängige Verfahren um indirekt auf den Grad der Osseointegration zurückzuschließen (von Wilmowsky et al. 2014). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine biomechanische Testung erfolgte, finden sich in der Literatur Anhaltspunkte für eine gute Korrelation zwischen biomechanischen Parametern und den μ CT-Parametern BIC und BV/TV, gemessen mittels Scanco 40- und Scanco-80-Geräten (Gao et al. 2009, Li, Y.F. et al. 2013, Stadlinger et al. 2013). So konnten Gao et al. (2009) eine hohe bzw. sehr hohe Korrelation ($r=0,768$ bzw. $r=0,955$) zwischen Push-out Werten und mikrocomputertomographisch bestimmtem BIC bzw. BV des umgebenden Knochens (bis 1000 μm vom Implantat entfernt) nachweisen. Li, Y.F. et al. (2013) wiesen moderat bis hohe Korrelationen zwischen einem biomechanischen Parameter (Push-out-Test) und den BIC-Werten bei μ CT ($r=0,767$)

und Histomorphometrie ($r=0,715$) nach. Die entsprechenden Korrelationen zwischen dem biomechanischen Parameter (Push-out-Test) und den BV-Werten des umgebenden Knochens bei μ CT und Histomorphometrie waren ähnlich hoch ($r=0,744$ und $r=0,745$) (Li, Y.F. et al. 2013).

Die Ergebnisse von Li, Y.F. et al. (2012) sind vergleichbar mit denen von Stadlinger et al. (2013), wobei die μ CT-Werte etwas höhere Korrelationen zu den biomechanischen Parametern (Removal Torque) aufweisen als die Histomorphometrie-Werte (Korrelation Histomorphometrie-BIC zu Biomechanik 0,570; Korrelation μ CT-BIC zu Biomechanik 0,614; Korrelation Histomorphometrie-BV zu Biomechanik 0,615; Korrelation μ CT-BV zu Biomechanik 0,695).

Wie bereits erwähnt, besteht eine bekannte Limitation von Mikro-CT Verfahren in der eingeschränkten Beurteilbarkeit des unmittelbaren Implantat-Knochen-Kontaktes aufgrund von Metallartefakten. Dies betrifft in etwa die ersten 0-50 μ m radialwärts von der Titanoberfläche aus gerechnet (Stoppie et al. 2005, Butz et al. 2006, Schouten et al. 2009, Song et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methodik etabliert werden, durch die ein geeigneter Mikro-CT Parameter resultiert, dessen Bestimmung mit einer validen Beurteilung des Knochen-Implantat-Kontaktes einhergeht.

Zunächst wurden die Proben derart getrimmt, dass die Längsachse des Implantates senkrecht zur Grundfläche Probenbehälter des Mikro-Computertomographen positioniert werden konnte (siehe Material und Methoden). Abweichungen der Längsachse von der Senkrechten zur Grundfläche von 3° oder weniger wurden als akzeptabel betrachtet. Durch diese vertikale Implantatpositionierung sollten Streuartefakte reduziert werden (Walker et al. 2012).

Um den Partialvolumeneffekt auch in einem kleinen VOI, wie bei der Variablen ATT%, gering zu halten wurde eine hohe isotrope Auflösung von 10 μ m gewählt. Allerdings führt dies zu einer gewissen Zunahme des Rauschens.

Einen wichtigen Aspekt zur Rauschunterdrückung und somit zur Verbesserung der Beurteilbarkeit des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes ist die Wahl geeigneter Gaußfilter. Dabei lag der Gauß Sigma für Knochen bei 1,2 und für Titan bei 2,0 sowie der Gauß Support für Knochen bei 2 und für Titan bei 3, korrespondierend zur Vorarbeit von Bissinger et al. 2011 und der Arbeit von Stadlinger et al. 2013. Die hohe Integrationszeit von 5 x 300 ms trägt darüber hinaus zur Verbesserung des

Signal-Rausch-Verhältnisses bei.

Eine große Bedeutung bei der Artefaktreduzierung kam der Bestimmung der Schwellenwerte zur Detektion von Knochenstrukturen und Implantatmaterial zu. Hierbei wurden Grenzwerte der Grauwertskala festgelegt, welche eine möglichst realitätsnahe Differenzierung von Implantatoberfläche, mineralisiertem Knochen und unmineralisiertem Gewebe erlauben. Die Schwellenwerte werden dabei in pro Mille vom maximalen Grauwert angegeben. In der Literatur rangieren untere Grenzwerte, bei der die Differenzierung von nicht-mineralisiertem Gewebe zu mineralisiertem Knochengewebe angegeben wird, zwischen 205 und 370. Der obere Schwellenwert zur Differenzierung von mineralisiertem Knochengewebe zum Implantatmaterial findet sich typischerweise bei 700 oder etwas darunter (Gao et al. 2009, Li, Y.F. et al. 2013, Stadlinger et al 2013, Li, X. et al. 2014). Während in den meisten Studien einheitliche Grenzwerte festgelegt werden (u.a. Gao et al. 2009, Li, Y.F. et al. 2013, Stadlinger et al 2013, Li, X. et al. 2014), ist es auch möglich für jede Probe individuelle Schwellenwerte zu definieren (Schouten et al. 2009). Nachteil solcher individueller Grenzwerte ist die damit einhergehende hohe Interobserver-Variabilität (Schouten et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zone von 0-20 µm um die Implantatoberfläche aufgrund der stark ausgeprägten Artefaktbeeinflussung ausgeschlossen. Für die unterschiedlichen VOI wurden spezifische Schwellenwerte ermittelt, entsprechend der Abnahme der Artefakte mit einem zunehmenden periimplantären Abstand zur Peripherie hin. Innerhalb der VOI galten dann für alle Proben einheitliche Schwellenwerte, da jeweils vergleichbare Knochenqualitäten untersucht wurden und die Daten bezüglich verschiedener Proben untereinander vergleichbar sein sollten.

Insgesamt bietet die Mikro-CT Technik einige wertvolle Vorteile in der Bestimmung der periimplantären Knochensituation gegenüber der konventionellen Histomorphometrie. Zum einen ist die Mikro-CT ein nicht-destruktives Verfahren, das auch mehrfache Untersuchungen zulässt. Es kann durch Verwendung entsprechend programmierter Skripte eine einfache, schnelle und automatisierte Auswertung großer Datenmengen erfolgen. Die Auswertung erfasst dabei komplett dreidimensional die periimplantäre Umgebung und gibt eine repräsentativere Datenmenge wieder als die Histomorphometrie, insbesondere wenn bei dieser nur ein oder zwei Schnitte pro Implantat ausgewertet werden. Da vollständige Daten der

trabekulären Knochenstruktur in der Mikro-CT vorliegen, können prinzipiell auch trabekuläre Strukturen dreidimensional erfasst werden und Strukturparameter wie trabecular thickness (Tb.Th.), degree of anisotropy (DA), bone surface (BS) oder structure model index (SMI) mit einer entsprechenden Software vollautomatisch quantifiziert werden (Cooper et al. 2004, Chappard et al. 2005, Bissinger 2011, von Wilmowsky et al. 2014). Dabei ist sogar eine Finite-elemente-Analyse auf Trabekelenebene möglich (van Oosterwyck et al. 2000). Als nachteilig muss insbesondere das bereits diskutierte Artefaktgeschehen, insbesondere im Bereich des unmittelbaren Knochen-Implantat-Kontaktes gesehen werden. Histologische Verfahren haben den Vorteil einer hervorragenden Auflösung und der Möglichkeit unterschiedliche Weichgewebetypen differenzieren zu können. Zudem können Verfahren zur immunochemischen oder fluoreszierenden Darstellung nur im Rahmen histologischer Methoden verwirklicht werden.

