

Rekombinanter humaner Platelet-Derived Growth Factor-BB zur Rekonstruktion großer Wanddefekte in Extraktionsalveolen beim Menschen



Marc L. Nevins, DMD, MMSc¹/Mark A. Reynolds, DDS, PhD²
Marcelo Camelo, DDS³/Peter Schupbach, PhD⁴
David M. Kim, DDS, DMSc⁵/Myron Nevins, DDS⁶

In der hier vorgestellten Studie wurde die Regeneration großer Wanddefekte in Extraktionsalveolen untersucht. Dazu wurden Wachstumsfaktor-angereicherte Matrizen in Kombination mit einem Stellschrauben-Trägersystem und einer resorbierbaren Membran verwendet. Acht Patienten wurden randomisiert mit einer bovinen oder equinen Matrix behandelt. Diese wurde zuvor für 10 min jeweils mit 1,0 ml (0,3 mg/ml) rekombinatem humanem Platelet-derived Growth Factor-BB (rhPDGF-BB) je Gramm vermischt. Die Stellschrauben sorgten für zusätzliche Stabilität. Die partikulierte und mit Wachstumsfaktor angereicherte Matrix wurde schichtweise in den Defekt eingebracht und verdichtet und anschließend mit einer resorbierbaren Membran abgedeckt. Bei der Freilegungsoperation nach fünf Monaten wurden mit dem Trepanbohrer Gewebeproben entnommen und die Implantate gesetzt. In beiden Gruppen heilten alle Defekte gut, wobei sich knochenartiges Hartgewebe bildete, das histologisch aus vitalem Knochen mit zwischengelagerten verbliebenen Transplantatpartikeln bestand. Die Studienergebnisse belegen, dass Wachstumsfaktor-angereicherte Matrizen in Kombination mit Stellschrauben und einer resorbierbaren Membran zur Rekonstruktion großer Wanddefekte in Extraktionsalveolen geeignet sind. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2014; 34: 149–155)

- ¹ Klinischer Assistenzprofessor, Division of Periodontology, Department of Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, Massachusetts, USA.
² Professor und Leiter, Department of Periodontics, University of Maryland School of Dentistry, Baltimore, Maryland, USA.
³ Institute for Advanced Dental Studies, Belo Horizonte, Brasilien.
⁴ Schupbach Ltd, Service and Research Laboratory for Biomaterials, Histology and Imaging, Horgen, Schweiz.
⁵ Assistenzprofessor, Division of Periodontology, Department of Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, Massachusetts, USA.
⁶ Außerordentlicher klinischer Professor, Division of Periodontology, Department of Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, Massachusetts, USA.

Korrespondenz an: Dr. Marc Nevins, Harvard School of Dental Medicine, 188 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. Fax: +1 617 432 1897. E-Mail: drmarcnevins@gmail.com

©2014 by Quintessenz Publishing Co Inc.

Die Knochenregeneration beim Menschen wird von Autografts, Allografts und Xenografts gefördert. Sie zeigen alle ähnliche morphologische Eigenschaften und Zusammensetzungen. Es zeigen sich jedoch wichtige speziesabhängige Unterschiede in ihrer Zusammensetzung und Dichte sowie den Materialeigenschaften, die sich auf die Effektivität der Regeneration auswirken. Die chemischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften, wie Oberflächenrauigkeit und Porosität, liefern für die osteogene Zelle und die Knochenentwicklung wichtige Signale und Umgebungsreize^{1,2}. Außerdem verändern Präparation, Verarbeitung und Sterilisierung die biologischen Eigenschaften aller Biomaterialien.

Die Kombination des rekombinanten humanen Platelet-derived Growth Factor-BB (rhPDGF-BB) mit einem Allograft oder xenogenem anorganischem Knochenmaterial hat sich für die Verbesserung von Implantatbetten als klinisch erfolgreich erwiesen^{3,4}. Außerdem belegt ein vor Kurzem veröffentlichter Fallbericht die erfolgreiche Verwendung eines mit rhPDGF-BB angereicherten equinen Knochenblocks zur lateralen Augmentation des Alveolarkammes⁵. Aus klinischen Fallberichten und Fallserien geht hervor, dass partikulierte und flexible equine Knochenplatten erfolgreich für die vertikale Kammaugmentation^{6–8} und Sinusboden-

augmentation eingesetzt werden können^{9,10}.

