

## Einfluss von rekombinantem PDGF-BB auf die Knochenregeneration: Eine Studie im Kaninchenschädel



Daniel S. Thoma, Dr. med. dent.<sup>1</sup>/Ronald E. Jung, PD Dr. med. dent.<sup>2</sup>  
 Patrick Hänsele, MSc ETH<sup>3</sup>/Christoph H. F. Hämmerle, Prof. Dr. med. dent.<sup>4</sup>  
 David L. Cochran, DDS, PhD<sup>5</sup>/Franz E. Weber, PD PhD<sup>6</sup>

In dieser Studie wurde ermittelt, ob die Knochenregeneration bei Anwendung von rekombinantem humanem Blutplättchenwachstumsfaktor-BB (platelet derived growth factor-BB, rhPDGF-BB) in Kombination mit granuliertem Beta-Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) oder deproteinisiertem bovinem Knochenmineral (DBBM) besser ist als bei leeren Defekten oder alleiniger Anwendung von  $\beta$ -TCP-Partikeln. Bei sieben Kaninchen wurden jeweils vier Titanzylinder von außen auf die Kortikalis der Kalotten gesetzt. Jeder Zylinder wurde in eine Gruppe randomisiert: (1) DBBM + rhPDGF-BB, (2)  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB, (3)  $\beta$ -TCP und (4) Leerkontrolle (Blutkoagulum). Der mittlere Anteil der Knochenregeneration betrug  $13,9 \pm 8,4$  % (Leerkontrolle),  $24,0 \pm 14,8$  % ( $\beta$ -TCP),  $37,1 \pm 8,9$  % ( $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB) und  $64,4 \pm 5,4$  % (DBBM + rhPDGF-BB). Die stärkste Knochenregeneration wurde mit DBBM + rhPDGF-BB erreicht ( $P < 0,01$ ). Der Anteil des Knochenersatzmaterials lag bei  $48,3 \pm 9,3$  % (DBBM + rhPDGF-BB),  $53,1 \pm 10,6$  % ( $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB) und  $58,0 \pm 14,8$  % ( $\beta$ -TCP). Die Knochenregeneration wurde am besten mit rhPDGF-BB + DBBM gefördert. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2012;32:187-194.)

<sup>1</sup> Oberassistent, Klinik für Kronen- und Brückenprothetik, Teilprothetik und zahnärztliche Materialkunde, Universität Zürich, Zürich, Schweiz.

<sup>2</sup> Oberassistent und Lehrbeauftragter, Klinik für Kronen- und Brückenprothetik, Teilprothetik und zahnärztliche Materialkunde, Universität Zürich, Zürich, Schweiz.

<sup>3</sup> PhD-Student, Orale Biotechnologie und Bioengineering, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Zürich, Zürich, Schweiz.

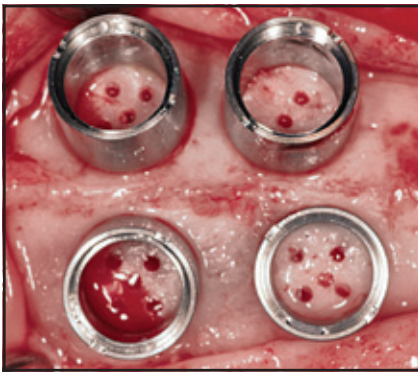
<sup>4</sup> Professor, Klinik für Kronen- und Brückenprothetik, Teilprothetik und zahnärztliche Materialkunde, Universität Zürich, Zürich, Schweiz.

<sup>5</sup> Professor, Department of Periodontics, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA.

<sup>6</sup> Professor, Orale Biotechnologie und Bioengineering, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Zürich, Zürich, Schweiz.

Korrespondenz an: Dr. Daniel S. Thoma, Klinik für Kronen- und Brückenprothetik, Teilprothetik und zahnärztliche Materialkunde, Zentrum für Zahnmedizin, Universität Zürich, Plattenstraße 11, CH-8032 Zürich, Schweiz. Fax: +41 44 634 43 05; E-Mail: daniel.thoma@zsm.uzh.ch