Schlussfolgerungen bezüglich der Methodik – Mikrocomputertomographie

Die Konkordanzanalyse zeigte eine mittlere bis hohe Korrelation zwischen BIC-Äquivalent der Mikro-CT (ATT%) und BIC der Histomorphometrie. Es lag eine systematische Abweichung der Mikro-CT in Bezug auf die parallel erfolgte Histomorphometrie vor, mit durchschnittlich niedrigeren korrespondierenden Mikro-CT Werten. Dies kann möglicherweise durch die Festlegung des unteren Schwellenwertes für ATT% bedingt sein (Schouten et al. 2009). Der Wert ist über die entsprechende Regressionsgleichung korrigierbar. Die Festlegung eines niedrigeren Schwellenwertes, die zu einer vermehrten Knochendetektion und folglich höherer Werte für ATT% führt, wäre allerdings nur unter Beibehaltung oder Verbesserung der guten Korrelation sinnvoll. Die ATT% Werte könnten darüber hinaus auch aufgrund dessen bedingt sein, dass die Proben zum Zeitpunkt der Mikro-CT Auswertung bereits eingebettet waren. Da das Methylmethacrylat Röntgenstrahlung in ähnlicher Weise wie nicht-mineralisierter bzw. wenig-mineralisierter Knochen absorbiert, kann ein hoher Anteil wenig-mineralisierten Knochens, aufgrund schwieriger Kontrastierung zwischen wenig-mineralisierter Knochen und Methylmethacrylat, zu einer Minderdetektion von Knochen führen (Bernhardt et al. 2012). Die Schwankungsbreite der Abweichungen war eher als hoch einzuschätzen. Dies kann zu einem entscheidenden Teil der Tatsache geschuldet sein, dass lediglich ein histologischer Schnitt pro Implantat erfolgte und somit der histomorphometrische

Parameter die gesamte periimplantäre Situation nur ungenügend repräsentierte. So konnten Bernhard et al. (2012) eine hohe Variabilität innerhalb der Proben in Bezug auf histologische BIC-Werte von bis zu $\pm 35\%$ belegen und kamen zu dem Schluss, dass die Auswahl von lediglich 1-2 Schnitten pro Implantat die BIC-Werte deutlich beeinflusst (Bernhardt et al. 2012).

Letztlich kann durch die erfolgte Konkordanzanalyse nicht abschließend über die Validität der Mikro-CT Untersuchung hinsichtlich der Bestimmung der Variablen ATT% geurteilt werden. Es können lediglich Aussagen über die Übereinstimmung der beiden Messverfahren Histomorphometrie und Mikro-CT im Hinblick auf die Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes, BIC, getroffen werden. Hier zeigte sich zwar eine systematische Abweichung mit gewisser Schwankungsbreite der Abweichungen, jedoch auch eine insgesamt gute Korrelation. Dabei gilt zu beachten, dass nur ein histologischer Schnitt pro Implantat durchgeführt wurde und deshalb auch die Validität der histomorphometrischen Untersuchung des BIC hinterfragt werden muss.

Insgesamt kann, mit gewissen Einschränkungen, die Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontaktes durch die Mikro-CT, aufgrund der Übereinstimmung mit der Histomorphometrie und in Zusammenschau mit der Literatur, als valides Verfahren eingestuft werden. Noch mehr als für den unmittelbaren Knochen-Implantat-Kontakt gilt für die erweiterte periimplantäre Umgebung, ab ca. 50 μm radiär von Implantatoberflächen aus gesehen, dass sich die Mikro-CT mittlerweile als akzeptiertes Verfahren zur quantitativen Beurteilung des Knochenvolumens etabliert hat. Auch Vergleiche mit biomechanischen Testverfahren stützen diese Annahme. Zudem ist zu beachten, dass die Effekte der Artefaktbildung bei allen Gruppen analog ausgeprägt waren, was insgesamt die Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen miteinander vergleichbar macht und die Schlussfolgerungen letztlich nicht wesentlich beeinflusst werden (Shi et al. 2013).

5.2.4 Diskussion Ergebnisse der in Vivo-Phase

Im vorliegenden Tierversuch war eine hohe Implantatverlustrate zu verzeichnen. Allerdings waren die Verluste statistisch sowohl unabhängig von der Art der Beschichtung als auch unabhängig von der Implantatinsertionsstelle. Wie bereits zuvor diskutiert, kann die hohe Verlustrate an Implantaten in Zusammenhang mit

mangelnder Mundhygiene und inadäquater mechanischer Belastung stehen (Smeets et al. 2009). Alle Implantate waren entweder nur mit einer PDLLA-Beschichtung oder mit einer PDLLA-Beschichtung in Kombination mit einem Wirkstoff versehen. Somit ist also auch ein möglicher Zusammenhang der Implantatverluste mit der PDLLA-Beschichtung denkbar. In der Vorarbeit von Kolk 2007 wurde nachgewiesen, dass auch hohe Konzentrationen an PDLLA nicht stärker zytotoxisch wirken. Es ist jedoch bekannt, dass Abbauprodukte des PDLLA eine lokale Fremdkörperreaktion hervorrufen können, welche beispielsweise bei der Verwendung biodegradierbarer Osteosyntheseplatten in bis zu mehr als 20 % der Fälle klinisch relevant werden (Böstman et al. 1990, Eppley et al. 2004, Landes et al. 2006, Nkenke et al. 2011, Xue et al. 2014). Möglicherweise liegen erst im Laufe der Zeit Abbauprodukte des PDLLA in kritischem Maße vor und bewirken dann eine lokale Fremdkörperreaktion. Dies könnte erklären, warum die Implantatverlustrate in der 56 Tage Gruppe im Vergleich zur 28 Tage Gruppe statistisch signifikant deutlich erhöht war. Außerdem kann über eine negative Beeinflussung der osteokonduktiven Eigenschaften der Implantatoberfläche durch die PDLLA-Beschichtung gemutmaßt werden, was durch den vorliegenden Versuch nicht weiter überprüft werden kann, da keine native Kontrollgruppe ohne Beschichtung untersucht wurde.

Knochenvolumen (ATT%, BV/TV_6-30, BV/TV_55-100)

Es wurde jeweils die Nullhypothese zugrunde gelegt und getestet, dass kein Unterschied bezüglich der Mittelwerte der Hauptzielgrößen in den zu vergleichenden Gruppen vorliegt. Nur für die 28 Tage Variablen ATT% und BV/TV_6-30 kann die Nullhypothese verworfen werden und die Alternativhypothese angenommen werden: Es besteht hier zwischen bestimmten Gruppen ein signifikanter Unterschied bezüglich der Mittelwerte der Hauptzielgrößen. Für die 28 Tage Variable BV/TV_55-100 und alle 56 Tage Variablen kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Als wesentliche Erkenntnis muss dabei herausgestellt werden, dass hinsichtlich der Volumenvariablen (ATT%, BV/TV_6-30, BV/TV_55-100) sowohl nach 28 als auch nach 56 Tagen keine therapeutische Gruppe statistisch signifikant höhere Mittelwerte als die Kontrollgruppe PDLLA aufwies. Es ist im Gegenteil so, dass die 28 Tage Kontrollgruppe PDLLA für die Variable ATT% signifikant höhere Werte aufwies als

die 28 Tage Testgruppen Triclosan, COPROG 6 und COPROG 12. Dies steht in Einklang mit jüngsten Studien (He et al. 2013, Jiang et al. 2013) in denen sich kein nachhaltiger positiver Effekt durch Beschichtungen mit einem BMP-2-Genvektor auf den Knochen-Implantat-Kontakt und das Knochenvolumen im periimplantären Umfeld belegen lassen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen beide Plasmidgruppen niedrigere Mittelwerte für alle Volumensvariablen nach 28 Tagen und für ATT% und BV/TV_6-30 nach 56 Tagen auf. Lediglich für BV/TV_55-100 nach 56 Tagen finden sich, ohne statistische Signifikanz, im Vergleich zur Kontrolle höhere Gruppenmittelwerte von COPROG 6 und insbesondere COPROG 12. Dies könnte ein vorsichtiger Hinweis darauf sein, dass die Plasmide in größerer Entfernung zum Implantat auch nach längerer Zeit noch einen positiven Effekt auf die Knochenregeneration haben. Solch eine Schlussfolgerung muss jedoch, aufgrund kleiner Fallzahlen der 56 Tage Plasmid-Gruppen (n=3), mit großer Vorsicht betrachtet werden.

Während die BMP 50 Gruppe insbesondere nach 28 Tagen und für ATT% und BV/TV_6-30 die höchsten Mittelwerte erreicht, wobei jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe vorliegt, weist die BMP 150 Gruppe insbesondere nach 28 Tagen für BV/TV_6-30 und BV/TV_55-100 den jeweils niedrigsten Mittelwert auf. Eine mögliche Ursache sind verstärkte zytotoxische Effekte der höheren BMP-Konzentration. Die hohen Mittelwerte der BMP 50 Gruppe nach 28 Tagen korrigieren sich nach 56 Tagen wieder nach unten. Somit scheinen positive Effekte des geringer konzentrierten BMP 50 auf die initiale Einheilphase in den ersten 4 Wochen beschränkt zu sein.