Auch intraossäre Defekte beim Hund wurden erfolgreich mit equinen Knochenpartikeln und rhPDGF-BB behandelt und eine parodontale Regeneration erreicht¹¹. Mit rhPDGF-BB angereicherte equine Knochenblöcke mit Hydroxylapatit und Kollagen führten bei Hunden¹² und nicht humanen Primaten¹³ mit Alveolar-kammdefekten kritischer Größe im Unterkiefer zu einem signifikanten vertikalen Knochenaufbau.

In der vorliegenden Studie wurden die klinischen, histologischen und radiologischen Ergebnisse der Augmentation vor einer Implantation von großen Extraktionsalveolen mit rhPDGF-BB-angereicherter, partikulierter equiner oder boviner Knochenmatrix verglichen.

Material und Methode

Einschlusskriterien und Studienaufnahme

Die acht Patienten (vier Männer, vier Frauen) im Alter von 36 bis 70 Jahren stimmten der Studienteilnahme schriftlich gemäß der Deklaration von Helsinki in der revidierten Fassung aus dem Jahr 2000 zu. Sie wiesen jeweils mindestens einen Zahn auf, der aufgrund einer schweren parodontalen Erkrankung als nicht erhaltungswürdig eingestuft und zur Extraktion vorgesehen war. Ausschlusskriterium war eine Knochendicke zwischen der Wurzelspitze des Zahns und dem N. alveolaris inferior bzw. dem Sinusboden von unter 2 mm.

Chirurgisches Vorgehen

Die Zähne wurden unter Lokalanästhesie (2 % Lidocain mit 1:100000

Adrenalin) und leichter intravenöser Sedierung extrahiert. Die Defekte an den Extraktionsalveolen wurden gereinigt und von Granulationsgewebe befreit. Anschließend wurde das Knochenmark penetriert, um eine Blutung in den Defekt auszulösen, und das Transplantat mit Stellschrauben (Osteomed) abgestützt.

Der Wachstumsfaktor (Gem 21S, Osteohealth) wurde randomisiert mit der bovinen (Bio-Oss, Geistlich) oder equinen (Equimatrix, Osteohealth) Matrix im Verhältnis von 1,0 ml (0,3 mg/ml) rhPDGF-BB je Gramm Xenograft vermischt und für 10 min absorbiert. Anschließend wurde die Wachstumsfaktor-angereicherte partikulierte Matrix schichtweise in den Defekt eingebracht und verdichtet, um eine höchstmögliche Stabilität zu erreichen, und das Transplantat mit einer resorbierbaren Membran (Dynamatrix, Keystone) abgedeckt. Der primäre Wundverschluss erfolgte nach Entlastungsschnitten mit einer Kombination aus vertikaler Matrattennaht und Einzelknopfnähten mit expandiertem Polytetrafluorethylen (e-PTFE; Gore-tex).

Postoperativ reinigten die Patienten den transplantierten Bereich für zwei Wochen nicht mit der Bürste, um Verletzungen zu vermeiden. Außerdem spülten sie zweimal täglich für sieben Tage den Mund mit 0,12 % Chlorhexidingluconat und nahmen oral Antibiotika ein (Amoxicillin oder Clindamycin), um die Bildung eines bakteriellen Biofilms zu verhindern und das Infektionsrisiko zu reduzieren. Zur Analgesie erhielten sie ein nicht steroidales Antiphlogistikum (Ibuprofen 4 x 600 mg/d für drei Tage).

Nach sieben und 14 Tagen wurden die Patienten untersucht und die transplantierten Defekte vorsichtig mit chlorhexidingetränkten Mullkompressen gereinigt. Bei diesen Besuchen wurden auch die Mundhygiene-Anweisungen wiederholt.