Dentale Implantate erzielen hohe Erfolgsraten, wenn sie in gesunden Knochen gesetzt werden<sup>1</sup>. Aufgrund der morphologischen Veränderungen nach einer Zahnextraktion wird der Arzt jedoch oft mit einer Knochensituation konfrontiert, die eine primäre Implantation unmöglich macht. Die derzeitigen Behandlungsoptionen in einem solchen Fall unterliegen zahlreichen Einschränkungen: Sie sind technisch anspruchsvoll, erhöhen die Patientenmorbidity und führen zu einer qualitativ und quantitativ sehr unterschiedlichen Knochenneubildung<sup>2-4</sup>. Um die Knochenneubildung im Mundraum anzuregen und somit die Einschränkungen dieser Verfahren zu überwinden, hat sich die Forschung auf die Verwendung bioaktiver Mediatoren konzentriert. In präklinischen und klinischen Studien wurden zahlreiche bioaktive Mediatoren für die Knochenregeneration von parodontalen und lokalisierten Alveolarkammdefekten untersucht.<sup>5</sup> Rekombinanter humaner platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) ist ein gut charakterisierter Gewebewachstumsfaktor, der in zahlreichen Studien an Mensch und Tier untersucht wurde<sup>5,6</sup>. In der Parodontologie wird rhPDGF-BB in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien zur Behandlung knöcherner Defekte und zur Rezessions-



**Abb. 1a** (links) Alle Zylinder nach der Platzierung auf dem Schädel. In den Zylindern sind die Perforationen der Kortikalisplatte zu erkennen.

**Abb. 1b** (rechts) Anwendung aller vier Behandlungsansätze. Ein Zylinder (Leerkontrolle) wurde bereits mit einem Deckel verschlossen.



deckung erfolgreich verwendet<sup>7-9</sup> und in der dentalen Implantologie zur Verbesserung der Knochenbildung bei lokalen Knochendefekten eingesetzt<sup>10, 11</sup>. Dazu wird rhPDGF-BB mit einem xenogenen Material kombiniert, dem deproteinisierten bovinen Knochenmineral (DBBM). Zu den Vorteilen von DBBM gehören seine Biokompatibilität, die niedrige Abbaurrate, ein minimales Risiko der Krankheitsübertragung und seine hohe Osteokonduktivität. Präklinische Studien ermittelten eine erfolgreiche Knochenbildung bei der kombinierten Verwendung von rhPDGF-BB und DBBM<sup>11, 12</sup>. Derzeit ist rhPDGF-BB in den USA und Kanada in Kombination mit Beta-Tricalciumphosphat erhältlich ( $\beta$ -TCP; GEM 21S, Osteohealth). Dieses Präparat wurde von der Food and Drug Administration (FDA) zwar nur zur Behandlung parodontaler Knochendefekte zugelassen, ein Off-Label-use ist jedoch dokumentiert<sup>13, 14</sup>. Bei der Verwendung von Wachstumsfaktoren spielt die Auswahl des Trägers eine wichtige Rolle für die Knochenregeneration<sup>15, 16</sup>. Daher sollten Kombinationen von rhPDGF-BB mit anderen Trägermaterialien untersucht werden. Bislang ist unbekannt, ob bei der lokalisierten Knochenaugmentation  $\beta$ -TCP oder DBBM der geeignetere Träger für rhPDGF-BB ist. In der vorliegenden Studie wurde untersucht,

ob die Knochenregeneration mit dem Wachstumshormon rhPDGF-BB in Kombination mit  $\beta$ -TCP-Granula oder DBBM schneller und effektiver verläuft als bei leeren Defekten oder alleiniger Verwendung von  $\beta$ -TCP-Granula.

#### Material und Methode

Verwendet wurden sieben erwachsene einjährige Weiße Neuseelandkaninchen mit einem Gewicht von 3 bis 4 kg. Die Tiere wurden in einem extra für Versuchstiere gestalteten Raum gehalten und erhielten die Standard-Labornahrung. Das Protokoll wurde von der lokalen Tierversuchsbereichs-Ethikkommission der Universität Zürich genehmigt. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Injektion von 65 mg/kg Ketamin und 4 mg/kg Xylazin, die Aufrechterhaltung mit Isofluran/O<sub>2</sub>. Das Verfahren wurde bereits andernorts ausführlich beschrieben<sup>17</sup>. Nach dem Abheben eines Vollschichtlappens wurden Os parietale und Os frontale freigelegt und vier Einschnitte (Durchmesser 6 mm, Tiefe 1 mm) und Perforationen der äußeren Kortikalisplatte präpariert. Anschließend wurde in jeden der Einschnitte ein Zylinder aus handelsüblichem Reintitan mit maschinierter Oberfläche platziert. Die Zylinder waren 7 mm hoch und