Die Triclosangruppen weisen nach 28 Tagen und bezüglich ATT% und BV/TV_6-30 signifikant niedrigere Mittelwerte als die Kontrollgruppe PDLLA auf. Dies ist am ehesten auf eine zytotoxische Komponente dieses Antiinfektivums zurückzuführen, die in der Vorarbeit von Schulze (2011) beschrieben wurde. Allerdings wiesen die Triclosangruppen die niedrigsten Implantatverlusten auf.

Bei allen 56 Tage Gruppen lagen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gruppen-Mittelwerte vor. Dies spricht dafür, dass sich der Einfluss der unterschiedlichen Beschichtungen auf periimplantäre Knochenveränderungen im zeitlichen Verlauf verringert. Die geringen Fallzahlen, aufgrund erhöhter Verlusten der 56 Tage Plasmid- und BMP-2 – Gruppen, schränken die Aussagekraft der Daten

dabei deutlich ein.

Zu einem gewissen Teil ähneln sich die Ergebnisse der Knochenvolumenvariablen ATT% und BV/TV₆₋₃₀. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten betragen nach 28 Tagen $r=0,651$ und nach 56 Tagen $r=0,642$. Der größte Unterschied besteht, wie bereits beschrieben, hinsichtlich der BMP 150 Gruppe und der Triclosan Gruppe, welche nach 28 Tagen, im Gegensatz zu ATT%, für BV/TV₆₋₃₀ die niedrigsten Mittelwerte aufweisen. Deutlichere Unterschiede bestehen dann zwischen ATT% bzw. BV/TV₆₋₃₀ zur Variablen BV/TV₅₅₋₁₀₀, wobei BV/TV₅₅₋₁₀₀ höhere Korrelationen zu BV/TV₆₋₃₀ als zu ATT% aufweist.

Knochendichte (TMD₆₋₃₀, TMD₅₅₋₁₀₀)

Bei der Auswertung der Knochendichtevariablen ergeben sich im Vergleich mit den entsprechenden Knochenvolumenvariablen keine richtungsweisenden Veränderungen hinsichtlich der zu treffenden Schlussfolgerungen. Dies wird auch bei der Auswertung der Korrelationskoeffizienten zwischen den einander entsprechenden Knochendichte- und Knochenvolumenvariablen deutlich, die zwischen $r=0,957$ und $r=0,994$ rangieren.

Schlussfolgerungen Ergebnisse der in Vivo-Phase

Insgesamt muss festgehalten werden, dass sowohl nach 28 als auch nach 56 Tagen keine der therapeutischen Gruppen, insbesondere nicht die Plasmidgruppen, statistisch signifikant höhere Mittelwerte als die Kontrollgruppe PDLLA aufwiesen. Es lässt sich somit in vivo keine positive Wirkung des nicht-viralen Gentransfer von BMP-2 aus einer biodegradierbar beschichteten Titanoberfläche auf die Osseointegration und periimplantäre Knochenheilung herleiten.

Die aktuelle Datenlage zum Einfluss von BMPs oder BMP-Genvektorformulierungen auf die periimplantäre Knochenregeneration ist insgesamt uneinheitlich und lässt derzeit keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Während einige Studien über eine verbesserte Osseointegration berichten (Becker et al. 2006, Lutz et al. 2008, Hunziker et al. 2012, Yoo et al. 2014) belegen andere Arbeiten keinen Vorteil auf die Implantateinheilung unter Verwendung von BMPs oder BMP-Genvektorformulierungen (Schliephake et al. 2005, Stadlinger et al. 2008, Wikesjo et al. 2008,

He et al. 2013, Jiang et al. 2013, Lee et al. 2014).

Mehrere Gründe können dafür verantwortlich sein. Zum einen ist es denkbar, dass, die in den in vitro- und in vivo- Vorarbeiten von Kolk (2007), Stöhrer (2008) und Bissinger (2009) ermittelten und validierten Freisetzungskinetiken und optimierten COPROG/PDLLA-Konzentrationen nicht auf das Profil der Wirkstofffreisetzung und die resultierenden lokalen Wirkstoffkonzentrationen für die speziellen Umstände der periimplantären Knochenregeneration übertragbar sind. Die niedrigen Mittelgruppenwerte der Knochenvolumina der Plasmidgruppen und der höher konzentrierten BMP-Gruppe (BMP 150) spiegeln möglicherweise zytotoxische Effekte des BMPs wider. Darüber hinaus ist bekannt, dass BMPs auch proliferative und chemotaktische Wirkungen auf Osteoklasten aufweisen (Chen et al. 2004, Cowan et al. 2005, Liu 2007a, Liu 2007b, Benglis et al. 2008, Paul et al. 2009, Toth et al. 2009) was zu einer Resorption von periimplantären Knochen führen kann. Zudem können hohe BMP-Konzentrationen zur vermehrten Produktion intrinsischer BMP-Inhibitoren wie Noggin führen (Roden 2006). Der in der Vorarbeit von Kolk 2007 auch bei Applikation des Gentransfersystems berichtete „burst release“, mit einer Freisetzung von 50 % der in PDLLA inkorporierten Menge an COPROGs innerhalb der ersten 48 Stunden, führte möglicherweise frühzeitig zu hohen lokalen BMP-Konzentrationen, welche die zuvor aufgeführten negativen Auswirkungen der BMPs ausgelöst haben könnten. Dies gilt in besonderem Maße für die höher konzentrierte BMP-Gruppe (BMP 150). Günstiger scheint sich die geringer konzentrierte BMP-Testgruppe (BMP 50) zu verhalten, wo die Dosischwelle zur Herbeiführung der negativen Effekte des BMPs möglicherweise nicht nachhaltig überschritten wurde und die gewünschten osteoinduktiven Effekte im Vordergrund standen. Die relativ hohen Werte insbesondere der höher konzentrierten Plasmidgruppe (COPROG 12) in der weiteren periimplantären Umgebung (Zone 550-1000 µm von der Implantatoberfläche entfernt) und nach längerer Beobachtungszeit (56 Tage) können als vager Hinweis auf einen längerfristigen Effekt des Genvektorsystems auf die periimplantäre Einheilung verstanden werden. Insgesamt ist bei der periimplantären Knochenheilung von einer komplexen Situation auszugehen, in der die optimale Balance zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption nur durch die genaue Abstimmung der Freisetzungskinetik und folglich der lokalen Wirkstoffkonzentration erreicht werden kann. Auch negative Effekte des Gentransfersystems müssen in Betracht gezogen werden. So ist

bekannt, dass das hier verwendete Transfektionagens Polyethylenimin (PEI) mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kDa zytotoxische Effekte mit sich bringt (Goula et al. 1998, Godbey et al. 2001, Moghimi et al. 2005).

Prinzipiell erscheint es ebenfalls denkbar, dass die Beschichtung mit dem Arzneimittelträger PDLLA einen deutlich größeren Einfluss auf die Osseointegration hatte als die therapeutischen Beschichtungen und deshalb kein signifikanter Unterschied zwischen der PDLLA-Kontrollgruppe und den therapeutischen Gruppen vorhanden war. So könnte möglicherweise die PDLLA-Beschichtung die Osseokonduktivität in erheblichem Maße beeinflusst haben. Da keine Kontrollgruppe zur PDLLA-Gruppe, das heißt mit unbeschichteten Implantaten, etabliert wurde lässt sich dies jedoch durch die bestehende Versuchsanordnung nicht überprüfen.

6 Zusammenfassung

Die vorhersehbare sichere Einheilung enossaler dentaler Implantate ist insbesondere in kompromittierten Situationen nach wie vor eine Herausforderung. Eine mögliche Strategie zur Verbesserung der Osseointegration besteht in der Anwendung von BMPs (bone morphogenetic proteins). Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es, in vivo zu untersuchen welchen Einfluss dentale Implantate, die mit dem nicht-viralen, geschützten und für BMP-2 kodierenden Genvektor COPROG in Kombination mit der biodegradierbaren Trägersubstanz PDLLA beschichtet waren auf die Implantateinheilung haben.

Zunächst wurde eine Methodik zur Beschichtung humaner Titanimplantate mit der Arzneimittelträgersubstanz PDLLA in Kombination mit dem Genvektor COPROG etabliert. Es zeigte sich, dass eine homogene Beschichtung erzielt werden konnte. Die Reproduzierbarkeit der aufgetragenen und letztlich nach dem Eindrehen der Implantate vorhandenen Beschichtungsmenge erwies sich für den vorliegenden Versuch als ausreichend, für einen regulären klinischen Einsatz besteht jedoch noch Verbesserungspotenzial.