Nach fünf Monaten wurde ein digitales Volumetomogramm der transplantierten Defekte angefertigt. Anschließend wurden bei der Freilegungsoperation Gewebeproben zur histologischen Untersuchung entnommen und Implantate (Intralock) gesetzt. Unabhängig von der verwendeten Matrix fanden sich dabei Überreste der Transplantatpartikel. Die Proben wurden mit einem Trepanbohrer mit einem Innendurchmesser von 2 mm aus dem Zentrum des vormaligen Defekts entnommen und im Bohraufsatz in 10 % Formalin konserviert. Die Implantate wurden nach einer Einheilungszeit von fünf Monaten restauriert.

Lichtmikroskopie

Die Biopsiezylinder wurden in 10 % gepufferter Formalinlösung fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Anschließend wurden sie in einen lichthärtenden Einkomponentenkunststoff (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer) eingebettet, die Probenblöcke in Scheiben mit einer Dicke von 30 bis 50 µm geschnitten, geschliffen (Exakt, Norderstedt) und poliert¹⁴. Die histologischen Schnittpräparate wurden mit Sanderson-Schnellknochenfärbung gefärbt und mit Säurefuchsin gegengefärbt (Dorn & Hart).

Rasterelektronenmikroskopie mit Rückstreuelektronen (REM-RE)

Nach der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Schnitte für die REM-RE vorbereitet. Dazu wurden die Schliffpräparate gereinigt, mit einer 6 nm dicken Kohlenstoffschicht bestäubt und unter einem Zeiss-Supra-40-VP-Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dieses Mikroskop besitzt

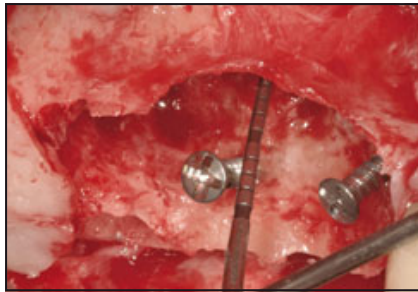


Abb. 1 Die Extraktionsalveolen des Molaren mit Stellschrauben zeigen den schwierigen Erhalt der Knochenhöhe und -breite.

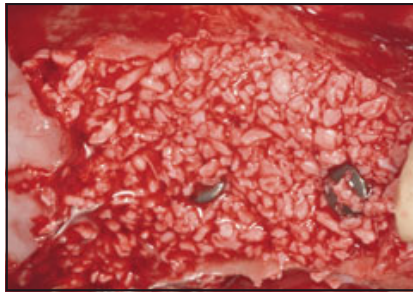


Abb. 2 Auffüllen des Defekts mit rhPDGF-BB-hydriertem partikuliertem equinem Transplantat bis auf Höhe der Stellschrauben.

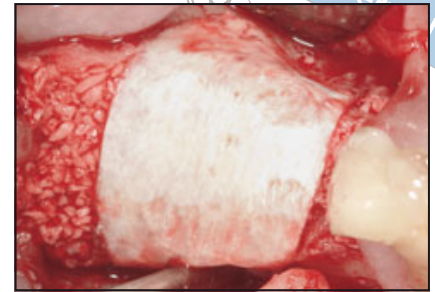


Abb. 3 Resorbierbare extrazelluläre Barriere-membran, die zum Raumerhalt über das Transplantat platziert wurde.

eine Feldemissionskathode und einen Detektor für die Rückstreuелектронен.

Ergebnisse

Klinische Ergebnisse

Insgesamt wurden acht Patienten mit (bis in den angrenzenden Alveolarkamm reichenden) Defekten in Extraktionsalveolen randomisiert auf zwei Behandlungsgruppen verteilt. Die Extraktionsalveolen zeigten sowohl einen horizontalen als auch einen vertikalen Knochenverlust. Insgesamt wurden acht Defekte behandelt: vier mit equiner und vier mit boviner Matrix.

In die mit equinem Knochen (EK-Gruppe) regenerierten Bereiche wurden 12 Implantate gesetzt, in die mit bovinem Knochen (BK-Gruppe) behandelten Bereiche sechs Implantate. Bei einem Patienten der BK-Gruppe konnte die Freilegungsoperation aufgrund einer nicht assoziierten Erkrankung infolge eines Unfalls nicht durchgeführt werden. Zur histologischen Untersuchung standen sieben Proben der EK-Gruppe und drei Proben der BK-Gruppe zur Verfügung. Die Heilung verlief ohne unvorherge-

sehene Komplikationen. Bei einem mit EK behandelten Defekt trat eine umschriebene Wunddehiszenz auf. Aufgrund der Alveolarkammaugmentation war bei der Freilegungsoperation eine Osteotomie mit einem Trepanbohrer möglich und es konnten Implantate mit einem Durchmesser von 4 mm oder 5 mm (Intralock) gesetzt werden. In der EK-Gruppe gab es einen Misserfolg eines Implantats im oberen Seitenzahnbereich.