besaßen einen Außendurchmesser von 7 mm mit Schraubendesign auf der Knochenseite und eine kleine Schulter für einen Titandeckel auf der Seite des abdeckenden Hautlappens (Abb. 1a). Die Zylinder wurden folgenden Behandlungsoptionen zugeteilt: (1) DBBM + rhPDGF-BB: 0,15 g DBBM (Bio-Oss, Geistlich) mit einer Porengröße von 250 bis 1000 µm und 112,5 µg rhPDGF-BB (GEM 21S). (2) β-TCP + rhPDGF-BB: 0,15 g β-TCP-Matrix und 112,5 µg rhPDGF-BB (GEM 21S). (3) β-TCP: 0,15 g einer synthetischen β-TCP-Matrix (GEM 21S) aus hochporösen Partikeln mit einer Größe von 250 bis 1000 µm. (4) Leerkontrolle (Blutkoagulum). Beim ersten Tier wurden die Behandlungsansätze zufällig auf die Zylinder verteilt. Bei den nachfolgenden wurde die Abfolge der Behandlungsansätze beibehalten, aber die Verteilung schrittweise im Uhrzeigersinn geändert (Abb. 1b). Die Zylinder blieben auf der Knochenseite offen und wurden auf der Hautseite mit einem Titandeckel verschlossen. Nach acht Wochen wurden die Kaninchen mit Barbituraten sediert und durch eine Überdosis Ketamin eingeschläfert. Die Schädel wurden inklusive aller Zylinder entfernt und in 40%iges Ethanol überführt.

#### *Histologische Präparation und Histomorphometrie*

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Polymethylmethacrylat (Merck) eingebettet. Mithilfe einer Mikrofräse und Schleifverfahren nach Donath und Breuner<sup>18</sup> wurden Längsschnitte durch den Zylinder mit einer Dicke von 50 bis 60 µm hergestellt und mit Toluidinblau eingefärbt. Die qualitative Bestimmung des mineralisierten Knochens, des nicht mineralisierten

Gewebes und des restlichen Knochenersatzmaterials erfolgte mit einem Stereoskop (Nikon Eclipse 90i, Nikon) gemäß der Standardnomenklatur der International Society for Stereology<sup>19</sup>. Die computergestützten histomorphometrischen Messungen wurden mit einem automatisierten Bildanalyse-System durchgeführt (Visiopharm Integrator System, Visiopharm A/S), an das eine Videokamera angeschlossen war (Nikon Digital Sight DS-5Mc, Nikon) und das auf einem Lichtmikroskop montiert war (Nikon Eclipse 90i). In den Zylindern wurden folgende Parameter bestimmt<sup>20, 21</sup>: Anteil des Knochenersatzmaterials, das von mineralisiertem Knochen bedeckt ist, Anteil des mineralisierten Knochens bezogen auf den Gesamtbereich, Anteil des Knochenersatzmaterials bezogen auf den Gesamtbereich, Anteil des nicht mineralisierten Gewebes bezogen auf den Gesamtbereich und Bereich der Knochenregeneration (Bereich der Knochenregeneration [%] = Pixelanzahl des Knochenbereichs x 100/Gesamtpixelanzahl des Zylinders).

#### *Adsorption, Freisetzung und Aktivität von rhPDGF-BB in vitro*

Die Proben für die In-vitro-Studien wurden in dreifacher Ausführung präpariert. Ähnlich wie im Tierexperiment wurde rhPDGF-BB mit β-TCP- und DBBM-Partikeln gemischt. Nach Adsorption wurden 10 ml Zellkulturmedium zugegeben (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) und verquirlt. Nach 10 Minuten wurden 9,5 ml des Überstands entnommen und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Dieser 9,5-ml-Überstand spiegelt die schnelle Anfangsfreisetzung wider und wurde dazu verwendet, den Anteil des nicht an

das Knochenersatzmaterial adsorbierten rhPDGF-BB zu bestimmen. Ein Röhrchen ohne Knochenersatzmaterial diente als positive Kontrolle. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C inkubiert. In festgelegten Intervallen (nach einer Stunde, nach sieben und nach 14 Tagen) wurde jeweils 1 ml des Überstands entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Adsorption und Freisetzung von rhPDGF-BB wurden durch die Konzentration von freiem rhPDGF-BB im Überstand ermittelt, die mit einem „Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay“ (ELISA; RayBiotech) gegen rhPDGF-BB gemessen wurde. Die Standardkurve der ELISA von 25 bis 2000 pg rhPDGF-BB/ml wurde durch festgelegte Konzentrationen von rhPDGF-BB (GEM 21S) erstellt. Die Aktivität von rhPDGF-BB wurde anhand der Proliferation der Fibroblasten in serumfreiem Medium ermittelt<sup>22</sup>. Die serumfreien Zellen wurden mit den Proben der schnellen Anfangsfreisetzung und der positiven Kontrolle stimuliert, die auf 60 ng/ml rhPDGF-BB verdünnt wurden. Lebensfähigkeit und Proliferation der Zellen wurden nach 72-stündiger Exposition mittels WST-1-Assay bestimmt.