In der anschließenden Tierversuchsphase wurden die beschichteten Titanimplantate nach vorausgegangener Zahnextraktion und zweimonatiger Heilungsphase in den Oberkiefer von Miniaturschweinen inseriert. Nach 28 und 56 Tagen Einheilphase erfolgte die Opferung der Tiere. Folgende Beschichtungen wurden untersucht (n=7 je Beschichtung und Einheilzeit): PDLLA, PDLLA / Triclosan, PDLLA / COPROG 6,25 µg, PDLLA / COPROG 12,5 µg, PDLLA / rhBMP-2 50 µg, PDLLA / rhBMP-2 150 µg. Bei allen eingehheilten Implantaten wurden die entsprechenden Proben mit einem Mikro-CT-Gerät bei einer isotropen Auflösung von 10 µm gescannt. Das periimplantäre Knochenvolumen (BV/TV) und die Knochendichte (TMD) wurden in folgenden Bereichen, d.h. Volume of Interest (VOI), gemessen: VOI 1: 20-50 µm (Variable ATT%), VOI 2: 60-300 µm (Variablen BV/TV_6-30 und TMD_6-30) sowie VOI 3: 550-1000 µm (Variablen BV/TV_55-100 und TMD_55-100) radiär zur Implantatoberfläche. Dabei wurden für jedes VOI spezifisch ermittelte Schwellenwerte zur Detektion mineralisierter Knochensubstanz verwendet. Sowohl nach 28 als auch nach 56 Tagen wies keine therapeutische Gruppe statistisch signifikant höhere Mittelwerte als die Kontrollgruppe PDLLA (ohne weiteren Wirkstoff) auf (p<0,05). Die Ergebnisse der Knochenvolumen- und Knochendichtevariablen

unterschieden sich nicht wesentlich. Für die Zielvariablen ATT% und BV/TV_6-30 wiesen nach 28 Tagen die Gruppen PDLLA und BMP 50 die höchsten Mittelwerte auf, nach 56 Tagen wurden die Unterschiede kleiner. Für die Variable BV/TV_55-100 wurden nach 28 Tagen die höchsten Mittelwerte für die Gruppen PDLLA und Triclosan ermittelt, nach 56 Tagen für die Gruppen COPROG 6 und BMP 150.

Anschließend wurde ein Teil der Proben histomorphometrisch untersucht und der errechnete Knochen-Implantat-Kontakt (Bone-Implant-Contact, BIC) mit der korrespondierenden Mikro-CT-Variablen ATT% korreliert, wobei sich eine mittlere bis hohe Übereinstimmung zeigte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine funktionsfähige Beschichtung von Titanimplantaten mit dem biodegradierbaren Wirkstoffträger Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) in Kombination mit dem nicht-viralen Genvektor COPROG (Copolymer Protected Gene Vector) etabliert werden. In vivo hatte der Gentransfer von BMP-2 aus biodegradierbar beschichteten Titanoberflächen keinen fördernden Einfluss auf die Osseointegration. Es zeigte sich eine mittlere bis hohe Korrelation zwischen den Messmethoden Mikro-CT und Histomorphometrie bezüglich der Ermittlung des Knochen-Implantat-Kontaktes.

7 Literaturverzeichnis

Abarrategi, A., Garcia-Cantalejo, J., Moreno-Vicente, C., Civantos, A., Ramos, V., Casado, J.V., Perez-Rial, S., Martinez-Corria, R., Lopez-Lacomba, J.L. Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials. *Acta Biomater* 5 (2009) 2633-2646

Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C.A., Economides, A.N., Stahl, N., Jilka, R.L., Manolagas, S.C. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 663-673

Abtahi, J., Agholme, F., Sandberg, O., Aspenberg, P. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res* 92 (2013) 279-283

Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139 (1998) 663-670

Akca, K., Chang, T.L., Tekdemir, I., Fanuscu, M.I. Biomechanical aspects of initial intraosseous stability and implant design: a quantitative micro-morphometric analysis. *Clin Oral Implants Res* 17 (2006) 465-472

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A., Lindstrom, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52 (1981) 155-170

Albrektsson, T. und Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2 (2001) S96-101

Amling, M., Herden, S., Posl, M., Hahn, M., Ritzel, H., Delling, G. Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 36-45

Anil, S., Cuijpers, V.M., Preethanath, R.S., Aldosari, A.A., Jansen, J.A. Osseointegration of oral implants after delayed placement in rabbits: a microcomputed tomography and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28 (2013) 1506-1511

Bae, S.E., Choi, J., Joung, Y.K., Park, K., Han, D.K. Controlled release of bone morphogenetic protein (BMP)-2 from nanocomplex incorporated on hydroxyapatite-formed titanium surface. *J Control Release* 160 (2012) 676-684

Bagno, A., Piovan, A., Dettin, M., Chiarion, A., Brun, P., Gambaretto, R., Fontana, G., Di Bello, C., Palu, G., Castagliuolo, I. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone* 40 (2007) 693-699

Baig, M.R. und Rajan, M. Effects of smoking on the outcome of implant treatment: a literature review. *Indian J Dent Res* 18 (2007) 190-195

Baltzer, A.W. und Lieberman, J.R. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther* 11 (2004) 344-350

Becker, J., Kirsch, A., Schwarz, F., Chatzinikolaidou, M., Rothamel, D., Lekovic, V., Laub, M., Jennissen, H.P. Bone apposition to titanium implants bio-coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig* 10 (2006) 217-224

Beddoe, A.H. A quantitative study of the structure of trabecular bone in man, rhesus monkey, beagle and miniature pig. *Calcif Tissue Res* 25 (1978) 273-281

Bell, B.F., Schuler, M., Tosatti, S., Textor, M., Schwartz, Z., Boyan, B.D. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clin Oral Implants Res* 22 (2011) 865-872

Benglis, D., Wang, M.Y., Levi, A.D. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 62 (2008) ONS423-431; discussion ONS431

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P., Lindhe, J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 14 (2003) 251-262

Bernhardt, R., Kuhlisch, E., Schulz, M.C., Eckelt, U., Stadlinger, B. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SRmicroCT slices. *Eur Cell Mater* 23 (2012) 237-247; discussion 247-238

Beutner, R., Michael, J., Schwenzer, B., Scharnweber, D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *J R Soc Interface* 7 Suppl 1 (2010) S93-S105

Bianco, G., Di Raimondo, R., Luongo, G., Paoleschi, C., Piccoli, P., Piccoli, C., Rangert, B. Osseointegrated implant for single-tooth replacement: a retrospective multicenter study on routine use in private practice. *Clin Implant Dent Relat Res* 2 (2000) 152-158

Bissinger, M.O. Bildgebende Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation

von rhBMP-2 versus Nukleinsäuretransfer am Rattenunterkiefer. Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2011)

Bissinger, M.O. Einfluss verschiedener Medikamente auf die Frakturheilung am Femurschaft – eine tierexperimentelle Studie. Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2013)

Böing, J. Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (2003)

Bornstein, M.M., Valderrama, P., Jones, A.A., Wilson, T.G., Seibl, R., Cochran, D.L. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res* 19 (2008) 233-241

Bosco, M.C., Puppo, M., Blengio, F., Fraone, T., Cappello, P., Giovarelli, M., Varesio, L. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 213 (2008) 733-749

Bostman, O., Hirvensalo, E., Makinen, J., Rokkanen, P. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br* 72 (1990) 592-596

Brammer, K.S., Oh, S., Cobb, C.J., Bjursten, L.M., van der Heyde, H., Jin, S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomater* 5 (2009) 3215-3223

Branemark, P.I., Zarb, G.A., Albrektsson, T., Rosen, H.M. Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. *Plast Reconstr Surg* 77 (1986) 496-497

Broggini, N., Tosatti, S., Ferguson, S.J., Schuler, M., Textor, M., Bornstein, M.M., Bosshardt, D.D., Buser, D. Evaluation of chemically modified SLA implants (modSLA) biofunctionalized with integrin (RGD)- and heparin (KRSR)-binding peptides. *J Biomed Mater Res A* 100 (2012) 703-711

Brunski, J.B., Puleo, D.A., Nanci, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15 (2000) 15-46

Buser, D., Broggin, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A., Steinemann, S.G. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83 (2004) 529-533

Buser, D., Nydegger, T., Hirt, H.P., Cochran, D.L., Nolte, L.P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13 (1998) 611-619

Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochran, D.L., Schenk, R.K., Hirt, H.P., Snetivy, D., Nolte, L.P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 45 (1999) 75-83

Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H., Stich, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25 (1991) 889-902

Butz, F., Ogawa, T., Chang, T.L., Nishimura, I. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (2006) 687-695

Cacaci, C., Neugebauer, J., Schlegel, A., Seidel, F. *Orale Implantologie*. Thieme, Stuttgart, 2006