Histologische Ergebnisse

Die mikroskopische Untersuchung der Proben aus beiden Gruppen zeigte die Neubildung von Knochen, der sich der Nähe der osteokonduktiven Transplantatpartikel befand und oft Brücken zwischen diesen Partikeln bildete. Es fanden sich weder Entzündungszellinfiltrate noch Fremdkörperreaktionen.

Patient 1

Bei diesem Patienten bestand ein fortgeschrittener Knochendefekt am oberen linken zweiten Molaren mit einem breiten, 6 mm tiefen Defekt.

Nach der Dekortikation wurden als zusätzliches vertikales Trägermaterial zwei Stellschrauben eingesetzt (Abb. 1) und der Defekt bis auf Höhe der Stellschrauben mit Wachstumsfaktorangereichertem equinem Knochen aufgefüllt (Abb. 2). Anschließend wurde das Transplantat zum Raumerhalt mit einer resorbierbaren extrazellulären Barriere-membran abgedeckt (Abb. 3) und die Wunde mit einer vertikalen Matratzennaht und Einzelknopfnähten spannungsfrei verschlossen.

Bei der Freilegungsoperation nach fünf Monaten zeigte sich knochenartiges Hartgewebe bis auf Höhe der Stellschrauben. Vor dem Setzen der drei Implantate wurden mit dem Bohrer Biopsiezylinder entnommen (Abb. 4). Die Implantate wurden nach fünf Monaten restauriert und belastet und waren klinisch und radiologisch osseointegriert (Abb. 5).

Patient 2

Der Patient stellte sich mit einem fortgeschrittenen Knochendefekt am oberen linken Eckzahn vor. Nach der Kürettage zeigte sich ein breiter, 7 mm tiefer Defekt. Als zusätzliches vertikales Trägermaterial wurden zwei

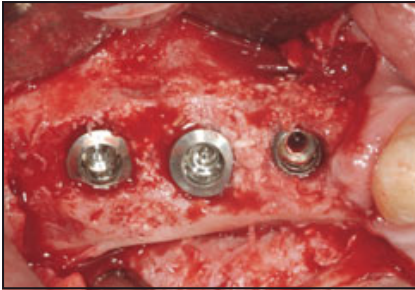


Abb. 4 Bei der Freilegungsoperation nach 5 Monaten findet sich knochenartiges Hartgewebe im Sinne des histologisch nachgewiesenen vitalen Knochens.

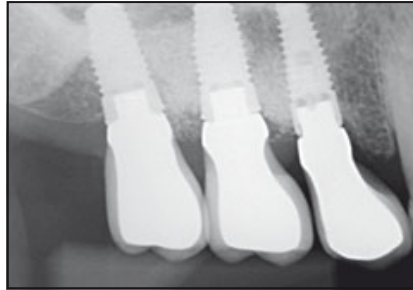


Abb. 5 Die Röntgenaufnahme der Implantate nach der Restauration zeigt ihre Osseointegration.

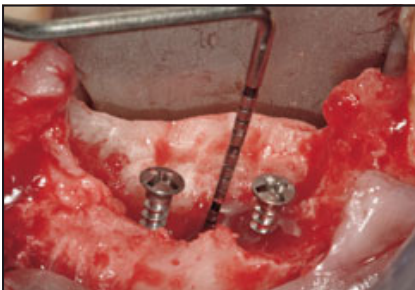


Abb. 6 Extraktionsalveole eines unteren Eckzahns nach Kürettage und Einbringen der Stellschrauben auf Höhe der geplanten Knochenbildung.