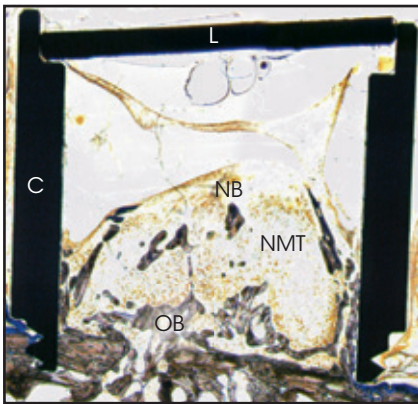
#### *Statistische Auswertung*

Die Datenauswertung erfolgte mit SAS-Software (SAS Institute). Angegeben wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Behandlungsgruppen. Zum Vergleich der wichtigsten Effekte wurden für jeden Messwert ein gemischtes lineares Regressionsmodell und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Zusätzlich wurden Einflüsse von Lokalisation und Tier berücksichtigt. Ergebnisse mit einem P-Wert < 0,05 galten als statistisch signifikant.

## Ergebnis

Alle Kaninchen blieben gesund. Es traten weder lokale noch systemische Komplikationen auf. Zum Zeitpunkt des Einschläfrens war die Position aller 28 Zylinder stabil. Die deskriptive Histologie zeigte, dass die Knochenregeneration in den leeren Zylindern (Gruppe 4) auf einige wenige Trabekel beschränkt war. Ein Großteil dieser Zylinder war mit nicht mineralisiertem Gewebe ausgefüllt (Abb. 2a). Die mit  $\beta$ -TCP augmentierten Zylinder (Gruppe 3) wiesen große Restmengen von  $\beta$ -TCP-Partikeln auf. Im unteren Zylinderrittzel wurde eine geringfügige Knochenneubildung ermittelt, überwiegend im Zentrum und entlang der Zylinderwände (Abb. 2b). Ähnlich wie bei  $\beta$ -TCP allein dominierten auch in den  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB enthaltenden Zylindern (Gruppe 2) die  $\beta$ -TCP-Partikel, allerdings fand sich mehr regenerierter Knochen, überwiegend in der unteren Zylinderhälfte (Abb. 2c). Im Vergleich zu den Gruppen 3 und 2 zeigte die rhPDGF+DBBM-Gruppe (Gruppe 1) große Mengen regenerierten Knochens, der locker in die DBBM-Partikel integriert war. Bis ins zweite Zylinderrittzel und entlang der Zylinderwand fanden sich neue Knochen trabekel, überwiegend jedoch angrenzend an das osteokonduktive Knochenersatzmaterial (Abb. 2d und e). Bei der quantitativen Bestimmung ergaben sich als mittlere Anteile der Knochenregeneration  $13,9 \pm 8,4$  % (Gruppe 4),  $24,0 \pm 14,8$  % (Gruppe 3),  $37,1 \pm 8,9$  % (Gruppe 2) und  $64,4 \pm 5,4$  % (Gruppe 1) (Abb. 3). Es bestanden statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und allen anderen Gruppen ( $P < 0,01$ ) sowie zwischen Gruppe 2 und Gruppe 4 ( $P < 0,01$ ). Der mittlere Anteil des mineralisierten Gewebes betrug  $22,0 \pm 7,3$  % (Gruppe 1),  $18,4 \pm 8,3$  %