Carano, R.A. und Filvaroff, E.H. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8 (2003) 980-989

Cha, J.Y., Lim, J.K., Song, J.W., Sato, D., Kenmotsu, M., Inoue, T., Park, Y.C. Influence of the length of the loading period after placement of orthodontic mini-implants on changes in bone histomorphology: microcomputed tomographic and histologic analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 24 (2009) 842-849

Chadha, G.K., Ahmadi, A., Kumar, S., Sedghizadeh, P.P. Osseointegration of dental implants and osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate therapy: a systematic review. *J Oral Implantol* 39 (2013) 510-520

Chambrone, L., Mandia, J., Jr., Shibli, J.A., Romito, G.A., Abrahao, M. Dental implants installed in irradiated jaws: a systematic review. *J Dent Res* 92 (2013) 119S-130S

Chappard, D., Retailleau-Gaborit, N., Legrand, E., Basle, M.F., Audran, M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 20 (2005) 1177-1184

Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22 (2004) 233-241

Chen, S., Yang, J., Wang, H., Chao, Y., Zhang, C., Shen, J., Zhang, P. Adenovirus

encoding BMP-7 immobilized on titanium surface exhibits local delivery ability and regulates osteoblast differentiation in vitro. *Arch Oral Biol* 58 (2013) 1225-1231

Cole, B.J., Bostrom, M.P., Pritchard, T.L., Sumner, D.R., Tomin, E., Lane, J.M., Weiland, A.J. Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin Orthop Relat Res* (1997) 219-228

Commerford, S.L. Iodination of nucleic acids in vitro. *Biochemistry* 10 (1971) 1993-2000

Cooper, D.M., Matyas, J.R., Katzenberg, M.A., Hallgrímsson, B. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int* 74 (2004) 437-447

Cornell, C.N. und Lane, J.M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* (1998) S267-273

Cowan, C.M., Aalami, O.O., Shi, Y.Y., Chou, Y.F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Nacamuli, R.P., Contag, C.H., Wu, B., Longaker, M.T. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng* 11 (2005) 645-658

Crouzier, T., Ren, K., Nicolas, C., Roy, C., Picart, C. Layer-by-layer films as a biomimetic reservoir for rhBMP-2 delivery: controlled differentiation of myoblasts to osteoblasts. *Small* 5 (2009) 598-608

Damien, C.J. und Parsons, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2 (1991) 187-208

Davies, J.E. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 (1998) 391-401

Davies, J.E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67 (2003) 932-949

Dayer, R., Badoud, I., Rizzoli, R., Ammann, P. Defective implant osseointegration under protein undernutrition: prevention by PTH or pamidronate. *J Bone Miner Res* 22 (2007) 1526-1533

de Jonge, L.T., Leeuwenburgh, S.C., Wolke, J.G., Jansen, J.A. Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharm Res* 25 (2008) 2357-2369

Dereka, X.E., Markopoulou, C.E., Vrotsos, I.A. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 24 (2006) 260-267

Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G., Cenni, E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov* 92 (2008) 161-168

Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36 (2005) 1392-1404

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

Drechsler, C. Etablierung der nicht-viralen Transfektion mittels copolymer protected gene vectors aus Poly D,L Laktid-beschichteten Titanoberflächen – eine in vitro Studie. Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2010)

Duan, K. und Wang, R. Surface modifications of bone implants through wet chemistry. *J Mater Chem* 16 (2006) 2309–2321

Dunn, C.A., Jin, Q., Taba, M., Jr., Franceschi, R.T., Bruce Rutherford, R., Giannobile, W.V. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther* 11 (2005) 294-299

Eitel, F., Klapp, F., Jacobson, W., Schweiberer, L. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg* 99 (1981) 59-64

Eppley, B.L., Morales, L., Wood, R., Pensler, J., Goldstein, J., Havlik, R.J., Habal, M., Losken, A., Williams, J.K., Burstein, F., Rozzelle, A.A., Sadove, A.M. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: clinical experience in 1883 patients. *Plast Reconstr Surg* 114 (2004) 850-856; discussion 857

Esposito, M., Murray-Curtis, L., Grusovin, M.G., Coulthard, P., Worthington, H.V. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev* (2007) CD003815

Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G., Kleerekoper, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4 (1989) 3-11

Ferguson, C.M., Miclau, T., Hu, D., Alpern, E., Helms, J.A. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci* 857 (1998) 33-42

Ferguson, S.J., Brogini, N., Wieland, M., de Wild, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D.L., Buser, D. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater*

Res A 78 (2006) 291-297

Ferguson, S.J., Langhoff, J.D., Voelter, K., von Rechenberg, B., Scharnweber, D., Bierbaum, S., Schnabelrauch, M., Kautz, A.R., Frauchiger, V.M., Mueller, T.L., van Lenthe, G.H., Schlottig, F. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 23 (2008) 1037-1046

Freilich, M., C, M.P., Wei, M., Shafer, D., Schleier, P., Hortschansky, P., Kompali, R., Kuhn, L. Growth of new bone guided by implants in a murine calvarial model. *Bone* 43 (2008) 781-788

Friedl, P. und Brocker, E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57 (2000) 41-64

Furlong, R.J. und Osborn, J.F. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br* 73 (1991) 741-745

Gabet, Y., Muller, R., Levy, J., Dimarchi, R., Chorev, M., Bab, I., Kohavi, D. Parathyroid hormone 1-34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis. *Bone* 39 (2006) 276-282

Gahlert, M., Roehling, S., Sprecher, C.M., Kniha, H., Milz, S., Bormann, K. In vivo performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin Oral Implants Res* 23 (2012) 281-286

Gao, Y., Luo, E., Hu, J., Xue, J., Zhu, S., Li, J. Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone* 44 (2009) 225-232

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22 (2001) 471-480

Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., Demeneix, B.A. Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Ther* 5 (1998) 1291-1295

Goulet, R.W., Goldstein, S.A., Ciarelli, M.J., Kuhn, J.L., Brown, M.B., Feldkamp, L.A. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* 27 (1994) 375-389

Guillot, R., Gilde, F., Becquart, P., Sailhan, F., Lapeyrere, A., Logeart-Avramoglou, D., Picart, C. The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium. *Biomaterials* 34 (2013) 5737-5746

Gupta, A., Subhas, N., Primak, A.N., Nittka, M., Liu, K. Metal artifact reduction: standard and advanced magnetic resonance and computed tomography techniques. *Radiol Clin North Am* 53 (2015) 531-547

He, F.M., Shan, H.Q., Shen, J.W., Jiang, Q.H. Bone formation at porous titanium implants coated with multiple layers of recombinant human bone morphogenetic protein-2 cDNA plasmid in the posterior mandible in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28 (2013) 1648-1654

He, J., Huang, T., Gan, L., Zhou, Z., Jiang, B., Wu, Y., Wu, F., Gu, Z. Collagen-infiltrated porous hydroxyapatite coating and its osteogenic properties: in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 100 (2012) 1706-1715

Heijink, A., Schwartz, J., Zobitz, M.E., Nicole Crowder, K., Lutz, G.E., Sibonga, J.D. Self-assembled monolayer films of phosphonates for bonding RGD to titanium. *Clin Orthop Relat Res* 466 (2008) 977-984

Heldin, C.H. und Westermarck, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79 (1999) 1283-1316

Henry, P.J., Laney, W.R., Jemt, T., Harris, D., Krogh, P.H., Polizzi, G., Zarb, G.A., Herrmann, I. Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 (1996) 450-455

Hitchon, C., Wong, K., Ma, G., Reed, J., Lyttle, D., El-Gabalawy, H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46 (2002) 2587-2597

Hönig, M. und Merten, H.A. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 9 (1993) 244-254

Hsu, J.T., Huang, H.L., Tsai, M.T., Wu, A.Y., Tu, M.G., Fuh, L.J. Effects of the 3D bone-to-implant contact and bone stiffness on the initial stability of a dental implant: micro-CT and resonance frequency analyses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42 (2013) 276-280

Huh, J.B., Kim, S.E., Kim, H.E., Kang, S.S., Choi, K.H., Jeong, C.M., Lee, J.Y., Shin, S.W. Effects of anodized implants coated with Escherichia coli-derived rhBMP-2 in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41 (2012) 1577-1584

Hunziker, E.B., Enggist, L., Kuffer, A., Buser, D., Liu, Y. Osseointegration: the slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity. *Bone* 51 (2012) 98-106

Jemt, T., Chai, J., Harnett, J., Heath, M.R., Hutton, J.E., Johns, R.B., McKenna, S.,