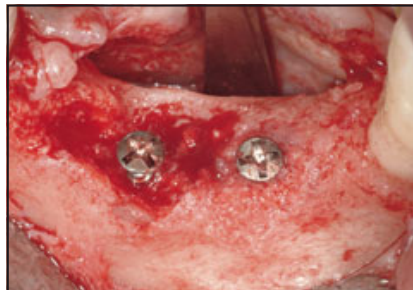


Abb. 7 Bei der Freilegungsoperation findet sich robustes Hartgewebe, das histologisch vitalem Knochen entspricht. Da die rechte Stellschraube mobil war, wurde vertikal etwas weniger Knochen gebildet.

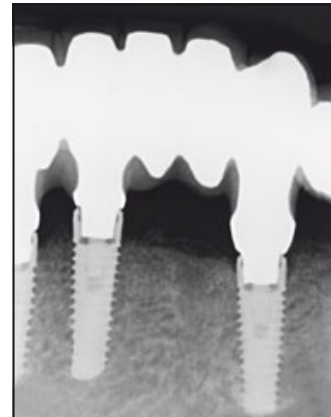


Abb. 8 Postoperative Röntgenaufnahme.

Stellschrauben eingesetzt (Abb. 6), der Defekt dekortikalisiert und bis auf Höhe der Stellschrauben mit Wachstumsfaktor-angereichertem bovinem Transplantat aufgefüllt. Zum Raumerhalt wurde das Transplantat mit einer resorbierbaren extrazellulären Barriermembran abgedeckt und die Lappen spannungsfrei über der Wunde geschlossen.

Bei der Freilegungsoperation nach fünf Monaten fand sich eine große Menge knochenartigen Hartgewebes (Abb. 7), sodass eine Implantation und anschließende Restauration (Abb. 8) möglich war. Histologisch war nahe der bovinen Transplantatpartikel vitaler, neugebildeter Knochen sichtbar (Abb. 9 und 10), was die osteokonduktiven Eigenschaften des Transplantatmaterials bestätigt.

Patient 3

Bei diesem Patienten bestand ein fortgeschrittener Knochendefekt des gesamten unteren linken Quadranten (Abb. 11). Zum Raumerhalt und zur Stabilisierung des Transplantats wurden vier Stellschrauben gesetzt. Die Wachstumsfaktor-angereicherte equine Matrix wurde bis auf Höhe der Stellschrauben eingebracht, mit einer Membran abgedeckt und die Wunde spannungsfrei verschlossen.

Bei der Freilegungsoperation nach fünf Monaten fand sich eine große Menge knochenartigen Hartgewebes (Abb. 12), sodass eine Implantation und anschließende Restauration (Abb. 13) möglich war. Histologisch fand sich nahe der equinen Transplantatpartikel vitaler, neugebil-

der Knochen (Abb. 14), was die osteokonduktiven Eigenschaften des Transplantatmaterials bestätigt (Abb. 15).

Diskussion

In dieser Studie wurde klinisch und histologisch untersucht, inwieweit große Defekte in Extraktionsalveolen mit Wachstumsfaktor-angereicherten xenogenen (bovinen oder equinen) Partikeltransplantaten in Kombination mit Stellschrauben und einer resorbierbaren Membran behandelt werden können. Die beiden Partikeltransplantate unterscheiden sich kaum hinsichtlich der Verarbeitung und ihrer Eigenschaften und sind vergleichbar effektive Trägermaterialien

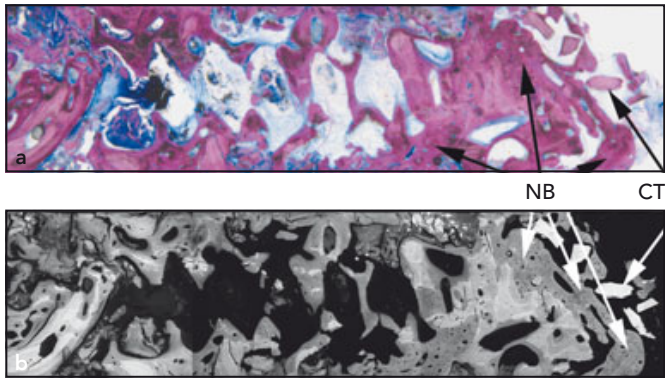


Abb. 9 (a) Histologie eines Knochenzylinders aus einem mit bovinem Knochen behandelten Defekt mit Transplantatpartikeln und vitalem Knochen. (b) Die REM-RE-Untersuchung desselben Biopsiezylinders zeigt eine unterschiedliche Mineralisierung, die an den verschiedenen Grautönen zu erkennen ist. NB = neugebildeter Knochen; CT = Bindegewebe.