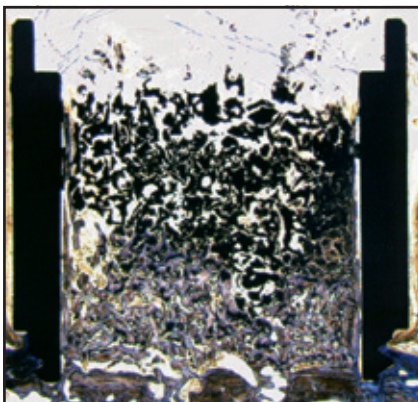
(Gruppe 2),  $13,4 \pm 8,5$  % (Gruppe 3) und  $10,3 \pm 5,4$  % (Gruppe 4), wobei sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen fanden. Der Restanteil des Knochenersatzmaterials lag bei  $48,3 \pm 9,3$  % (Gruppe 1),  $53,1 \pm 10,6$  % (Gruppe 2) und  $58,0 \pm 14,8$  % (Gruppe 3) mit statistisch signifikantem Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 3 ( $P < 0,05$ ). Der Anteil des nicht mineralisierten Gewebes betrug  $89,7 \pm 5,4$  % (Gruppe 4),  $28,6 \pm 14,4$  % (Gruppe 3),  $28,5 \pm 12,1$  % (Gruppe 2) und  $29,7 \pm 2,6$  % (Gruppe 1) mit einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 4 und allen anderen Gruppen ( $P < 0,001$ ). In den Zylindern, die rhPDGF-BB enthielten, war ein höherer Anteil von Partikeln des Knochenersatzmaterials von mineralisiertem Knochen bedeckt ( $38,3 \pm 20,5$  % bei Gruppe 1 und  $37,7 \pm 13,3$  % bei Gruppe 2). Obwohl zwischen den drei Testgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bestanden, nahm der Anteil der Partikel, die mit mineralisiertem Knochen bedeckt waren, in der Gruppe 3 um ein Fünftel ab ( $31,3 \pm 8,9$  %). Die In-vitro-Evaluation der Interaktionen von rhPDGF-BB mit den beiden Trägermaterialien erbrachte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Adsorption von rhPDGF-BB an  $\beta$ -TCP ( $38 \pm 4$  %) und an DBBM ( $67 \pm 6$  %) im Vergleich zur Positivkontrolle ( $0 \pm 5$  %) (Abb. 4). Innerhalb von 14 Tagen kam es zu einer minimalen Freisetzung ( $< 0,2$  % initiale rhPDGF-BB-Konzentration) aus beiden Trägermaterialien. Bei den Proben, die mit der Positivkontrolle ( $43 \pm 7$  ng/ml), der Probe mit der schnellen Anfangsfreisetzung von  $\beta$ -TCP ( $42 \pm 13$  ng/ml) und von DBBM ( $39 \pm 11$  ng/ml) stimuliert wurden, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, sodass die Trägermaterialien offenbar keine Auswirkungen auf die Aktivität des ungebundenen



**Abb. 2a** (links) Leerkontrolle. Zentraler Schnitt durch den Zylinder (Vergrößerung x 2,5). C = Titanzylinder, L = Deckel des Titanzylinders, NB = neugebildeter Knochen, NMT = nicht mineralisiertes Gewebe, OB = natürlicher Knochen (Schädel).

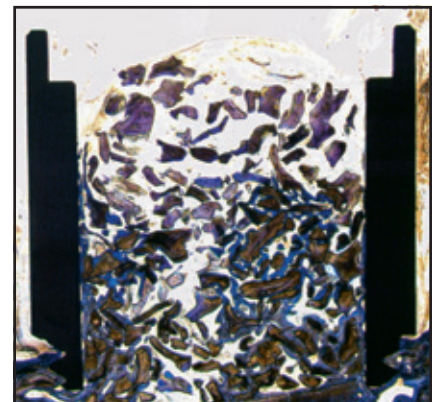


**Abb. 2b** (rechts)  $\beta$ -TCP. Zentraler Schnitt durch den Zylinder (Vergrößerung x 2,5).

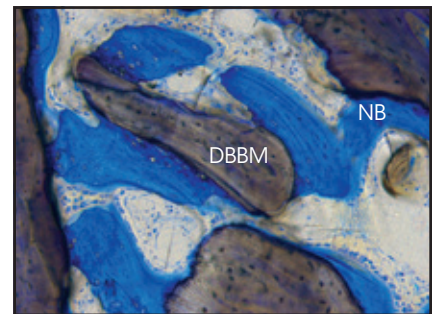


**Abb. 2c** (links)  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB. Zentraler Schnitt durch den Zylinder (Vergrößerung x 2,5).

**Abb. 2d** (rechts) DBBM + rhPDGF-BB. Zentraler Schnitt durch den Zylinder (Vergrößerung x 2,5).



**Abb. 2e** (rechts) DBBM + rhPDGF-BB. Starke Vergrößerung (x 20) mit Knochenneubildung entlang des osteokonduktiven DBBM-Trägers. DBBM = Partikel des deproteinisierten bovinen Knochenminerals, NB = neugebildeter Knochen.