McNamara, D.C., van Steenberghe, D., Taylor, R., Watson, R.M., Herrmann, I. A 5-year prospective multicenter follow-up report on overdentures supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 (1996) 291-298

Jennissen, H.P., Zumbrink, T., Chatzinikolaidou, M., Steppuhn, J. Biocoating of implants with mediator molecules: surface enhancement of metals by treatment with chromosulfuric acid. *Materialwiss Werkstofftech* 30 (1999) 838–845

Jiang, Q.H., Liu, L., Peel, S., Yang, G.L., Zhao, S.F., He, F.M. Bone response to the multilayer BMP-2 gene coated porous titanium implant surface. *Clin Oral Implants Res* 24 (2013) 853-861

Jones, A.A., Buser, D., Schenk, R., Wozney, J., Cochran, D.L. The effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model. *J Periodontol* 77 (2006) 1184-1193

Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M., Jansen, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4 (2009) 185-206

Kachelrieß, M. Reduktion von Metallartefakten in der Röntgen-Computer-Tomographie. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Dr. rer. biol. hum.), Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (1998)

Kalfas, I.H. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10 (2001) E1

Katyayan, P.A., Katyayan, M., Shah, R.J. Rehabilitative considerations for dental implants in the diabetic patient. *J Indian Prosthodont Soc* 13 (2013) 175-183

Kienapfel, H., Sprey, C., Wilke, A., Griss, P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty* 14 (1999) 355-368

Kilpadi, K.L., Chang, P.L., Bellis, S.L. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 57 (2001) 258-267

Kim, M., Jung, W.K., Kim, G. Bio-composites composed of a solid free-form fabricated polycaprolactone and alginate-releasing bone morphogenic protein and bone formation peptide for bone tissue regeneration. *Bioprocess Biosyst Eng* 36 (2013) 1725-1734

Kolk, A. Förderung des Knochenwachstums durch nicht-viralen BMP-2-Gentransfer aus PDLLA-beschichteten Titanoberflächen – In vitro und in vivo Untersuchungen- im Vergleich zum rekombinanten Protein rh BMP-2. Medizinische Habilitationsschrift

Technische Universität München (2007)

Kolk, A., Haczek, C., Koch, C., Vogt, S., Kullmer, M., Pautke, C., Deppe, H., Plank, C. A strategy to establish a gene-activated matrix on titanium using gene vectors protected in a polylactide coating. *Biomaterials* 32 (2011) 6850-6859

Kuhn, J.L., Goldstein, S.A., Feldkamp, L.A., Goulet, R.W., Jasion, G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res* 8 (1990) 833-842

Kwiecien, R., Kopp-Schneider, A., Blettner, M. Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 108 (2011) 515-521

Laiblin, C. und Jaeschke, G. [Clinical chemistry examinations of bone and muscle metabolism under stress in the Gottingen miniature pig--an experimental study]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 92 (1979) 124-128

Landes, C.A., Ballon, A., Roth, C. Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P(L/DL)LA implants: a 5-year inpatient biocompatibility and degradation experience. *Plast Reconstr Surg* 117 (2006) 2347-2360

Lane, J.M., Tomin, E., Bostrom, M.P. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* (1999) S107-117

Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N., Bosshardt, D.D. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res* 22 (2011) 349-356

Lansdown, A.B., Sampson, B., Rowe, A. Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *Int J Exp Pathol* 82 (2001) 35-41

Lee, J., Lee, E.N., Yoon, J., Chung, S.M., Prasad, H., Susin, C., Wikesjo, U.M. Comparative study of Chinese hamster ovary cell versus Escherichia coli-derived bone morphogenetic protein-2 using the critical-size supraalveolar peri-implant defect model. *J Periodontol* 84 (2013) 415-422

Lee, S.W., Hahn, B.D., Kang, T.Y., Lee, M.J., Choi, J.Y., Kim, M.K., Kim, S.G. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. *J Oral Maxillofac Surg* 72 (2014) 53-60

Li, D., Ferguson, S.J., Beutler, T., Cochran, D.L., Sittig, C., Hirt, H.P., Buser, D. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *J Biomed Mater Res* 60 (2002)

Li, J.P., Li, P., Hu, J., Dong, W., Liao, N.N., Qi, M.C., Li, J.Y. Early healing of hydroxyapatite-coated implants in grafted bone of zoledronic acid-treated osteoporotic rabbits. *J Periodontol* 85 (2014) 308-316

Li, X., Li, Y., Liao, Y., Li, J., Zhang, L., Hu, J. The effect of magnesium-incorporated hydroxyapatite coating on titanium implant fixation in ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 29 (2014) 196-202

Li, Y.F., Li, X.D., Bao, C.Y., Chen, Q.M., Zhang, H., Hu, J. Promotion of peri-implant bone healing by systemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporos Int* 24 (2013) 1063-1071

Liddel, G. und Klineberg, I. Patient-related risk factors for implant therapy. A critique of pertinent literature. *Aust Dent J* 56 (2011) 417-426; quiz 441

Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 1032-1044

Liu, S., Broucek, J., Viridi, A.S., Sumner, D.R. Limitations of using micro-computed tomography to predict bone-implant contact and mechanical fixation. *J Microsc* 245 (2012) 34-42

Liu, Y., de Groot, K., Hunziker, E.B. Osteoinductive implants: the mise-en-scene for drug-bearing biomimetic coatings. *Ann Biomed Eng* 32 (2004) 398-406

Liu, Y., de Groot, K., Hunziker, E.B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 36 (2005) 745-757

Liu, Y., Enggist, L., Kuffer, A.F., Buser, D., Hunziker, E.B. The influence of BMP-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration. *Biomaterials* 28 (2007a) 2677-2686

Liu, Y., Huse, R.O., de Groot, K., Buser, D., Hunziker, E.B. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res* 86 (2007b) 84-89

Lorenz, C., Hoffmann, A., Gross, G., Windhagen, H., Dellinger, P., Mohwald, K., Dempwolf, W., Menzel, H. Coating of titanium implant materials with thin polymeric films for binding the signaling protein BMP2. *Macromol Biosci* 11 (2011) 234-244

Lu, S.X., Fiorini, T., Lee, J., Prasad, H.S., Buxton, A.N., Bisch, F.C., Dixon, D.R., Susin, C., Wikesjo, U.M. Evaluation of a compression resistant matrix for

recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Clin Periodontol* 40 (2013) 688-697

Lutz, R. und Neukam, F.W. Chirurgische Aspekte der Implantologie. In: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Hausamen, J.-E., Machtens, E., Reuther, J.F., Eufinger, H., Kübler, A., Schliephake, H. (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, 95-119

Lutz, R., Park, J., Felszeghy, E., Wiltfang, J., Nkenke, E., Schlegel, K.A. Bone regeneration after topical BMP-2-gene delivery in circumferential peri-implant bone defects. *Clin Oral Implants Res* 19 (2008) 590-599

Lutz, R., Srour, S., Nonhoff, J., Weisel, T., Damien, C.J., Schlegel, K.A. Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 21 (2010) 726-734

Macdonald, M.L., Rodriguez, N.M., Shah, N.J., Hammond, P.T. Characterization of tunable FGF-2 releasing polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 11 (2010) 2053-2059

Macdonald, M.L., Samuel, R.E., Shah, N.J., Padera, R.F., Beben, Y.M., Hammond, P.T. Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials* 32 (2011) 1446-1453

Maimoun, L., Brennan, T.C., Badoud, I., Dubois-Ferriere, V., Rizzoli, R., Ammann, P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone* 46 (2010) 1436-1441

Moghimi, S.M., Symonds, P., Murray, J.C., Hunter, A.C., Debska, G., Szewczyk, A. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 11 (2005) 990-995

Müller, R., Van Campenhout, H., Van Damme, B., Van Der Perre, G., Dequeker, J., Hildebrand, T., Ruegsegger, P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23 (1998) 59-66

Murdoch, C., Giannoudis, A., Lewis, C.E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104 (2004) 2224-2234

Mykhaylyk, O., Antequera, Y.S., Vlaskou, D., Plank, C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc* 2 (2007) 2391-2411

Nkenke, E., Vairaktaris, E., Schwarz, S., Eyupoglu, I., Ganslandt, O., Leis, T.,

Knipfer, C., Stelzle, F. Prospective assessment of complications associated with ultrasound activated resorbable pin osteosynthesis in pediatric craniofacial surgery: preliminary results. *Neurocirugia (Astur)* 22 (2011) 498-506