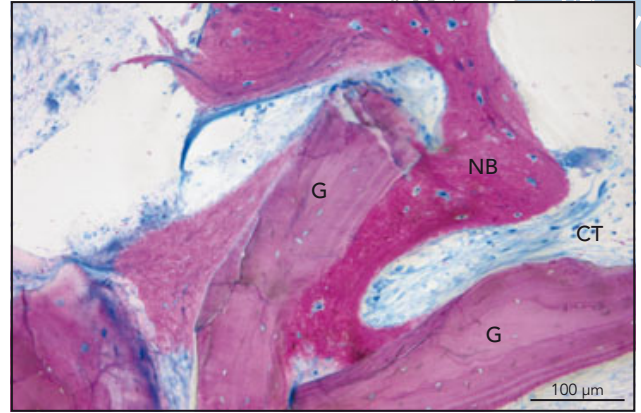


Abb. 10 Das histologische Präparat zeigt die Bildung von neuem Knochen (NB) und bovinem Transplantatmaterial (G). Es finden sich keine Zeichen einer Entzündung. CT = Bindegewebe.

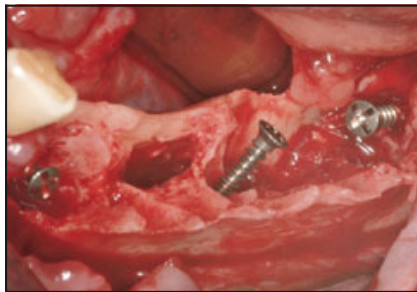


Abb. 11 Extraktionsalveole eines Molaren nach Kürettage und Einsetzen der Stellschrauben auf Höhe der geplanten Knochenbildung.



Abb. 12 Freilegungsoperation und Implantation nach 6 Monaten; die Breite des Alveolarkamms hat deutlich zugenommen.

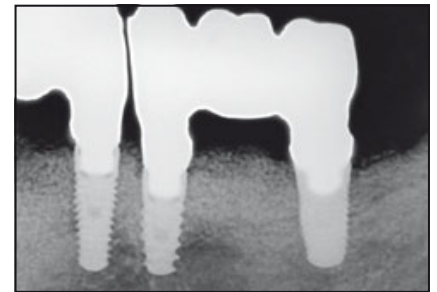


Abb. 13 Postoperative Röntgenaufnahme.

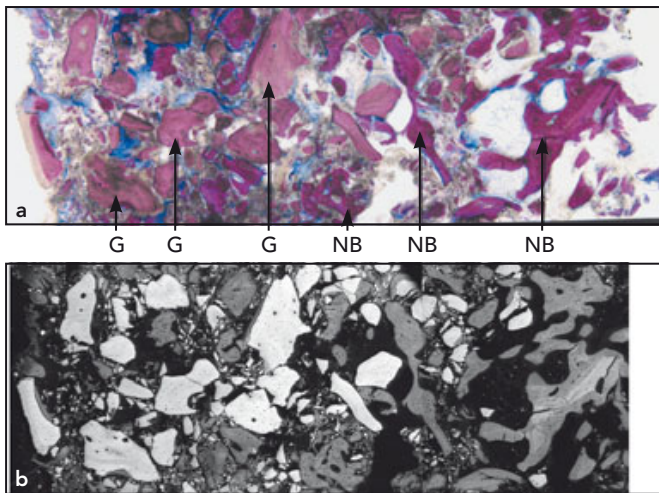


Abb. 14 (a) Histologisch enthält dieser Knochenzylinder aus einem Bereich, der mit equinem Knochen transplantiert wurde, Transplantatpartikel und vitalen Knochen. (b) Die REM-RE-Untersuchung desselben Biopsiezylinders zeigt eine unterschiedliche Mineralisierung, die an den verschiedenen Grautönen zu erkennen ist. NB = neugebildeter Knochen; G = equines Transplantat.