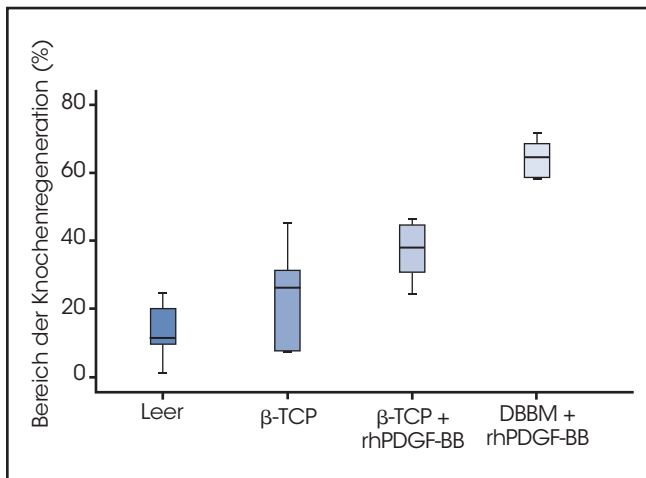
rhPDGF-BB hatten. Allerdings war die Aktivität von rhPDGF-BB in allen Proben gegenüber der Standardaktivität reduziert.

## Diskussion

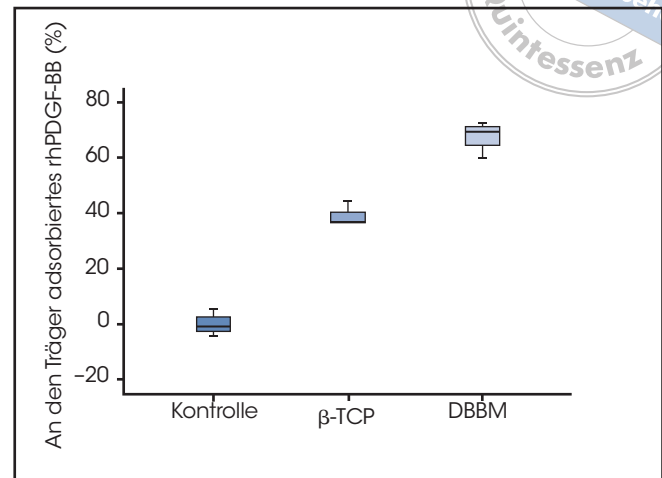
Diese experimentelle Studie ermittelte den größten Bereich mit Knochen-

regeneration, den höchsten Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf den Gesamtbereich und den höchsten Anteil der Bedeckung des Knochenersatzmaterials durch mineralisierten Knochen, wenn eine Kombination von rhPDGF-BB und DBBM zur Augmentation verwendet wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse und nur in diesem Tiermodell war

DBBM als Träger von rhPDGF-BB  $\beta$ -TCP überlegen. In den leeren Kontrollbereichen kam es innerhalb von zwei Monaten zu einer nur minimalen Knochenneubildung, wie es auch vorausgegangene Studien ermittelt hatten<sup>21, 23</sup>. Die Knochenneubildung wurde durch Zugabe von Knochenersatzmaterial ( $\beta$ -TCP) leicht verbessert und nahm bei der Zugabe von



**Abb. 3** Boxplot mit Mittelwert, oberem und unterem Quartil sowie 95% -Konfidenzintervall für den Bereich der Knochenregeneration.



**Abb. 4** Adsorption von rhPDGF-BB an  $\beta$ -TCP bzw. DBBM im Vergleich zur Positivkontrolle mit derselben Menge rhPDGF-BB. Die Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und zu  $\beta$ -TCP bzw. DBBM waren statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ). Die Affinität von rhPDGF-BB an DBBM war signifikant höher als an  $\beta$ -TCP ( $P < 0,01$ ).

rhPDGF-BB weiter zu, während die Kombination von rhPDGF-BB und DBBM zur stärksten Knochenneubildung führte.

Dass die Zugabe von rhPDGF-BB zu  $\beta$ -TCP einen zusätzlichen Nutzen bringt, wurde auch bei der Behandlung parodontaler Knochendefekte beschrieben<sup>7</sup>. In der vorliegenden Studie unterschied sich der Anteil des mineralisierten Knochens bezogen auf den Gesamtbereich statistisch nicht signifikant. Dies ist vermutlich auf die geringe Anzahl von lediglich sieben Kaninchen zurückzuführen. Die deskriptive Histologie zeigte jedoch, dass die Knochenneubildung bei Zugabe von rhPDGF-BB nicht nur auf die an den nativen Knochen und die Zylinderwände angrenzenden Bereiche beschränkt war, sondern auch weiter oben im Zylinder auftrat. Diese Beobachtung wurde bestätigt, wenn der Anteil der Knochenregeneration im

Zylinder berechnet wurde. Zylinder, die rhPDGF-BB + DBBM enthielten, wiesen eine Knochenneubildung bis zum mittleren Drittel des Zylinders auf, während der neugebildete Knochen in den Zylindern, die rhPDGF-BB +  $\beta$ -TCP beinhalteten, nur etwa das untere Drittel bedeckte.