Nozaki, K., Wang, W., Horiuchi, N., Nakamura, M., Takakuda, K., Yamashita, K., Nagai, A. Enhanced osteoconductivity of titanium implant by polarization-induced surface charges. *J Biomed Mater Res A* 102 (2014) 3077-3086

Oh, S., Daraio, C., Chen, L.H., Pisanic, T.R., Finones, R.R., Jin, S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes. *J Biomed Mater Res A* 78 (2006) 97-103

Osborn, J.F. [Biomaterials and their application to implantation]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 89 (1979) 1138-1139

Papaspyridakos, P., Chen, C.J., Singh, M., Weber, H.P., Gallucci, G.O. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. *J Dent Res* 91 (2012) 242-248

Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (1987) 595-610

Park, J., Bauer, S., Schlegel, K.A., Neukam, F.W., von der Mark, K., Schmuki, P. TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm--an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. *Small* 5 (2009) 666-671

Park, J.Y. und Davies, J.E. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11 (2000) 530-539

Park, Y.S., Yi, K.Y., Lee, I.S., Jung, Y.C. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 16 (2005) 156-160

Paul, S., Lee, J.C., Yeh, L.C. A comparative study on BMP-induced osteoclastogenesis and osteoblastogenesis in primary cultures of adult rat bone marrow cells. *Growth Factors* 27 (2009) 121-131

Perez-Sayans, M., Somoza-Martin, J.M., Barros-Angueira, F., Rey, J.M., Garcia-Garcia, A. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109 (2010) 679-686

Popat, K.C., Leoni, L., Grimes, C.A., Desai, T.A. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* 28 (2007) 3188-3197

Poth, N., Seiffart, V., Gross, G., Menzel, H., Dempwolf, W. Biodegradable chitosan nanoparticle coatings on titanium for the delivery of BMP-2. *Biomolecules* 5 (2015) 3-19

Potts, J.R. und Campbell, I.D. Fibronectin structure and assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6 (1994) 648-655

Puleo, D.A., Kissling, R.A., Sheu, M.S. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials* 23 (2002) 2079-2087

Qi, M., Hu, J., Li, J., Li, J., Dong, W., Feng, X., Yu, J. Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. *Bone* 50 (2012) 119-127

Qiao, C., Zhang, K., Jin, H., Miao, L., Shi, C., Liu, X., Yuan, A., Liu, J., Li, D., Zheng, C., Zhang, G., Li, X., Yang, B., Sun, H. Using poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to encapsulate plasmid of bone morphogenetic protein 2/polyethylenimine nanoparticles to promote bone formation in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 8 (2013) 2985-2995

Ramazanoglu, M. und Oshida, Y. Osseointegration and Bioscience of Implant Surfaces - Current Concepts at Bone-Implant Interface. In: *Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice*. Turkyilmaz, I. (Hrsg.). InTech, 2011, DOI: 10.5772/16936

Rebaudi, A., Koller, B., Laib, A., Trisi, P. Microcomputed tomographic analysis of the peri-implant bone. *Int J Periodontics Restorative Dent* 24 (2004) 316-325

Reddi, A.H. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited. *Clin Orthop Relat Res* (1995) 115-119

Rosen, V. BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1068 (2006) 19-25

Rosen, V. und Thies, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8 (1992) 97-102

Sachse, A., Wagner, A., Keller, M., Wagner, O., Wetzel, W.D., Layher, F., Venbrocks, R.A., Hortschansky, P., Pietraszczyk, M., Wiederanders, B., Hempel, H.J., Bossert, J., Horn, J., Schmuck, K., Mollenhauer, J. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone* 37 (2005) 699-710

Safii, S.H., Palmer, R.M., Wilson, R.F. Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin*

Implant Dent Relat Res 12 (2010) 165-174

Santo, V.E., Gomes, M.E., Mano, J.F., Reis, R.L. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering--Part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. *Tissue Eng Part B Rev* 19 (2013a) 308-326

Santo, V.E., Gomes, M.E., Mano, J.F., Reis, R.L. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering--Part II: challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery. *Tissue Eng Part B Rev* 19 (2013b) 327-352

Saulacic, N., Bosshardt, D.D., Bornstein, M.M., Berner, S., Buser, D. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. *Eur Cell Mater* 23 (2012) 273-286; discussion 286-278

Schenk, R.K. und Buser, D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17 (1998) 22-35

Schlegel, K.A., Thorwarth, M., Plesinac, A., Wiltfang, J., Rupprecht, S. Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study. *Clin Oral Implants Res* 17 (2006) 666-672

Schliephake, H., Aref, A., Scharnweber, D., Bierbaum, S., Roessler, S., Sewing, A. Effect of immobilized bone morphogenetic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res* 16 (2005) 563-569

Schmidmaier, G. Einfluss der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Biomaterialien auf die Frakturheilung. Medizinische Habilitationsschrift Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin (2004)

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 58 (2001) 449-455

Schouten, C., Meijer, G.J., van den Beucken, J.J., Spauwen, P.H., Jansen, J.A. The quantitative assessment of peri-implant bone responses using histomorphometry and micro-computed tomography. *Biomaterials* 30 (2009) 4539-4549

Schuler, M., Owen, G.R., Hamilton, D.W., de Wild, M., Textor, M., Brunette, D.M., Tosatti, S.G. Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. *Biomaterials* 27 (2006) 4003-4015

Schulze, J. In-vitro-Untersuchungen zu bioaktiven Implantatoberflächenbeschichtungen. Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2011)

Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., Becker, J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 18 (2007) 481-488

Schwarz, F., Sager, M., Kadelka, I., Ferrari, D., Becker, J. Influence of titanium implant surface characteristics on bone regeneration in dehiscence-type defects: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 37 (2010) 466-473

Sellers, R.S., Zhang, R., Glasson, S.S., Kim, H.D., Peluso, D., D'Augusta, D.A., Beckwith, K., Morris, E.A. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 82 (2000) 151-160

Shah, N.J., Macdonald, M.L., Beben, Y.M., Padera, R.F., Samuel, R.E., Hammond, P.T. Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 32 (2011) 6183-6193

Shalabi, M.M., Gortemaker, A., Van't Hof, M.A., Jansen, J.A., Creugers, N.H. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res* 85 (2006) 496-500

Shi, L., Shi, L., Wang, L., Duan, Y., Lei, W., Wang, Z., Li, J., Fan, X., Li, X., Li, S., Guo, Z. The improved biological performance of a novel low elastic modulus implant. *PLoS One* 8 (2013) e55015

Shin, J.H., Kim, K.H., Kim, S.H., Koo, K.T., Kim, T.I., Seol, Y.J., Ku, Y., Rhyu, I.C., Chung, C.P., Lee, Y.M. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats. *J Clin Periodontol* 37 (2010) 305-311

Sigurdsson, T.J., Fu, E., Tatakis, D.N., Rohrer, M.D., Wikesjo, U.M. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 8 (1997) 367-374

Sjostrom, T., Dalby, M.J., Hart, A., Tare, R., Oreffo, R.O., Su, B. Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomater* 5 (2009) 1433-1441

Smeets, R., Maciejewski, O., Gerressen, M., Spiekermann, H., Hanisch, O., Riediger, D., Blake, F., Stein, J., Holzle, F., Kolk, A. Impact of rhBMP-2 on regeneration of buccal alveolar defects during the osseointegration of transgingival inserted implants.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 108 (2009) e3-e12

Sodek, J. und Cheifetz, S. Molecular regulation of osteogenesis. In: Bone Engineering. Davies, J. (Hrsg.). EMSquared, Toronto, 1999, 31-43

Song, J.W., Cha, J.Y., Bechtold, T.E., Park, Y.C. Influence of peri-implant artifacts on bone morphometric analysis with micro-computed tomography. Int J Oral Maxillofac Implants 28 (2013) 519-525

Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. Am J Surg 176 (1998) 26S-38S

Stadlinger, B., Korn, P., Todtmann, N., Eckelt, U., Range, U., Burki, A., Ferguson, S.J., Kramer, I., Kautz, A., Schnabelrauch, M., Kneissel, M., Schlottig, F. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. Eur Cell Mater 25 (2013) 326-340; discussion 339-340

Stadlinger, B., Pilling, E., Huhle, M., Mai, R., Bierbaum, S., Bernhardt, R., Scharnweber, D., Kuhlisch, E., Hempel, U., Eckelt, U. Influence of extracellular matrix coatings on implant stability and osseointegration: an animal study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 83 (2007) 222-231

Stadlinger, B., Pilling, E., Huhle, M., Mai, R., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Kuhlisch, E., Loukota, R., Eckelt, U. Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. Int J Oral Maxillofac Surg 37 (2008) 54-59