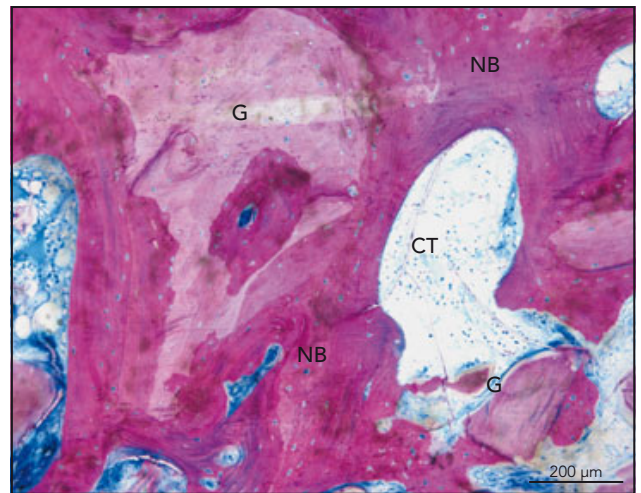


Abb. 15 Das histologische Präparat zeigt die Bildung von neuem Knochen (NB) am equinen Transplantat (G). Es finden sich keine Zeichen einer Entzündung. CT = Bindegewebe.

für rhPDGF-BB. Beide Knochenmatrizen förderten die Knochenneubildung, die sich oft nahe den Transplantatpartikeln zeigte. Dies belegt die osteokonduktiven Eigenschaften der Matrizen. Die histologisch ermittelte Knochenneubildung entsprach den klinischen und radiologischen Befunden und ermöglichte eine korrekte Implantation und Restauration.

Bovine Knochenmatrizen wurden schon oft erfolgreich in Kombination mit rhPDGF-BB eingesetzt. Über die Kombination von rhPDGF-BB mit equinem Knochentransplantat gibt es nur einen Fallbericht⁵. In der vorliegenden Studie führte diese Kombination zu einem ausreichenden Knochenaufbau. Außerdem gab es bei den 12 Implantaten in Defektbereichen, die mit Wachstumsfaktorangereichertem equinem Knochen behandelt worden waren, nur einen Misserfolg. Die übrigen Implantate wurden inzwischen restauriert und werden auch weiterhin funktionell belastet.

Das Regenerationspotenzial der Matrizen wird durch unterschiedliche physikalische und biologische Eigenschaften der Knochentransplantate beeinflusst. So besitzt humane Kortikalis eine geringere Knochendichte als boviner oder equiner Knochen¹. In Vergleichsstudien wurden deutliche morphometrische und morphologische Unterschiede zwischen der Kortikalis der langen Röhrenknochen von Pferden und Rindern ermittelt². Plexiformer Knochen, der überwiegend aus fibrolamellärem Knochengewebe besteht, findet sich oft bei Pferden und Rindern, nicht aber beim Menschen¹⁵. Diese Unterschiede wirken sich auf die Verwendung von Knochengewebe als Trägermaterial für biologische Substanzen und damit auf die Effektivität der regenerativen Behandlung aus.

Die Kombination aus einem equinen Knochenblock mit Hydroxylapatit und Kollagen führte bei der Behand-

lung lokalisierter Knochendefekte im Hundemodell zu besseren regenerativen Ergebnissen als ein deproteinisierter boviner Knochenblock¹⁶. Zecha et al. untersuchten im Rattenmodell die Verwendung von equinen spongiösen Knochenblöcken für die laterale Augmentation im Unterkiefer. Sie wiesen eine signifikant bessere Knochenbildung nach als bei der Verwendung boviner spongiöser Knochenblöcke; außerdem wuchs mehr Knochen in die equinen Knochenblöcke ein¹⁷.

Präklinische Studien liefern eine starke Evidenz dafür, dass Wachstumsfaktoren, wie rhPDGF-BB, die Effektivität von Trägermaterialien bei der Regeneration von Alveolarknochen verstärken.

Simion et al. untersuchten im Hundemodell die Effektivität von rhPDGF-BB, das mit einem equinen Knochenblock mit Hydroxylapatit und Kollagen kombiniert wurde. Die Autoren setzten es für den vertikalen Knochenaufbau von kritisch großen Alveolarkammdefekten im Unterkiefer ein¹². Die Zugabe von rhPDGF-BB führte zu einer signifikant besseren vertikalen Knochenregeneration mit dichtem, gut vaskularisiertem Knochen, großem Knochen-Implantat-Kontakt und einem rascheren Ersatz der Transplantatpartikel durch neugebildeten Knochen als bei der alleinigen Verwendung des Knochenblocktransplantats. Genauso wie bei den Neuentwicklungen im Gebiet des Tissue Engineering, ermitteln wir immer weiter die zuverlässigsten Verfahren für die Knochenregeneration in parodontalen Defekten.

Schlussfolgerung

Die regenerativen Verfahren für orale Implantationen werden gemäß dem Wunsch der Patienten nach minimalinvasiven Eingriffen entwickelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie

zeigen, dass Wachstumsfaktorangereicherte xenogene Matrizen in Kombination mit Stellschrauben und einer resorbierbaren Membran die Rekonstruktion großer Defekte an Extraktionsalveolen ermöglichen.

Interessenerklärung

Diese Studie wurde durch Fördergelder der Osteohealth Company unterstützt.

Literatur

1. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998;139:663–670.
2. Zedda M, Lepore G, Manca P, Chisu V, Farina V. Comparative bone histology of adult horses (*Equus caballus*) and cows (*Bos taurus*). *Anat Histol Embryol* 2008;37:442–445.
3. Nevins ML, Reynolds MA. Tissue engineering with recombinant human platelet-derived growth factor BB for implant site development. *Compend Contin Educ Dent* 2011;32:18–27.
4. Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Nevins M, Kim SW, Kim DM. Human buccal plate extraction socket regeneration with recombinant human platelet-derived growth factor BB or enamel matrix derivative. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31:481–492.
5. De Angelis N, Scivetti M. Lateral ridge augmentation using an equine flex bone block infused with recombinant human platelet-derived growth factor BB: A clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31:383–388.
6. Ludovichetti M, Di Stefano DA, Pagnutti S, Vaccari E, Ludovichetti FS, Celletti R. Vertical ridge augmentation using a flexible heterologous cortical bone sheet: Three-year follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31:401–407.

7. Scarano A, Carinci F, Assenza B, Piattelli M, Murrura G, Piattelli A. Vertical ridge augmentation of atrophic posterior mandible using an inlay technique with a xenograft without miniscrews and miniplates: Case series. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:1125–1130.
8. Di Stefano DA, Artese L, Iezzi G, et al. Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: A clinical, histological, and immunohistochemical case series. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009;11:90–100.
9. Artese L, Piattelli A, Di Stefano DA, et al. Sinus lift with autologous bone alone or in addition to equine bone: An immunohistochemical study in man. *Implant Dent* 2011;20:383–388.
10. Stievano D, Di Stefano A, Ludovichetti M, et al. Maxillary sinus lift through heterologous bone grafts and simultaneous acid-etched implants placement. Five year follow-up. *Minerva Chir* 2008;63:79–91.
11. Nevins M, Nevins ML, Karimbux N, Kim SW, Schupbach P, Kim DM. The combination of purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB and equine particulate bone graft for periodontal regeneration. *J Periodontol* 2012;83:565–573.
12. Simion M, Nevins M, Rocchietta I, et al. Vertical ridge augmentation using an equine block infused with recombinant human platelet-derived growth factor-BB: A histologic study in a canine model. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:245–255.
13. Nevins M, Hezaimi KA, Schupbach P, Karimbux N, Kim DM. Vertical ridge augmentation using an equine bone and collagen block infused with recombinant human platelet-derived growth factor-BB: A randomized single-masked histologic study in non-human primates. *J Periodontol* 2012;83:878–884.
14. Donath K, 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* 1982;11:318–326.
15. Hillier ML, Bell LS. Differentiating human bone from animal bone: A review of histological methods. *J Forensic Sci* 2007;52:249–263.
16. Fontana F, Rocchietta I, Dellavia C, Nevins M, Simion M. Biocompatibility and manageability of a new fixable bone graft for the treatment of localized bone defects: Preliminary study in a dog model. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:601–607.
17. Zecha PJ, Schortinghuis J, van der Wal JE, et al. Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:533–542.