DBBM wird mit oder ohne Zugabe von Kollagen bei vielen Indikationen eingesetzt<sup>24-26</sup>. In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die Applikation von DBBM und Kollagen (BC) in Extraktionsalveolen die Knochenheilung hinauszögern kann<sup>27</sup>, aber zum Erhalt des Alveolarkamms effektiver beiträgt, als es bei Kontrollen ohne das Knochenersatzmaterial der Fall ist<sup>28</sup>. Vermutlich erhöht die Zugabe des Wachstumsfaktors den Knochenumsatz und die Knochenneubildung, was durch das vorliegende Experiment bestätigt wurde. In einer In-vitro-Studie wurde rhPDGF-BB rasch adsorbiert und

dann schnell aus BC freigesetzt, sodass es zu einer stärkeren Proliferation von osteoblastären Zellen kam als bei alleiniger Anwendung des Trägers<sup>29</sup>. Dieselbe Kombination aus rhPDGF-BB und BC wurde in humane Extraktionsalveolen gegeben und führte zur Bildung von robustem Knochen, aber auch zur Resorption von BC<sup>30</sup>. Lokalisierte Alveolardefekte sind schwieriger zu behandeln, da der augmentierte Bereich eine verbesserte Langzeitstabilität erreichen muss. Die dafür erforderlichen Voraussetzungen eines Trägermaterials erfüllt DBBM ohne Kollagen daher besser.

Die In-vitro-Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen eine rasche Adsorption von rhPDGF-BB an DBBM und  $\beta$ -TCP sowie die höhere Kapazität von DBBM als von  $\beta$ -TCP zur rhPDGF-BB-Adsorption. Wenn keine um die Adsorption kompetitierenden Proteine vorhanden waren,

blieb rhPDGF-BB an beide Materialien gebunden. BC besteht zu 10 % aus porcinem Kollagenprotein und zu 90 % aus DBBM. Diese abweichende Zusammensetzung könnte dafür verantwortlich sein, dass über die Zeitspanne von 10 Tagen 30 % des rhPDGF-BB abgegeben wurden<sup>29</sup>. Mit höherer Wahrscheinlichkeit wurde rhPDGF-BB von der rhPDGF-BB-Fraktion freigesetzt, die initial an Kollagen adsorbiert war, als von der Fraktion, die von der Mineralphase adsorbiert wurde.

Hinsichtlich der Bioaktivität hatte die Exposition von rhPDGF-BB auf rhPDGF-BB-gesättigtem  $\beta$ -TCP bzw. DBBM keine Auswirkungen auf die Aktivität des Wachstumsfaktors. Obwohl die Aktivität von rhPDGF-BB unter derjenigen von Standard-rhPDGF-BB aus einer anderen Quelle lag (Sigma-Aldrich Chemie), gab es in der Positivkontrolle keinen Unterschied, sodass die Abweichungen vermutlich durch die unterschiedlichen Quellen der Wachstumsfaktoren entstanden. Eventuell führte die im Vergleich zu  $\beta$ -TCP höhere Kapazität von DBBM für rhPDGF-BB zur vermehrten Knochenneubildung, vor allem da das an die BC-Oberfläche adsorbierte rhPDGF-BB weiterhin bioaktiv ist<sup>29</sup>. Obwohl rhPDGF-BB in vitro unter proteinfreien Bedingungen nicht von  $\beta$ -TCP oder DBBM freigesetzt wurde, könnte dies in vivo durch die Konkurrenz mit anderen Proteinen und den schnelleren Abbau des Trägermaterials durchaus geschehen. Um dies abschließend beurteilen zu können, ist jedoch der Vergleich von nur mit DBBM behandelten Bereichen und ein Einschluss von BC-Proben in die Untersuchung erforderlich. Diese Behandlungsansätze waren wegen des auf vier Defekte beschränkten etablierten Protokolls kein Bestandteil der vorliegenden Studie.

### Schlussfolgerungen

Aus diesem Tiermodell ergibt sich, dass die Kombination von rhPDGF-BB und DBBM die Knochenheilung in therapeutisch anspruchsvollen Bereichen beschleunigen kann. Dieser Effekt wurde durch den größten Anteil an regeneriertem Knochen, den größten Anteil an mineralisiertem Knochen bezogen auf den Gesamtbereich und den größten Anteil von mit mineralisiertem Knochen bedeckten Korngrenzen des Knochenersatzmaterials bei Verwendung von DBBM + rhPDGF-BB im Vergleich zu  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB,  $\beta$ -TCP und Leerkontrollen belegt. Diese In-vivo-Daten werden durch In-vitro-Daten gestützt, wonach die Adsorption von rhPDGF-BB an DBBM stärker ist als an  $\beta$ -TCP.

### Danksagungen

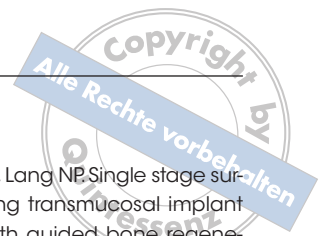
Die Autoren danken dem Team von F. Nicholls für die Unterstützung bei der Durchführung der Operationen und bei der Unterbringung der Tiere, A. Tchouboukov für die technische Unterstützung und J. Fierz und B. Glaus für die Verarbeitung der histologischen Proben. Die Finanzierung dieser Studie erfolgte durch die Universität Zürich sowie durch einen Zuschuss der Schweizerischen Zahnärzte-Gesellschaft (Nr. 237-08).

### Literatur

1. Cochran DL, Nummikoski PV, Schoolfield JD, Jones AA, Oates TW. A prospective multicenter 5-year radiographic evaluation of crestal bone levels over time in 596 dental implants placed in 192 patients. *J Periodontol* 2009;80:725–733.
2. Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Tröger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: A prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:495–502.

3. Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WW, Vissink A. Morbidity of mandibular bone harvesting: A comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:359–365.
4. Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994;14:496–511.
5. Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: A systematic review. *J Clin Periodontol* 2008;35(suppl):255–281.
6. Thoma DS, Cochran DL. Unlocking the mystery of periodontal regeneration—Different tissues, different phenotypes. *J Periodontol Implantol Orale* 2010;17:23–60.
7. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, et al. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol* 2005;76:2205–2215.
8. McGuire MK, Kao RT, Nevins M, Lynch SE. rhPDGF-BB promotes healing of periodontal defects: 24-month clinical and radiographic observations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:223–231.
9. McGuire MK, Scheyer T, Nevins M, Schubach P. Evaluation of human recession defects treated with coronally advanced flaps and either purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB with beta tricalcium phosphate or connective tissue: A histologic and microcomputed tomographic examination. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:7–21.
10. Simion M, Rocchietta I, Dellavia C. Three-dimensional ridge augmentation with xenograft and recombinant human platelet-derived growth factor-BB in humans: Report of two cases. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2007;27:109–115.





11. Simion M, Rocchietta I, Kim D, Nevins M, Fiorellini J. Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: A histologic study in a dog model. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:415-423.
12. Schwarz F, Ferrari D, Podolsky L, Mihatovic I, Becker J. Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: An immunohistochemical study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:90-99.
13. Urban I, Caplanis N, Lozada JL. Simultaneous vertical guided bone regeneration and guided tissue regeneration in the posterior maxilla using recombinant human platelet-derived growth factor: A case report. *J Oral Implantol* 2009;35:251-256.
14. Cardaropoli D. Vertical ridge augmentation with the use of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bovine bone mineral: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:289-295.
15. Wikesjo UM, Razi SS, Sigurdsson TJ, et al. Periodontal repair in dogs: Effect of recombinant human transforming growth factor-beta1 on guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1998;25:475-481.
16. Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, et al. Periodontal repair in dogs: Evaluation of rhBMP-2 carriers. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:524-537.
17. Jung RE, Hämmerle CH, Kokovic V, Weber FE. Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:258-266.
18. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318-326.
19. Exner HE. A model stereological nomenclature. *Acta Stereologica* 1987;6:179-184.
20. Hämmerle CH, Olah AJ, Schmid J, et al. The biological effect of natural bone mineral on bone neof ormation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:198-207.
21. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hämmerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:188-195.
22. He CF, Hughes MA, Cherry GW, Arnold F. Effects of chronic wound fluid on the bioactivity of platelet-derived growth factor in serum-free medium and its direct effect on fibroblast growth. *Wound Repair Regen* 1999;7:97-105.
23. Schneider D, Weber FE, Hämmerle CH, Feloutzis A, Jung RE. Bone regeneration using a synthetic matrix containing enamel matrix derivate. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:214-222.
24. Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:9-18.
25. Orsini G, Traini T, Scarano A, et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: A light, scanning, and transmission electron microscopy study in man. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:448-457.
26. Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: A prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:1219-1225.
27. Araújo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: An experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1-6.
28. Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:433-440.
29. Stephan EB, Renjen R, Lynch SE, Dziak R. Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. *J Periodontol* 2000;71:1887-1892.
30. Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Kim DM, Camelo JM, Nevins M. Human histologic evaluation of mineralized collagen bone substitute and recombinant platelet-derived growth factor-BB to create bone for implant placement in extraction socket defects at 4 and 6 months: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:129-139.