Stöhrer, M. Aktuelle Aspekte der histomorphometrischen, histologischen und mikroradiographischen Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation des rekombinanten Proteins BMP-2 versus Nukleinsäuretransfers – eine tierexperimentelle Studie. Medizinische Dissertation, Technische Universität München (2008)

Stoppie, N., van der Waerden, J.P., Jansen, J.A., Duyck, J., Wevers, M., Naert, I.E. Validation of microfocus computed tomography in the evaluation of bone implant specimens. Clin Implant Dent Relat Res 7 (2005) 87-94

Suetens, P. Fundamentals of medical imaging. Cambridge University Press, Cambridge 2002

Sul, Y.T., Johansson, C., Wennerberg, A., Cho, L.R., Chang, B.S., Albrektsson, T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. Int J Oral Maxillofac Implants 20 (2005) 349-359

Sul, Y.T., Johansson, C.B., Jeong, Y., Roser, K., Wennerberg, A., Albrektsson, T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med* 12 (2001) 1025-1031

Swindle, M.M., Smith, A.C., Hepburn, B.J. Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1 (1988) 65-79

Teixeira, J.O. und Urist, M.R. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg* 117 (1998) 27-34

Terebesi, J., Kwok, K.Y., Rice, K.G. Iodinated plasmid DNA as a tool for studying gene delivery. *Anal Biochem* 263 (1998) 120-123

Terheyden, H., Lang, N.P., Bierbaum, S., Stadlinger, B. Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res* 23 (2012) 1127-1135

Thies, R.S., Bauduy, M., Ashton, B.A., Kurtzberg, L., Wozney, J.M., Rosen, V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130 (1992) 1318-1324

Thorwarth, M., Schlegel, K.A., Wiltfang, J., Rupprecht, S., Park, J.H. [Experimental pilot study on surface activation of implants with liposomal vectors]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8 (2004) 250-255

Toth, J.M., Boden, S.D., Burkus, J.K., Badura, J.M., Peckham, S.M., McKay, W.F. Short-term osteoclastic activity induced by locally high concentrations of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a cancellous bone environment. *Spine (Phila Pa 1976)* 34 (2009) 539-550

Uchiyama, T., Tanizawa, T., Muramatsu, H., Endo, N., Takahashi, H.E., Hara, T. A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 61 (1997) 493-498

Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (1965) 893-899

Van Oosterwyck, H., Duyck, J., Vander Sloten, J., Van der Perre, G., Jansen, J., Wevers, M., Naert, I. Use of microfocus computerized tomography as a new technique for characterizing bone tissue around oral implants. *J Oral Implantol* 26 (2000) 5-12

Vandeweghe, S., Coelho, P.G., Vanhove, C., Wennerberg, A., Jimbo, R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101

(2013) 1259-1266

Vehof, J.W., Mahmood, J., Takita, H., van't Hof, M.A., Kuboki, Y., Spauwen, P.H., Jansen, J.A. Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with bone morphogenetic protein and coated with calcium phosphate. *Plast Reconstr Surg* 108 (2001) 434-443

Voggenreiter, G.K., Hartl, M., Assenmacher, S., Chatzinikolaidou, M., Jennissen, H.P., Rumpf, H.M. Assessment of the biological activity of chemically immobilized rhBMP-2 on titanium surfaces in vivo. *Materialwiss Werkstofftech* 32 (2001) 942–948

von Wilmsky, C., Moest, T., Nkenke, E., Stelzle, F., Schlegel, K.A. Implants in bone: part II. Research on implant osseointegration: material testing, mechanical testing, imaging and histoanalytical methods. *Oral Maxillofac Surg* 18 (2014) 355-372

Walker, S.S., Kontogiorgos, E.D., Dechow, P.C., Kerns, D.G., Nelson, C.J., Opperman, L.A. Comparison of the effects of phosphate-coated and sandblasted acid-etched titanium implants on osseointegration: a microcomputed tomographic examination in the canine model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27 (2012) 1069-1080

Wang, S., Liu, Y., Fang, D., Shi, S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Dis* 13 (2007) 530-537

Watzek, G., Fürhauser, R., Mailath-Pokorny, G. Zahnärztliche Implantate. In: *Zahnärztliche Chirurgie*. Schwenger, N., Ehrenfeld, M. (Hrsg.). Thieme, Stuttgart, 2009, 226-273

Welch, R.D., Jones, A.L., Bucholz, R.W., Reinert, C.M., Tjia, J.S., Pierce, W.A., Wozney, J.M., Li, X.J. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* 13 (1998) 1483-1490

Wen, B., Karl, M., Pendry, D., Shafer, D., Freilich, M., Kuhn, L. An evaluation of BMP-2 delivery from scaffolds with miniaturized dental implants in a novel rat mandible model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 97 (2011) 315-326

Wennerberg, A. und Albrektsson, T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4 (2009) 172-184

Wierzbicka-Patynowski, I. und Schwarzbauer, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 116 (2003) 3269-3276

Wikesjo, U.M., Qahash, M., Polimeni, G., Susin, C., Shanaman, R.H., Rohrer, M.D., Wozney, J.M., Hall, J. Alveolar ridge augmentation using implants coated with

recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol* 35 (2008) 1001-1010

Wilson, C.J., Clegg, R.E., Leavesley, D.I., Pearcy, M.J. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* 11 (2005) 1-18

Wong, M., Eulenberger, J., Schenk, R., Hunziker, E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 1567-1575

Wood, K.C., Chuang, H.F., Batten, R.D., Lynn, D.M., Hammond, P.T. Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 10207-10212

Xue, A.S., Koshy, J.C., Weathers, W.M., Wolfswinkel, E.M., Kaufman, Y., Sharabi, S.E., Brown, R.H., Hicks, M.J., Hollier, L.H., Jr. Local foreign-body reaction to commercial biodegradable implants: an in vivo animal study. *Craniofac Trauma Reconstr* 7 (2014) 27-34

Yamazaki, Y., Oida, S., Ishihara, K., Nakabayashi, N. Ectopic induction of cartilage and bone by bovine bone morphogenetic protein using a biodegradable polymeric reservoir. *J Biomed Mater Res* 30 (1996) 1-4

Yoo, D., Tovar, N., Jimbo, R., Marin, C., Anchieta, R.B., Machado, L.S., Montclare, J., Guastaldi, F.P., Janal, M.N., Coelho, P.G. Increased osseointegration effect of bone morphogenetic protein 2 on dental implants: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 102 (2014) 1921-1927

Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 26 (1998) 112-115

Zacchetti, G., Wiskott, A., Cugnoni, J., Botsis, J., Ammann, P. External mechanical microstimuli modulate the osseointegration of titanium implants in rat tibiae. *Biomed Res Int* 2013 (2013) 234093

Zellin, G. und Linde, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 31 (1997) 97-104

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. K.-D. Wolff, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München und bei Herrn Professor Dr. B. Gänsbacher vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit an deren Klinik bzw. Institut durchführen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Kollegen Herrn Professor Dr. Dr. A. Kolk für die Vergabe des Themas sowie die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit sowie Herrn Professor Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München für die Bereitstellung der von ihm entwickelten Vektortechnologie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Speziell möchte ich mich bei Herrn Christian Koch für die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeiten am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung bedanken.

Ebenso danke ich meinem Kollegen Herrn Dr. Dr. Weitz für die ausgezeichnete Zusammenarbeit während des gesamten Projektes. Herrn Dr. Dr. Bissinger möchte ich insbesondere für die Unterstützung bei der mikrocomputertomographischen Auswertung danken. Ich danke Herrn Professor Dr. Kunzelmann für die Möglichkeit zur Nutzung des Mikro-CT-Gerätes. Zudem gilt mein Dank Frau Dr. Jeschke für die Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Schwiegereltern und allen voran meiner Frau Monika für die immerwährende Geduld und Unterstützung.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Probst
Vornamen: Florian Andreas
Geburtsdatum: 15.03.1979
Geburtsort: Dachau

Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Markt Indersdorf
1989 – 1998 Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
06/1998 Abitur

Universitätsstudium

05/1999 – 05/2004 Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05/2004 Staatsexamen Zahnmedizin
10/2007 Promotion zum Dr. med. dent.
2001 – 2002 und 09/2004 – 10/2008 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Technischen Universität München, Harvard Medical School, Boston, USA und The University of Hong Kong
10/2008 Staatsexamen Humanmedizin

Beruf

06/2004 Approbation als Zahnarzt
11/2008 Approbation als Arzt
seit 06/2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor Prof. Dr. Dr. M. Ehrenfeld)
11/2014 Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie