

Biologisierung von Knochenersatzmaterialien zur Steigerung der Knochenregeneration – eine Alternative zu autologen Knochentransplantaten

Bioactivation of bone substitutes to increase bone
regeneration – an alternative to autogenous bone
transplants

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades der
Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr. scient. med.)
an der Medizinischen Universität Graz

eingereicht von
Dr. med. dent. Angelika Wildburger

ausgeführt am Department für Zahnärztliche Chirurgie und
Röntgenologie, an der Universitätsklinik für Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde, Graz

unter der Anleitung von Univ. Prof. DDr. Norbert Jakse

Graz, 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und abgefasst, und jene Personen und Institutionen, die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt habe. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikationen wurde gemäß den Regeln der „Good Scientific Practice“ durchgeführt.

Graz, am 30.04.2014

Danksagungen

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Jakse für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und dessen laufende Betreuung, sowie für seine Unterstützung bei der Erstellung und Veröffentlichung der Publikation.

Desweiteren möchte ich mich bei Univ.Doz.DDr. Sebastian Sauerbier von der Universitätsklinik Freiburg als Initiator und Wegbegleiter der klinischen Studie bedanken. Er hat mit seiner Erfahrung wesentlich zum Gelingen des klinischen Teils der Studie beigetragen und lieferte wertvolle Unterstützung bei der Fertigstellung der Publikation und Dissertation. Großen Dank möchte ich auch den Mitarbeitern des Zellabors der Uniklinik Freiburg, insbesondere Herrn Dr. Hainer Nagursky und Frau Annette Lindner, für die histomorphometrische Auswertung der Biopsien aussprechen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr. Dirk Strunk und Frau Nathalie Etchard-Liechtenstein von der Stem Cell Research Unit der Hämatologie Graz für die Auswertung der Qualitätskontrollen und ihre fachliche Expertise bedanken, sowie bei Herrn Dr. Marton Magyar und sein Team von der Radiologie für die Durchführung und Auswertung der CT- und MRT-Aufnahmen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen und Mitarbeitern der Zahnklinik, ohne deren tatkräftige Unterstützung die Umsetzung der Studie nicht möglich gewesen wäre, insbesondere bei Herrn Prof. DDr. Michael Payer, Herrn Priv.Doz. Dr. Robert Kirmeier, Frau Dr. Susanne Platzer, Frau Hafner Erika (study nurse) und dem gesamten OP-Team. Desweiteren danke ich Frau Mag. Irene Mischak für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Abschließend möchte ich mich noch bei Paul bedanken, da er für mich immer eine wichtige mentale Stütze war.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	11
ZUSAMMENFASSUNG	12
HINTERGRUND	12
MATERIAL UND METHODEN	12
ERGEBNISSE	13
KONKLUSION	13
ABSTRACT	15
OBJECTIVE	15
MATERIAL AND METHODS	15
RESULTS	16
CONCLUSION	16
GRUNDLAGEN	17
EINLEITUNG	17
ZIELSETZUNG	20
ENTWICKLUNGSGESCHICHTE DER KNOCHENAUGMENTATION	21
BIOLOGISCHE ÜBERLEGUNGEN	21
GESTIELTE KNOCHENTRANSPLANTATION	23
FREIE KNOCHENTRANSPLANTATION	24
AUGMENTATION DER MANDIBULA	24
AUGMENTATION DER MAXILLA	25
TISSUE ENGINEERING	26
KIEFERKAMMAUGMENTATION	26
DEFEKTKLASSIFIKATION	26
METHODEN	31
GBR (Guided Bone Regeneration)	31
Inlaygraft - Sinusbodenelevation	35

Horizontale und vertikale Blocktransplantate	38
Bone Splitting	42
Vertikale Distraktionsosteogenese	44
Le Fort I Osteotomie mit autogenem Knocheninterponat	46
KNOCHENERSATZMATERIALIEN	47
ANFORDERUNGEN AN KNOCHENERSATZMATERIALIEN	47
ALLOTRANSPLANTATE	48
XENOTRANSPLANTATE	50
ALLOPLASTISCHE TRANSPLANTATE	53
METHODEN ZUR BIOLOGISIERUNG VON KNOCHENERSATZMATERIALIEN	58
TISSUE ENGINEERING	58
IN SITU REGENERATION	60
WACHSTUMS-/ DIFFERENZIERUNGSFAKTOREN UND OSTEOINDUKTIVE PROTEINE	61
MESENCHYMALE STAMMZELLEN (MSZ)	63
Klinischer Einsatz von MSZ	65
Methoden zur Stammzellkonzentrierung	67
FICOLL-Methode	68
LIMITIERENDE FAKTOREN	71
STUDIE	73
VORPROJEKT: KNOCHENMARKASPIRAT VON DER TIBIA	73
ZIEL DER PILOTSTUDIE	77
MATERIAL UND METHODEN	77
STUDIENDESIGN	77
KNOCHENMARKASPIRATION UND GEWINNUNG VON AUTOLOGEM THROMBIN	78
ZELLKONZENTRIERUNG	80
SINUSBODENAUGMENTATION	83
QUALITÄTSKONTROLLE - NACHWEIS VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN (MSZ)	85
KNOCHENBIOPSIE	90
HISTOLOGISCHE AUFBEREITUNG UND HISTOMORPHOMETRIE	92
RADIOLOGISCHE KONTROLLEN	94
STATISTIK	95
ERGEBNISSE	96
KNOCHENMARKASPIRATION	96
SINUSBODENAUGMENTATION	96
BIOPSIEENTNAHME	96
QUALITÄTSANALYSE VON KNOCHENMARKASPIRAT UND -KONZENTRAT	97

HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	99
HISTOMORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG	100
KNOCHENNEUBILDUNG BEI KOAGULIERTEN UND NICHT-KOAGULIERTEN PROBEN	103
KORRELATION VON MNZ UND KBE	104
KORRELATION VON KNOCHENNEUBILDUNG (KNB) UND KBE NACH 3 UND 6 MONATEN	105
KORRELATION VON KNOCHENNEUBILDUNG (KNB) UND BKEM NACH 3 UND 6 MONATEN	106
DISKUSSION	108
KNOCHENMARKASPIRATION UND ZELLKONZENTRIERUNG	108
KNOCHENNEUBILDUNG	110
KNOCHENERSATZMATERIALIEN	112
MESENCHYMALE STAMMZELLEN ZUR IN VIVO REGENERATION	117
KONKLUSION	120
LITERATURVERZEICHNIS	122
ANHANG	164
PATIENTENINFORMATION UND EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG ZUR TEILNAHME AN DER KLINISCHEN	
PRÜFUNG	164
PATIENTENPRÜFBOGEN	174
ORIGINALARBEIT	179

Abkürzungen

BMAC	Bone marrow aspiration concentrate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CD	Cluster of differentiation
CE	Communauté Européenne (gemäß EU-Verordnung)
CT	Computertomogramm
DBBM	Deproteinized bovine bone material
BKEM	Bovines Knochenersatzmaterial
DFDBA	Demineralized freeze dried bone allograft
DANN	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (= Durchflusszytometrie)
FDBA	Freeze dried bone allograft
FFB	Fresh frozen bone
FGF	Fibroblast-growth-factor
FICOLL	Dichtegradientenzentrifugation
GBR	Guided Bone Regeneration
GDF-5	Growth Differentiation Factor - 5
GTR	Guided Tissue Regeneration
HA	Hydroxylapatit
HIV	Human immunodeficiency virus
IGF	Insulin-like-growth-factor
i.v.	intravenös

KbE	Kolonie bildende Einheiten
KNB	Knochenneubildung
KV	Knochenvolumen
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
MNZ	Mononukleäre Zellen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylactid
PLGA	Polylaktid-co-Glycolid
PRP	Platelet-rich-Plasma
PTH	Parathyroidhormon
RCT	Randomized Clinical Trial
rh-BMP	Rekombinantes Bone Morphogenetic Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Scan-Elektronenmikroskop
Sog.	sogenannt
TGF	Transforming-growth-factor
TNZ	Total nucleated cells
VEGF	Vascular endothelial growth factor
β-TCP	β-Tricalciumphosphat
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 ERSTES DOKUMENTIERTES KNOCHENTRANSPLANTAT VON DER MANDIBULA, BARDENHEUER (1892), AUFGEZEICHNET VON ESMARCH UND KOWALZIG (1899)	24
Abb. 2 DARSTELLUNG DER DEFEKTKLASSEN DES ALVEOLARFORTSATZES UND DEREN THERAPIEKONZEPTE NACH HÄMMERLE UND JUNG (2008)	28
Abb. 3 INDIKATION FÜR HORIZONTALE GBR-TECHNIK: EINZIEHUNG DER BUCCALEN KORTIKALIS IN REGIO 12 UND 22, ZUSTAND NACH PILOTBOHRUNG	33
Abb. 4 APPLIKATION VON BioOss® FEIN (GEISTLICH MATERIALS) ZUM AUSGLEICH DER HORIZONTALEN KNOCHENATROPHIE	33
Abb. 5 EXTERNER SINUSLIFT MIT OSTEOTOMIE DER LATERALEN KIEFERHÖHLENWAND	37
Abb. 6 SINUS SINISTRA NACH APPLIKATION VON BOVINEM KNOCHENERSATZMATERIAL	37
Abb. 7 RADIOLOGISCHE KONTROLLE EINES BILATERALEN EXTERNEN SINUSLIFTES 3 MONATE POSTOPERATIV	38
Abb. 8 ENTNAHMERESSIONEN INTRAORALER KNOCHENTRANSPLANTATE (DRAENERT ET AL 2013)	39
Abb. 9 AUTOGENER KORTIKOSPONIÖSER KNOCHENBLOCK VON DER LINEA OBLIQUA	40
Abb. 10 APPLIKATION VON BOVINEM KNOCHENERSATZMATERIAL AUF DEN KNOCHENBLOCK ALS RESORPTIONSSCHUTZ	41
Abb. 11 DIE KNOCHENRINGTECHNIK ZUM AUSGLEICH HORIZONTALER UND VERTIKALER KNOCHENDEFEKTEN IM BEREICH DES KRESTALEN KIEFERKAMMES (STEVENS ET AL 2010)	42
Abb. 12 BONE-SPLITTING REGIO 35-37 MITTELS EINES KIEFERKAMMSPREIZERS (CHIAPASCO ET AL 2006)	44
Abb. 13 INTERNER DISTRAKTOR (MC ALLISTER ET AL 2007)	45
Abb. 14 EXTERNE VERANKERUNG (MC ALLISTER ET AL 2007)	45
Abb. 15 LE FORT I OSTEOTOMIE BEI AUSGEPRÄGTER ALVEOLARKAMMATROPHIE UND MAXILLÄRER PSEUDORETROGNATHIE (CHIAPASCO ET AL 2007)	47
Abb. 16 SCHEMATISCHE EINTEILUNG DER KNOCHENERSATZMATERIALIEN	48
Abb. 17 MAXGRAFT BLOCK (BOTISS DENTAL GMBH, BERLIN, DEUTSCHLAND) (KOLK ET AL 2012)	50
Abb. 18 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON MAXGRAFT® GRANULA, SEM AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	50
Abb. 19 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON ALGIPORE®, DENTSPLY IMPLANTS (KOLK ET AL 2012)	51
Abb. 20 BOVINES DEPROTEINISIERTES KNOCHENERSATZMATERIAL (BioOss®, GEISTLICH BIOMATERIALS, WOHLHUSEN, SCHWEIZ) (KOLK ET AL 2012)	53
Abb. 21 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON BioOss GRANULA, SEM AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	53
Abb. 22 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON HA, SEM AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	54
Abb. 23 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON β -TRICALCIUMPHOSPHAT GRANULA, SEM AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	55
Abb. 24 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON BIOGLASS-PARTIKEL MIT EINER NADELARTIGEN HYDROXYLAPATITOBERFLÄCHE (FU ET AL 2008)	55
Abb. 25 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON BIOGLASS GRANULA, SEM AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	56
Abb. 26 SEM AUFNAHME VON NANO BONE® GRANULA, WELCHE AUS HA EINGEBETTET IN EINE MATRIX AUS KIESELGEL BESTEHEN (ARTOSS GMBH, ROSTOCK, DEUTSCHLAND) (KOLK ET AL 2012)	57
Abb. 27 GRANULA AUS 60% HA UND 40 % β -TCP MIT EINER POLYGLYKOLIDSCHICHT UMMANTELT	57

Abb. 28 DIE GRANULA VERBINDEN SICH NACHDEM DIE POLYGLYKOLIDSCHICHT DURCH EINEN BIOLINKER AKTIVIERT WURDE (EASY-GRAFT CRYSTAL TM , DEGRADABLE SOLUTION, SCHLIEREN, SCHWEIZ)	57
Abb. 29 MORPHOLOGIE UND MIKROSTRUKTUR VON EASY GRAFT CRYSTAL TM , SEM-AUFNAHME (KOLK ET AL 2012)	58
Abb. 30 NACHWEIS DER PLURIPOTENZ VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN (MSZ) DURCH DIFFERENZIERUNG MITTELS VERSCHIEDENER WACHSTUMSFAKTOREN ZU OSTEOLASTEN, ADIPOZYTEN UND CHONDROZYTEN; DIESE KÖNNEN Z.B. HISTOLOGISCH DURCH ANFÄRZEN SPEZIFISCHER MATRIXBESTANDTEILE IDENTIFIZIERT WERDEN (ARBEITSGRUPPE PROF. DR. SHAKIBAEI, LEHRSTUHL FÜR ANATOMIE, LMU MÜNCHEN)	64
Abb. 31 KONZENTRIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN MITTELS FICOLL-VERFAHREN (ROBERT TRIPMACHER, „UNTERSUCHUNGEN ZU WIRKUNGEN EINER EINGESCHRÄNKTEN ENERGIESYNTHESE AUF FUNKTIONEN VON HUMANEN IMMUNZELLEN“, DISSERTATION 2005, CHARITÉ BERLIN)	69
Abb. 32 BMAC-SYSTEM (HARVEST TECHNOLOGY CORPORATION)	70
Abb. 33 BMAC-ZENTRIFUGE MIT BMAC-BEHÄLTER FÜR DAS KNOCHENMARKASPIRAT UND EINEM ZWEITEN BLAUEN BEHÄLTER FÜR DAS VENÖSE BLUT	70
Abb. 34 EINBRINGEN DES KNOCHENMARKASPIRATES IN DIE GROßE KAMMER MIT WEIßEM ZELLFILTER	71
Abb. 35 KNOCHENMARKASPIRAT NACH DER KONZENTRIERUNG MIT BUFFY COAT UND PLASMAÜBERSTAND IN DER KLEINEN KAMMER (PRIV.-DOZ. DDR. SEBASTIAN SAUERBIER, DEP. FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE, UNIKLINIK FREIBURG)	71
Abb. 36 MARKIERUNGEN DES PROXIMALEN TIBIAKOPFES VOR DER KNOCHENMARKASPIRATION	75
Abb. 37 2,5ML ASPIRAT FÜR DIE QUALITÄTSKONTROLLE IN VITRO	75
Abb. 38 TESTSEITE: BKEM VERMISCHT MIT KNOCHENMARKASPIRAT VON DER TIBIA	75
Abb. 39 KONTROLLSEITE: REINES BKEM IN STERILER KOCHSALZLÖSUNG	76
Abb. 40 PROZENTUELLER ANTEIL AN NEU GEBILDETEM KNOCHEN IN DER TEST- UND KONTROLLSEITE NACH 3 UND 6 MONATEN	76
Abb. 41 PROZENTUELLER ANTEIL DER KONTAKTFLÄCHE ZWISCHEN BioOss [®] -GRANULA UND NEU GEBILDETEM KNOCHEN IN DER TEST- UND KONTROLLSEITE NACH 3 UND 6 MONATEN	76
Abb. 42 ABNAHME VON VENÖSEM EIGENBLUT VOR DER KNOCHENMARKASPIRATION	78
Abb. 43 VERMISCHEN DES VENÖSEN BLUTES MIT ACD-A/ MANNITOL UND CaCl ₂ / ETHANOL VOR DER ZENTRIFUGATION	79
Abb. 44 MARKIERUNG DER INZISIONSSTELLE AN DER SPINA ILIACA SUPERIOR POSTERIOR	79
Abb. 45 KNOCHENMARKASPIRATION MIT 6 x10ML SPRITZEN ZU JE 2ML NATRIUMCITRAT	79
Abb. 46 EINBRINGEN VON 60 ML KNOCHENMARKASPIRAT IN DIE GROßE KAMMER DES PROCESS-BECHERS	81
Abb. 47 BMAC- ZENTRIFUGE MIT VENÖSEM BLUT IM ZENTRIFUGENRÖHRCHEN (BLAU) UND KNOCHENMARKASPIRAT IM PROCESS-BECHER (RECHTS)	81
Abb. 48 NACH DER KONZENTRIERUNG: PLASMAÜBERSTAND MIT <i>BUFFY COAT</i> (ZARTE WEIßE SCHICHT) UND THROMBOZYTENKONZENTRAT AM BODEN DES GEFÄßES (FOTO MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON PRIV.-DOZ. DDR. SEBASTIAN SAUERBIER, DEP. FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE, FREIBURG)	81
Abb. 49 ÜBERFÜHREN DES AUTOLOGEN THROMBINS IN DEN STERILEN BEREICH	82
Abb. 50 VERMISCHEN VON AUTOLOGEM THROMBIN UND ZELLKONZENTRAT IN DER APPLIKATORSPRITZE, SOWIE ZUGABE ZUM BioOss [®] - GRANULAT	82
Abb. 51 DICHT GEPACKTE BioOss [®] PARTIKEL DURCH KOAGULATION DES AUTOLOGEN THROMBINS NACH ZUGABE ZUM ZELLKONZENTRAT	82

Abb. 52	LATERALE KIEFERHÖHLENWAND NACH ABPRÄPARATION DES MUCOPERIOSTLAPPENS	83
Abb. 53	PRÄPARATION DES LATERALEN ZUGANGES ZUR KIEFERHÖHLE	84
Abb. 54	APPLIKATION DES BIOSS [®] – ZELLKONZENTRAT GEMISCHES IN DEN SINUS	84
Abb. 55	ABDECKEN DES AUGMENTATES MITTELS BIOGIDE [®] MEMBRAN VOR DEM DEFINITIVEN WUNDVERSCHLUß	84
Abb. 56	PLASTIKADHÄRENTE, FIBROBLASTENARTIGE UND BEREITS KONFLUIERENDE ZELLEN NACH 7 TAGEN IN KULTUR	85
Abb. 57	KONFLUIERTE ZELLKOLONIEN NACH 14 TAGEN IN KULTUR (DARSTELLUNG IM LICHTMIKROSKOP, ABTEILUNG FÜR HÄMATOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIK GRAZ)	86
Abb. 58	DARSTELLUNG DES FACS-PROFILS MIT AUSSCHLUßMARKER FÜR DAS VORKOMMEN VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN. DIE AUSSCHLUßMARKER SIND NEGATIV, DA DIE BEIDEN KURVEN (GRAU UND ROT) SICH DECKEN	87
Abb. 59	DARSTELLUNG DES FACS-PROFILS MIT MARKERN FÜR DEN NACHWEIS VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN. DIE STAMMZELLMARKER SIND IN DIESEM PROFIL POSITIV, DA SICH DIE KURVEN NICHT DECKEN. JE WEITER RECHTS SICH DIE ROTE KURVE BEFINDET, UM SO DEUTLICHER ERSCHEINT DAS ERGEBNISS POSITIV.	88
Abb. 60	DARSTELLUNG DES FACS-PROFILS MIT VARIABLEM VORKOMMENDEN ANTIGENMARKERN	89
Abb. 61	POSITIONIERUNG DER PRÄFABRICIERTEN BOHRSCHABLONE VOR DER BIOPSIEENTNAHME ZUR MARKIERUNG DER ENTNAHMESTELLEN	90
Abb. 62	SCHABLONENGEFÜHRTE BIOPSIEENTNAHME	91
Abb. 63	OP-SITUS NACH DER BIOPSIEENTNAHME	91
Abb. 64	KNOCHENBIOPSIE IN EINEM 18 MM TREPANBOHRER (KOMET DENTAL)	91
Abb. 65	HISTOLOGISCHE FÄRBUNG EINER KNOCHENBIOPSIE (6 MONATE) MIT AZUR II UND PARAROSANILIN	93
Abb. 66	HISTOMORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG NACH MARKIERUNG DER „REGION OF INTEREST“ (OBERHALB DER GELBEN GRENZLINIE) UND MARKIERUNG DES NEU GEBILDETEN KNOCHENS (ROT) UND DER BIO-SS [®] GRANULA (GRÜN) MITTELS ANALYSIS ^D BILDVERARBEITUNGSPROGRAMM	93
Abb. 67	ZUSTAND OK FREIENDE AB 14 UND 24 VOR DER AUGMENTATION	94
Abb. 68	SINUSLIFT 6 MONATE POST AUGMENTATIONEM	94
Abb. 69	12 MONATE POST IMPLANTATIONEM MIT DER DEFINITIVEN VERSORGUNG	95
Abb. 70	ANZAHL DER MONONUKLEÄREN ZELLEN (MNZ) IM ASPIRAT UND IM KONZENTRAT (* KOAGULIERTE PROBEN)	94
Abb. 71	ANZAHL DER KbE/10 ⁶ MNZ/cm ² IM ASPIRAT UND KONZENTRAT NACH KULTIVIERUNG (* KOAGULIERTE PROBEN)	94
Abb. 72	HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINER 6-MONATSBIOPSIE MIT AZUR II PARAROSANILIN FÄRBUNG. *BKEM, x KNOCHENNEUBILDUNG (HARD TISSUE RESEARCH LABORATORY, DEP. FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE, UNIKLINIK FREIBURG)	99
Abb. 73	KNOCHENNEUBILDUNG IN DER TESTGRUPPE NACH 3 UND 6 MONATEN	100
Abb. 74	KNOCHENNEUBILDUNG IN DER KONTROLLGRUPPE NACH 3 UND 6 MONATEN	101
Abb. 75	INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH DER PROZENTUELLEN KNB TESTGRUPPE VS. KONTROLLGRUPPE NACH 3 UND 6 MONATEN	101
Abb. 76	RESTGEHALT AN BIOSS [®] -GRANULA IN DER TESTSEITE NACH 3 UND 6 MONATEN	102
Abb. 77	RESTGEHALT AN BIOSS [®] -GRANULA IN DER KONTROLLSEITE NACH 3 UND 6 MONATEN	102
Abb. 78	VERGLEICH DER KNOCHENNEUBILDUNG ZWISCHEN KOAGULIERTEN UND NICHT-KOAGULIERTEN PROBEN	104
Abb. 79	KORRELATION VON MNZ/ML KNOCHENMARKASPIRAT (KMA) UND KbE	104
Abb. 80	KORRELATION VON MNZ/ML KNOCHENMARKKONZENTRAT (KMK) UND KbE	105

ABB. 81 ZUSAMMENHANG VON KNB NACH 3 MONATEN UND KbE (KONZENTRAT)	105
ABB. 82 INDIREKTE KORRELATION VON KNB NACH 6 MONATEN UND KbE (KONZENTRAT)	106
ABB. 83 KORRELATION KNB UND BioOss-GEHALT AN DER TESTSEITE NACH 3 MONATEN	106
ABB. 84 KORRELATION KNB UND BioOss-GEHALT AN DER TESTSEITE NACH 6 MONATEN	107
ABB. 85 KORRELATION KNB UND BioOss – GEHALT AN DER KONTROLLSEITE NACH 3 MONATEN	107
ABB. 86 KORRELATION KNB UND BioOss – GEHALT AN DER KONTROLLSEITE NACH 6 MONATEN	107

Tabellenverzeichnis

TAB. 1 DEFEEKTKLASSIFIKATION DES ABGEHEILTEN ALVEOLARKNOCHENS NACH SCHINCAGLIA UND NOWZARI (2001), KV = KNOCHENVOLUMEN	29
TAB. 2 KLASSIFIKATION DES ALVEOLARFORTSATZES UND INDIKATIONEN FÜR DIE SOFORTIMPLANTATION (SCHINCAGLIA UND NOWZARI 2001)	30
TAB. 3 ÜBERSICHTSTABELLE ZUR DARSTELLUNG DER KNB UND DES RESTGEHALTES AN BioOss®	103

Zusammenfassung

Hintergrund

Autogener Knochen gilt bis heute als Goldstandard zur präimplantologischen Rekonstruktion von Kieferkammdefekten. Einen wesentlichen Nachteil bei der Entnahme autogenen Knochens stellt jedoch die Morbidität an der Spenderregion dar. Eine potentielle Alternative zu autogenen Knochentransplantaten ermöglicht der Einsatz von Knochenersatzmaterialien, welche durch die Zugabe von mesenchymalen Progenitorzellen osteoinduktive Eigenschaften erhalten und zu einer vergleichbaren Knochenneubildung wie autogener Knochen führen könnten. Die Menge mesenchymaler Stammzellen (MSZ), die aus einem Knochenmarkaspirat gewonnen werden kann, könnte jedoch zu gering sein, um eine entsprechende Osteogenese im Knochenersatzmaterial zu erhalten. Es gibt verschiedene laborgebundene Methoden, mit denen die gewonnen MSZ vor einer geplanten Augmentation dementsprechend amplifiziert werden können. Diese sind allerdings sehr teuer und zeitaufwendig. Das BMAC[®] Harvest System ist ein geschlossenes Zentrifugensystem, welches ermöglicht, chair-side eine Konzentrierung von MSZ durchzuführen. Es wurde bereits in der Orthopädie und Gefäßchirurgie eingesetzt und könnte eine, vor allem für den klinischen Einsatz relevante, günstigere Alternative zu den bisher gedienten Methoden sein.

Das Ziel einer klinischen Pilotstudie war es die Knochenneubildung in einem Gemisch aus einem bovinem Knochenersatzmaterial (BKEM) und einem Konzentrat aus autogenen MSZ im direkten Vergleich zu reinem BKEM im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation nach 3 und 6 Monaten zu evaluieren.

Material und Methoden

Die Studie wurde randomisiert und kontrolliert in einem Split-Mouth-Design durchgeführt. 7 Patienten (2 weiblich, 5 männlich; Durchschnittsalter: 58 Jahre) mit einem beidseits hoch atrophen Oberkieferalveolarkamm (Restknochenhöhe < 3 mm), die

eine beidseitige Sinusbodenaugmentation und Implantation benötigten, konnten für die Studie akquiriert werden. Vor der Augmentation wurden 60 ml Knochenmarkaspirat von der rechten spina iliaca superior posterior entnommen. Auf der Testseite wurde zur Augmentation BKEM, vermischt mit einem Konzentrat aus mesenchymalen Progenitorzellen (BMAC[®] Harvest System), appliziert. In die Kontrollseite wurde BKEM alleine eingelagert. Darüber hinaus fand eine Qualitätsanalyse des entnommenen Knochenmarkaspirates und -konzentrates auf Anzahl und Viabilität von MSZ statt. Nach 3 und 6 Monaten wurden Biopsien zur histomorphometrischen Analyse navigiert (ExpertEase[®] System), in den Regionen der geplanten Implantatpositionen, entnommen. Die Implantate wurden zum Zeitpunkt der 6-Monats-Biopsien inseriert.

Ergebnisse

Drei Aspireate koagulierten während des Konzentrierungsprozesses. Nach 3 Monaten betrug der Anteil an neu gebildetem Knochen (KNB) 11,8 % (SD 6,2 %) an der Kontrollseite und 7,4 % ($\pm 4,1$ %) an der Testseite ($p = 0,165$). Nach 6 Monaten war eine KNB von 13,9 % ($\pm 8,5$ %) an der Kontrollseite und von 13,5 % ($\pm 5,4$ %) an der Testseite vorzufinden ($p = 0,469$). Der Anteil an BKEM nach 3 Monaten war 42,6 % ($\pm 3,5$ %) an der Testseite und 34,9 % ($\pm 11,8$ %) an der Kontrollseite ($p = 0,133$). Nach 6 Monaten war der Anteil an BKEM in beiden Gruppen vergleichbar (Test 36,2 %, $\pm 7,8$ %; Kontrolle 39,5 %, $\pm 9,3$ %) ($p = 0,550$).

Konklusion

Unter Berücksichtigung der Einschränkungen einer geringen Fallzahl zeigte sich in dieser Pilotstudie kein signifikanter Unterschied in der Knochenneubildung (KNB) zwischen Test- und Kontrollgruppe. Der Anteil an neuem Knochen nach 6 Monaten war insgesamt gering und könnte auf die dichte Packung des BKEM durch Verwendung der kleinen Biomaterial-Partikel zurückzuführen sein. Weiters könnten die Aspirationstechnik und das Aspirationsvolumen ausschlaggebend für eine geringe Ausbildung von MSZ in vivo sein. Aufgrund der wenigen vergleichbaren Studien, sind noch weitere Studien mit standardisiertem Studienprotokoll und einer größeren Patientenzahl zur stammzellinduzierten Knochenregeneration erforderlich. Aus den Ergebnissen dieser

Studie ist der Einsatz von Chair-Side konzentrierten Stammzellen für die klinische Anwendung noch in Frage zu stellen. Trotzdem stellen die Ergebnisse wichtige Daten für zukünftige Studienplanungen oder Metaanalysen dar.

Abstract

Objective

Autogenous bone is named a “goldstandard” for the reconstruction of alveolar bone defects before implantation. One of the major disadvantages is the morbidity of the donor region after the harvest of autogenous bone. An alternative to autogenous bone could be the use of bone substitutes mixed with mesenchymal progenitor cells to obtain osteoinductive characteristics of the bone substitute. Because the amount of mesenchymal stem cells in the bone marrow aspirate could be too less for the induction of osteogenesis various methods are available to amplify the cells before the augmentation procedure. But these methods are very time-consuming and expensive. The BMAC[®] Harvest System allows a *chair-side* concentration of the mesenchymal stem cells in a centrifuge. It has been almost established in orthopedy and vascular surgery and could be an advantageous alternative to the previous methods.

The aim of the clinical pilot study was to compare the new bone formation in a mixture of a bovine bone material and a concentrate of autogenous mesenchymal stem cells to a bovine bone material alone in a sinuslift model after 3 and 6 months.

Material and Methods

The pilot-study was performed in a randomized, controlled split-mouth design. 7 consecutive patients (2 female, 5 male; mean age 58 years) with a highly atrophic maxillary jaw (residual bone height < 3 mm), requiring bilateral sinus augmentation and implant treatment, were included. 60 ml of bone marrow aspirate was harvested from the right posterior iliac crest before the augmentation procedure. At the test side augmentation procedure was performed with a bovine bone mineral (Bio-Oss[®]) mixed with the stem cell concentrate (BMAC[®] Harvest Systems). At the control side Bio-Oss[®] was applied alone. Additionally a quality analysis of cell number and viability was made. Biopsies for histomorphometric analysis were taken navigated (ExpertEase[®] System) 3 and

6 months after sinus augmentation at the planned implant sites. Implants were inserted at the time of the 6-month biopsies.

Results

3 samples coagulated during the concentration process. After 3 months new bone formation at the control side was 11.8 % (SD 6.2 %) and at the test side 7.4 % (SD 4.1 %). After 6 months 13.9 % (SD 8.5 %) of new bone was at the control side and 13.5 % NB (SD 5.4 %) at the test side. The fraction of bovine bone material after 3 months was 42.6 % (SD 3.5 %) at the test side and 34.9 % (SD 11.8 %) at the control side. After 6 months the biomaterial content was comparable at both sides (test 36.2 %, SD 7.8%; control 39.5 %, SD 9.3 %).

Conclusion

Within the limitations of this pilot-study no significant difference in new bone formation between the test and the control side could be identified. New bone formation after 6 months was low in both groups. One reason could be the dense package of biomaterial, because of the use of small Bio-Oss® particles. Aspirationmethod and –volume could be reasonable for the low number of mesenchymal stem cells in vivo. Because of the few comparable studies in the field of oral surgery more studies with a similar study protocol and a greater number of patients are needed. From the results of this study the application of chair-side concentrated cells in the clinical daily use remains disputable. Anyway the results of this study could be an important contribution for further prospective study designs and metaanalysis.

Grundlagen

Einleitung

Die Wiederherstellung der Kaufunktion teilbezahnter oder unbezahnter Patienten mit Implantaten wird seit den letzten drei Jahrzehnten routinemäßig durchgeführt (Albrektsson et al 1986, van Steenberghe et al 1990, Lekholm et al 1999, Weber et al 2000, Esposito et al 2004, Becktor et al 2004). Die funktionelle Längzeitstabilität der Implantate hängt dabei unmittelbar von der qualitativen und quantitativen Beschaffenheit des vorhandenen Alveolarknochens ab. Das Knochenvolumen kann durch parodontale Vorerkrankungen, traumatische Zahnentfernungen, pathologische Knochenveränderungen oder altersbedingte Alveolarkammatrophie entsprechend beeinträchtigt sein, sodaß zusätzliche chirurgische Maßnahmen zur Knochenregeneration während oder vor der Implantation benötigt werden. In Abhängigkeit von Defektgröße und Defektlokalität wurden unterschiedliche Augmentationsmethoden entwickelt (Chiapasco et al 2009, Rochietta et al 2008, Aghaloo et al 2007, von Arx & Buser 2006, Esposito et al 2006).

Die größte Herausforderung stellen heute ausgedehnte Knochendefekte dar, die eine präimplantologische Rekonstruktion benötigen. Dabei entspricht der Einsatz von autogenem Knochen noch immer dem Goldstandard (Carlsen et al 2013, Kim B.C. et al 2013, Jensen et al 2012, Rickert et al 2011, Nkenke et al 2009, Chiapasco et al 2009, Hallmann et al 2008, Browaeys et al 2007). Die Entnahme autogener Knochenblocktransplantate vom Kieferwinkel, Kinn, Calvaria, Becken oder Tibia bedarf jedoch eines Zweiteingriffes, erhöht die postoperative Morbiditätsrate und verlängert den operativen Eingriff. Außerdem unterliegt autogener Knochen je nach Knochenqualität einer gewissen Resorption, die teilweise bis zu 40% des transplantierten Knochens betreffen kann (Browaeys et al 2007). Durch die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien allogenen, xenogenen oder alloplastischen Ursprungs wurde weitgehend eine Alternative zu autogenen Knochentransplantaten geschaffen. Sie

werden heute routinemäßig im Rahmen der GBR (Guided Bone Regeneration) zur membrangeschützten bzw. -geführten Regeneration kleiner, umschriebener Knochendefekte im Rahmen der Implantatinserterion eingesetzt (Buser et al 1998, Chiapasco et Zaniboni 2009, Retzepi 2010). Während autogener Knochen den großen Vorteil bietet sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften zu besitzen, weisen Knochenersatzmaterialien rein osteokonduktive Eigenschaften auf (Rickert et al 2012). Aufgrund der fehlenden osteoinduktiven Eigenschaften eines BKEM kann sich die Knochenregenerationszeit dementsprechend verlängern (Hallmann et al 2008). Bei ausgedehnten Knochendefekten stoßen Knochenersatzmaterialien aufgrund ihrer fehlenden Osteoinduktivität an ihre Grenzen. Bei zu großen Distanzen kann eine suffiziente Vaskularisation des gesamten Ersatzmaterials und somit die Versorgung mit ausreichend Nährstoffen nicht sichergestellt werden. Aufgrunddessen wird autogener Knochen im Rahmen großer Auflagerungsplastiken noch immer als Methode der ersten Wahl gesehen (Chiapasco et al 2009).

Alternative Methoden, um größere Gewebsdefekte zu ersetzen, könnten das Tissue Engineering und die in situ Regeneration sein (Richter et al 2009). Das Tissue Engineering wird heute hauptsächlich in der Orthopädie angewendet und basiert auf dem Prinzip in vitro auf einem Trägermaterial, zuvor amplifizierte und differenzierte Stammzellen wachsen zu lassen, um letztendlich mit einem vitalen Gewebskonstrukt den vorhandenen Defekt rekonstruieren zu können. Neben hohem Zeit- und Kostenaufwand gilt es zahlreiche limitierende Faktoren, wie das Trägermaterial, die Ernährung und die Applikation bioaktiver Faktoren zu bedenken. Bei der in situ Regeneration erhalten die Knochenersatzmaterialien durch das Aufbringen von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren bzw. Zellen osteoinduktive Eigenschaften und können somit Osteoprogenitorzellen aus dem umgebenden Knochen aktivieren (Richter et al 2009). Eine derartige Biologisierung oder Aktivierung von Knochenersatzmaterialien ist weniger zeitaufwendig und spart Kosten, wodurch diese Methode auch für den klinischen Einsatz interessanter wird. Aktuelle Forschungen befassen sich nicht nur mit der Zugabe von Wachstumsfaktoren zu einem Trägermaterial, sondern auch mit der direkten Applikation von autogenen mesenchymalen Stammzellen, um die Knochenregeneration zu stimulieren (Khaled et al 2011, Rickert et al 2011, Janicki et al 2011, Payer et al 2010, Hallmann et al 2008, Pieri et 2008, Shayesteh et al 2008, Thorwarth et al 2006, Thor et al

2007, Jakse et al 2007). Multipotente mesenchymale Stammzellen können sich, abhängig von der Empfängerregion, zu entsprechenden Zellen des Zielorgans differenzieren (Pieri et al 2008, Gonshor et al 2011). Sie werden im Knochenmark gebildet, kommen aber auch in allen anderen Geweben des Körpers vor. Deren Gewinnung erfolgt häufig aus dem Beckenkamm (Jakobsen et al 2013, Sauerbier et al 2011, Rickert et al 2011). Da im Aspirat die Stammzellkonzentration verhältnismäßig gering ist, werden die mononukleären Zellen, welche die Stammzellen enthalten, im Labor mittels einer Zellsolierungsmethode (FICOLL) von den restlichen Blutzellen getrennt und erst nach Kultivierung und Vermehrung dem Augmentationsmaterial beigemengt (Sauerbier et al 2010, Fuerst et al 2004). Aufgrund der Konzentrierung und Vermehrung in einem Labor ist die Behandlung allerdings zeitaufwendig und kostenintensiv. Eine Alternative könnte die Anwendung von geschlossenen chair-side Systemen bieten, in welchen die MSZ-Konzentrierung unmittelbar erfolgen könnte und dem Knochenersatzmaterial sofort beigemengt wird (Rickert et al 2011, Sauerbier et al 2010, Hermann et al 2008). Rickert et al (2011) bestätigten in einer prospektiv randomisierten klinischen Studie eine signifikant höhere Knochenregeneration nach Sinusbodenaugmentation mit einer Mischung aus bovinem Knochenersatzmaterial (BKEM) und Stammzell-Konzentrat, als in der Kontrollgruppe mit BKEM und autogenem Knochen nach 3 - 4 Monaten. Sie schlussfolgerte, dass mit der Zugabe von einem Konzentrat aus autogenen Stammzellen zu einem bovinen Knochenersatzmaterial eine gleichwertig suffiziente Knochenneubildung induziert werden kann, wie durch die Beimengung von autogenem Knochen. Sauerbier et al (2011) wiederum stellten in einem ähnlichen Studiendesign fest, dass es bei der Gruppe mit dem Zellkonzentrat zu einer geringeren Knochenneubildung kam, als bei der Gruppe mit autogenem Knochen. Das Ergebnis war nicht signifikant. Die Schwäche dieser Studie war, dass die beiden Gruppen nicht im Split-Mouth Design getestet wurden, wodurch ein direkter Vergleich mit der Studie von Rickert et al (2011) nicht durchgeführt werden kann. Es bleibt weiters ungeklärt, ob mit autogenem Knochen eine signifikant schnellere Knochenregeneration erreicht werden kann (Rickert et al 2012). Eine Kontrollgruppe mit reinem BKEM könnte vielleicht deutlicher zeigen, ob die Beimengung eines Zellkonzentrates zu einer schnelleren Knochenregeneration führt, als eine Kontrollgruppe mit einem Eigenknochengemisch. Derzeit liegen keine vergleichbaren Studien vor, die

reines BKEM als Kontrollgruppe am humanen Situs verwenden und den Verlauf der Knochenregeneration nach 3 und 6 Monaten histomorphometrisch darstellen.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Übersicht über den aktuellen Stand von Studienergebnissen der sich derzeit in klinischem Einsatz befindlichen Knochenregenerationstechniken zu geben und einen Einblick in laufende und zukünftige Forschungsvorhaben im Bereich der dentalen Knochengewebsregeneration zu ermöglichen. In einer Pilotstudie im Split-Mouth Design sollte im Rahmen von Sinusbodenaugmentationen - ein gut dokumentiertes und kontrollierbares Studienmodell - untersucht werden, ob es durch die Zugabe eines Konzentrates von mesenchymalen Progenitorzellen zu einem bovinen Knochenersatzmaterial (BKEM) zu einer vermehrten und schnelleren Knochenneubildung (KNB) kommt, als mit dem Einsatz von BKEM alleine.

Entwicklungsgeschichte der Knochenaugmentation

In Moskau wurde im Jahr 1668 die erste dokumentierte xenogene Knochentransplantation von Job van Meekeren aus Amsterdam an einem Soldaten namens Butterlyn durchgeführt, indem er dessen Schädeldefekt mit einem Knochenstück aus einer Hundekalotte deckte. Dieser Eingriff wurde von der Kirche jedoch nicht gebilligt und es drohte dem Soldaten die Exkommunikation, wenn er sich das Transplantat nicht entfernen liese. Der Aufforderung des Soldaten, den Knochen wieder zu entfernen, konnte aber nicht mehr Folge geleistet werden, da der Knochen bereits gut eingeeilt war (de Boer 1988). Von Walther, ein Chirurg von der Universität Bonn, war der Erste, der eine erfolgreiche Transplantation von autogenem Knochen im Jahre 1821 durchführte. Es kam zwar zu einer Wundinfektion mit Sequestration der Tabula externa, das Transplantat war jedoch vollständig osseointegriert (Walther Ph 1821). Die Einführung der Lachgasanästhesie durch Horace Wells 1844 und William Morton 1846 eröffneten neue chirurgische Möglichkeiten. Letztendlich unterstützte auch die Entdeckung der Antisepsis von Lister 1864 die Knochentransplantation im klinischen Einsatz (Horting-Hansen 2002).

Biologische Überlegungen

Der französische Chirurg Ollier war der erste, der zwischen autogener, allogener und xenogener Knochentransplantation unterschied. Er konnte am Tiermodell feststellen, dass frisch entnommener Knochen an der gleichen Spezies ein gutes Einheilungsverhalten zeigte, während toter Knochen oder Knochen einer anderen Spezies abgestoßen wurde bzw. bindegewebig einheilte. Vitaler Knochen mit Spongiosa und Periost stellte für ihn das beste Knochentransplantat dar (Ollier 1867).

Der deutsche Chirurg Barth (1893) konnte in seinen Untersuchungen feststellen, dass weder frischer vitaler Knochen, noch devitaler Knochen einen Defektschluß bewirkte. Er widerlegte somit die Aussage von Ollier und beschrieb, dass der transplantierte Knochen ausschließlich als Leitschiene für den vom Empfängerlager gebildeten Knochen diene und prägte den Begriff des *schleichenden Ersatzes*. Eine qualitative Unterscheidung zwischen

xenogenen, allogenen und autogenen Transplantaten schloss er somit aus (Barth 1893 und 1895).

Axhausen und Lexer begründeten die *Osteoblastentheorie* und widersprachen somit der Auffassung Barths. Sie sahen einen eindeutigen Vorteil von vitalem gegenüber totem Gewebe und erklärten, dass die Einheilung des Transplantates von den Osteoblasten des transplantierten Periostes und Markendostes ausgeht (Lexer 1929). Axhausen publizierte im Jahre 1909 eine sehr ausführliche These basierend auf 146 Tierversuchen mit detaillierter histologischer Darstellung von autogenen, allogenen und heterogenen Knochentransplantaten. Er kam zu folgenden fünf Schlussfolgerungen, die heute teilweise noch Gültigkeit haben:

1. Ein Transplantat, das von Periost bedeckt ist, zeigt eine zelluläre Proliferation unter dem Periost und induziert eine Gefäßversorgung aus dem Empfängerbett.
2. Die Kortikalis eines Knochentransplantates zeigt zum Großteil leere Zelllakunen.
3. Ein Transplantat, das spongiösen Knochen enthält, bildet neuen Knochen von Spongiosa ausgehend überall dort wo es mit durchblutetem Gewebe in Verbindung steht.
4. Die Überlebensrate und Proliferation von Allotransplantaten sind unsicherer als jene von Autotransplantaten.
5. Xenotransplantate werden eingekapselt oder resorbiert und zeigen keine Vitalität oder proliferative Kapazität.

1938 prägte der schwedische Chirurg Levander den Begriff der *Induktionstheorie*. Er beobachtete, dass nicht nur das transplantierte Knochenhartgewebe, sondern auch das Periost und das Knochenmark absterben und die Knochenneubildung ausgehend vom umgebenden Knochenlager durch das transplantierte Knochengewebe induziert wird (Levander 1934). Dieser Induktionstheorie schlossen sich auch Annersten und Oberdalloff an (Annersten 1940). In seinem Werk *Bone formation by autoinduction* zeigte Urist 1965, dass die anorganischen Bestandteile des Knochens für die Knochenneubildung unbedeutend sind. Wenn diese präoperativ aus dem Transplantat herausgelöst werden, können die Interzellulärsubstanzen, mit den darin enthaltenen *Bone Morphogenetic*

Proteins(BMP's), direkt auf die Stammzellen des Empfängerlagers einwirken, ohne dass zuvor ein langwieriger Resorptionsprozess stattgefunden hat. Die Knochenneubildung soll dadurch schneller erfolgen (Urist MR 1965). Nach Schweiberer ist diese Theorie auch auf allogene Transplantate übertragbar. Durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion werden allogene Zellelemente zerstört und es kommt anschließend, ausgehend von der Interzellulärsubstanz, zu einer Differenzierung von Stammzellen zu knochenbildenden Zellen (Schweiberer L 1970).

Gestielte Knochentransplantation

1892 entnahm Bardenheuer ein gestieltes Transplantat von der Mandibula, um einen Defekt im angrenzenden Kieferwinkel zu ersetzen (Abb. 1).

Ludwig von Rydygier berichtete 1908 von einem gestielten Transplantat von der Clavicula zum Ersatz eines Mandibuladefektes, welches er zunächst für 8-12 Tage von Haut umwachsen ließ und danach in einem zweiten Schritt mit einem langen Hautlappen in die Mandibula transplantierte (Rydygier LR 1908). Siemssen führte 1978 eine Sofortrekonstruktion eines Kontinuitätsdefektes der Mandibula mit dem Clavicularkopf und dem Musculus sternocleidomastoideus durch. Diese Art der Transplantation war zwar erfolgreich, führte aber zu großen Schmerzen und der dünne Clavicularknochen bereitete Schwierigkeiten bei der Implantation (Siemssen SO et al 1978). Mc Williams (1917) verwendete Knochentransplantate (gestielte Clavicula oder Tibia) bei posttraumatischen Mandibulardefekten bzw. nach Osteomyelitis. Für ihn war es wichtig den Unterkiefer nach Defektrekonstruktion in der anatomisch korrekten Position mittels intermaxillärer Fixation zu stabilisieren (McWilliams CA 1917).

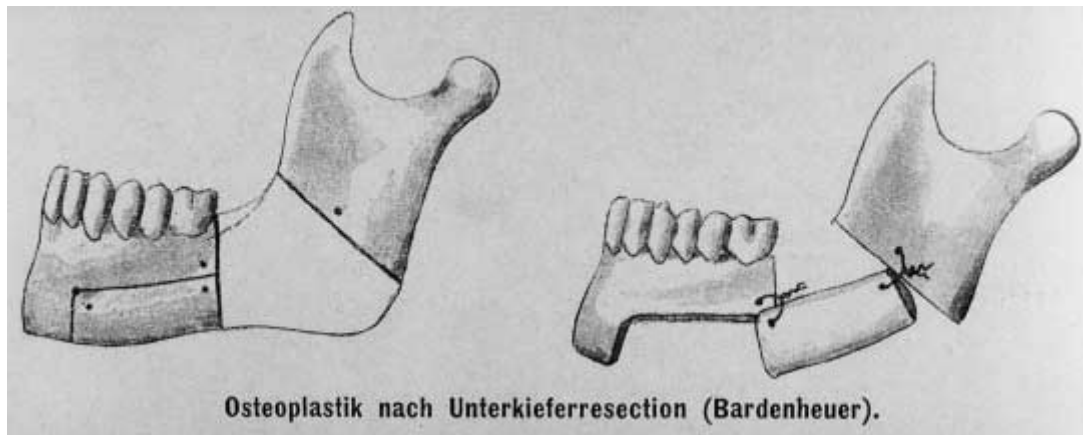


Abb. 1 Erstes dokumentiertes Knochentransplantat von der Mandibula, Bardenheuer (1892), aufgezeichnet von Esmarch und Kowalzig (1899)

Freie Knochentransplantation

Leo Winter beschrieb 1943 als erster die Anwendung von freien Knochentransplantaten von der Tibia, dem Becken und der Rippe zur Therapie von Defektfrakturen der Mandibula (Winter L 1943). Er betonte die Wichtigkeit der gedeckten submukosalen Einheilung über einen extraoralen Zugang). Bei einer Ruptur der oralen Mukosa sollte der operative Eingriff sofort unterbrochen werden. Damals gab es jedoch noch keine Angaben über Langzeitresultate oder die perioperative Abschilderung mittels Antibiotika. Die transorale posttraumatische Knochentransplantation wurde während des Krieges eingeführt. Lockere Knochenfragmente, die in die Mundhöhle exponiert waren, verfestigten sich wieder und heilten ohne Entzündung ein. Die Einführung des Penicillin und anderer Antibiotika war einer der Hauptfaktoren, die dafür verantwortlich waren, dass die transorale Knochentransplantation erfolgreich durchgeführt werden konnte. Deren Anwendung wurde 1951 von Obwegeser an 33 freien Knochen- und Knorpeltransplantaten überprüft (Obwegeser H 1951).

Augmentation der Mandibula

1956 wurde von Gerry der erste erfolgreiche vertikale Knochenaufbau der Mandibula mit Hilfe eines Beckentransplantates durchgeführt. Er beschrieb die Oberfläche der Empfängerregion vor der Auflagerung eines Onlaytransplantates aufzurauen.

Um die atrophe Mandibula aufzubauen wählte Celesnik 1965 einen tunnelierenden Zugang, um dem Transplantat ausreichend Stabilität zu geben. Er betonte, dass eine möglichst frühe Belastung des Transplantates in der Remodellingphase von Vorteil für die Einheilung sei und behauptete, dass die Verwendung einer Prothese die Resorption des Transplantates verhindern könne (Celesnik F 1965).

Dennoch kam es zu Resorptionen des transplantierten Knochens, welche zunächst 1975 ausführlich von Davis und in einer weiteren Arbeit 1977 von Baker und Connole beschrieben wurden (Davis WH et al 1975; Baker and Connole 1977). Davis fand 50% Knochenresorption in den ersten 1,5 Jahren und 80% Resorption 3 Jahre nach der Transplantation vor.

Um das Problem der Knochenresorption zu umgehen wurden alternative Techniken beschrieben, wie z.B. die Visierosteotomie von Härle im Jahr 1975 oder die Knocheninterponatplastik von Stoelinga im Jahr 1983 (Härle F 1975; Stoelinga et al 1983). Bei beiden kam es häufig zu Nervschädigungen und vor allem erfolgte nach der Transplantation eine sehr schnelle Resorption in den ersten 6 Monaten.

Augmentation der Maxilla

Terry et al. war der erste, der die hoch atrophe Maxilla mittels Autotransplantat von der Rippe augmentierte (Terry BC 1974). In weiterer Folge wurde von Farrell et al. im Jahre 1976 die Le Fort I Osteotomie mit einem Knocheninterponat aus dem Becken sowie einer simultanen submucösen Vestibuloplastik zur Erhöhung des maxillären Kieferkammes durchgeführt (Farrell CD et al 1976). Von Tatum wurde letztendlich 1977 der direkte Sinuslift durch Abheben der Schneider'schen Membran vom Kieferhöhlenboden durchgeführt (Tatum et al 1986) und von James und Boyne 1980 weiter modifiziert (Boyne & James 1980). Diese Methode stellt bis heute den Goldstandard zur Behandlung der atrophien Maxilla dar.

Partikulierter Knochen

1968 wurde zum ersten Mal die osteogene Kapazität von Knochenmark und spongiösen Knochenchips zur präprothetischen Rehabilitation beschrieben (Richter et al 1968). Marx

legte den Grundstein für das heute allgemein gültige Wissen über die Osteogenese auf einem molekularen Level. Histomorphometrisch konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil an trabekulärem Knochen von 55 % in der unbehandelten Mandibula auf bis zu 74 % mit dem Zusatz von Plättchen reichem Plasma in partikuliertem Knochen erhöht werden konnte ($p = 0,005$) (Marx et al 1998).

Tissue Engineering

Mit dem *Prinzip der Autoinduktion* und durch die Entdeckung der Bone Morphogenetic Proteins durch Marshall Urist wurde der Grundstein zur gesteuerten Gewebsregeneration mit Materialien unterschiedlichster Herkunft und der Anwendung von Wachstumsfaktoren gelegt (Urist MR 1965). Terheyden publizierte in seiner Arbeit im Jahre 1999 als erster die Rekonstruktion der Mandibula mittels heterotoper Implantation von deproteinisiertem Rinderknochen, der mit BMP-7 und rekombinantem humanem OP-1 getränkt war (Terheyden H et al 1999). In Zukunft soll es möglich sein, auf Basis einer dreidimensionalen Defektdarstellung, ein vitales Transplantat mittels Knochenmarkstammzellen auf einer Trägermatrix in der exakten Defektkonfiguration in vitro herstellen zu können.

Kieferkammaugmentation

Defektklassifikation

Die Klassifikation der Alveolarfortsatzdefekte wurde 1983 zunächst von Seibert vorgeschlagen. Er unterschied 3 Klassen:

KI I: buccolinguale Defekte

KI II: apikocoronale Defekte

KI III: kombinierte Defekte

Wang et al. (2002) modifizierte die Klassifikation nach Seibert und unterteilte die einzelnen Defekte (**H** = horizontale Defekte, **V** = vertikale Defekte und **C** = kombinierte Defekte) wiederum in 3 Subklassen, welche die Defektgröße beschreiben (**S** $\leq$ 3 mm; **M** 4–6 mm; **L** $\geq$ 7 mm). Zusätzlich werden auf Basis der HVC-Klassifikation dementsprechende Behandlungsmöglichkeiten und Therapiekonzepte für die Hartgewebs- und Weichgewebsskorrektur vorgeschlagen. Die Einteilung ist sehr genau und ausführlich beschrieben, für die praktische Anwendung allerdings wenig übersichtlich.

Eine einfache und übersichtliche Klassifikation der Kieferkammdefekte mit gleichzeitigem Therapiekonzept zur Indikation der GBR bei Sofortimplantation erstellten Hämmerle und Jung (2008) (Abb. 2):

- Klasse 0 entspricht einem gut ausgeprägten Kieferkamm ohne Extraktionsalveole und Knochenresorption.
- Klasse I stellt einen Kieferkamm mit intakter Extraktionsalveole und intakter buccaler Knochenlamelle dar. In ästhetisch relevanten Bereichen wird eine zusätzliche GBR trotz intakter Knochenlamelle empfohlen.
- Bei den Klassen II und III liegen Dehiszenzdefekte des buccalen Knochens während und nach der Extraktion vor. Eine Sofortimplantation wird hier vom Vorhandensein von 2-3 mm apikalem Restknochen für eine ausreichende Primärstabilität abhängig gemacht.
- Die Klassen IV und V weisen ausgedehnte horizontale und vertikale Kieferkammefekte auf und benötigen einen präimplantologischen Knochenaufbau mit Knochenblöcken. Es wird hier ein zweizeitiges implantologisches Konzept empfohlen.

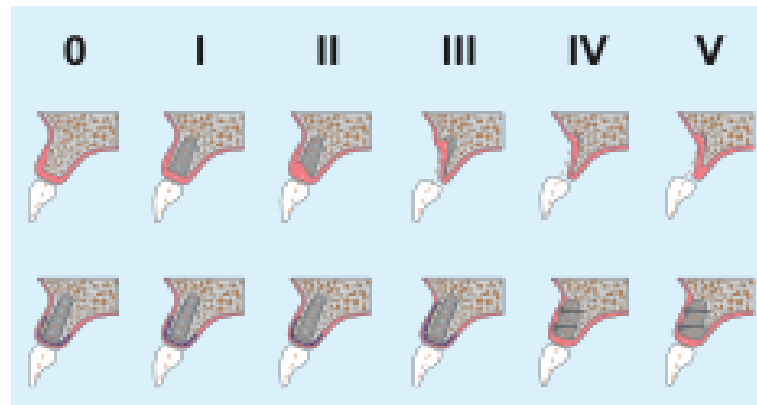


Abb. 2 Darstellung der Defektklassen des Alveolarfortsatzes und deren Therapiekonzepte nach Hämmerle und Jung (2008)

Eine sehr übersichtliche und praxisrelevante Einteilung ist jene von Schincaglia und Nowzari (2001). Sie haben eine Defektklassifikation der ausgeheilten Alveole für die Spätimplantation (Tab. 1) und eine Klassifikation des Kieferkammes für die Sofortimplantation inklusive Weichgewebkontur mit praktischen Empfehlungen zum operativen Vorgehen erarbeitet (Tab. 2).

	Defekt	Therapie
Typ 1	vertikales KV erhalten horizontales KV $\geq 6\text{mm}$ Parodontium erhalten Papillen erhalten kein Weichgewebsverlust	keine regenerativen Maßnahmen erforderlich
Typ 2	vertikales KV erhalten horizontales KV $\geq 6\text{mm}$ buccolingual leichter Hart- und Weichgewebskollaps	Weichgewebsplastik vor Implantation oder bei Freilegung mehr palatinale Implantatpositionierung (4-5mm unter buccaler Gingivagrenze der Nachbarzähne)
Typ 3	vertikales KV erhalten horizontales KV 3-5mm mittlerer Weichgewebeverlust	Knochenaugmentation mittels Bone Split, Osteotomie oder GBR Weichgewebskorrektur
Typ 4	vertikales KV erhalten horizontales KV $< 3\text{mm}$ Weichgewebe hochgradig kollabiert	zweizeitiges Vorgehen mit präimplantologischer Blockaugmentation Weichgewebskorrektur
Typ 5	vertikaler KV horizontales KV $< 3\text{mm}$ Weichgewebe hochgradig kollabiert	zweizeitiges Vorgehen mit vertikaler und horizontaler Knochenaugmentation Weichgewebskorrektur

Tab. 1 Defektklassifikation des abgeheilten Alveolarknochens nach Schincaglia und Nowzari (2001), KV = Knochenvolumen

	Defekt	Therapie
Typ 1	palatinale Knochenwand > 3mm breit in einer Tiefe von 3-5mm apikal der Weichgewebsskontur der Nachbarzähne harmonische Weichgewebsskontur	Implantation zum Zeitpunkt der Extraktion ohne Rücksicht auf die Morphologie der buccalen Lamelle nehmen zu müssen
Typ 2	buccale Knochenlamelle teilweise resorbiert palatinale Knochenwand > 3mm breit in einer Tiefe von >5mm apikal der Weichgewebsskontur der Nachbarzähne Weichgewebsdehiszenz oder Kollaps der interapproximalen Gingiva	forcierte orthodontische Eruption Barrieremembran allein oder in Kombi mit Knochenaufbaumaterial
Typ 3	buccale Knochenlamelle total resorbiert palatinale Knochenwand <3mm breit hochgradiger Weichgewebsskollaps	zweizeitiges Vorgehen: Hart- und Weichgewebsaufbau vor der Implantation

Tab. 2 Klassifikation des Alveolarfortsatzes und Indikationen für die Sofortimplantation (Schincaglia und Nowzari 2001)

Methoden

GBR (Guided Bone Regeneration)

Das Konzept der GBR beinhaltet die Regeneration von Knochendefekten mittels Barrieremembranen, die ein Einwachsen von nicht-osteogenen Zellpopulationen vom umgebenden Weichgewebe in den Defekt verhindern und dadurch den osteogenen Zellpopulationen, ausgehend vom angrenzenden Knochen, erlauben in den Defekt einzuwandern. Zu Beginn der 80-iger Jahre wurde der Begriff GTR-Technik zur Regeneration parodontaler Defekte (Guided Tissue Regeneration) von Nyman geprägt (Nyman et al 1980). Bei der GTR soll durch Anwendung einer Barrieremembran sichergestellt werden, dass die durch Parodontitis freiliegende Wurzeloberfläche durch Zellen vom parodontalen Ligament besiedelt wird und somit zur Defektregeneration führt. Durch die größtenteils guten Ergebnisse wurden weitere Forschungen gegen Mitte und Ende der 80iger Jahre durchgeführt. Dafür wurden bioinerte Membranen aus expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) verwendet, die als physikalische Barriere für Gewebe und Zellen dienten. Daraus entwickelte sich die GBR-Technik, die vor allem bei horizontalen Knochendefekten im Rahmen der Implantation vorhersehbar angewendet werden kann (Seibert & Nyman 1990). Um einen Membrankollaps oder die Bildung von periostartigem Gewebe unter der Membran zu vermeiden, wird bei der GBR zusätzlich Knochenersatzmaterial oder Eigenknochen als Platzhalter und Leitschiene für Knochenzellen angewendet. Die GBR-Technik wurde sowohl einzeitig (simultan mit der Implantation), als auch zweizeitig (die Implantation erfolgt nach einer Einheilzeit von 6-9 Monaten) durchgeführt. Häufige Weichgewebsdehiszenzen, die zu einer lokalen Infektion unter der Membran führten, eine erschwerte intraoperative Handhabung durch die hydrophoben Eigenschaften der Membran, sowie die Entfernung der nichtresorbierbaren Membran im Rahmen einer Zweitoperation machten die GBR-Technik zu einem komplizierten und techniksensitiven Eingriff (Becker et al 1994, Augthun et al 1995). Aus dieser Situation entstand die Suche nach bioresorbierbaren, anwenderfreundlichen Membranen. Bioresorbierbare Membranen wurden zuerst im Rahmen der GTR Mitte der 90iger Jahre eingesetzt (Gottlow et al 1994). Es entwickelten sich 2 Gruppen von bioresorbierbaren Membranen: (1) Kollagenmembranen unterschiedlicher tierischer

Herkunft und (2) polymere Membranen aus Polylactidsäure und Polyglycolsäure (Hutmacher et al 1996). Für die heutigen GBR-Verfahren werden zum Großteil Kollagenmembranen tierischen Ursprungs eingesetzt. Die wünschenswerten Eigenschaften einer Barrieremembran umfassen Biokompatibilität, zellokklusive Eigenschaften, suffiziente Integration in das Lagergewebe und leichtes klinisches Handling (Karring et al 1993). Ein wichtiges Kriterium für die Membranauswahl ist dabei die strukturelle Integrationsmöglichkeit der Membran, sowie ihre suffiziente Anpassung an den angrenzenden Knochen, um einen effizienten Abschluss gegen eine mögliche Zellinvasion zu bilden. Linde et al (1993) beschrieb eine erhöhte Neoosteogenese beim Einsatz von Barrieremembranen mit erhöhter Porosität. Lundgren et al (1998) bestätigten ebenfalls, dass eine Porosität von $> 25 \mu\text{m}$ zu einer signifikant höheren Knochenneubildung in der Initialphase der Knochenbildung führt, während nach 12 Monaten bei allen Arten von Barrieremembranen neu gebildeter Knochen in gleichem Ausmaß vorhanden war.

Die GBR-Technik wird sowohl zur Rekonstruktion von horizontalen als auch von vertikalen Kieferkammdefekten eingesetzt. Dabei ist erwiesenermaßen die Defektmorphologie ausschlaggebend für den Erfolg der GBR. Defekte kleiner Dimension, sowie mehrwandige Defekte haben ein höheres regeneratives Potential, als große und suprakrestale Defekte (Wikesjö et al 2004). Die klassische Indikation für die horizontale GBR-Technik ist eine Restkieferkambbreite von 3-5mm (Defektklasse 3 nach Schincaglia und Nowzari 2001). Voraussetzung für das einzeitige Vorgehen ist ein ausreichendes Restknochenvolumen, welches die Primärstabilität des inserierten Implantates gewährleisten kann. Bei ausgedehnten Augmentationen (z.B. Restknochenbreite $< 3 \text{ mm}$, Defektklasse 4-5), bei denen ein zweizeitiges Vorgehen indiziert ist, muss im Rahmen der GBR für eine ausreichende Stabilität und Nährstoffversorgung des Knochenersatzmaterials (z.B. durch nicht resorbierbare Membranen und Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Osteoprogenitorzellen) während der Einheilungsphase gesorgt werden. Ein teilweise bindegewebiges Einwachsen der Partikel ist dabei nicht auszuschließen und kann zu einem insuffizienten Primärhalt des späteren Implantates führen (Buser 2010). Die Augmentation mit einem autogenen Blocktransplantat ist bei dieser Defektklasse der GBR vorzuziehen. Die Überlebensrate von Implantaten mit einer GBR wird in der Literatur unabhängig von der verwendeten Barrieremembran mit 95% angegeben (Aghaloo & Moy

2007, Chiapasco & Zaniboni 2009). In einem systematischen Review von Donos et al (2008) wurde die GBR - definiert als komplette Bedeckung der exponierten Implantatoberfläche - mit 71,4% - 100% angegeben.

Die laterale GBR ist eine erfolgreiche und gut dokumentierte Methode zur Verbreiterung des Kieferkammes, die mit einer gut vorhersehbaren Erfolgsrate eingesetzt werden kann (Abb. 3 + 4).

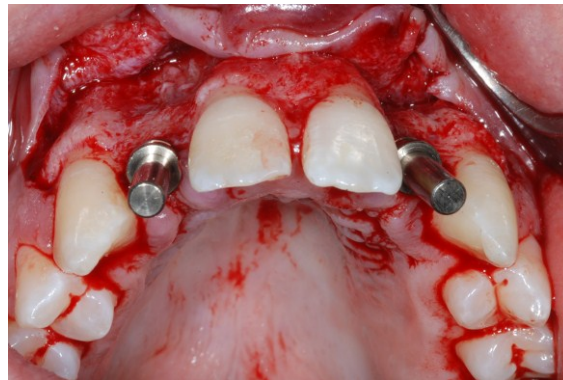


Abb. 3 Indikation für horizontale GBR-Technik: Einziehung der buccalen Kortikalis in regio 12 und 22, Zustand nach Pilotbohrung

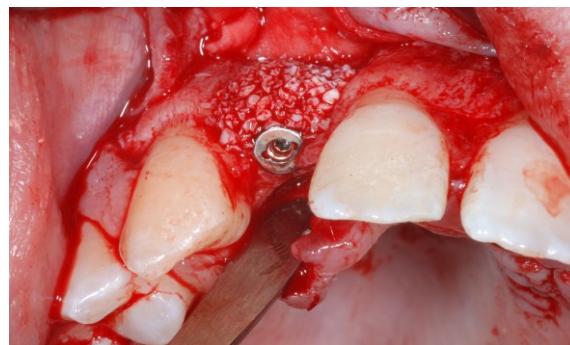


Abb. 4 Applikation von BioOss[®] fein (Geistlich Materials) zum Ausgleich der horizontalen Knochenatrophie

Im Gegensatz dazu ist die GBR-Technik zur Rekonstruktion von vertikalem Knochenverlust noch nicht etabliert und wenig vorhersehbar (Lang & Lindhe 2008). Beschriebene Techniken verwenden partikulierten autogenen Knochen, autogene Blockaugmentate oder Knochenersatzmaterialien in Kombination mit einer steifen und nicht resorbierbaren

ePTFE Membran (Tinti & Parma-Benfenati 1998, Chiapasco et al 2004). Die Membran kann dabei von den Implantaten selbst oder von Osteotomieschrauben gehalten werden. Ein vertikaler Knochengewinn bis zu 4 mm konnte durch diese Technik bis jetzt im Tiermodell erreicht werden (Simion et al 1994). Allerdings kam es nicht immer zu einer vollständigen Knochenregeneration. Der Bereich direkt unter der Membran blieb teilweise mit nicht-mineralisiertem Gewebe gefüllt (Simion et al 1994). In einem aktuellen Review von Rochietta et al (2008) werden nur zwei randomisiert kontrollierte Studien zur vertikalen GBR-Technik (Chiapasco et al 2004, Merli et al 2006) und zwei Fallstudien (Parma-Benfenati et al 1999, Simion et al 2007) mit einer vergleichbaren Evidenz angegeben. Die Ergebnisse zeigten einen vertikalen Knochengewinn von 2-8 mm, während die Komplikationsrate teilweise bis zu 45,5 % betrug. Aufgrund der geringen Datenlage ist eine klinische Evidenz für die vertikale GBR-Technik mit vorhersagbaren Ergebnissen derzeit noch nicht möglich.

Aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Kombination von Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren oder anderen biologischen Mediatoren, um eine Entnahme von autogenem Knochen zu vermeiden und eine Regeneration auch bei kritischen Defektgrößen gewährleisten zu können (Hosakawa et al 2002, Hallman et al 2008, Howell et al 1997, Lekovic et al 2002, Mott et al 2002, Rossa et al 2000, Ruskin et al 2000, Trubiani et al 2010). Vor allem bei rekombinantem humanem BMP-2 (rhBMP-2) wurde in experimentellen und klinischen Studien eine sehr hohe osteogene Potenz festgestellt (Cochran et al 1999; Jung et al 2003, 2005; Boyne et al 1997). In einer Hundestudie konnte Wikesjö et al (2004) durch den Einsatz von rhBMP-2 auf einem Kollagenschwamm unter einer ePTFE Membran ein vertikaler Knochengewinn von fast 5mm und in der Kontrollgruppe ohne rhBMP-2 eine Knochenhöhe von 1,8 mm erreichen. Die Ergebnisse beider Gruppen erwiesen sich als signifikant. Ebenfalls zeigten Simion et al (2006) am Hundemodell, dass der Einsatz von rhPDGF in Kombination mit einem allogenen Knochenblock zu einer suffizienten Knochenneubildung und größtenteils zum Ersatz des Knochenblockes mit Eigenknochen nach 4 Monaten Einheilzeit führte, während in der Kontrollgruppe mit dem allogenen Block alleine hauptsächlich eine bindegewebige Regeneration stattfand. Interessant war vor allem, dass es nur zu einer vermehrten Knochenneubildung kam, wenn keine zellokklusive Barrieremembran verwendet wurde.

Der Einsatz einer Membran bei einer gleichzeitigen Anwendung von Wachstumsfaktoren scheint somit die Wundheilung zu behindern, da die Stimulierung der Osteoblasten, welche ebenso vom Periost ausgeht, dadurch unterdrückt werden könnte (Simion et al 2006, Snyder et al 2012). In einem anderen Studienmodell von Jung et al (2007) wurde ebenfalls am Hundemodell der Effekt von Parathyroidhormon (PTH) in einer gelartigen Polyethylenglykolmatrix (PEG) im Vergleich zu Eigenknochen alleine untersucht. Nach drei Monaten zeigte sich in beiden Gruppen eine vergleichbare Knochenneubildung. Es gibt somit Studien am Tiermodell, die beweisen, dass im Rahmen einer GBR ein Knochenersatzmaterial in Kombination mit Wachstumsfaktoren oder Hormonen durchaus zu einer adäquaten Knochenneubildung führen kann, um dadurch das autogene Knochentransplantat zu ersetzen.

Die GBR wird heute erfolgreich zur Regeneration von horizontalen Knochendefekten im Rahmen der Implantation eingesetzt. Die Vorhersagbarkeit wird dabei wesentlich von der Defektgröße und -morphologie bestimmt. Für die Regeneration großer Defekte oder vertikaler Knochendefekte kann die GBR-Technik noch nicht als Standardtherapiekonzept angewendet werden. Letztendlich müssen sich zukünftige Studien mehr mit der Physiologie und Pathophysiologie des Heilungsprozesses im Rahmen einer GBR auseinandersetzen, um neue Strategien entwickeln zu können, die mittels Tissue Engineering, Gentherapie oder Knochenersatzmaterialien, die als Medikamententräger dienen, die Knochenregeneration unterstützen (Retzepi et al 2010).

Inlaygraft - Sinusbodenelevation

Die Erhöhung des Alveolarkammes in der posterioren Maxilla durch Anhebung der Sinusbodenmembran wurde erstmals 1980 von Boyne und James und 1986 von Tatum beschrieben und zählt mittlerweile zu den am häufigsten durchgeführten und sichersten Knochenaufbaumethoden (Beaumont et al 2008, van den Bergh et al 2000, Boyne and James 1980, Cordaro et al 2008, Lundgren et al 2008, Rickert et al 2011, Schlegel et al 2003). Der externe Sinuslift, durch Präparation eines Knochenfensters in die laterale Kieferhöhlenwand, wurde zuerst beschrieben (Abb. 4a). Die Schneider'sche Membran wird dabei vom Boden der Kieferhöhle bis zur medianen Kieferhöhlenwand vorsichtig

abpräpariert und nach kranial angehoben. Es entsteht somit ein Hohlraum, der lange Zeit hauptsächlich mit autogenem Knochen gefüllt wurde (Raghoobar et al 1993, Triplett & Schow 1996). Aufgrund der hohen Resorptionsrate – größtenteils in den ersten 2-3 Jahren postoperativ (Hatano et al 2004) – und der möglichen Morbidität an der Entnahmestelle verwendet man heute als Füllmaterial meistens resorptionsstabile xenogene, allogene oder alloplastische Knochenersatzmaterialien (Abb. 4b), die entweder alleine oder in Kombination mit autogenem Knochen appliziert werden (Browaeys et al 2007, Fürst et al 2004, Jensen et al 2012, Rickert et al 2011). Das einzeitige Vorgehen kann ab einer Restknochenhöhe von mindestens 5 mm durchgeführt, bei ausreichender Primärstabilität des Implantates auch bei 3-5 mm. Ein zweizeitiges Vorgehen ist ab einem verbleibenden Restknochenvolumen von < 3 mm indiziert (Cosci et al 2000). Tawil und Mawla (2001) zeigten, dass ein einzeitiges Vorgehen bei einer Knochenhöhe von weniger als 5 mm zu einer deutlichen Reduktion der Implantatüberlebensraten (78,1 %) führte, wenn die Augmentation nicht mit einer Membran abgedeckt wurde und die Belastung der Implantate nach 6-9 Monaten Einheilzeit erfolgte. Die Überlebensrate stieg an, wenn das Augmentat mit einer Membran abgedeckt wurde (93,1 %). Nach einer Einheildauer von 9 Monaten war kein Unterschied zu jenen Augmentaten vorhanden, die nicht mit einer Membran bedeckt wurden. Es wurden doppelt so viele Implantate im einzeitigen Vorgehen inseriert, wodurch der direkte Vergleich der beiden Gruppen beeinträchtigt wird.

Summers (1994) beschrieb erstmalig ein weniger invasives einzeitiges Vorgehen für die Sinusbodenelevation – den internen Sinuslift mittels Osteotomie des Kieferhöhlenbodens. Dabei wird über die Implantatbettpräparation die zur Kieferhöhle angrenzende Kortikalislamelle mittels Osteotomen angehoben. Die entstandene Kuppel kann mit Knochenersatzmaterial aufgefüllt werden. Allerdings kann es beim Eindrehen des Implantates durch die Partikel zu einem Einreißen der Sinusschleimhaut kommen. Ein Knochenersatzmaterial ist bei dieser Methode nicht zwingend notwendig, da das alleinige Abhalten der Sinusmembran durch das Implantat eine Art Zelt bildet, indem sich ein Koagulum ausbilden kann, dass anschließend verknöchert. Als Voraussetzung gab Summers eine Alveolarfortsatzhöhe von mindestens 6mm an. Insgesamt kann dadurch eine Knochenhöhe von 2-3 mm gewonnen werden.

Die Kieferhöhle besitzt aufgrund ihrer allseitigen knöchernen Begrenzung eine hohe Regenerationsfähigkeit und eine sichere Vorhersagbarkeit von Knochenaufbaumethoden mit verschiedensten Knochenersatzmaterialien. Aufgrund der beidseitigen Anlage wird das Sinusliftmodell häufig zur Durchführung kontrollierter Studien, vor allem im sog. Split mouth design verwendet (Abb. 5+6), um die Knochenregeneration von verschiedenen Knochenersatzmaterialien in Kombination mit Wachstumsfaktoren oder mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu autogenem Knochen beobachten zu können (Farré-Guasch et al 2013).

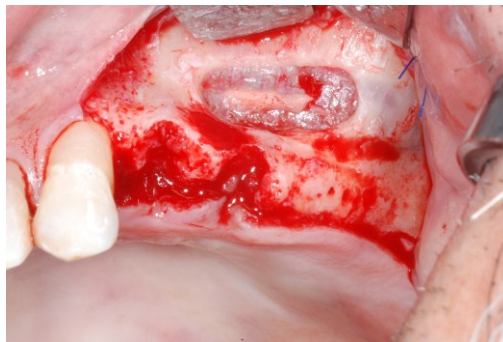


Abb. 5 Externer Sinuslift mit Osteotomie der lateralen Kieferhöhlenwand

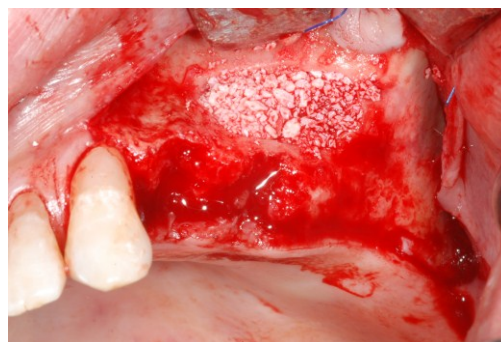


Abb. 6 Sinus sinistra nach Applikation von bovinem Knochenersatzmaterial

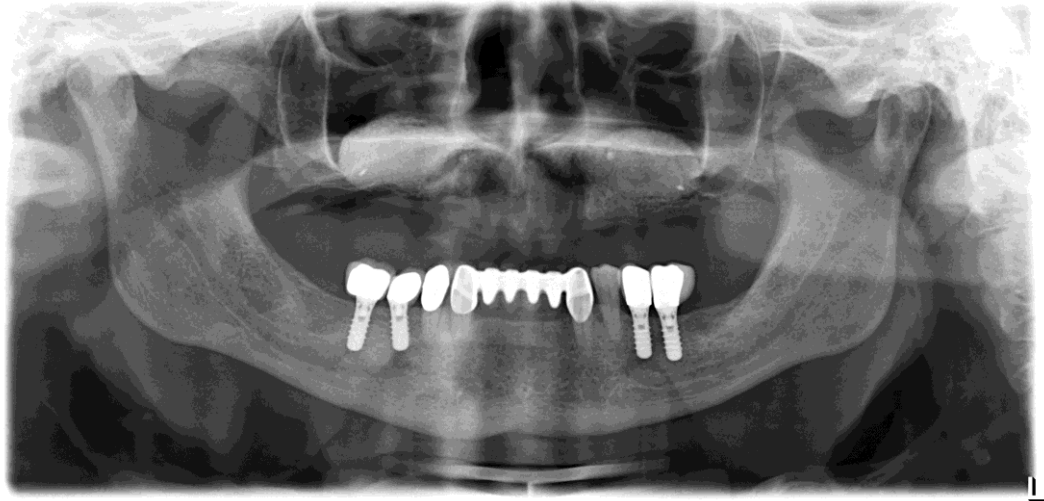


Abb. 7 Radiologische Kontrolle eines bilateralen externen Sinusliftes 3 Monate postoperativ

Horizontale und vertikale Blocktransplantate

Der Goldstandard für horizontale und vertikale Auflagerungsplastiken ab einer Restkieferkambbreite von $\leq 3\text{mm}$ bzw. bei vertikalen Defekten ist heute noch immer der autogene Knochenblock (Cordaro et al 2002, Zerbo et al 2003, von Arx et al 2006, Chiapasco et al 2009, Spin-Neto et al 2013). Um allerdings die Morbidität an der Spenderregion durch die Eigenknochenentnahme zu verhindern, werden immer häufiger allogene und xenogene Knochenersatzmaterialien verwendet, die zum Teil bereits computergestützt in der entsprechenden Defektgröße vorgefertigt werden. Knochenblöcke können folgenden Ursprungs sein:

- (1) autogen/ intraoral (Linea obliqua, Kinn, Tuber) (Abb. 8)
- (2) autogen/ extraoral (Becken, Tibia, Calvaria)
- (3) allogen oder xenogen

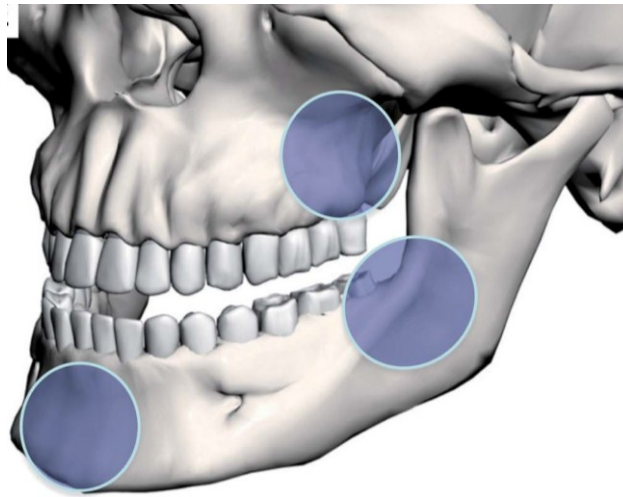


Abb. 8 Entnahmeregionen intraoraler Knochentransplantate (Draenert et al 2013)

Die Knochenblöcke können entweder in kortikaler, kortikospongiöser oder spongiöser Form entnommen werden, wobei das autogene kortikospongiöse Transplantat eine optimale Mischung zwischen relativer Resorptionsstabilität und hohem Regenerationspotential darstellt (Chiapasco et al 2009).

Der Knochenblock muss nach der Entnahme dem Empfängerlager in Form und Größe angepasst werden, sodass eine maximale Kongruenz zwischen Transplantat und Knochenlager entsteht. Voraussetzung für eine knöcherne Integration des Transplantates ist die Immobilisierung des Blockes mittels Osteosyntheseschrauben, sowie das Abdecken mit einer zelloklusiven Barrieremembran. Prophylaktisch kann durch das Bedecken des Blockes mit Knochenersatzpartikel einer Resorption entgegengewirkt werden (Abb. 9+10). Nachteile der autogenen Transplantate sind hauptsächlich die Morbidität an der Spenderregion, die begrenzte Verfügbarkeit und ein gewisses Resorptionsverhalten. Dieses beträgt bei vertikalen Auflagerungsplastiken von autogenen Knochenblöcken vom Becken 12 – 60 % nach 5 Jahren, während die Calvaria wesentlich resorptionsstabiler ist (0-15 %) (Chiapasco et al 2009). Das Resorptionsverhalten von intraoralen Transplantaten ist laut Chiapasco (2009) aus den Angaben der aktuellen Literatur nicht eindeutig definierbar. Rochietta et al (2008) geben in ihrem Review einen durchschnittlichen Knochenverlust von 4,88 mm nach 3 Jahren bei Beckentransplantaten und von 1,3 mm nach 4 Jahren bei Ramustransplantaten an. Das Resorptionsverhalten der Knochentransplantate wird sehr unterschiedlich beschrieben und hängt von mehreren Faktoren ab: ursprünglich vorhandenes Knochenvolumen,

Beobachtungszeitraum, Art der Rekonstruktion, Defektregion, Entnahmeregion des Transplantates, Zeitpunkt der Implantatversorgung, Tragen von provisorischen Prothesen (Chiapasco et al 2009). Der größte Nachteil intraoraler autogener Transplantate ist die mögliche Sensibilitätsstörung in der Endversorgungsregion des N. alveolaris inferior (0-5%) bei der Knochenentnahme von der Linea obliqua, sowie des Plexus dentalis bei der Knochenentnahme vom Kinn (10-50%) (Misch et al 1997). Die höchste Implantatmißerfolgsrate war bei Implantaten in Beckenkammtransplantaten (17,5%) zu beobachten, während diese bei Transplantaten von der Calvaria (6%) oder intraoralen Transplantaten (5,5%) wesentlich geringer war. Eine mögliche Ursache für den höheren Mißerfolg bei Beckenkammtransplantaten könnte eine unterschiedliche Ausgangssituation bei den einzelnen Probanden sein.



Abb. 9 Autogener kortikosponiöser Knochenblock von der Linea obliqua



Abb. 10 Applikation von bovinem Knochenersatzmaterial auf den Knochenblock als Resorptionsschutz

Als Alternative werden immer häufiger spongiöse allogene Knochenblöcke verwendet (Nissan et al. 2009, Nissan et al. 2012, Novell et al. 2012, Waasdorp et al. 2010). Diese zeigen eine ähnlich gute Einheilung wie autogene Knochenblöcke, mit dem Vorteil auf eine zusätzliche Entnahmestelle verzichten zu können. Die Erfolgsrate der allogenen Knochenblöcke ist in der posterioren Mandibula niedriger (87 %) als in der anterioren Maxilla (95,6 %) (Nissan et al. 2009). Spin-Neto et al (2013) beschreibt einen eindeutigen Vorteil autogener gegenüber allogener Transplantate, die hauptsächlich eine bindegewebige Einheilung zeigten. Allerdings verwendete er frische, gefrorene allogene Blöcke, die häufiger zu Abstoßungsreaktionen führen können, als gefriergetrocknete und demineralisierte Transplantate. Derzeit liegen zu viele Fallberichte und Kurzzeituntersuchungen, vor allem an der anterioren Maxilla, vor, die nur eine insuffiziente Evidenz bezüglich Transplantatinkorporation und Langzeitüberleben, sowie der Erfolgsrate der inserierten Implantate erlauben (Waasdorp et al. 2010). Die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder osteogenen Progenitorzellen zu einem allogenen Knochentransplantat soll die Osteoinduktivität erhöhen und somit die Knochenregeneration beschleunigen (Mott et al 2002). Trotzdem bleibt zu bedenken, dass das Zeitfenster der natürlichen Regeneration durch die beliebige Zugabe von derartigen Faktoren nicht unendlich minimiert werden kann und diese in erhöhter

Konzentration zu einer Erhöhung des karzinogenen Potentials führen können (Draenert et al 2013).

Eine bis jetzt noch wenig verbreitete Alternative zu den herkömmlichen Blocktransplantaten sind sog. Zylinderblocktransplantate für die horizontale und vertikale Defektrekonstruktion. Sie bestehen hauptsächlich aus kortikalem Knochen und werden durch das Implantat selbst im Eigenknochen verankert werden (Draenert et al 2011). Da das Implantat vom Transplantat umgeben wird und primär keine Vaskularisation erfährt, ist die Einheilung nicht sicher vorraussagbar. Als Alternative werden Zylinderringe nur im crestalen Bereich des Implantates zum Ausgleich kleiner vertikaler Defekte verwendet (Stevens et al. 2010) (Abb. 11). Auch hier werden die Implantate simultan wie durch einen Ring durch das Transplantat in den Eigenknochen inseriert. Auch hier gibt es bis jetzt noch keine Langzeitdaten, um über eine sichere Langzeitstabilität der Transplantate Auskunft geben zu können.

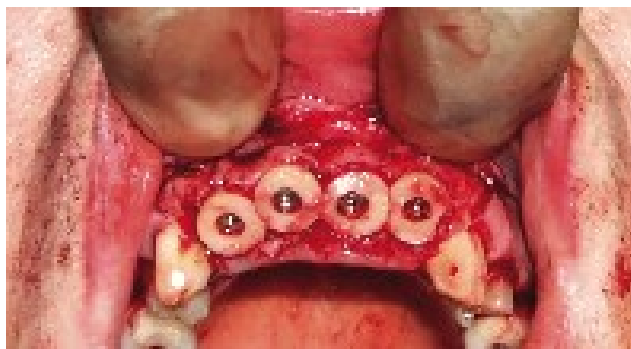


Abb. 11 Die Knochenringtechnik zum Ausgleich horizontaler und vertikaler Knochendefekten im Bereich des krestalen Kieferkammes (Stevens et al 2010)

Bone Splitting

Diese Technik dient der horizontalen Verbreiterung des Kieferkammes. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer intakten fazialen und oralen Kortikalislamelle, sowie eines Spongiosaanteiles zwischen den beiden Knochenlamellen. Indikation für diese Technik besteht bei einer Restkieferkammbreite von mindestens 3-5 mm. Im Rahmen des chirurgischen Vorgehens wird zunächst eine krestale Inzision zur Bildung eines

Mucoperiostlappens durchgeführt. Idealerweise erfolgt die Präparation des Lappens nur im Bereich des krestalen Kieferkammes nach buccal und lingual, um die buccale Kortikalis möglichst wenig von der Gefäßversorgung abzutrennen. Anschließend wird die krestale Inzisionsosteotomie mit einer oszillierenden Säge, einer Diamantscheibe oder mittels Piezotom durchgeführt. Ist es notwendig mesial und distal eine vertikale Entlastungsosteotomie der buccalen Lamelle durchzuführen, sollte ein Spaltlappen präpariert werden, um die buccale Kortikalislamelle periostgestielt zu lassen. Die Entlastungen sollten in einem Abstand von mindestens 1 mm zu den Nachbarzahnwurzeln erfolgen (Chiapasco et al 2006). Das Aufdehnen der Kortikalislamellen erfolgt langsam mit Hilfe eines Meisels oder Osteotomen aufsteigender Größe (Abb. 9). Die Implantation kann in der gleichen Sitzung oder etwas verzögert 2-3 Wochen darauf erfolgen (Chiapasco et al 2006). Bei sehr dünn auslaufenden Kortikalislamellen, mit einem hohen Risiko für postoperative Resorptionsvorgänge, kann es auch sinnvoll sein, den aufgedehnten Defekt zunächst mit Knochenersatzmaterial aufzufüllen und die Implantation erst nach abgeschlossener Verknöcherung durchzuführen.

Generell wird die Split-Technik häufiger im Oberkiefer als im Unterkiefer beschrieben, da der Unterkiefer vor allem im Seitzahnbereich häufig eine stärker ausgeprägte buccale Lamelle aufweist. Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass bei einer ungünstigen Kieferkammangulation die Implantatinklination zu weit buccal erfolgen kann und somit funktionelle und ästhetische Einschränkungen erfolgen können (Chiapasco et al 2009). Die Implantatüberlebensrate ist vergleichbar mit Implantaten, die in nativem Knochen inseriert wurden (97,8%) (Chiapasco et al 2006). Die Vorteile des Bone-Splitting sind die Vermeidung einer zweiten Wunde durch Eigenknochenentnahme und dass die Implantate sowohl fazial als oral von Eigenknochen umgeben sind. Dennoch liegen bis heute zu wenig standardisierte Daten mit großen Fallzahlen und langen Nachuntersuchungsperioden vor.



Abb. 12 Bone-Splitting regio 35-37 mittels eines Kieferkammspreizers (Chiapasco et al 2006)

Vertikale Distraktionsosteogenese

Bei der Distraktionsosteogenese wird das biologische Prinzip genutzt, dass sich neuer Knochen bildet, wenn zwei Knochenstücke langsam unter Spannung voneinander wegbewegt werden. Als Voraussetzung gilt ein vertikaler Kieferkammdefekt von ≥ 3 bis 4 mm, ein Minimum an Restknochenhöhe von 6-7 mm über vitalen Strukturen (Neurovaskuläres Bündel, Kieferhöhle) und ein zahnloser Kieferkamm von mehr als drei fehlenden Zähnen. Bei kleineren Kieferkammdefekten im Ausmaß von 1-2 Zähnen kommt es häufiger zu Komplikationen. Im Durchschnitt kann ein Knochengewinn von 4-6 mm erreicht werden (Gaggl et al 2000). Die zervikale Knochenhöhe der Nachbarzähne gilt dabei als maximale Grenze für den vertikalen Knochengewinn (Mc Allister et al 2007).

Die Distraktion wird in 3 Phasen unterteilt: die *Latenzphase* bis zu 7 Tage nach dem operativen Eingriff. Es erfolgt in diesem Zeitraum noch keine Distraktion, um das Weichgewebe abheilen zu lassen. In der *Distraktionsphase* werden die beiden Knochenstücke um ca. 1 mm pro Tag voneinander wegbewegt bis die gewünschte Knochenhöhe erreicht ist. Zur Anwendung kommen dabei externe oder interne Distraktoren (Abb. 13+14). Die Knochenregeneration im neu entstandenen Raum findet in der sog. *Konsolidierungsphase* statt (Mc Allister et al 2007). Die Implantation erfolgt 3-6 Monate nach der Distraktion. Wesentlicher Vorteil der Distraktionsosteogenese ist die Vermeidung einer autogenen Knochenentnahme und daher eine Reduktion der Morbiditätsrate. Zusätzlich kann das Weichgewebe langsam an den vertikalen Knochengewinn angepasst werden und das Infektionsrisiko ist wesentlich geringer, als bei autologen Knochenblöcken. Durch die Distraktion entsteht neuer Knochen, der dem

ortsständigen Knochen sehr ähnlich ist. Die Implantatüberlebensrate verhält sich ähnlich wie jene, bei der die Implantate in nativem Knochen gesetzt wurden (Chiapasco et al 2009). Die Nachteile dieser Technik sind teilweise eine palatinale oder linguale Inklination des distrahierten Fragmentes, sowie eine mögliche Resorption des Knochens vor der Implantation, wodurch eine Überkorrektur von 20 % empfohlen wird (Saulacic et al 2005). Entscheidend ist vor allem, dass nur Alveolarkämme mit einem vertikalen Defizit und ausreichend Knochenbreite mit dieser Technik behandelt werden können und komplizierte Kombinationsdefekte mit einem horizontalen Defizit nicht im Rahmen der Distraction therapiert werden können (Chiapasco et al 2007).

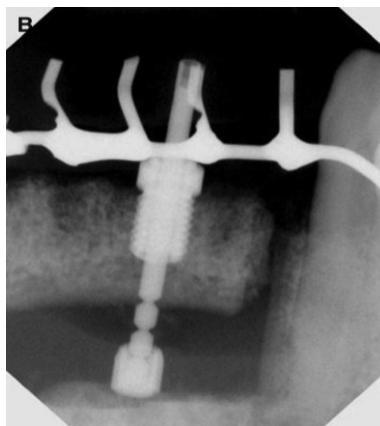


Abb. 13 Interner Distraktor (Mc Allister et al 2007)



Abb. 14 Externe Verankerung (Mc Allister et al 2007)

Le Fort I Osteotomie mit autogenem Knocheninterponat

Die Le Fort I Osteotomie ist eine bereits ältere Technik zur Regeneration von hochatrophen Alveolarkammdefekten der zahnlosen Maxilla (Klasse VI nach Cawood und Howell 1988). Hierbei erfolgt das horizontale Ablösen der Maxilla im Bereich des Kieferhöhlenbodens und des Nasenhöhlenbodens bis zur lateralen Begrenzung der Apertura piriformis. Dieser Anteil wird nach vorne und nach unten verlagert. Als autogenes Knocheninterponat wird ein bikortikaler Knochenblock aus der crista iliaca anterior entnommen und zwischen Alveolarfortsatz und Nasenhöhlen- und Kieferhöhlenboden befestigt (Abb. 15). Dadurch kann nicht nur der Alveolarknochendefekt, sondern auch die intermaxilläre sagittale, transversale und vertikale Diskrepanz korrigiert werden (Chiapasco et al 2007). Die Implantation wird sofort oder in einem zweizeitigen Vorgehen durchgeführt. Die Implantatüberlebensrate ist jedoch bei einem zweizeitigen Vorgehen höher (84,5% vs. 93%) (Chiapasco et al 2007). Durch die Abtrennung der Maxilla besteht anfänglich eine Ischämie des Alveolarknochens. Das Präparationstrauma im Rahmen einer einzeitigen Implantation bewirkt eine zusätzliche Reduktion der Vaskularisation und führt dadurch zu einem möglichen Implantatverlust.

Wesentliche Nachteile der Le Fort I Osteotomie sind, dass eine relativ hohe postoperative Morbiditätsrate mit Infektionen, Schmerzen und hüftbezogenem Diskomfort auftreten kann. Intraoperative und postoperative Komplikationen können Frakturen des harten Gaumens, Sinusitis und Exposition von Knochenfragmenten aufgrund von Dehisenzenbildung sein. Die Implantatüberlebensraten sind im Durchschnitt geringer (66,7 % – 95 %), als jene von Implantaten in nativem Knochen (Chiapasco et al 2009). Ebenfalls ist die Implantaterfolgsrate geringer (82,9 %), als bei Implantaten, die ohne Knochenaugmentation inseriert wurden (Chiapasco et al 2006). Aufgrund der hohen Morbiditätsrate und der Techniksensitivität wird empfohlen diese Technik nur bei hochatrophen Kieferkammverhältnissen durchzuführen.

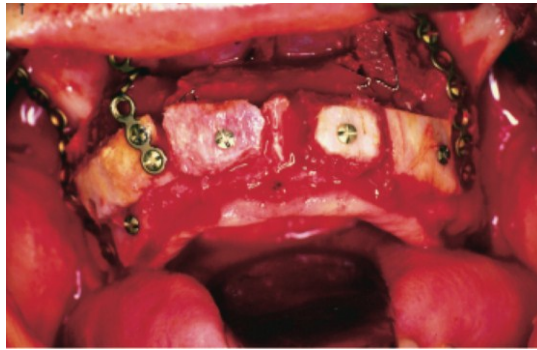


Abb. 15 Le Fort I Osteotomie bei ausgeprägter Alveolarkammatrophie und maxillärer Pseudoretrognathie (Chiapasco et al 2007)

Knochenersatzmaterialien

Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sollten für den klinischen Einsatz folgende Kriterien erfüllen:

- Gerüstfunktion, um das Einwachsen von Knochenzellen aus dem umgebenden Transplantatlager zu ermöglichen (Osteokonduktion)
- Träger für Wachstumsfaktoren oder Stammzellen
- Oberfläche zur Migration, Adhäsion, Differenzierung und Proliferation von Zellen
- Stabilität, um dem Druck des darüber liegenden Weichgewebes standzuhalten
- Mikroporositäten von mindestens über 100 µm, um das Einwachsen von Blutgefäßen und pluripotenten Vorläuferzellen gewährleisten zu können
- Biokompatibilität (keine Fremdkörper- oder Immunreaktion auslösend)

Knochenersatzmaterialien lassen sich je nach Herkunft und Zusammensetzung unterteilen in (Abb. 16):

<i>allogen</i>	Knochen, der von einem anderen Spender der gleichen Spezies entnommen wurde
<i>xenogen</i>	Knochenmineral, dass von Spendern unterschiedlicher Spezies gewonnen wurde (Rinderknochen, Algen)
<i>alloplastisch</i>	synthetisch hergestellte Materialien (Kalziumphosphate, bioaktives Glas,

Polymere)

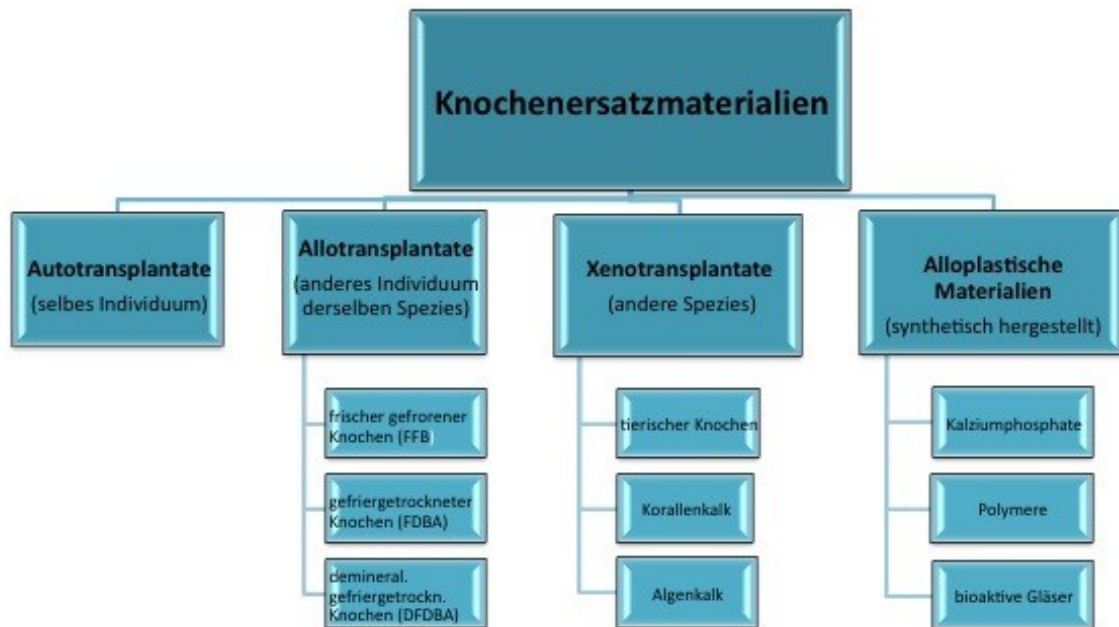


Abb. 16 Schematische Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Allotransplantate

Allotransplantate können von Leichen oder vom lebenden Menschen im Rahmen von Hüftoperationen gewonnen werden. Sie sind hauptsächlich in den USA weit verbreitet, während in Europa strengere Richtlinien für die Gewinnung und den klinischen Einsatz vorliegen.

Sie können generell in 3 Gruppen unterteilt werden:

- frischer, gefrorener Knochen (fresh frozen bone, FFB)
- gefriergetrockneter Knochen (freeze-dried bone allograft, FDBA)
- demineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (demineralized freeze-dried bone allograft, DFDBA)

Durch das Gefriertrocknen oder Einfrieren von Knochen sollen die Alloantigene reduziert und eine Immunantwort des Empfängers verhindert werden (Garg 2006). Allerdings kann eine Übertragung von Infektionskrankheiten wie HIV nicht ganz ausgeschlossen werden und beträgt 1:1,6 Millionen (Buck et al 1989). Weiters können Hepatitis B und C, Autoimmunerkrankungen, bösartige Tumore und Toxine übertragen werden (Kolk et al 2012). Aus diesem Grund wird FFB nicht mehr im klinischen Einsatz verwendet. Um das Infektionsrisiko einzuschränken wird der gewonnene Knochen speziellen Desinfektions- und Konservierungsverfahren unterzogen, wodurch ihre biologische Wertigkeit jedoch abnimmt (Glass et al 2008). Durch die Aufbereitungsverfahren können BMP's gelöst werden und somit dem allogenen Transplantat osteoinduktive Eigenschaften verleihen. Andererseits können durch das Autoklavieren auch osteoinduktive Faktoren inaktiviert werden (Glass et al 2008). Die Konzentration der freigesetzten BMP's schwankt allerdings von Transplantat zu Transplantat, sodass die Osteoinduktivität ebenfalls stark variieren kann (Boyan et al 2006). Allogene Transplantate werden in mineralisierter (FDBA = freeze dried bone allograft; z. B. Tutoplast[®]) und demineralisierter Form (DFDBA = demineralized freeze dried bone allograft; z. B. Grafton[®]) angeboten, wobei durch die Demineralisierung zusätzlich Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in der Matrix freigelegt werden (Glass et al 2008).

Allogene Knochenersatzmaterialien werden in den unterschiedlichsten Formen angeboten: von kompletten Knochensegmenten, über kortikale oder kortikospongiöse Blöcke, bis hin zu Spongiosachips oder demineralisierter Knochenmatrix (Kolk et al 2012) (Abb. 17+18). Die Einheilung von DFDBA erfolgt gleich wie bei autogenem Knochen, der Prozess ist allerdings etwas verlangsamt. DFDBA hat in der Europäischen Union noch keine CE Zertifizierung erhalten und ist somit nicht für den klinischen Einsatz erlaubt (Browaeys et al 2007).



Abb. 17 Maxgraft Block (botiss dental GmbH, Berlin, Deutschland) (Kolk et al 2012)

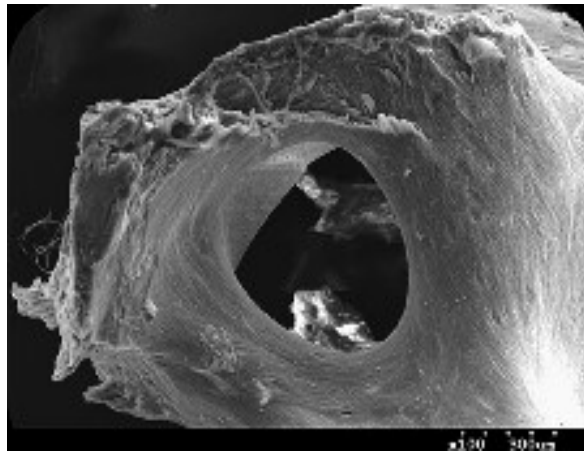


Abb. 18 Morphologie und Mikrostruktur von Maxgraft® Granula, SEM Aufnahme (Kolk et al 2012)

Xenotransplantate

Xenotransplantate stammen von einer anderen Spezies, wie z.B. Algen, Korallen oder Tierknochen bovinen, porcinen oder equinen Ursprungs.

Das Kalziumkarbonatgerüst von *Korallen* ähnelt mit einer Porenstruktur von 150-500 μm der humanen Spongiosa und ist eines der wenigen Materialien, das eine chemische Verbindung mit Knochen und Weichgewebe eingehen kann (Hutmacher et al 2007) (Abb. 19). Durch eine hydrothermale Austauschreaktion mit Phosphor wird Kalziumkarbonat zu Hydroxylapatit umgewandelt (Buser et al 2010). Allerdings haben Studien gezeigt, dass

das osteokonduktive Potential geringer ist, als bei anderen Knochenersatzmaterialien (Buser et al 1998, Jensen et al 1996) und v.a. bei Verwendung von Blocktransplantaten häufiger Spätkomplikationen wie Dehiszenzen auftreten können (Horting-Hansen et al 1990).

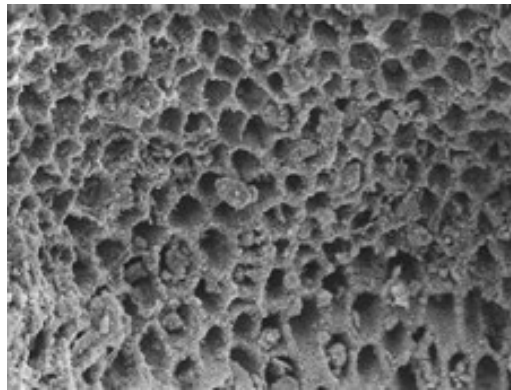


Abb. 19 Morphologie und Mikrostruktur von Aligipore[®], Dentsply Implants (Kolk et al 2012)

Bovines Knochenersatzmaterial wurde bis jetzt in experimentellen und klinischen Studien am häufigsten untersucht. Durch seine biologischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften ist es humaner Spongiosa sehr ähnlich. Es ist biofunktionell und osteokonduktiv. Um eine immunologische Reaktion oder die Übertragung von Krankheiten ausschließen zu können wird die organische Komponente durch Hitzebehandlung oder ein chemisches Extraktionsverfahren vollständig entfernt (deproteinised bovine bone material, DBBM). Trotz der potentiellen Gefahr, dass organische Überreste im Knochenersatzmaterial verbleiben können, gibt es bis jetzt keine Berichte über eine Krankheitsübertragung (Buser 2010). Aufgrund der guten mechanischen Eigenschaften und der Resorptionsstabilität wird DBBM häufig für Sinusbodenaugmentationen und laterale Auflagerungsplastiken verwendet. In Diskussion steht allerdings, in welchem Ausmaß DBBM resorbiert werden kann. Studien konnten zeigen, dass Osteoklasten und osteoklastenähnliche Zellen, sowie dementsprechende Resorptionshöhlen an der Oberfläche der Partikel nachweisbar sind. Eine Abnahme des DBBM-Volumens war jedoch ein Jahr nach der Augmentation histomorphometrisch nicht zu erkennen (Hämmerle et al 1998, Jensen et al 2007). Piatelli et al (1999) konnte in einer Nachuntersuchung auch nach 10 Jahren noch immer DBBM Partikel im Augmentat

nachweisen. Durch deren lange Verweildauer im Körper gelten bovine Knochenersatzmaterialien als resorptionsstabil.

BioOss®

Das xenogene BioOss® gilt als einziges Knochenersatzmaterial als „evidence based“ (Kolk et al 2012) (Abb. 20). Es muß grundsätzlich als pathogenes und allergenes Material betrachtet werden. Durch Hitzesterilisation werden die Knochenteile deproteinisiert, sodass nur die anorganische Knochenmatrix übrig bleibt. Durch die Denaturierung werden Proteine, organische Bestandteile und Prionen, welche die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) verursachen können, zerstört. Die bovine Knochenmatrix ähnelt in ihrer mikro- und makroporösen Struktur der menschlichen Spongiosa (Abb. 21). Mineralische Anteile und mechanische Eigenschaften entsprechen dem Knochen des Menschen (Spector et al 1994). Das Apatit im bovinen Knochenersatzmaterial besteht aus mehr Carbonat- und weniger Hydroxylapatitgruppen. Kalzium- und Phosphatgruppen liegen im Verhältnis 2:1 vor. Die innere Oberfläche der Spongiosabälkchen erreicht bis zu 100 m² pro Gramm und bildet dadurch eine optimale Leitschiene zur Osteoblastenanlagerung und Osteoidbildung. Die Größe der Poren eignet sich ebenfalls bestens zur Einsprossung neuer Kapillaren. Aufgrund des Herstellungsverfahrens von BioOss® gehen alle Proteine zugunsten der Sterilität und dem Schutz vor BSE verloren, wodurch das Material nur seine osteokonduktiven Eigenschaften behält. Bovines anorganisches Hydroxylapatit findet heutzutage eine breit gefächerte Anwendung zur Regeneration von Parodontaldefekten, zur gesteuerten Geweberegeneration (GBR), Sinusbodenaugmentation und im Rahmen der Socket Preservation. Angeboten wird bovines Knochenersatzmaterial auch in Blockform zur horizontalen und vertikalen Kieferkammrekonstruktion als Alternative zum autologen Knochenblocktransplantat. Aufgrund der langsameren Knochenregeneration, als mit autologen Knochentransplantaten, wird der Einsatz des Materials in Verbindung mit osteoinduktiven Faktoren empfohlen (Cordaro et al 2003; Merckx et al 2003).



Abb. 20 Bovines deproteinisiertes Knochenersatzmaterial (BioOss[®], Geistlich Biomaterials, Wohlhusen, Schweiz) (Kolk et al 2012)



Abb. 21 Morphologie und Mikrostruktur von BioOss Granula, SEM Aufnahme (Kolk et al 2012)

Alloplastische Transplantate

Der eindeutige Vorteil von alloplastischen Materialien liegt darin, dass sie keine Krankheiten übertragen können und in uneingeschränkter Menge erhältlich sind. Deshalb wurden sie in den letzten Jahren immer mehr Bestandteil der Forschung, vor allem da sie es erlauben einzelne Materialeigenschaften für unterschiedliche klinische Indikationen zu kombinieren. Bis heute ist es jedoch noch nicht gelungen das ideale alloplastische Material herzustellen (Buser 2010).

Grundsätzlich können 3 Gruppen unterschieden werden:

- Kalziumphosphate
- Bioaktives Glas
- Polymere

Unter den *Kalziumphosphaten* sind Hydroxylapatit (HA) und β -Trikalziumphosphat (β -TCP) am besten untersucht (Abb. 22+23). Während HA osteokonduktiv und teilweise nicht oder nur sehr langsam resorbierbar ist (Lu et al 2002, Tadic et al 2002), weist β -TCP zwar osteokonduktive Eigenschaften auf, resorbiert aber sehr schnell. Das hat den Vorteil, dass β -TCP in kleineren Defekten durch die Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen rascher zur Knochenneubildung führt als HA. Für laterale Kieferkammaugmentationen ist die Resorptionsrate von β -TCP allerdings zu hoch (Jensen et al 2007, Buser et al 1998). Deshalb versucht man HA und β -TCP zu kombinieren, um die Eigenschaften wie mechanische Langzeitstabilität und Resorptionsfähigkeit vereinen zu können. Kalziumphosphate gelten zwar als osteokonduktiv, trotzdem müssen die Oberflächenmerkmale, die zu einer ähnlichen Osteokonduktivität wie der von Spongiosa führen, noch erforscht werden (Buser 2010).

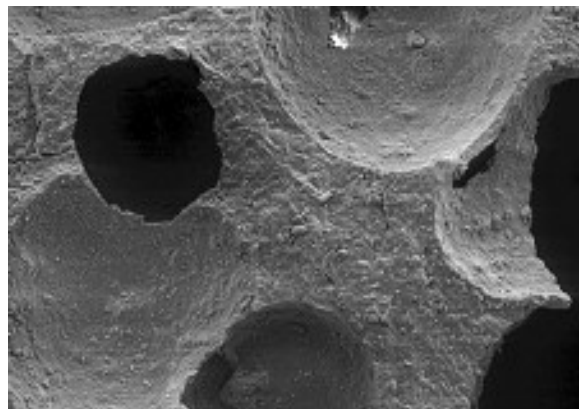


Abb. 22 Morphologie und Mikrostruktur von HA, SEM Aufnahme (Kolk et al 2012)

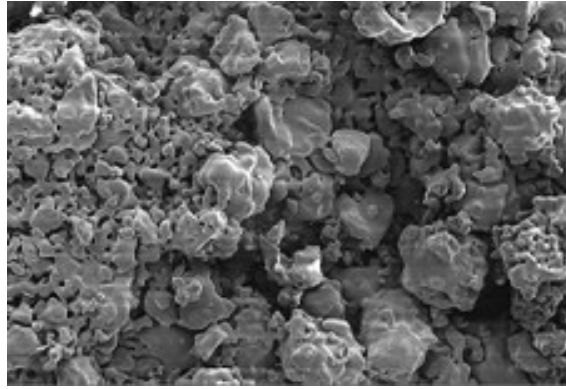


Abb. 23 Morphologie und Mikrostruktur von β -Tricalciumphosphat Granula, SEM Aufnahme (Kolk et al 2012)

Biogläser bestehen aus Siliziumdioxid. Sie binden Knochen durch oberflächenreaktive Siliziumdioxid-, Kalzium- und Phosphatgruppen und sind sehr biokompatibel. Sie sind allerdings durch ihre nicht poröse Struktur sehr instabil und deshalb nur eingeschränkt anwendbar (Brovarone et al 2008). Ihr Haupteinsatzgebiet finden Biogläser derzeit hauptsächlich in der Regeneration von Parodontaldefekten (Garg et al 2006) (Abb. 24 + 25).

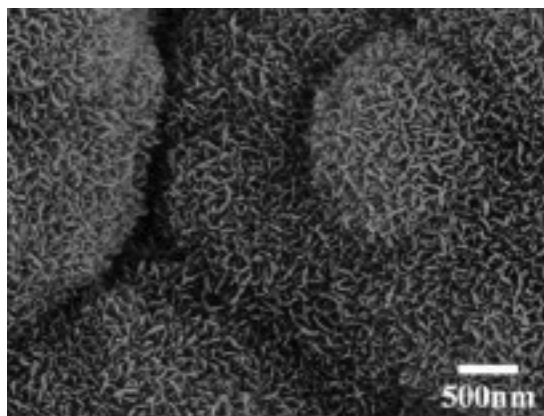


Abb. 24 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bioglass-Partikel mit einer nadelartigen Hydroxylapatitoberfläche (Fu et al 2008)

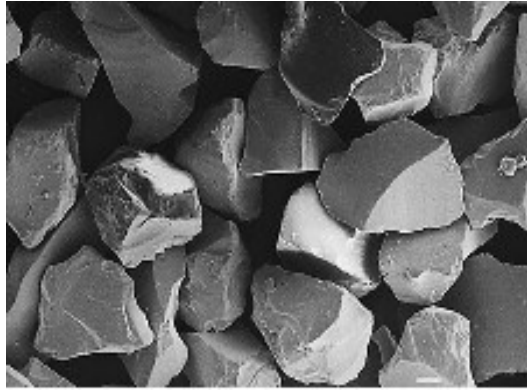


Abb. 25 Morphologie und Mikrostruktur von Bioglass Granula, SEM Aufnahme (Kolk et al 2012)

Polymere werden heutzutage hauptsächlich als Matrix für synthetische Knochenersatzpartikel verwendet. Reine biodegradierbare Polymere, wie PLA (Polylaktid) und PGA (Polyglykolid), sind nicht osteokonduktiv (Wang 2006). Eine hohe Konzentration der Abbauprodukte von PLA und PGA können sogar zum Absterben ganzer Zellkolonien führen. Somit finden in der aktuellen Literatur Hybrid-/ Kompositmaterialien, wie die Kombination aus β -TCP und HA in einer PLGA-Matrix (Polylaktid-co-Glycolid) ihre Anwendung (Abb. 26, 27, 28, 29). Die Basisresorptionsprodukte von TCP und HA puffern das entstandene saure Milieu und verhindern somit, dass ein für die Zellen ungünstiges Milieu gebildet wird (Hutmacher et al 2007).

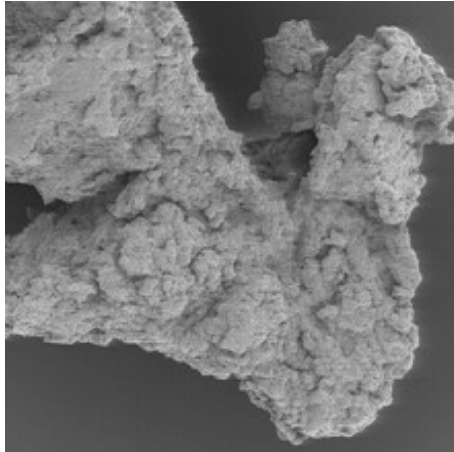


Abb. 26 SEM Aufnahme von NanoBone[®] Granula, welche aus HA eingebettet in eine Matrix aus Kieselgel bestehen (ARTOSS GmbH, Rostock, Deutschland) (Kolk et al 2012)



Abb. 27 Granula aus 60% HA und 40 % β -TCP mit einer Polyglykolidschicht ummantelt

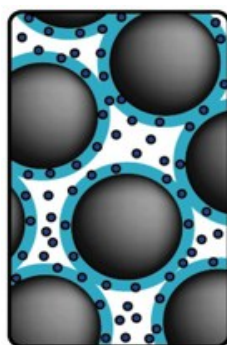


Abb. 28 Die Granula verbinden sich nachdem die Polyglykolidschicht durch einen Biolinker aktiviert wurde (easy-graft crystalTM, Degradable Solution, Schlieren, Schweiz)

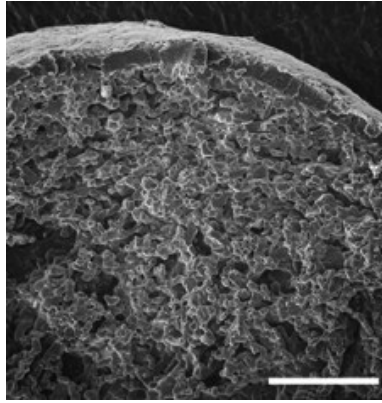


Abb. 29 Morphologie und Mikrostruktur von easy graft crystalTM, SEM-Aufnahme (Kolk et al 2012)

Methoden zur Biologisierung von Knochenersatzmaterialien

Tissue Engineering

Das Tissue Engineering wird als Regeneration biologischer Gewebe mittels Zellen unter zu Hilfenahme von Trägermaterialien und /oder Biomolekülen definiert (Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices 2001). Am häufigsten wird derzeit das Tissue Engineering zur Rekonstruktion von Haut, Knorpel und Gefäßen durchgeführt. In der Orthopädie wird es vor allem zur Regeneration von sog. „critical size bone defects“ (Defekte, die durch natürliche Vaskularisation und Osteoprogenitorzellen nicht überbrückt werden können und somit zu einer insuffizienten, teilweise bindegewebigen Ausheilung führen) eingesetzt und hat somit den Vorteil, dass das benötigte Gewebe in unlimitierter Menge und ohne Erzeugung von Spendermorbidity zur Verfügung steht. Primär basiert das Tissue Engineering auf der Strategie, dass Trägermaterialien, die eine bestimmte Form und mechanische Eigenschaften vorgeben, mit zuvor in vitro amplifizierten mesenchymalen Vorläuferzellen besiedelt werden. Biologische Stimuli, wie Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren, können zusätzlich die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen beeinflussen. Die Zellzüchtung auf einer Art Gewebsgerüst wurde erstmalig von Prof. Joseph Vacanti im Jahre 1980 durchgeführt (Hutmacher et al 2007). Der Vorgang setzt sich grundlegend aus drei Schritten zusammen: (1) Ernten,

Isolieren und Vermehren von mesenchymalen Stammzellen, (2) Aufbringen der bereits zu Osteoblasten differenzierten Zellen auf ein Gerüst und (3) in-vivo Reimplantation. Hauptlimitierung bei den derzeitigen Methoden ist die ausreichende Versorgung der regenerierten Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff, um eine ausreichende Dicke und Größe des Zielgewebes zu erhalten (Richter et al 2009). Durch die Züchtung der Gewebe in sogenannten Bioreaktoren soll der Sauerstofftransport wesentlich verbessert werden. Da vor allem Knochenkonstrukte im Körper möglichst schnell anwachsen sollen, um die Vitalität der Zellen aufrecht zu erhalten, werden zusätzlich Endothelprogenitorzellen eingesetzt, um die Vaskularisierung zu beschleunigen (Richter et al 2009). Noch bleibt allerdings offen, wie sich diese Endothelzellen in Kombination mit MSZ in Bezug auf ihre Ausdifferenzierung und Funktionalisierung gegenseitig beeinflussen.

Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass die Auswahl des geeigneten Gerüstmaterials noch immer nicht klar definiert werden konnte (Payer et al 2010, Wu et al 2006, Terheyden et al 2001, Terheyden et al 2004, Heliotis et al 2006, Orringer et al 1999, Warnke et al 2004). Als Voraussetzung für das Gerüstgewebe gilt, dass es biokompatibel und frei von Prionen ist, Vaskularisation und Chemotaxis ermöglicht und keine Immunreaktion hervorruft. Durch die Ausbildung eines starren Gerüsts, die Oberflächenbeschaffenheit des Materials und die Freisetzung von löslichen Molekülen, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine, soll die Zellmigration und das Zellwachstum positiv beeinflusst werden (Hutmacher et al 2007). Obwohl es bereits eine große Anzahl an Materialien gibt, besteht jedes aus einer anderen chemischen Zusammensetzung. Bis heute fehlen Materialien, die aus einer osteoinduktiven mineralischen Komponente bestehen und gleichzeitig mechanische Eigenschaften, wie bei in Funktion stehendem Knochen, besitzen (Tortelli & Cancedda 2009).

Der größte Nachteil des Tissue Engineering ist jedoch der große Zeit- und Kostenaufwand, um Zellen in vitro zu expandieren, zu differenzieren und sie auf einem Gerüst wachsen zu lassen. Um den klinischen Einsatz des Tissue engineering in Zukunft zu vereinfachen, könnte man versuchen Zellen und /oder biologische Moleküle direkt während des Produktionsprozesses in die Gerüstmaterialien zu integrieren (Hutmacher et al 2007). Ein weiterer Ansatz ist, in Zukunft allogene Transplantationen von MSZ zu ermöglichen und dadurch Gewebebanken aufzubauen. Die Transplantate haben dann zwar den Vorteil

immer verfügbar zu sein, würden aber dennoch zu teuer für den klinischen Einsatz sein (Richter et al 2009).

In situ Regeneration

Unter in situ Regeneration versteht man die Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe ohne Transplantation von vitalem Gewebe, indem durch „intelligente“ Biomaterialien Informationen an Progenitorzellen, die sich in der Nähe des Defektlagers befinden, vermittelt werden (Richter et al 2009). Durch das Aufbringen von Wachstums-/ Differenzierungsfaktoren auf Knochenersatzmaterialien sollen diese zusätzlich zu ihren osteokonduktiven Eigenschaften Osteoinduktivität erlangen, ähnlich den Eigenschaften eines autogenen Knochentransplantates. Dadurch können Stamm- oder Progenitorzellen aus der Umgebung angelockt und aktiviert werden. Durch die Materialeigenschaften des Gerüsts kann die zukünftige Differenzierung der Zelle bestimmt werden. Anscheinend reagieren MSZ und Progenitorzellen sehr sensibel auf die Viskosität des Trägermaterials und differenzieren auf einer harten Matrix eher zu Osteoblasten, während sie auf weichen Matrizes eine neurogene Differenzierung einschlagen (Engler et al 2006). Die Oberflächen von Biomaterialien können bei ihrer Herstellung auch biochemisch funktionalisiert werden, das heißt Adhäsions- und Wachstumsfaktoren werden in dem Material immobilisiert und können dadurch Prozesse wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung steuern (Richter et al 2009). Eine weitere Möglichkeit auf Zellen über das Trägermaterial einzuwirken ist der Einsatz von Plasmid-DNA. Die DNA-Ringe werden in Bakterien hergestellt und tragen die Information zur Herstellung verschiedener Proteine. Dabei kann durch die Bildung von Parathormon, Wachstumsfaktoren der BMP-Familie oder durchblutungsfördernde Faktoren (VEGF) die Knochenheilung wesentlich begünstigt werden (Bonadio et al 1999). Die Gestaltung der Oberflächen von Trägermaterialien scheint in Zukunft einen Schwerpunkt in der Materialforschung darzustellen, während die alleinige Zugabe von Wachstumsfaktoren zu einem Trägermaterial bis jetzt in präklinischen und klinischen Studien keine signifikante Evidenz zeigte. Jung et al (2008) konnten in einem Review zwar feststellen, dass BMP-2, BMP-7, GDF-5, PDGF und PTH zu einer Zunahme der Knochenregeneration am Tiermodell in

unterschiedlichem Ausmaß führten, während beim Menschen rhBMP-2 die Regeneration der Extraktionsalveole, der Sinusbodenelevation und der lateralen Kieferkammaugmentation positiv beeinflusste. Trotzdem werden zu allen genannten Wachstumsfaktoren groß angelegte RCTs im Rahmen präklinischer und klinischer Studien gefordert. Auch Del Fabbro et al (2013) konnten keinen positiven Effekt eines Plättchenkonzentrates im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation feststellen. In diesem Review wurden insgesamt 12 kontrollierte Studien mit ähnlichem Studiendesign verglichen. Allerdings fehlt es auch hier an einem standardisierten Vorgehen bei der Anwendung und Auswertung dieser Studien. Schliephake (2013) bestätigt dieses Ergebnis, indem er keine Evidenz für die Anwendung von rhPDGF in Extraktionsalveolen, bei der Rezessionsbehandlung, bei der Sinusbodenaugmentation und zur vertikalen und horizontalen Kieferkammaugmentation findet. rhBMP-2 führte hingegen zu einer eindeutigen Verbesserung der Knochenheilung in Extraktionsalveolen und beim Sinuslift. In präklinischen Studien zeigt rhBMP-2 eine normale physiologische Knochenbildung sowohl bei Defekten mit kritischer Defektgröße, als auch bei supraalveolären Defekten und führt zu einer sicheren Osseo- oder Reosseointegration von Implantaten (Wikesjö et al 2009).

Wachstums-/ Differenzierungsfaktoren und osteoinduktive Proteine

Wachstumsfaktoren wirken mitogen auf die Knochenzellen und regen deren Matrixbiosynthese an. *Differenzierungsfaktoren* bewirken wiederum über Induktion die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in die Zellen des Zielgewebes. Osteoinduktive Proteine, die sog. „Bone morphogenetic proteins“, nehmen eine Sonderstellung ein, da sie in der Lage sind primär nicht osteogene Zellen in Knorpel- und Knochenzellen zu transformieren (Glass et al 2008).

PDGF (Platelet Derived Growth Factor) hat eine starke mitogene Wirkung. Er führt zu einer Steigerung an Wundheilungszellen, fördert die Regeneration von Kapillaren und führt zur Aktivierung weiterer Wachstumsfaktoren. PDGF kommt in Blutplättchen, aktiven Makrophagen und in der Knochenmatrix vor. Häufig wird PDGF mit anderen Wachstumsfaktoren, wie IGF kombiniert, um dadurch ein breiteres Spektrum an Zellen

für die Knochenregeneration zu stimulieren (Garg 2006). In der Literatur befinden sich hauptsächlich Studien, die in der Regeneration des Parodontalligamentes und des angrenzenden Knochens eine signifikant höhere Regeneration im Vergleich zu Knochenersatzmaterialien ohne PDGF und IGF sehen (Nevins et al 2005, Camelo et al 2003, Howell et al 1997).

TGF (Transforming-growth-factor) ist einer der häufigsten Wachstumsfaktoren, die im Knochen und in den Blutplättchen vorkommen. Er kann die Regeneration von Knochenzellen je nach Bedarf steigern oder mindern. Dennoch wurde in vitro gezeigt, dass auch dieser Wachstumsfaktor in Kombination mit beispielsweise PDGF bessere Effekte zeigt (Mott et al 2002).

IGF (Insulin-like-growth-factor) scheint die Knochenbildung durch Zelldifferenzierung- und proliferation, sowie durch die Produktion von Matrix zu steigern. Er spielt auch bei der Steuerung von Parathormon zur Proliferation von Osteoprogenitorzellen eine Rolle. Allerdings führt IGF in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren zu besseren Regenerationsergebnissen als in alleiniger Anwendung (Garg 2006).

FGF (Fibroblast-growth-factor) bewirkt mitunter die Stimulation von Fibroblasten ähnlichen Zelltypen und die Angiogenese (Garg et al 2006). In vitro Studien weisen zwar auf die Proliferation von Endothelzellen und Zellen des Parodontalligamentes beim Einsatz von FGF hin, ein gesteigerter Nutzen bei der Knochenregeneration ist allerdings nicht zu finden (Hosokawa et al 2000, Rossa et al 2000).

PRP (Platelet-rich-plasma) wird durch Konzentrierung von venösem Blut gewonnen und enthält die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF, IGF und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in konzentrierter Menge. Zusätzlich wirkt der hohe Anteil an Fibrinogen hämostatisch und hilft das Augmentationsmaterial im Defekt zu stabilisieren. Möglicherweise kann es sogar als Barrieremembran dienen und das Einwachsen von epithelialen und Bindegewebszellen verhindern (Lekovic et al 2002). Forschungsergebnisse zeigen durch den Einsatz von PRP eine Verbesserung der Weichteilheilung, reduzierte Blutungen, Ödem- und Narbenbildung, sowie geringere postoperative Schmerzen und ein dichteres Knochenwachstum als beim Einsatz von nativen Knochen alleine (Ruskin et al 2000, Arora et al 2009, Thor et al 2007). Dennoch gibt es auch Studien, die keinen wesentlichen Vorteil durch die Beimengung von PRP zu

autogenem Knochen oder bovinem Knochenersatzmaterial sehen (Jakse et al 2003, Raghoobar et al 2005, Schaaf et al 2008). Plachokova et al (2008) fand in einer systematischen Übersichtsarbeit zwar eine positive Wirkung in Parodontaldefekten, während die Wirkung von PRP bei der Sinusbodenelevation in Frage zu stellen ist. Aufgrund der teilweise sehr differierenden Untersuchungsprotokolle bleibt noch immer ungeklärt, welche Faktoren in welcher Art und Weise die Wirkung von PRPs beeinflussen.

BMPs (Bone-Morphogenetic-Protein) sind osteogen wirksame Proteine (gehören somit nicht zur Gruppe der Wachstumshormone) und befinden sich in der extrazellulären Knochenmatrix. Sie bewirken eine osteogene Zelldifferenzierung in vitro und führen zur Knochendefektheilung in vivo (Khaled et al 2011). Marshall Urist entdeckte in den 60-iger Jahren erstmalig die BMPs. 1988 gelang es Wang drei verschiedene BMPs im bovinen Knochen zu identifizieren. Heutzutage können mittels der rekombinanten DNA-Technologie vor allem BMP-2 und BMP-7 in größeren Mengen hergestellt werden. BMP-2 ist hauptsächlich Gegenstand aktueller Forschung in der oralen, sowie craniomaxillären Chirurgie. Es konnte gezeigt werden, dass BMP-2 die komplette enchondrale Ossifikation induzieren kann und der gebildete Knorpel anschließend von Knochen und Knochenmark ersetzt wird. Ebenso soll es eine wichtige Rolle im frühen Stadium der Osteoinduktion spielen (Okubo et al 2002). Allerdings ist die Gewinnung sehr teuer und es fehlt noch immer an passenden Trägermaterialien und der Bestimmung optimaler Dosierungen, um BMPs klinisch regelmäßig anwenden zu können.

Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

Der deutsche Pathologe Cohnheim beschrieb vor 140 Jahren zum ersten Mal mesenchymale Stammzellen in nicht hämatopoetischem Gewebe (Maulitz 1978). Alexander Friedenstein war der erste, der die Anwesenheit von nicht hämatopoetischen Zellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung von Knochenzellen im Knochenmark haben, entdeckte (Friedenstein et al 1970). Weitere Beschreibungen anderer Autoren folgten (Piersma 1983, Howlett 1986, Mardon et al 1987, Caplan et al 1991, Beresford et al 1992). Definiert wurde der Begriff „Mesenchymale Stammzelle“ von Caplan (1994). Er dokumentierte das Vorkommen von multipotenten Vorläuferzellen mesenchymalen Gewebes im Knochenmark. Sie sind für die Regeneration mesenchymaler

Gewebe nach deren Absterben durch Trauma, Krankheit oder Alterungsprozess zuständig. Mesenchymale Stammzellen liegen als undifferenzierte und unspezialisierte Vorläuferzellen im Knochenmark vor und können durch entsprechende Stimulation zu spezialisierten Zellen des Skelettgewebes wie Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten ausdifferenzieren (Pittenger et al 1999, Grove et al 2004, Wulf et al 2006) (Abb. 30).

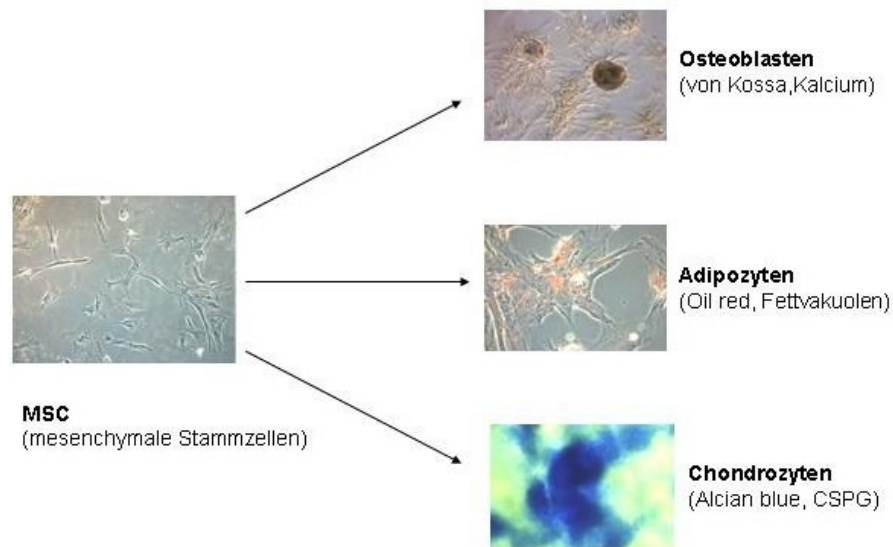


Abb. 30 Nachweis der Pluripotenz von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) durch Differenzierung mittels verschiedener Wachstumsfaktoren zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten; diese können z.B. histologisch durch Anfärben spezifischer Matrixbestandteile identifiziert werden (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Shakibaei, Lehrstuhl für Anatomie, LMU München)

Um eine Vereinheitlichung zu finden und dadurch vergleichbare Studienergebnisse zu erhalten, dürfen heute nur noch Zellen als MSZ bezeichnet werden, die folgende Charakteristika erfüllen (Dominici et al 2006):

Morphologisch – Plastikadhärenz und fibroblastenähnliches Erscheinungsbild

Funktionell – Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten, sowie in Hepatozyten und Neuronen

Phänotypisch – Exprimierung der Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90,

weniger als 2% der Population exprimiert zusätzlich den

Leukozytenmarker CD45, den Endothelmarker CD34 und die

Monozyten- und Makrophagenmarker CD14 und CD11.

Haynesworth et al. (1992) war der Erste, der erfolgreich Knochenneubildung in vivo nachweisen konnte, nachdem er humane MSZ von adultem Knochenmark auf einem Gerüst aus poröser Kalzium-Phosphatkeramik ektop in immunsupprimierte Mäuse implantierte. Mittlerweile konnte in Tiermodellen wiederholt belegt werden, dass die lokale Applikation von MSZ die Regeneration von Knochendefekten signifikant beschleunigt (Mankani et al 2001, De Kok et al 2003, Tsuchida et al 2003).

Ein wesentlicher Vorteil mesenchymaler Stammzellen ist, dass sie sich leicht aus Gewebeproben isolieren lassen und als autologes Transplantat keine Transplantatabstoßungsreaktion induzieren. Ebenfalls beeinflussen sie die Wundheilung positiv (Connolly et al 1995). Aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten, deren Wirkungsprinzip bis jetzt noch nicht geklärt ist, könnten Stammzellen in Kombination mit körperfremden Knochenersatzmaterialien das Auftreten einer Transplantatabstoßungsreaktion verringern (Bartholomew et al 2002). Zusätzlich können sie die Produktion zytotoxischer Lymphozyten hemmen und sind gegen natürliche Killerzellen resistent (Le Blank et al 2006). Dennoch ist ihr Differenzierungspotential abhängig von der Art des Spendergewebes und der Isolierungstechnik (Chamberlain et al 2007). Auch die Anzahl an gewonnenen MSZ ist für eine suffiziente Wirkung an der Empfängerregion meist zu gering, wodurch aufwendige in vitro Verfahren zur Zellvermehrung zum Einsatz gebracht werden müssen.

Klinischer Einsatz von MSZ

Eine groß angelegte Nachuntersuchung zur Geweberegeneration in Europa im Jahre 2011 zeigt die häufigsten Anwendungsgebiete des „Tissue Engineering“ mit autologen MSZ. Hauptsächlich wurden diese bei muskuloskeletalen und rheumatoiden Erkrankungen (46%), sowie zur kardiovaskulären Regeneration (22%) eingesetzt (Martin et al 2013). Zur Anwendung kamen hauptsächlich aus dem Gewebe (42%) entnommene mesenchymale Zellen, die zunächst ex vivo amplifiziert wurden (40%). Vor allem zur Regeneration großer,

meist insuffizient ausheilender Knochendefekte, hauptsächlich in der Orthopädie und Unfallchirurgie, wird versucht mittels MSZ die Regenerationsfähigkeit zu verbessern. Die Qualität eingesetzter humaner Zellen wird dabei mit der *Richtlinie der Europäischen Union über Gewebe und Zellen* (European Union Tissues and Cells Directive, EUTDC) zur Einhaltung von GMP-Standards („good manufacturing practice“) reguliert.

Im Bereich der experimentellen Alveolarkammrekonstruktion werden häufig Knochenersatzmaterialien mit autologen MSZ vom Beckenknochen verwendet (Hernigou et al 2005, Sauerbier et al 2011, Shayesteh et al 2008). Die Anzahl der MSZ ist im Knochenmark am höchsten und deshalb am ertragreichsten. Smiler et al (2007) konnte in einer nicht kontrollierten Studie zeigen, dass die Verwendung eines Knochenmarkaspirates mit alloplastischen und xenogenen Knochenersatzmaterialien zu einer erfolgreichen Knochenregeneration beitragen (16-40% neuer Knochen) kann und dadurch autologe Transplantate ersetzen kann. Die Studie zeigt allerdings nur eine kleine Patientengruppe von 5 Teilnehmern und unterschiedliche Augmentationstechniken (Sinuslift und laterale Auflagerungsplastik) mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien. Man erkennt eine deutlich geringere Knochenneubildung im Sinusaugmentat als bei der lateralen Auflagerung. Ein wesentlicher Mangel an dieser Studie ist, dass es keine Kontrollgruppe ohne Knochenmarkaspirat oder mit autogenem Knochen gibt. Ebenfalls wurden die Zellen vor der Applikation nicht von den hämatopoetischen Zellen getrennt und konzentriert. Das stellt jedoch häufig die Voraussetzung für die Anwendung von MSZ dar, da diese im Knochenmark meist in einer sehr geringen Konzentration anzutreffen sind. Die Isolierung der MSZ erfolgt im Labor mittels Dichtegradientenzentrifugation (FICOLL). Hierbei werden zunächst die mononukleären Zellen von den restlichen Blutzellen getrennt und anschließend in Kulturschalen die Vermehrung der MSZ durchgeführt. MSZ adhären umgehend an der Kulturschale, während hämatopoetische Zellen nicht adhären und beim Mediumwechsel automatisch entfernt werden (Wulf et al 2006, Le Blanc et al 2005). Gutwald et al (2010) und Sauerbier et al (2010) belegten, dass die Konzentrierung von MSZ mittels FICOLL die Knochenregeneration unterstützen kann und eine Alternative zu autologen Knochentransplantaten darstellt. Aufgrund des aufwendigen Konzentrierungsprozesses im Labor und den damit verbundenen höheren Kosten und Zeitaufwand sucht man nach geschlossenen Systemen, die eine „chair-side“ Konzentrierung im Rahmen der Augmentation ermöglichen. Mit dem BMAC System

(Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) wird es ermöglicht das gewonnene Knochenmarkaspirat sofort zu konzentrieren und dem Knochenersatzmaterial nach Zugabe von autologem Thrombin wieder beizumengen, sodass die Zellgewinnung, -konzentrierung und der Knochenaufbau am gleichen Tag stattfinden können und auf ein externes Labor verzichtet werden kann. In aktuellen Studien wurde bewiesen, dass der Einsatz von BMAC im Vergleich zu FICOLL eine höhere Konzentrierung der Zellen ermöglicht (Hermann et al 2008, Sauerbier et al 2010). Rickert konnte in einem Sinuslift-Modell sogar eine höhere Knochenregeneration bei der Applikation von in BMAC konzentrierten MSZ auf bovinem Knochenersatzmaterial feststellen ($17.7 \pm 7.3\%$), als bei bovinem Knochenersatzmaterial und autologem Knochen ($12.0\% \pm 6.6$; $P = 0.026$) (Rickert et al 2011). Vor allem im Bereich der craniomaxillären und oralen Chirurgie gibt es noch viel zu wenig kontrollierte Studien zur Knochenregeneration mittels mesenchymalen Stammzellen und der Mechanismus der Stammzellwirkung in vivo ist noch nicht vollständig geklärt (Khojasteh 2011).

Methoden zur Stammzellkonzentrierung

Aufgrund der relativ geringen Anzahl an mesenchymalen Stammzellen im Knochenmarkaspirat versucht man durch Konzentrierung der mononukleären Zellen (Leukozyten, Progenitorzellen, mesenchymale Stammzellen) die Zahl an MSZ zu erhöhen und dadurch die Knochenregeneration zu steigern. Mittels unterschiedlichster Konzentrierungsverfahren sollen mononukleäre Zellen (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, mesenchymale Stammzellen) von den restlichen hämatopoetischen (Thrombozyten, Erythrozyten) und abgestorbenen Zellen getrennt werden. Durch die Ergebnisse aus der REPAIR-AMI und der ASTAMI-Studie, in welchen Knochenmarkszellen zur Wiederherstellung der Kontraktilität des Linksherzventrikels injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Zellisierungsprotokolle einen Einfluß auf die Funktion und das Überleben der mononukleären Stammzellen haben (Assmus et al 2006, Schächinger et al 2006, Lunde et al 2006). Seeger et al (2007) konnte in seiner Untersuchung feststellen, dass die Anzahl an mesenchymalen Stammzellen signifikant reduziert war, wenn das ASTAMI Protokoll (236×10^6 vs. 87×10^6 Zellen) angewendet wurde. Die Isolierung mittels FICOLL entspricht der bis jetzt sichersten und am häufigsten

durchgeführten Zellseparierungsmethode (Hermann et al 2008). Aber eine der größten Limitationen von FICOLL ist, dass es sehr untersucherabhängig und zeitaufwendig ist und ein Labor mit „good manufacturing practice“ (GMP) benötigt wird. Durch Harvest Technologies wurde eine *Chair-side* Methode (BMAC[®] System, Bone Marrow Aspiration Concentrate) entwickelt, bei der das Knochenmarkaspirat direkt nach der Entnahme am Patienten konzentriert und sofort in den Defekt eingebracht werden kann. Hermann et al (2008) konnten nachweisen, dass mit dem BMAC Verfahren eine 2,4-fach höhere Anreicherung an MNZ möglich war, als mit dem herkömmlichen FICOLL Verfahren. Die Kapazität KbE (Kolonie bildende Einheiten) zu bilden war in der Kultur bei beiden Verfahren ähnlich. Die Migrationsfähigkeit der Zellen war allerdings bei dem BMAC-Verfahren höher ($p < 0,001$). Einen wesentlichen Vorteil des BMAC-Systems sah Hermann (2008) auch in der Anreicherung von Thrombozyten, die mit 74,3 % dem Anteil an Thrombozyten im ursprünglichen Knochenmarkaspirat entspricht.

FICOLL-Methode

Bei dieser Technik wird mittels eines Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers (Ficoll-Paque[®] Plus, GE Healthcare) eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, um Lymphozyten und Monozyten von den restlichen Blutzellen zu trennen (Abb. 31).

Zunächst wird in ein Zentrifugenröhrchen das Saccharose-Copolymer mit einer Probe verdünntem venösem Blut gefüllt. Anschließend erfolgt eine 30 bis 40-minütige Zentrifugation. Da die Dichte des Saccharose-Copolymers (1-1,2 g/ml) jener von mononukleären Zellen entspricht, sammeln sich diese (Lymphozyten, Monozyten) in der sog. Interphase über der Copolymerschicht. Die Zellen mit einer höheren Dichte (Erythrozyten, Granulozyten, tote Zellen) setzen sich am Boden des Röhrchens ab, während das Plasma mit den Thrombozyten die oberste Schicht über der Interphase bildet. Dieser Plasmaüberstand wird abpipettiert, die Interphaseschicht mit den Monozyten separiert und mit isotoner, gepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend können die Zellen mittels der Trypan-Blau Färbung gezählt werden. Diese Technik ist sehr aufwendig und kann nur extern in einem Labor durchgeführt werden.

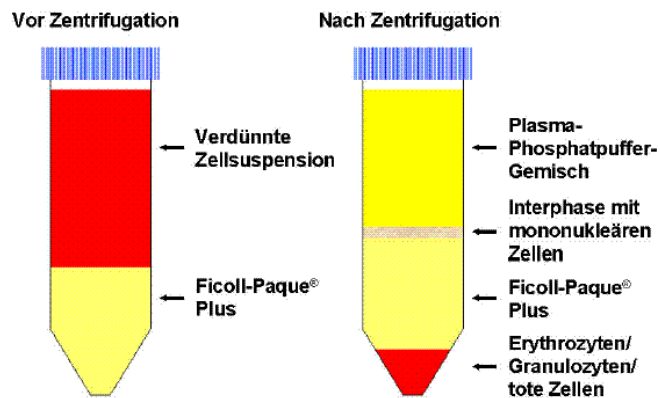


Abb. 31 Konzentrierung von mononukleären Zellen mittels FICOLL-Verfahren (Robert Tripmacher, „Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen“, Dissertation 2005, Charité Berlin)

Mit dem BMAC[®]-System (Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) wird die Konzentrierung des Knochenmarkaspirates in einem *Chair-side* Verfahren ermöglicht (Abb. 32). Dieses System wird bereits seit einigen Jahren im Bereich der Gefäßchirurgie und der Orthopädie verwendet. Das Aspirat wird zunächst in einen Behälter, der aus zwei Kammern besteht, eingebracht (Abb. 33). In der größeren Kammer mit dem Aspirat befindet sich ein beweglicher Zellfilter (Abb. 34). Durch diesen Filter werden während der Zentrifugation Erythrozyten und abgestorbene Zellen von den Leukozyten, Thrombozyten und dem Plasma getrennt. Letztere werden während der Zentrifugation durch einen kleinen Zwischenstop in die kleinere Kammer überführt. Nach 14 Minuten stoppt die Zentrifuge. Am Boden der kleinen Kammer befindet sich jetzt eine rote Schicht, gefolgt von einer dünnen weißen Schicht und darüber eine bernsteinfarbene Schicht, das Plasma. Die weiße Schicht wird als sog. *buffy coat* (= Leukozytenfilm) bezeichnet und enthält die Leukozyten mit den darin enthaltenen mesenchymalen Stammzellen. Am Boden der Kammer befinden sich die Thrombozyten (Abb. 35). Nach Entfernung des Plasmaüberstandes wird der *buffy coat* mit den Thrombozyten vermengt. Das Vorhandensein von Blutplättchen stellt einen weiteren Vorteil des BMAC-Systems gegenüber dem FICOLL-Verfahren dar, da jene die Wachstumsfaktoren VEGF (Vasoendothelialer Wachstumsfaktor) und PDGF (Plateletderived Wachstumsfaktor) enthalten. Da die Thrombozyten diese Faktoren vor allem beim Koagulationsprozess freisetzen, wird dem Konzentrat vor der Beimengung zum Knochenersatzmaterial autologes Thrombin aus venösem Blut zugefügt, welches dem Patienten vor der

Knochenmarkaspiration abgenommen wurde. Das sich dabei bildende Koagel verdichtet und stabilisiert die Knochenersatzmaterialpartikel und erleichtert dadurch wesentlich die Applikation des Materials (Sauerbier et al 2011, Jäger et al 2009).



Abb. 32 BMAC-System (Harvest Technology Corporation)



Abb. 33 BMAC-Zentrifuge mit BMAC –Behälter für das Knochenmarkaspirat und einem zweiten blauen Behälter für das venöse Blut



Abb. 34 Einbringen des Knochenmarkaspirates in die große Kammer mit weißem Zellfilter



Abb. 35 Knochenmarkaspirat nach der Konzentrierung mit buffy coat und Plasmaüberstand in der kleinen Kammer (Priv.-Doz. DDr. Sebastian Sauerbier, Dep. für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Uniklinik Freiburg)

Limitierende Faktoren

Das ideale Knochenersatzmaterial für alle Indikationen existiert bis heute nicht. Abhängig von der bestehenden klinischen Situation ist es notwendig unterschiedliche Kombinationen von Knochenersatzmaterial und bioaktiven Molekülen oder Stammzellen zu kombinieren. Die Anzahl der Studien ist groß und dennoch fehlt es ihnen an Vergleichbarkeit. Das größte Problem bei der Interpretation klinischer Daten ist eine zu kleine Patientenfallzahl, das Fehlen von Kontrollgruppen und der Einschluss von Patienten, bei denen bereits multiple Operationen versagt haben, sog. *worst case* Fälle

(Lee et al 2009). Ein wichtiger Punkt ist auch, dass sehr viel präklinische Arbeit vor allem an Kleintieren (Ratten, Hasen) durchgeführt wird und die Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragbar sind (Lee et al 2009). Die benötigten Konzentrationen sind höher, mit mehr Nebenwirkungen und höheren Kosten verbunden.

Einer der Hauptfaktoren für das Überleben des Transplantates ist die Entwicklung einer suffizienten Vaskularisation (Schroeder et al 2011). Wenn sich keine Blutgefäße bilden, bleibt das Transplantat ischämisch, es können keine Wachstumsfaktoren einwandern und die Zellen sterben ab. Durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, PDGF und FGF, versucht man die Angiogenese zu fördern. Eine Alternative wäre der Einsatz von adipösen Stammzellen, die zu einer höheren Vaskularisation führen können, als Stammzellen aus dem Knochenmark (Kim et al 2007). Der Hauptgrund für den eingeschränkten Einsatz von Wachstumsfaktoren und BMP's liegt an der Notwendigkeit eines geeigneten Trägermaterials, sowie der Bereitstellung jener Faktoren in entsprechenden Dosen und zum richtigen Zeitpunkt (Lee et al 2009). Aktuelle Techniken zum Einsatz von Wachstumsfaktoren resultieren in einer schnellen Freisetzung von diesen Faktoren kurz nach der Applikation. Der erwünschte Langzeiteffekt bleibt dabei jedoch aus (Schroeder et al 2011). Um eine osteoinduktive Wirkung zu erhalten müssen teilweise supraphysiologische Konzentrationen eingesetzt werden, wodurch nicht nur hohe Kosten, sondern auch das Risiko einer ektopen Knochenbildung stark ansteigen (Chatterjea et al 2010). Supraphysiologische Konzentrationen von BMP können jedoch auch genau den gegenteiligen Effekt auslösen und Knochenresorption und – umbau fördern (Nakashima et al 2003).

Der Einsatz von MSZ befindet sich trotz der weitflächigen Verbreitung noch immer in Entwicklung. Es gibt verschiedenste Arten die Zellen zu ernten, isolieren und zu vermehren. Die ex vivo Konzentrierung der Zellen führt zu einer wesentlichen Erhöhung des Zeit- und Kostenaufwandes und es ist immer ein potentiell Kontaminationsrisiko vorhanden. Einen weiteren Einfluss hat auch die vom Spender abhängige Knochenbildungskapazität, welche unter den Patienten, je nach Alter, Geschlecht und Umweltfaktoren (Rauchen), stark variieren kann. Ebenfalls abhängig von diesen Faktoren ist die Anzahl der MSZ, die normalerweise $1-38 \text{ pro } 10^6$ mononukleäre Zellen beträgt und erst bei entsprechender Signalinduktion konzentriert wird. Zusätzlich kann die ex vivo

Vermehrung von Zellen zu einer Veränderung der Genexpression und somit zu einem veränderten Zellverhalten führen. Deshalb ist es für die therapeutische Applikation wichtig eine einheitliche Vermehrung und Qualität der Progenitorzellen zu erreichen (Janicki et al 2011).

Laut Jakobsen et al (2013) wird die zukünftige Herausforderung sein, ein exakt gestaltetes 3-D Trägermaterial in entsprechender Größe und Porosität zur Rehabilitation großer Defekte zu finden, welches zur entsprechenden Wiederherstellung von Form und Funktion beiträgt ohne dabei die Knochenheilung zu verzögern. Es gilt dabei eine ideale Kombination aus Trägermaterial, MSZ und Wachstumsfaktoren zu finden. Dabei spielen jedoch die Kosten eine nicht außer Acht zu lassende Rolle. Es muss somit eine Technologie gefunden werden, die eine einfache und kostensparende Wiederherstellung von „critical size bone defects“ erlaubt und weltweit, auch in entwicklungsschwachen Ländern, eingesetzt werden kann (Schroeder et al 2011).

Studie

Vorprojekt: Knochenmarkaspirat von der Tibia

Die Tibia stellt eine leicht zugängliche Spenderregion zur Entnahme von autologem Knochenmark dar. Die direkte Applikation des Knochenmarkaspirates auf ein geeignetes Knochenersatzmaterial könnte somit eine einfache Möglichkeit zur Rekonstruktion ausgedehnter Alveolarkammdefekte darstellen. Deshalb sollte zunächst im Rahmen eines Vorprojektes mit der Entnahme von Knochenmark aus dem proximalen Tibiakopf die direkte Wirkung eines unbehandelten Knochenmarkaspirates von der Tibia auf die Knochenneubildung untersucht werden (Payer et al 2013). In einer kontrollierten Pilotstudie im Split-mouth-design wurde bei 6 Patienten (3 Frauen, 3 Männer) eine bilaterale Sinusbodenaugmentation mit einer Mischung aus bovinem Knochenersatzmaterial (BKEM, Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Deutschland) und Knochenmarkaspirat aus dem proximalen Tibiakopf auf der Testseite und reinem BKEM auf der Kontrollseite durchgeführt (Abb. 36). Pro Patient wurden 10,5 ml Knochenmarkaspirat entnommen und mit 0,2 ml Heparin (500 IU Heparin, B.Braun,

Melsungen, Deutschland) in einer 20-ml Spritze vermischt. Davon wurden 8,0 ml auf 2,0 g BKEM (Bio-Oss® 0,25-1mm, Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Schweiz) appliziert und direkt in den zuvor randomisierten Sinus eingebracht (Abb. 38). 2,5 ml des Aspirates wurden für die Qualitätskontrolle kultiviert (Abb. 37). Zum Nachweis der Pluripotenz wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen und auf ihr Differentierungspotential in osteogene und adipogene Zelllinien untersucht. Nach 3 und 6 Monaten wurden Biopsien in den Regionen der geplanten Implantatpositionen navigiert mittels Trepanbohrer (3,2 mm Durchmesser, Komet, Besigheim, Deutschland) entnommen. Die Knochenneubildung, sowie die Kontaktfläche Knochen zu Knochenersatzmaterial wurden histomorphometrisch analysiert.

Die gewonnenen Zellen zeigten in der Qualitätskontrolle die typischen morphologischen Merkmale mesenchymaler Stammzellen (mononuklear, fibroblastenähnlich, spindelförmig, plastik-adhärenz). Sie konnten in vitro bis zu einer, für den klinischen Einsatz adäquaten, Menge von $1,5 \times 10^8$ Zellen vermehrt und in osteogene und adipogene Zelllinien differenziert werden. Mit der FACS-Analyse gelang der Nachweis des Immunphänotypus für mesenchymale Stammzellen (CD 73, CD 90 und CD 105).

Die Knochenneubildung betrug nach 3 Monaten auf der Testseite $10,36 \pm 11,83 \%$ und auf der Kontrollseite $9,45 \pm 4,15 \%$ ($p = 0,535$), während nach 6 Monaten die Proben eine Knochenneubildung von $14,17 \pm 3,59 \%$ auf der Testseite und von $10,41 \pm 5,25 \%$ auf der Kontrollseite zeigten ($p = 0,928$) (Abb. 40). Die Kontaktfläche zwischen neu gebildetem Knochen und BioOss® - Granula betrug nach 3 Monaten $16,40 \pm 18,59 \%$ auf der Testseite und $15,06 \pm 12,52 \%$ auf der Kontrollseite ($p = 0,678$), sowie nach 6 Monaten $20,26 \pm 11,32 \%$ auf der Testseite und $17,89 \pm 9,63 \%$ auf der Kontrollseite ($p = 0,879$) (Abb. 41). Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant. Aus der Studie wurde geschlossen, dass die Applikation eines Knochenmarkaspirates zu wenig mesenchymale Stammzellen enthält, um zu einer vermehrten Knochenneubildung in vivo führen zu können. Obwohl die Ergebnisse keinen Vorteil in der Anwendung eines Knochenmarkaspirates auf die Knochenneubildung zeigten, kann dieses Model als wichtige Grundlage für andere diagnostische oder therapeutische Methoden im Rahmen zell-basierter Therapiekonzepte oder im Rahmen des Tissue engineering dienen.



Abb. 36 Markierungen des proximalen Tibiakopfes vor der Knochenmarkaspiration



Abb. 37 2,5ml Aspirat für die Qualitätskontrolle in vitro



Abb. 38 Testseite: BKEM vermischt mit Knochenmarkaspirat von der Tibia



Abb. 39 Kontrollseite: reines BKEM in steriler Kochsalzlösung

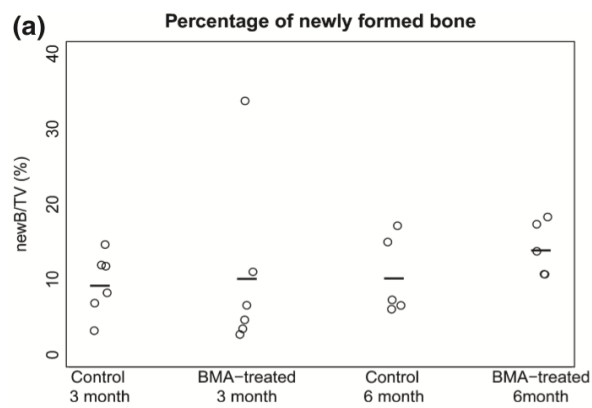


Abb. 40 Prozentueller Anteil an neu gebildetem Knochen in der Test- und Kontrollseite nach 3 und 6 Monaten

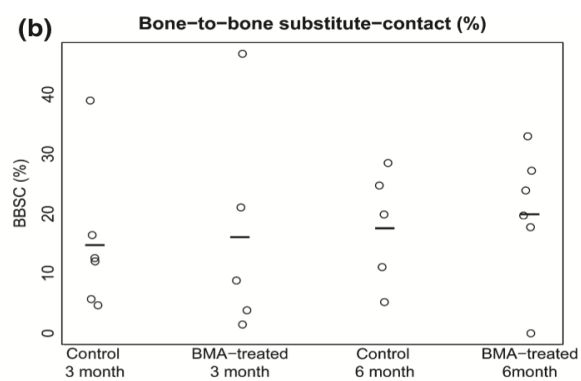


Abb. 41 Prozentueller Anteil der Kontaktfläche zwischen BioOss[®]-Granula und neu gebildetem Knochen in der Test- und Kontrollseite nach 3 und 6 Monaten

Ziel der Pilotstudie

Ziel der Studie war es zu bestimmen, ob es durch die Zugabe eines Konzentrates von mononukleären Zellen (MNZ) zu einem bovinen Knochenersatzmaterial (BKEM) zu einer schnelleren Knochenneubildung (KNB) kommt, als mit dem BKEM alleine.

Material und Methoden

Studiendesign

Die Studie wurde in einem randomisierten, kontrollierten Split-mouth Design durchgeführt. Dem Studienprotokoll stimmte die Ethikkommission der medizinischen Universität Graz (Projektnummer: 20-138 ex 08/09) zu. Es wurden insgesamt 7 Patienten (2 weiblich, 5 männlich; Durchschnittsalter 58 Jahre), mit beidseitig hochatrophem Alveolarknochen der distalen Maxilla (< 3mm) und der Notwendigkeit einer Sinusbodenelevation vor Implantation aus dem Patientenpool der Ambulanz des Dep. für Zahnärztliche Chirurgie und Röntgenologie in die Studie aufgenommen. Stoffwechselerkrankungen, status post Radiatio im Hals-/ Kopfbereich, Bisphosphonattherapie, Lokalanästhesieunverträglichkeit und Schwangerschaft waren Ausschlußkriterien. Die Randomisierung von Test- und Kontrollseite wurde vor dem operativen Eingriff mittels eines Computersystems durchgeführt (Randomizer for Clinical Trials, Institut für medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation, Medizinische Universität Graz). Auf der Testseite wurde ein bovines Knochenersatzmaterial (BKEM; Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) mit dem konzentrierten Knochenmarkaspirat (KK) appliziert, während die Kontrollseite mit BKEM alleine augmentiert wurde. Knochenbiopsien wurden nach 3 und 6 Monaten navigiert mittels einer Bohrschablone im Bereich der späteren Implantatinserion (ExpertEase® System, Dentsply Friadent) entnommen. Die histomorphometrische Auswertung fand am Hard Tissue Research Laboratory in Freiburg (Dep. für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) statt. Panoramaröntgen und Computertomogramme dienten zur Evaluation der vorhandenen Restknochenhöhe, sowie zur Kontrolle des Augmentationsvolumens.

Knochenmarkaspiration und Gewinnung von autologem Thrombin

Alle Patienten wurden unter Sedierung mit 7,5 mg Dormicum® (Midazolamhydrochlorid) p.o. and 3 mg Dormicum® i.v. behandelt. Vor der Knochenmarkentnahme wurde dem Patienten venöses Blut abgenommen, welches anschließend mit 1 ml ACD-A und Mannitol und einer Mischung aus 1,7 ml CaCl und Ethanol in ein Röhrchen (20 ml) überführt und vermengt wurde (42 + 43). Das Röhrchen verweilte für ca. 45 min in aufrechter Lagerung. Die Patienten wurden jeweils in Linksseitenlage gebracht und mit Ultracain dental (Articain 4%, Sanofi Aventis, Wien, Österreich) im Bereich der rechten spina iliaca superior posterior lokal anästhesiert (Abb. 44). Durch eine ca. 5 mm lange Stichinzision wurde die Hohlneedle mit dem Trokar in den Markraum eingeführt. Mit 6 Spritzen (jeweils 15 ml) wurde insgesamt 60 ml Knochenmark aspiriert (Abb. 45). Die Spritzen enthielten jeweils 2 ml Natriumcitrat (3,13%, B.Braun GmbH, Austria) als Antikoagulantium. 2 ml Aspirat kam zur Qualitätskontrolle und Kultivierung ins Labor. Nach der Entnahme wurde die Wunde mit einer nicht resorbierbaren Naht und einem Pflasterverband (3M™ Steri-Strip™) verschlossen und der Patient in Rückenlage gebracht.



Abb. 42 Abnahme von venösem Eigenblut vor der Knochenmarkaspiration

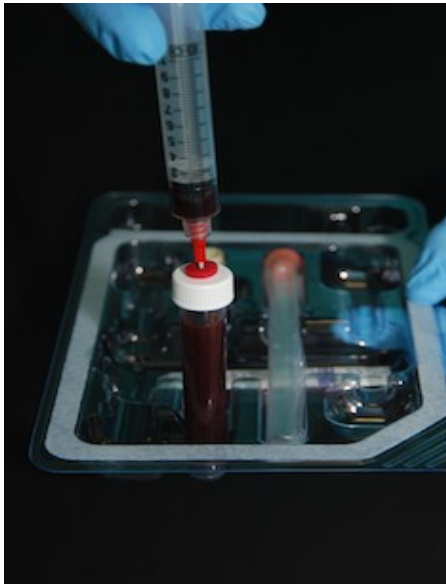


Abb. 43 Vermischen des venösen Blutes mit ACD-A/ Mannitol und CaCl/ Ethanol vor der Zentrifugation

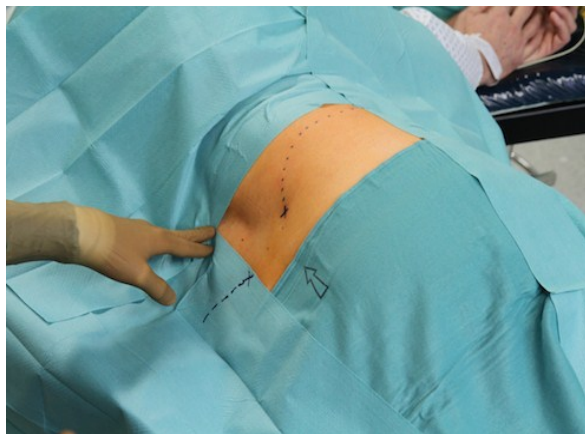


Abb. 44 Markierung der Inzisionsstelle an der spina iliaca superior posterior



Abb. 45 Knochenmarkaspiration mit 6 x10ml Spritzen zu je 2ml Natriumcitrat

Zellkonzentrierung

Mittels der BMAC-Zentrifuge (BMAC[®], Bone Marrow Procedure Pack, Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) wurde die Chair-side Konzentrierung der Knochenmarkstammzellen durchgeführt. Das gewonnene Aspirat (60 ml) wurde unter regelmäßigem Schwenken in einer Spritze gesammelt und anschließend in den sog. PROCESS-Becher überführt. Der PROCESS-Becher besteht aus zwei Kammern. In die größere der beiden Kammern wurde das Aspirat appliziert (Abb. 46). Hier befindet sich ein beweglicher Zellfilter durch welchen während des Zentrifugationsprozesses Erythrozyten und abgestorbene Zellen von den Leukozyten, Thrombozyten und dem Plasma getrennt werden. Als Ausgleichsgewicht wurde das Röhrchen mit dem venösen Blut in einen zweiten Behälter, der sich gegenüber vom PROCESS-Becher befindet, in die Zentrifuge eingebracht (Abb. 47). Leukozyten, Thrombozyten und Plasma werden durch einen kleinen Zwischenstop während der Zentrifugation in die kleinere Kammer überführt. Nach insgesamt 14 Minuten stoppt die Zentrifuge. Am Boden der kleinen Kammer befindet sich jetzt eine rote Schicht, gefolgt von einer dünnen weißen Schicht und darüber eine bernsteinfarbene Schicht, das Plasma. Die weiße Schicht wird als sog. *buffy coat* (=Leukozytenfilm) bezeichnet und enthält die Leukozyten mit den darin enthaltenen mesenchymalen Stammzellen (Abb. 48). Am Boden der Kammer befinden sich die Thrombozyten. Mit einer Spritze wird der Plasmaüberstand vorsichtig entfernt und der *buffy coat* mit den Thrombozyten vermennt. Insgesamt konnten im Durchschnitt 5 ml an Konzentrat gewonnen werden, von dem 2 ml zur Qualitätskontrolle im Labor verwendet und 3 ml in einer sterilen Spritze aufgezogen wurden. Das autologe Thrombin wurde ebenfalls in den sterilen Bereich überführt und 1ml in der „PROCESS-Spritze“ aufgezogen (Abb. 49). Beide Spritzen wurden auf einen gemeinsamen Applikator gesteckt und als Gemisch mit dem BKEM (BioOss[®], 0,25-1 mm) vermennt (Abb. 50). Durch das zugefügte Thrombin wurden die BKEM-Partikel dichter aneinander gepackt und die Applikation in den Sinus wesentlich erleichtert (Abb. 51).



Abb. 46 Einbringen von 60 ml Knochenmarkaspirat in die große Kammer des PROCESS-Bechers



Abb. 47 BMAC- Zentrifuge mit venösem Blut im Zentrifugenröhrchen (blau) und Knochenmarkaspirat im PROCESS-Becher (rechts)



Abb. 48 Nach der Konzentrierung: Plasmaüberstand mit *buffy coat* (zarte weiße Schicht) und Thrombozytenkonzentrat am Boden des Gefäßes (Foto mit freundlicher Genehmigung von Priv.-Doz. DDr. Sebastian Sauerbier, Dep. für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Freiburg)



Abb. 49 Überführen des autologen Thrombins in den sterilen Bereich



Abb. 50 Vermischen von autologem Thrombin und Zellkonzentrat in der Applikatorspritze, sowie Zugabe zum BioOss® - Granulat



Abb. 51 Dicht gepackte BioOss® Partikel durch Koagulation des autologen Thrombins nach Zugabe zum Zellkonzentrat

Sinusbodenaugmentation

Zunächst erfolgte die Gabe eines Lokalanästhetikums buccal und palatinal mit Ultracain dental forte® (Sanofi Aventis, Wien). Zur Sinusbodenelevation wurde die modifizierte Technik nach Kent und Block (1989) angewendet. Nach breitflächiger Präparation eines Mucoperiostlappens nach buccal fand die Osteotomie der lateralen Kieferhöhlenwand in Form eines querovalen Knochenfensters mittels Hartmetall- und Diamantbohrer statt (Abb. 52+53). Anschließend wurde die Schneider'sche Membran vorsichtig mittels Sinusbodenelevatoren vom Kieferhöhlenboden bis zur medianen Kieferhöhlenwand abgehoben und nach kranial eleviert. Auf der zuvor randomisierten Testseite wurden 2 g BKEM mit dem Zellkonzentrat eingebracht (Abb. 54). Auf der Kontrollseite wurden 2 g BKEM ohne jeglichen Zusatz appliziert. Das Augmentationsvolumen betrug durchschnittlich 3,5ml pro Sinus. Abschließend wurde der Zugang zur Kieferhöhle mittels einer Kollagenmembran (BioGide®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) abgedeckt (Abb. 55) und der Mucoperiostlappen mit Einzelknopfnähten (Dafilon 5.0, B.Braun, Melsungen AG) refixiert. Die Patienten konnten bereits zwei Stunden nach dem Eingriff aus dem Krankenhaus entlassen werden. Sie erhielten Instruktionen zu postoperativem Verhalten und Hygienemaßnahmen, sowie eine antibiotische (Augmentin® 1 g, 2x1, bei Allergie Dalacin C® 300 mg, 3x1) und antiphlogistische (Diclofenac 50 mg, 3x1) Therapie bis zu 4 Tage postoperativ. Prothesenkarenz galt für eine Woche, danach wurde diese provisorisch mit Softreliner® unterfüttert.



Abb. 52 Laterale Kieferhöhlenwand nach Abpräparation des Mucoperiostlappens



Abb. 53 Präparation des lateralen Zuganges zur Kieferhöhle



Abb. 54 Applikation des BioOss® – Zellkonzentrat Gemisches in den Sinus



Abb. 55 Abdecken des Augmentates mittels BioGide® Membran vor dem definitiven Wundverschluß

Qualitätskontrolle - Nachweis von mesenchymalen Stammzellen (MSZ)

Jeweils 2 ml Knochenmarkaspirat und -konzentrat wurden im Labor der *Stem Cell Research Unit* der Abteilung für Hämatologie (Universitätsklinik Graz) untersucht. Dabei wurde die Menge an Leukozyten (mononukleäre Zellen, MNZ), sowie die Bildung von Kolonie bildenden Einheiten (KbE) und der Nachweis von Oberflächenantigenen (CD - cluster of differentiation) an der Zelloberfläche vor und nach der Konzentrierung nachgewiesen.

Zunächst erfolgte die Zellzählung laserunterstützt mittels ADVIA Measurements (Siemens AG, Healthcare). Die Anzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wurden in $10^6/\text{ml}$ angegeben und der Konzentrierungsfaktor (= X FACTOR) ermittelt.

Die mesenchymalen Stammzellen bilden bei ihrer Vermehrung Kolonien und werden somit als KbE bezeichnet. Die Zellen wurden dafür in Kulturflaschen von 55 cm^2 mit 60 ml alpha-MEM Medium + 10% HPL (humanes Plättchenlysat) kultiviert (Abb. 56+57). Sie wurden in 3 unterschiedlichen Dichteverhältnissen ausgesät - $5,5 \times 10^6$ Zellen/ cm^2 , $5,5 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 und $5,5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 . Der erste Mediumwechsel fand nach 2-3 Tagen statt. Hierbei werden nicht plastikadhärente Zellen, wie Erythrozyten und abgestorbene Zellen, ausgewaschen. Am 10. Tag wurde 1/3 des Mediums gewechselt und nach weiteren 3-4 Tagen wurde das Medium entfernt und die getrockneten Kulturflaschen mit Papanicolaou gefärbt. Die sichtbar gewordenen Kolonien konnten danach gezählt werden.

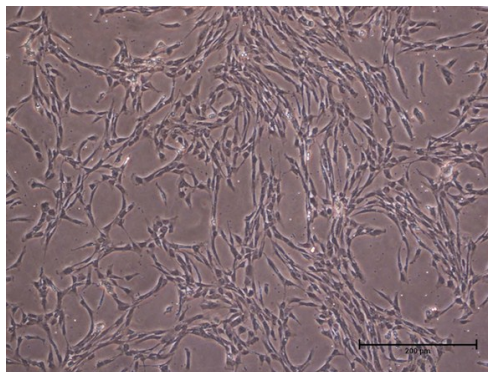


Abb. 56 Plastikadhärente, fibroblastenartige und bereits konfluierende Zellen nach 7 Tagen in Kultur

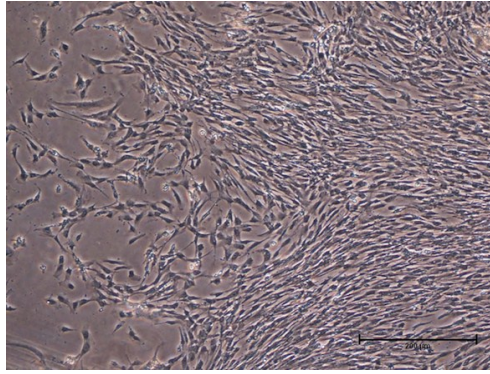


Abb. 57 Konfluente Zellkolonien nach 14 Tagen in Kultur (Darstellung im Lichtmikroskop, Abteilung für Hämatologie, Universitätsklinik Graz)

Für die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) wurden die Zellen ebenfalls in Kulturflaschen (T225) in einer Dichte von 4×10^5 Zellen /cm² ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte ebenfalls am 3. Tag. Im Durchschnitt wurden die Zellen nach 2 Wochen geerntet. Für die Durchflusszytometrie wurden 2×10^6 Zellen entnommen. Dabei strömen die mit fluoreszierenden Antikörpern versehenen Zellen einzeln durch eine dünne Kapillare und werden von einem Laserlicht bestrahlt. Dieses Licht wird von der jeweiligen Zelle je nach Partikelgröße, Granulagehalt und interner Komplexität unterschiedlich stark gestreut. Detektoren messen das gestreute Licht und können es anhand verschiedenster Zellmerkmale erkennen, über einen Monitor auswerten und einer bestimmten Zellpopulation zuordnen. Werden die Zellen mit Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmerkmale markiert, so werden diese vom Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt und emittieren Licht. Ebenfalls kann die Fluoreszenzintensität gemessen werden. Sie dient zur weiteren Unterscheidung von verschiedenen Zellpopulationen oder als Maß für die Menge bestimmter Oberflächenmerkmale auf den Zellen. Die Analyse wurde mit dem FACsCalibur (BD Biosciences, Kalifornien, USA) und die analytische Auswertung mit dem FlowJo (Gladstone Core Services) durchgeführt. Nach dem klassischen Protokoll wurde ein 19-Tube Multicolour Panel verwendet. Nach diesem wurden jeweils 6 Oberflächenmarker zum Ausschluss mesenchymaler Zellen (CD34, CD3, CD14, CD45, CD31, CD19), 14 Marker zum Nachweis mesenchymaler Stammzellen (CD90, CD73, CD105, CD146, CD166, HLA ABC, CD13, CD29, CD63, CD49a, CD44, CD10, NG2 und Nestin) und 12 weitere Marker (CD15, CD27, CD56, HLA DR-FITC, Stro1, MSCA1, CXCR4, PDGFR alpha, PDGFR beta, CXCL 12, alpha smooth muscle actin, alkaline phosphatase) bestimmt (Abb. 58 - 60).

Exclusion Markers

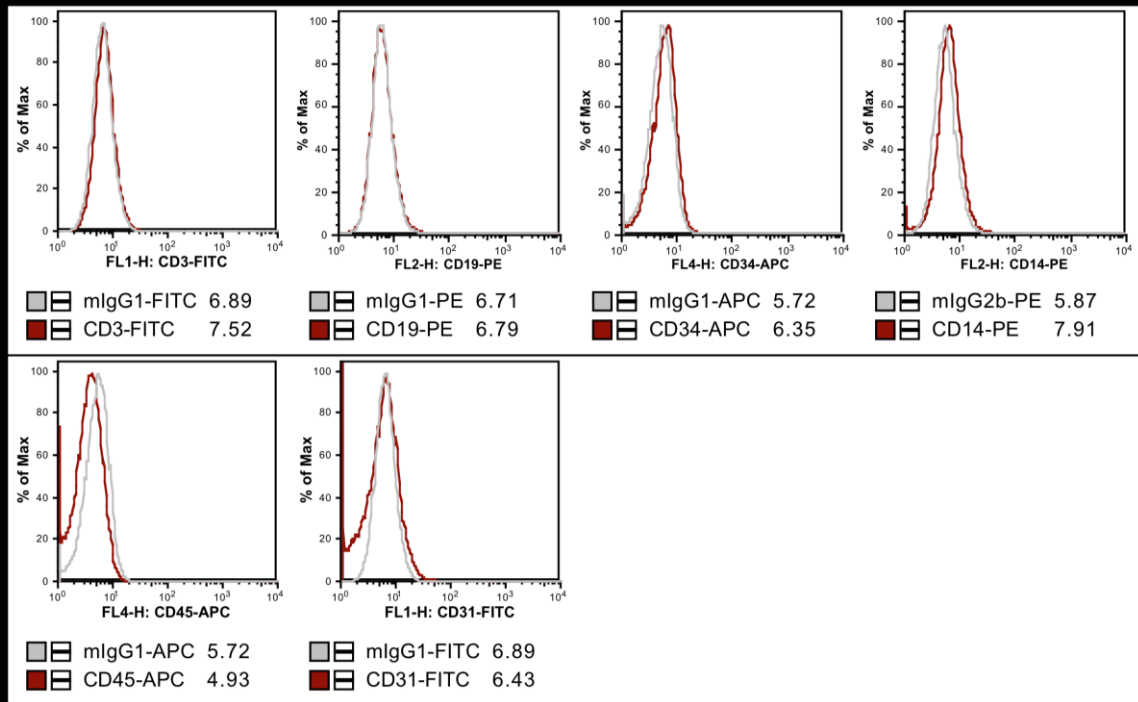


Abb. 58 Darstellung des FACS-Profiles mit Ausschlussmarker für das Vorkommen von mesenchymalen Stammzellen. Die Ausschlussmarker sind negativ, da die beiden Kurven (grau und rot) sich decken; grau= Isotype control, rot= specific antibody (die Kurven geben die mittlere Fluoreszenzintensität wieder)

Mesenchymal Stem Cell Markers

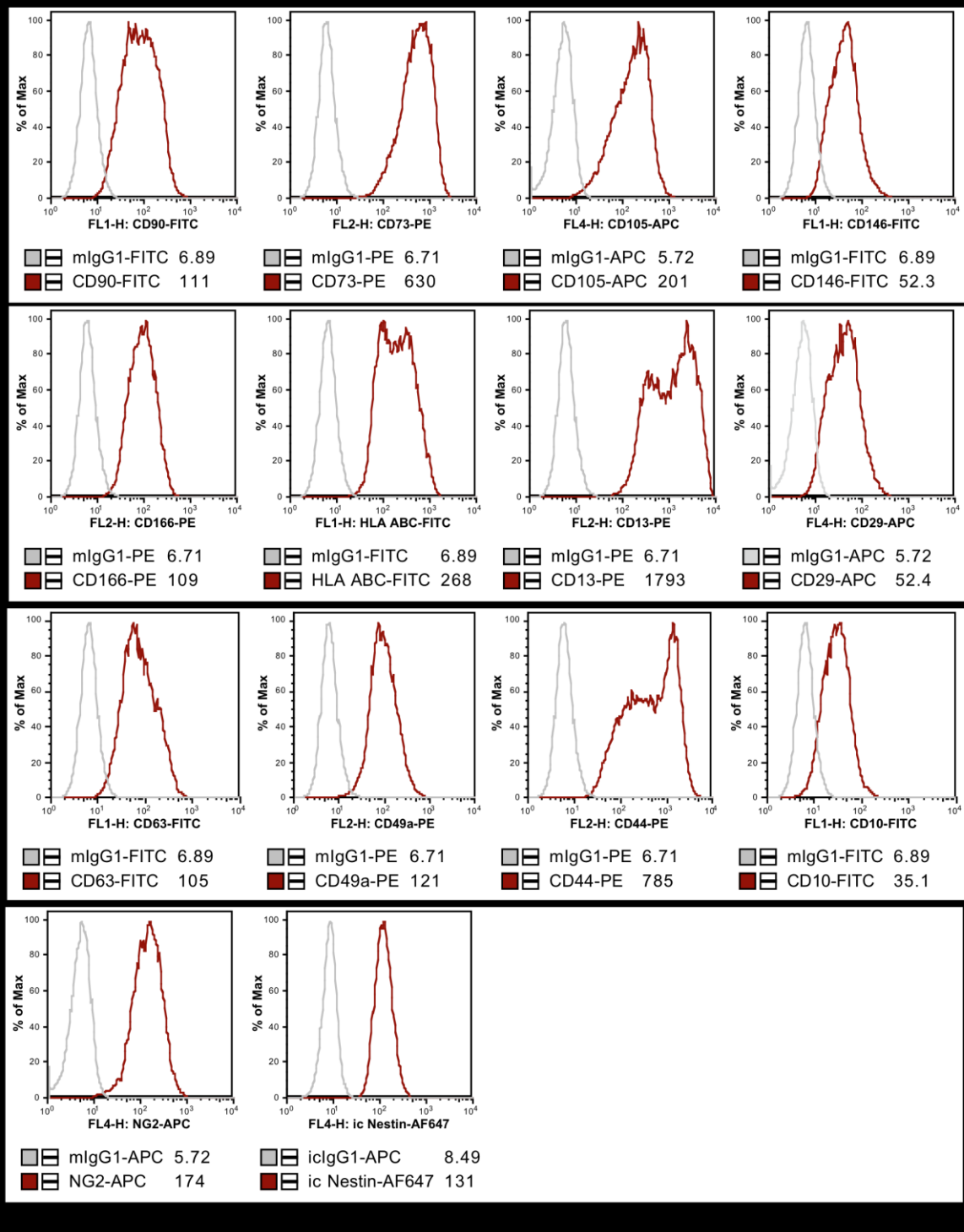


Abb. 59 Darstellung des FACS-Profiles mit Markern für den Nachweis von mesenchymalen Stammzellen. Die Stammzellmarker sind in diesem Profil positiv, da sich die Kurven nicht decken. Je weiter rechts sich die rote Kurve befindet, umso deutlicher erscheint das Ergebnis positiv.

Variable Markers

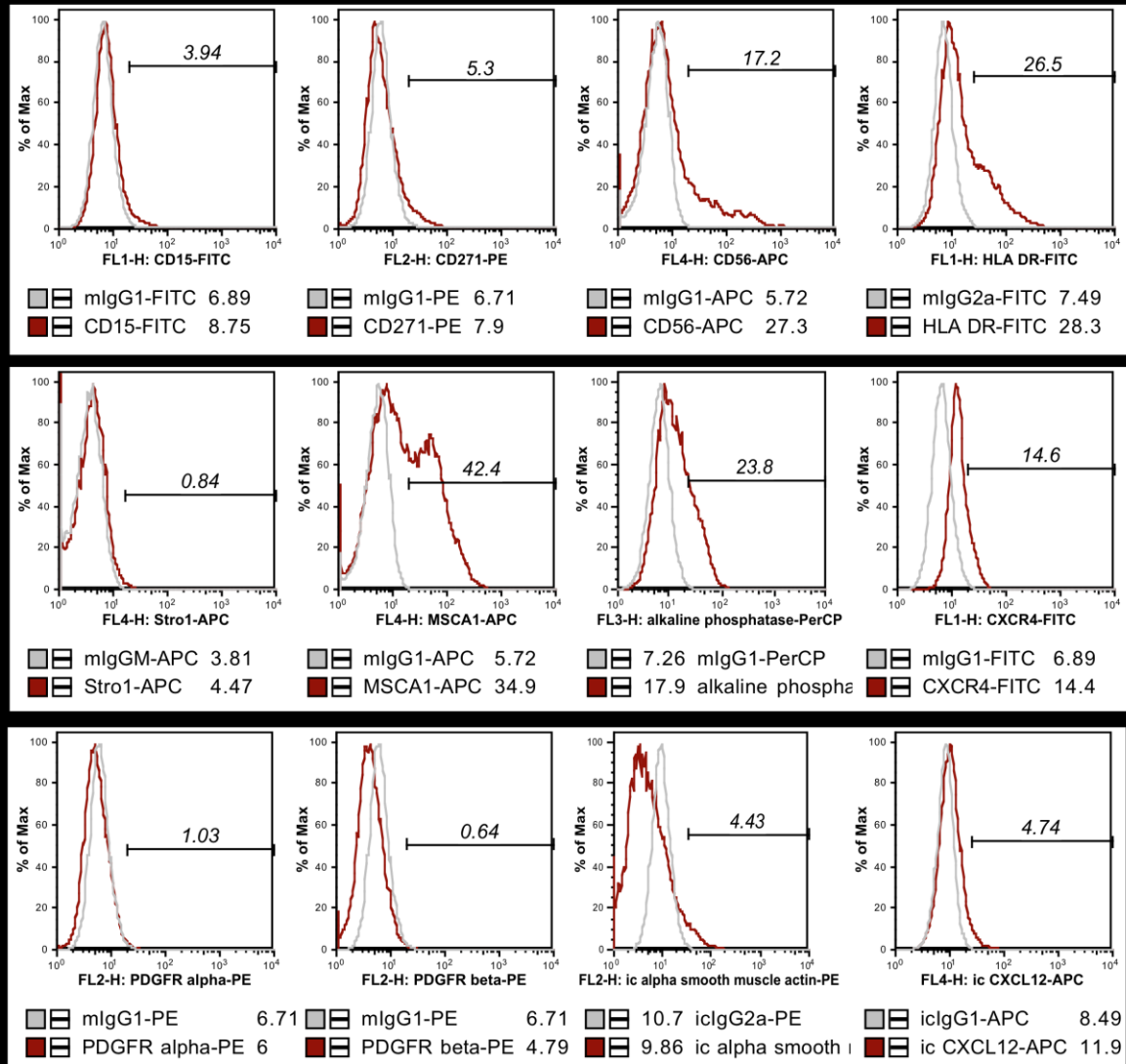


Abb. 60 Darstellung des FACS-Profiles mit variabel vorkommenden Antigenmarkern

Knochenbiopsie

Es wurde jeweils eine Knochenbiopsie pro Seite nach 3 und 6 Monaten entnommen. Die geplanten Entnahmestellen waren jeweils die Region des 2. Prämolaren und des 1. Molaren (ebenfalls Insertionsregionen für die spätere Implantation). Die Auswahl, welche Biopsie zu welchem Zeitpunkt entnommen wird, erfolgte per Zufallsprinzip mit dem Randomizer (Randomizer for Clinical Trials, Institut für medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation, Medizinische Universität Graz). Mittels einer Bohrnavigationsschablone (ExpertEase® System, Dentsply Friadent) (Abb. 61) wurden die Biopsien mit einem Trepanbohrer (Innendurchmesser 2,8 mm, Länge 18 mm; Komet dental, Salzburg, Österreich) entnommen (Abb. 62 - 64). Die 6-Monatsbiopsien fanden gleichzeitig mit der Implantatinsertion statt. Insgesamt wurden 6-8 Implantate pro Oberkiefer inseriert. Die Trepanbohrer mit den Knochenproben wurden in 4 %-iger Formalinlösung bis zur weiteren histomorphometrischen Aufarbeitung eingelegt.

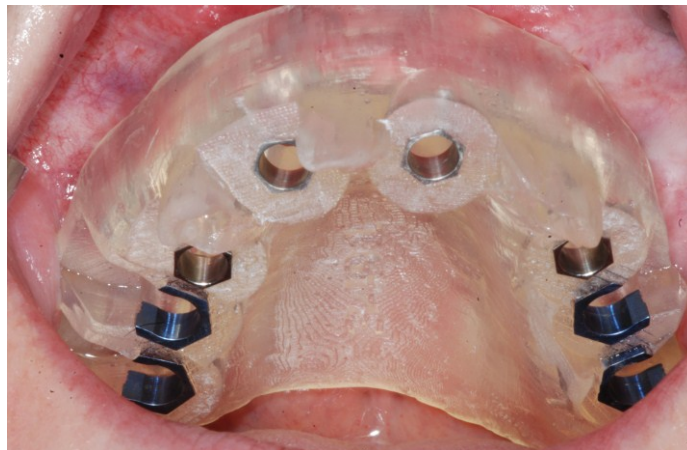


Abb. 61 Positionierung der präfabrizierten Bohrschablone vor der Biopsieentnahme zur Markierung der Entnahmestellen

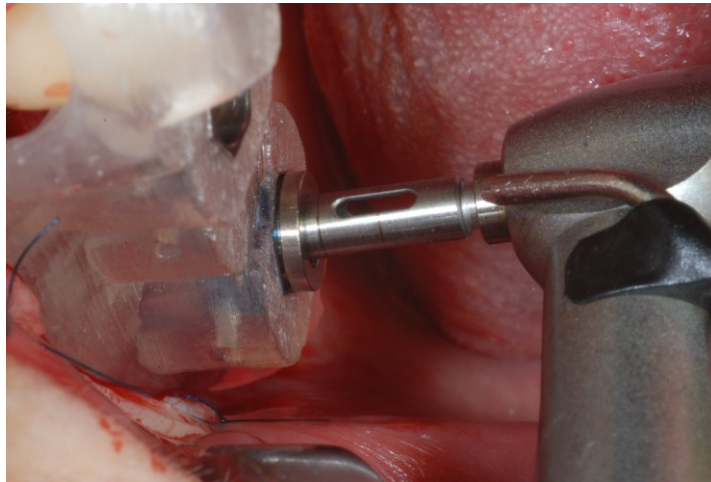


Abb. 62 Schablonengeführte Biopsieentnahme

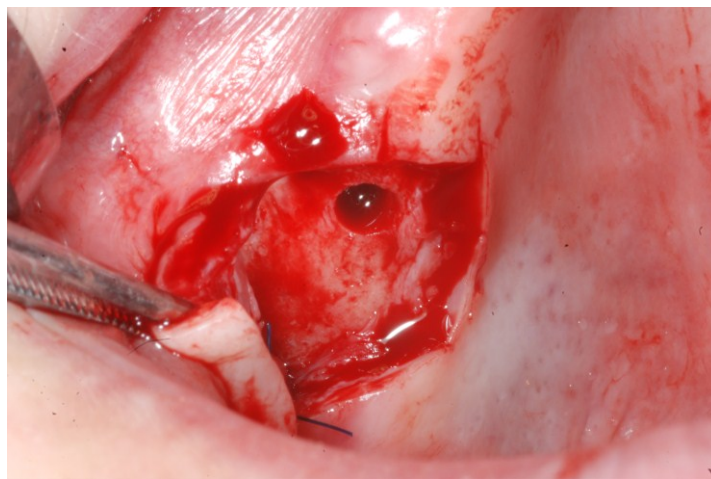


Abb. 63 OP-Situs nach der Biopsieentnahme



Abb. 64 Knochenbiopsie in einem 18 mm Trepanbohrer (Komet dental)

Histologische Aufbereitung und Histomorphometrie

Die Proben wurden im *Hard Tissue Research Laboratory* des Departments für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Uniklinik Freiburg ausgewertet. Nach Entnahme der Proben aus den Formalinbehältern, wurden diese mit Wasser abgespült und schrittweise in aufsteigender Alkoholkonzentration dehydriert (70%, 80%, 90%, 100%), indem sie in jeder Konzentration für 3 Tage gelagert wurden. Danach wurden die Proben mit Resin für 2 Wochen infiltriert (Technovit 7200 VLC, Heareus Kulzer, Hanau, Germany). Das Resin wurde in einer UV-Lichtkammer für 10 Stunden polymerisiert. Nach dem Härten wurden je zwei Schliffe in der Dicke von 300-400 µm parallel zur Achse des Bohrers mit einer Diamantsäge erzeugt (Microslice, IBS, Cambridge, UK). Die Schliffe wurden auf einen Plexiglasträger (Maertin, Freiburg, Deutschland) aufgetragen und bis zu einer Schichtdicke von 100 µm auf einer rotierenden Schleifplatte (Struers, Ballerup, Dänemark) reduziert. Anschließend wurden die Proben mit Azur II und Pararosanilin gefärbt, um zwischen den Bio-Oss[®] Partikeln, sowie dem alten und dem neuen Knochen differenzieren zu können (Abb. 65). Die Histologische Analyse wurde mit einem Lichtmikroskop durchgeführt (Axiovert 135, Zeiss, Kochern, Deutschland). Die Auswertung der Histomorphometrie erfolgte mit Hilfe des Bildauswertungsprogrammes AnalysisIS^D (Soft Imaging System, Olympus Europa, Hamburg, Deutschland), indem die Bio-Oss[®] Partikel grün und der neu gebildete Knochen rot markiert wurden. In die Auswertung wurde die gesamte Biopsielänge oberhalb des bestehenden, alten Knochens (gelbe Grenzlinie) miteinbezogen (Abb. 66). Ziel der histomorphometrischen Auswertung war es, den prozentuellen Anteil an neu gebildetem Knochen und bestehenden Bio-Oss[®]-Partikeln zu bestimmen.

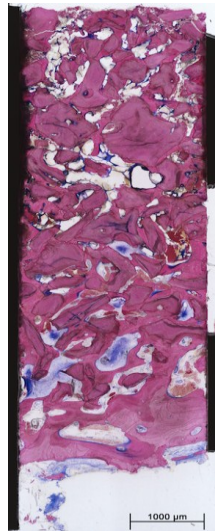


Abb. 65 Histologische Färbung einer Knochenbiopsie (6 Monate) mit Azur II und Pararosanilin

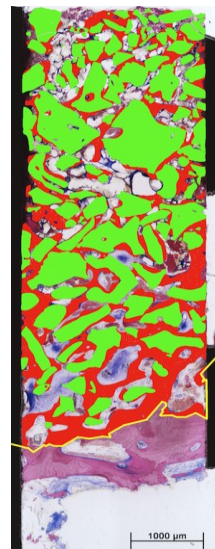


Abb. 66 Histomorphometrische Auswertung nach Markierung der „region of interest“ (oberhalb der gelben Grenzlinie) und Markierung des neu gebildeten Knochens (rot) und der Bio-Oss[®] Granula (grün) mittels AnalysisIS^D Bildverarbeitungsprogramm

Radiologische Kontrollen

Panoramaschichtaufnahmen wurden vor und nach der Sinusbodenaugmentation (Abb. 67 und 68), vor und direkt nach der Implantation, sowie 4 und 12 Monate nach der Implantation durchgeführt (Abb. 49). CT-Aufnahmen fanden vor und direkt nach der Sinusbodenelevation, sowie 6 und 12 Monate danach statt (Abb. 69).



Abb. 67 Zustand OK Freunde ab 14 und 24 vor der Augmentation

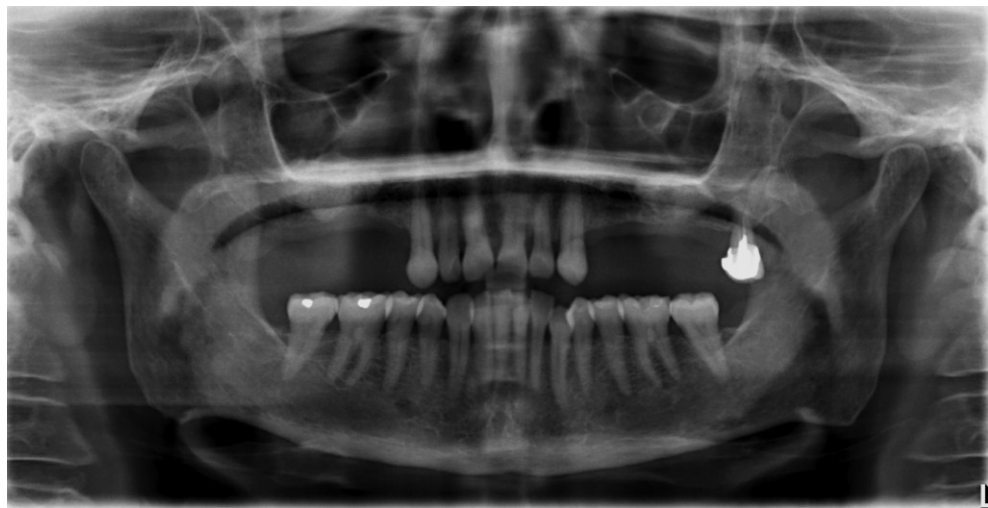


Abb. 68 Sinuslift 6 Monate post augmentationem

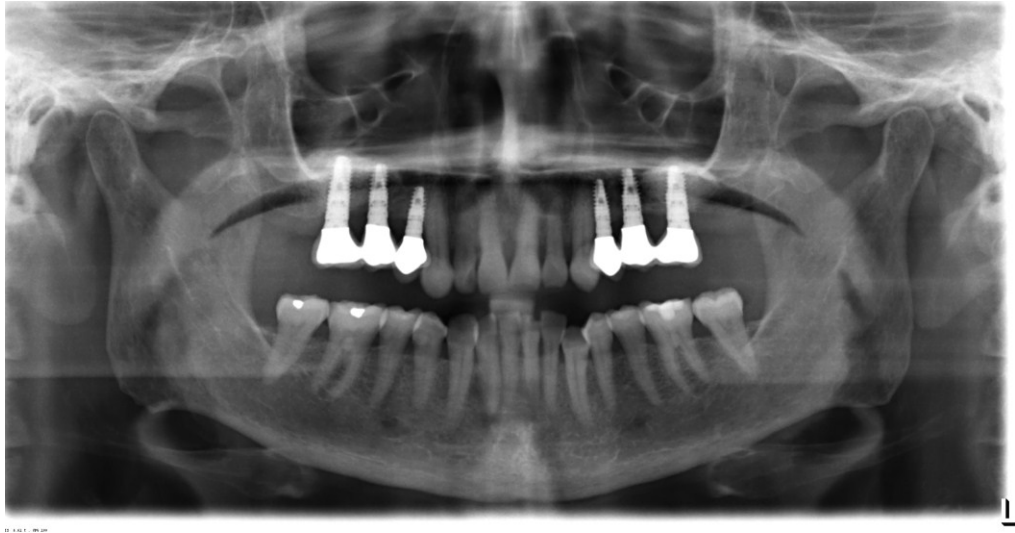


Abb. 69 12 Monate post implantationem mit der definitiven Versorgung

Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Mag. Irene Mischak. Mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS (IBM SPSS Statistics Version 20) wurden die Auswertung der Ergebnisse, sowie die Erstellung der Grafiken durchgeführt. Es wurde eine deskriptive Auswertung in Form von Mittelwerten und Standardabweichung der Prozentwerte angewendet. Um die zeitabhängige Veränderung der Werte, sowie Unterschiede zwischen Aspirat und Konzentrat zu prüfen, wurden T-Tests für abhängige und unabhängige Stichproben durchgeführt. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert von $< 0,05$. Zusammenhänge und Abhängigkeiten zwischen den ermittelten Einzelwerten wurden mit dem Pearson Korrelationskoeffizient ($p < 0,05$) errechnet.

Ergebnisse

Knochenmarkaspiration

Bei allen 7 Patienten konnten 60 ml Knochenmark ohne Komplikationen entnommen werden. Die Patienten gaben an, nach der Operation weder lang anhaltende Schmerzen im Bereich der Entnahmestelle, noch Bewegungseinschränkungen gehabt zu haben. Jeweils 2 ml von dem Knochenmarkaspirat und -konzentrat wurden für die Qualitätskontrolle und zur Verifizierung von mesenchymalen Vorläuferzellen im Labor kultiviert. Nach Konzentrierung mittels BMAC[®]-System konnten im Durchschnitt 5-6 ml Knochenmarkskonzentrat gewonnen werden. In drei Fällen koagulierte das Aspirat während des Konzentrierungsvorganges.

Sinusbodenaugmentation

Alle Sinusbodenaugmentationen heilten ohne Komplikationen aus. Während der Präparation kam es in drei Fällen (1x Kontrollseite, 2x Testseite) aufgrund von Knochensepten und Vernarbungen zu einer Perforation der Schneider'schen Membran. In diesen Fällen wurde eine Kollagenmembran (BioGide[®], Geistlich Pharma AG) auf den Schleimhautdefekt aufgebracht und mit 2 Nägeln an der lateralen Kieferhöhlenwand fixiert. Es kam zu keinem Verlust von BioOss[®] Partikeln aus der Nase oder zu postoperativen Entzündungsreaktionen.

Biopsieentnahme

Die Knochenbiopsien wurden bei allen 7 Patienten nach 3 und 6 Monaten ohne Perforation der Sinusschleimhaut durchgeführt. Alle Biopsien konnten ohne Einschränkung unter Anwendung der Bohrschablone durchgeführt werden. Die zusätzlichen Inzisionsstellen der 3-Monatsbiopsien heilten ohne Komplikationen aus. Im

Durchschnitt maßen die Biopsien eine Länge von 8 mm. Eine 6-Monatsbiopsie musste verworfen werden, da diese während der Entnahme zerfiel und somit unbrauchbar war.

Qualitätsanalyse von Knochenmarkaspirat und -konzentrat

Da es bei 3 Proben zu einer Koagulation während des Konzentrierungsprozesses kam und vermutet wurde, dass dadurch die Anzahl der MNZ und daraus folgend der KbE wesentlich reduziert sein müsste, wurden zusätzlich die Durchschnittswerte von MNZ und KbE, sowie des Konzentrierungsfaktors (X-Factor) der koagulierten und non-koagulierten Proben analysiert.

Im Durchschnitt konnten $39,8 (\pm 19,5) \times 10^6$ mononukleäre Zellen (MNZ) pro Milliliter Aspirat ($p = 0,131$) und $121,4 (\pm 54,0) \times 10^6$ MNZ/ml Konzentrat der nicht koagulierten Proben gewonnen werden. In den koagulierten Proben befanden sich $38,5 (\pm 41,6) \times 10^6$ MNZ/ml Konzentrat ($p = 0,080$) (Abb. 70). Die MNZ der nicht koagulierten Proben konnten bis auf das $4,5 (\pm 2,0)$ -fache konzentriert werden, während in den koagulierten Proben lediglich eine $0,6 (\pm 0,5)$ -fache Konzentrierung der MNZ erreicht werden konnte ($p=0,022$). Aus den gewonnen MNZ im Aspirat bildeten sich im Durchschnitt $4,5 (\pm 3,7)$ KbE/ 10^6 MNZ. In den nicht koagulierten Proben des Konzentrates bildeten sich $4,7 (\pm 4,9)$ KbE/ 10^6 MNZ und in den koagulierten Proben $2,4 (\pm 2,2)$ KbE/ 10^6 MNZ/ in Kultur aus ($p=0,490$) (Abb. 71).

Die FACS Analyse zeigte eine reguläre Stammzellmorphologie und ein für Stammzellen typisches Profil mit positivem Nachweis der Oberflächenantigene CD 90, CD 73, CD 105 und negativem Nachweis von CD 14, CD 19 und CD 45.

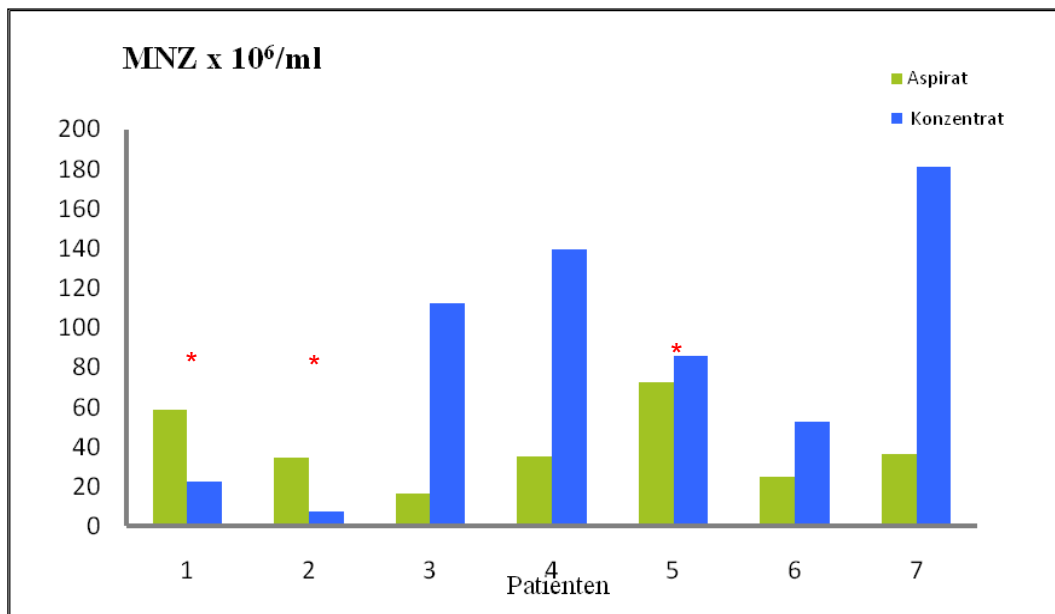


Abb. 70 Anzahl der mononukleären Zellen (MNZ) im Aspirat und im Konzentrat (* koagulierte Proben)

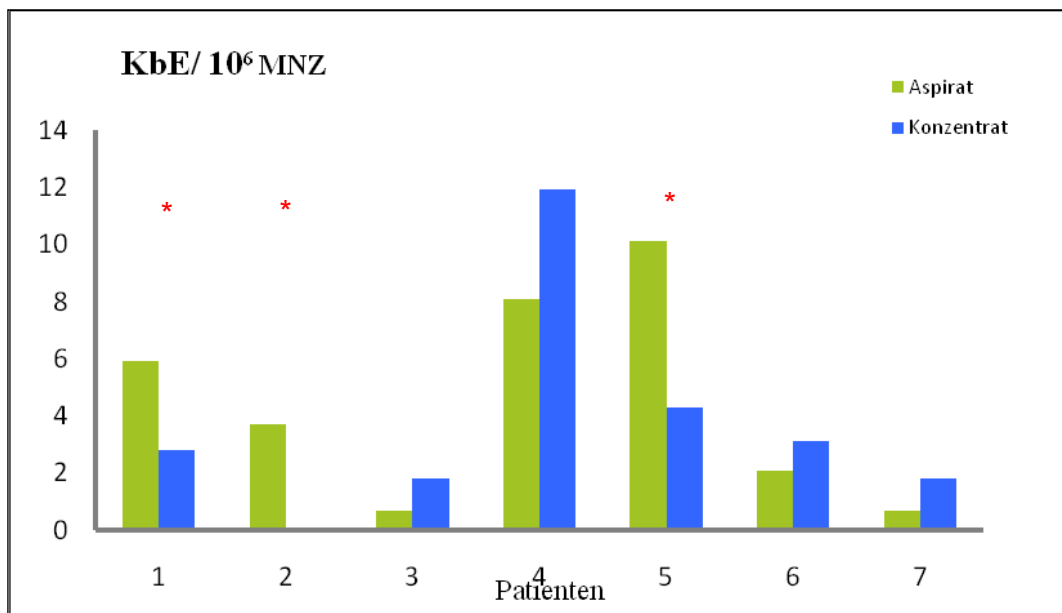


Abb. 71 Anzahl der KbE/10⁶ MNZ/cm² im Aspirat und Konzentrat nach Kultivierung (* koagulierte Proben)

Histologische Auswertung

Die Proben der Test- und Kontrollseite waren vergleichbar. Die Biopsien zeigten neu geformten reifen Lamellenknochen. Neuer Knochen und BKEM bildeten dichte, trabekuläre Strukturen. Das Knochenmark war gut durchblutet ohne Anzeichen einer Entzündungsreaktion. Der neu geformte Knochen konnte mit der Azur II Pararosanilin Färbung gut dargestellt werden und erschien dunkelrot. Knochenneubildung (KNB) zeigte sich ebenfalls in den Makroporen der BioOss® Partikel. Blutgefäße konnten in allen Biopsieproben nachgewiesen werden (Abb. 72).

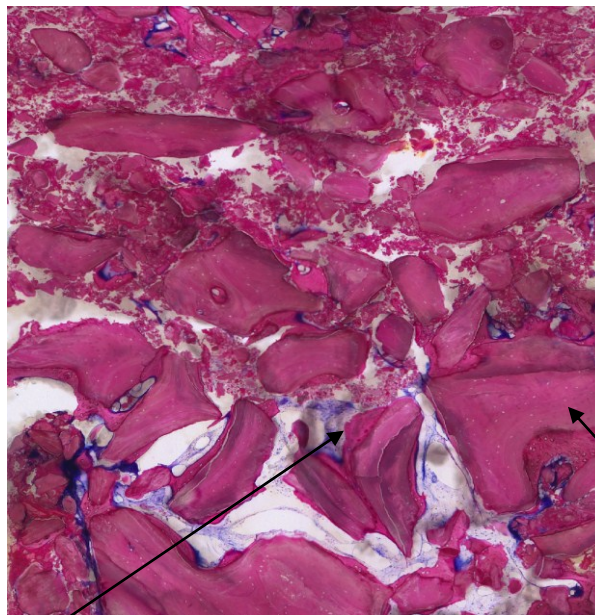


Abb. 72 Histologische Darstellung einer 6-Monatsbiopsie mit Azur II Pararosanilin Färbung. BKEM, Knochenneubildung (Hard Tissue Research Laboratory, Dep. für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Uniklinik Freiburg)

Histomorphometrische Auswertung

Die 3-Monatsbiopsien zeigten eine KNB von 7,4 % ($\pm$ 4,1 %) auf der Testseite und von 11,8 % ($\pm$ 6,2 %) auf der Kontrollseite ($p = 0,165$). Nach 6 Monaten konnten 13,5 % ($\pm$ 5,4 %) KNB auf der Testseite und 13,9 % ($\pm$ 8,5 %) auf der Kontrollseite nachgewiesen werden ($p = 0,469$) (Abb. 73 und 74). Der Anteil an BKEM auf der Testseite betrug nach 3 Monaten 42,6 % ($\pm$ 3,5 %) und auf der Kontrollseite 34,9 % ($\pm$ 11,8 %) ($p = 0,133$). Nach 6 Monaten war der prozentuelle Anteil an Biomaterial auf beiden Seiten vergleichbar (Testseite 36,2 %, $\pm$ 7,8 %; Kontrollseite 39,5 %, $\pm$ 9,3 %) ($p = 0,550$) (Abb. 76 und 77).

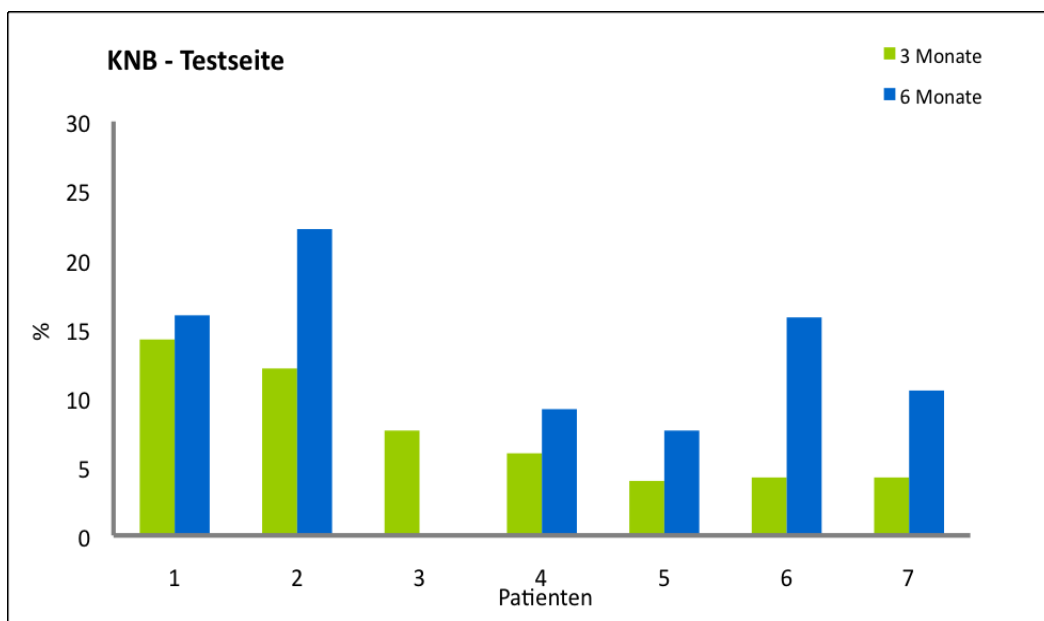


Abb. 73 Knochenneubildung in der Testgruppe nach 3 und 6 Monaten

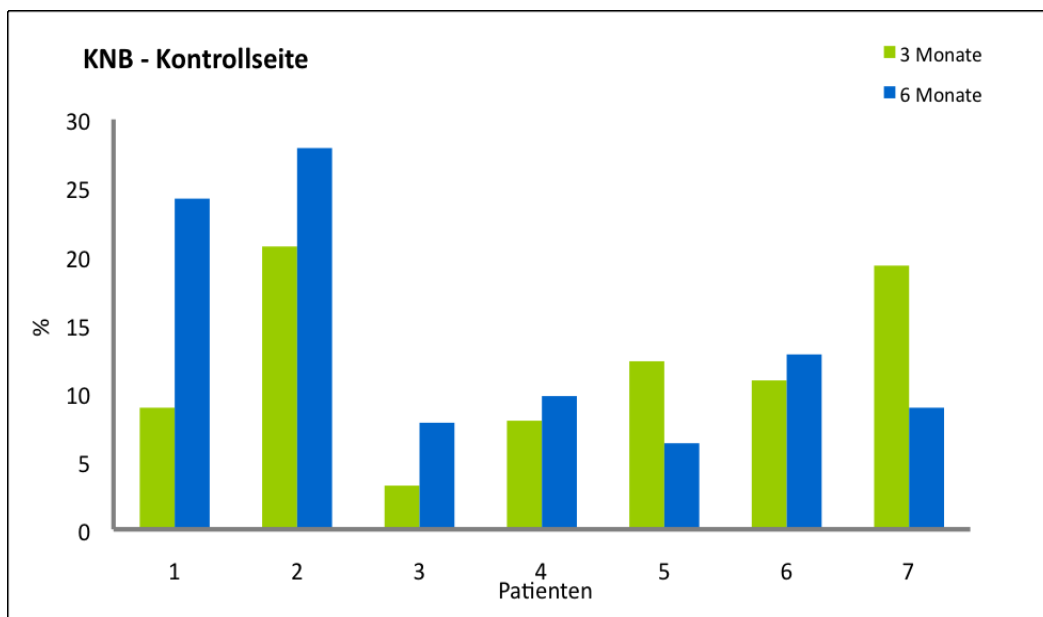


Abb. 74 Knochenneubildung in der Kontrollgruppe nach 3 und 6 Monaten

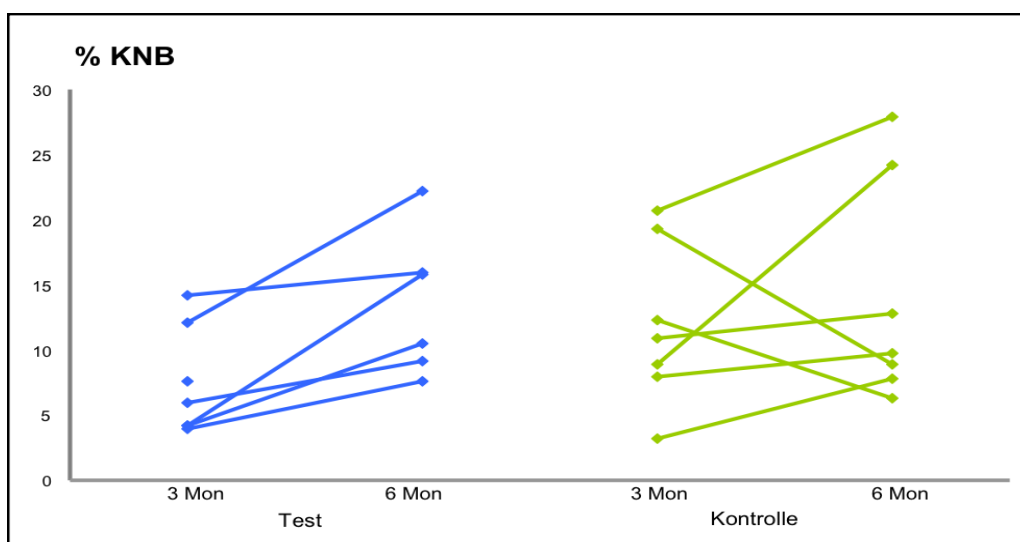


Abb. 75 Intraindividueller Vergleich der prozentuellen KNB Testgruppe vs. Kontrollgruppe nach 3 und 6 Monaten

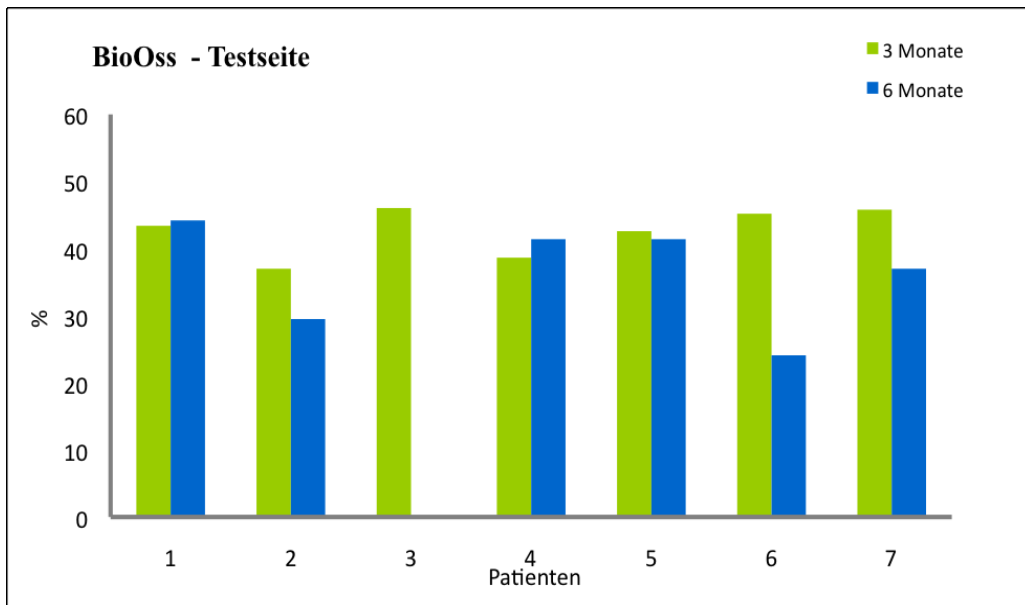


Abb. 76 Restgehalt an BioOss®-Granula in der Testseite nach 3 und 6 Monaten

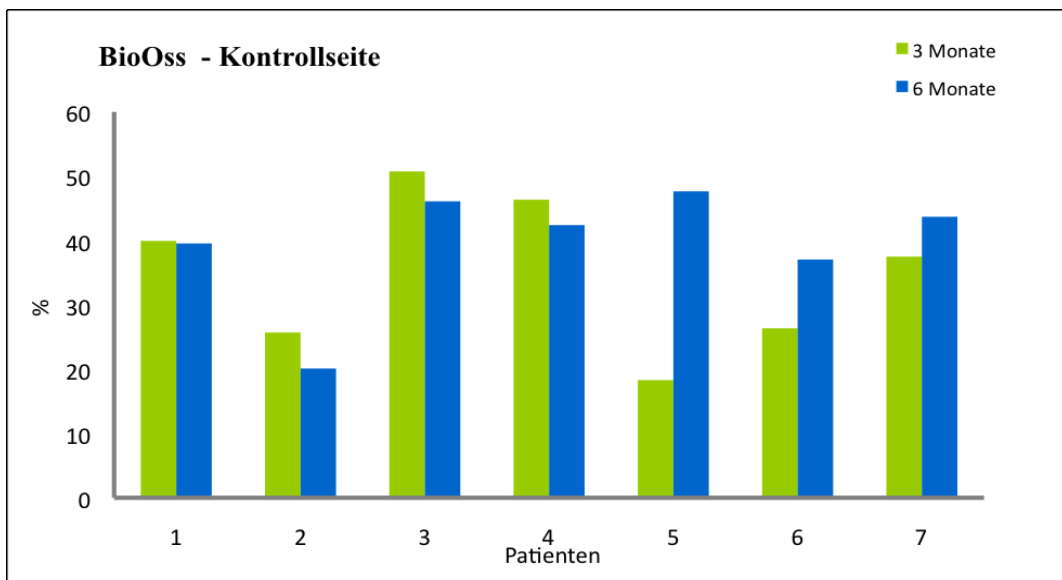


Abb. 77 Restgehalt an BioOss®-Granula in der Kontrollseite nach 3 und 6 Monaten

Patienten ID	% KNB				% BioOss [®]				Koagulation
	3 Mo		6 Mo		3 Mo		6 Mo		
	Test	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test	Kontrolle	Test	Kontrolle	
1	14.2	8.9	15.95	24.2	43.4	40.0	44.2	39.6	coag
2	12.1	20.7	22.2	27.9	37.0	25.7	29.5	20.1	coag
3	7.6	3.2	*	7.8	46.1	50.8	*	46.1	non-coag
4	5.95	7.95	9.15	9.75	38.7	46.4	41.4	42.4	non-coag
5	3.95	12.3	7.6	6.3	42.6	18.3	41.4	47.7	coag
6	4.2	10.9	15.8	12.8	45.2	26.4	24.1	37.1	non-coag
7	4.2	19.3	10.5	8.9	45.8	37.5	37.0	43.7	non-coag
mean	7.46	11.89	13.53	13.95	42.67	34.99	36.27	39.51	
SD	4.14	6.24	5.47	8.57	3.57	11.89	7.87	9.3	

Tab. 3 Übersichtstabelle zur Darstellung der KNB und des Restgehaltes an BioOss[®]

Knochenneubildung bei koagulierten und nicht-koagulierten Proben

Die Knochenneubildung betrug in der Gruppe der nicht-koagulierten Proben nach 3 Monaten 5,5 % ($\pm 1,6$ %) und in der Gruppe der koagulierten Proben 10,1 % ($\pm 5,4$ %) ($p = 0,160$). Nach 6 Monaten wurde in der Gruppe der nicht-koagulierten Proben eine KNB von 11,8 % ($\pm 3,5$ %) und in der Gruppe der koagulierten Proben eine KNB von 15,3 % ($\pm 7,3$ %) gemessen ($p = 0,505$). Aufgrund der großen Streuung waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant (Abb. 78).

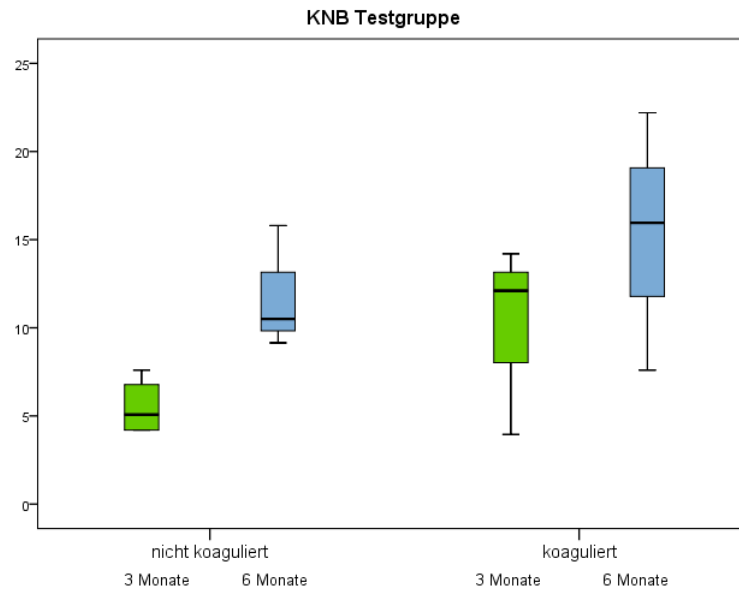


Abb. 78 Vergleich der Knochenneubildung zwischen koagulierten und nicht-koagulierten Proben

Korrelation von MNZ und KbE

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von MNZ und der Ausbildung von KbE im Aspirat ($r = 0,775$; $p = 0,041$) und Konzentrat ($r = 0,392$; $p = 0,385$), wobei sich dieser nur beim Aspirat als statistisch signifikant darstellt (Abb. 79 und 80).

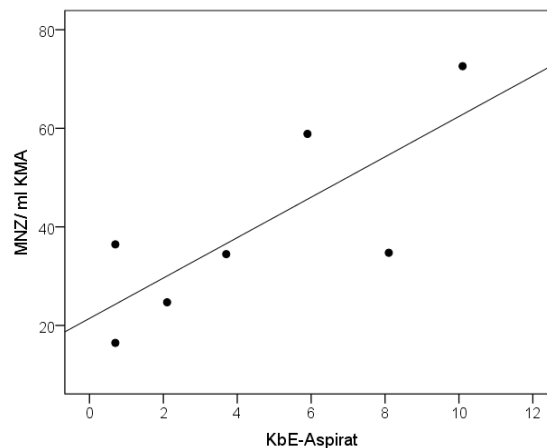


Abb. 79 Korrelation von MNZ/ml Knochenmarkaspirat (KMA) und KbE

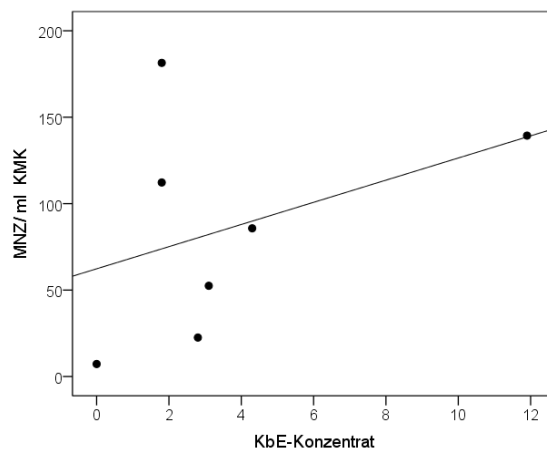


Abb. 80 Korrelation von MNZ/ml Knochenmarkkonzentrat (KMK) und KbE

Korrelation von Knochenneubildung (KNB) und KbE nach 3 und 6 Monaten

Es besteht eine Tendenz zwischen der KNB und der Ausbildung von KbE in vitro nach 3 Monaten ($r = -0,311$, $p = 0,498$) und nach 6 Monaten ($r = -0,613$, $p = 0,196$), welche jedoch aufgrund der großen Streuung nicht statistisch signifikant ist (Abb. 81 und 82).

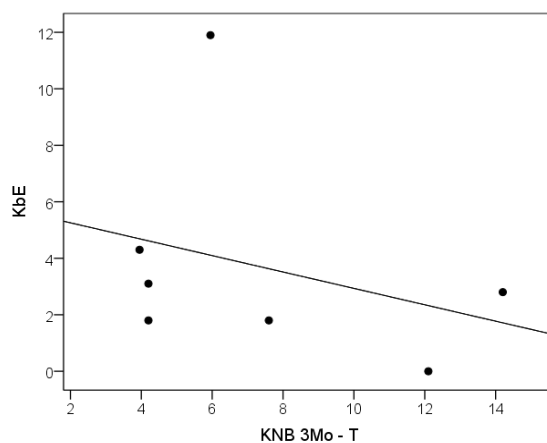


Abb. 81 Zusammenhang von KNB nach 3 Monaten und KbE (Konzentrat)

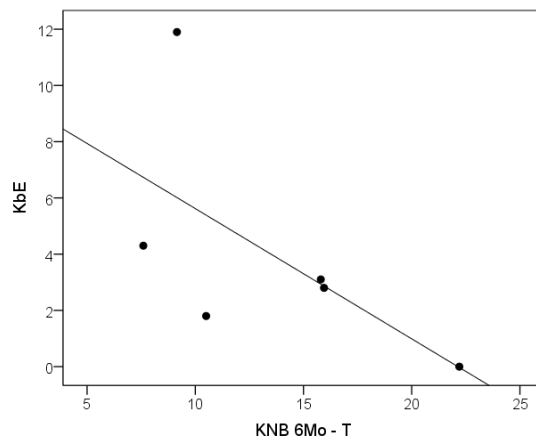


Abb. 82 indirekte Korrelation von KNB nach 6 Monaten und KbE (Konzentrat)

Korrelation von Knochenneubildung (KNB) und BKEM nach 3 und 6 Monaten

Es zeigt sich nach 3 Monaten ein reziprok proportionaler Zusammenhang sowohl an der Testseite ($r = -0,373$; $p = 0,410$), als auch an der Kontrollseite ($r = -0,580$; $p = 0,172$) ohne statistische Signifikanz. Nach 6 Monaten besteht ein reziprok proportionaler Zusammenhang an der Testseite ($r = -0,568$; $p = 0,240$) ohne Signifikanz und bei der Kontrollseite ($r = -0,845$; $p = 0,017$) mit statistischer Signifikanz. Aufgrund der geringen Fallzahl wird der Zusammenhang nur einmal signifikant. Auffallend ist eine stärkere Korrelation jeweils an der Kontrollseite nach 3 und 6 Monaten (Abb. 83 - 86).

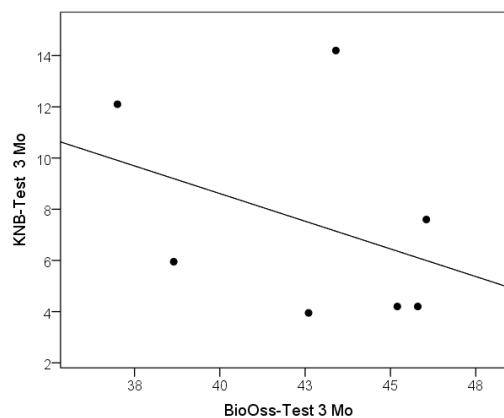


Abb. 83 Korrelation KNB und BioOss-Gehalt an der Testseite nach 3 Monaten

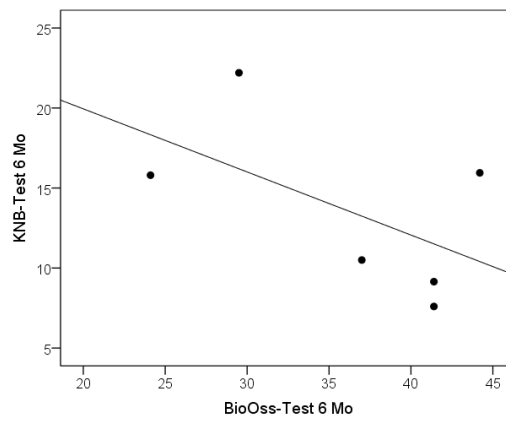


Abb. 84 Korrelation KNB und BioOss-Gehalt an der Testseite nach 6 Monaten

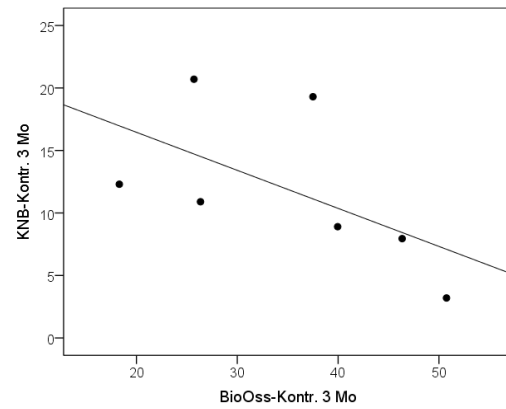


Abb. 85 Korrelation KNB und BioOss – Gehalt an der Kontrollseite nach 3 Monaten

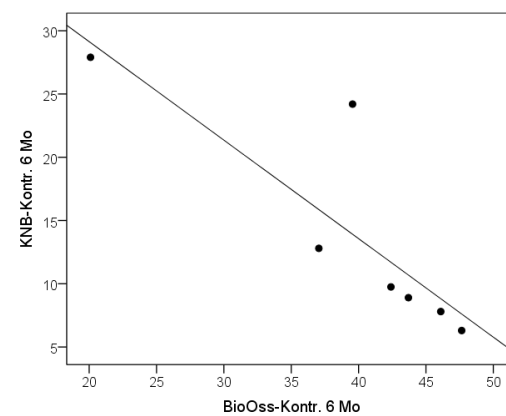


Abb. 86 Korrelation KNB und BioOss – Gehalt an der Kontrollseite nach 6 Monaten

Diskussion

Ziel der durchgeführten Studie war es, Ergebnisse über die frühe Knochenregeneration in einem Gemisch aus BKEM und eines Konzentrates aus mononukleären Vorläuferzellen im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation zu erhalten. Als Kontrollgruppe wurde die kontralaterale Seite mit dem Knochenersatzmaterial ohne Konzentrat verwendet. Bis heute wurden Knochenbiopsien von purem BKEM als Kontrolle zu autogenem Knochen oder mesenchymalen Stammzellen im Rahmen von Sinusbodenaugmentationen zu einem früheren Zeitpunkt als 6 Monate hauptsächlich am Tiermodell untersucht (Fürst et al 2004, Haas et al 2002, John et al 2004, Schlegel et al 2003). Es gibt bis jetzt am Menschen keine kontrollierten Studien zur Knochenregeneration mit BKEM alleine, da eine Implantation zu einem früheren Zeitpunkt als 6 Monate nicht empfohlen wird und die erste Knochenbiopsie nach 3 Monaten einen zusätzlichen Eingriff für den Patienten darstellt (John & Wenz 2004). Um eine einfache und für den klinischen Einsatz geeignete Methode zur Beschleunigung der Knochenregeneration in Knochenersatzmaterialien in vivo zu finden, wurde diese Pilotstudie am humanen Situs in einem bereits gut dokumentierten und vorhersehbaren Modell, der Sinusbodenaugmentation, durchgeführt.

Knochenmarkaspiration und Zellkonzentrierung

Es wurden bei 7 Patienten jeweils 60 ml Knochenmark entnommen, wovon nach der Konzentrierung mittels BMAC[®]-System im Durchschnitt 5-6 ml Knochenmarkkonzentrat gewonnen werden konnten. Bei drei Proben kam es zu einer Koagulation während des Konzentrierungsprozesses. Da sich hier kein Leukozytenfilm im Sinne eines *buffy coats* ausbildete wurde davon ausgegangen, dass sich ein Großteil der MNZ im Koagulum befindet und das Konzentrat nicht wesentlich mehr MNZ beinhaltet, als das Aspirat.

Im Durchschnitt enthielt das Aspirat $39,8 (\pm 19,5) \times 10^6$ MNZ/ml (n=7) und das Konzentrat $85,9 (\pm 63,9) \times 10^6$ MNZ/ml (n=7) (p = 0,131). Die MNZ der nicht-koagulierten Proben konnten bis auf das 4,48-fache konzentriert werden (n=4). Davon bildeten sich im Durchschnitt $3,7 (\pm 3,9)$ KbE/ 10^6 MNZ/cm² nach Kultivierung. Aus den gewonnen MNZ im

Aspirat (n=7) bildeten sich im Durchschnitt $4,5 (\pm 3,7) \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}/\text{cm}^2$ ($p = 0,559$). In den koagulierten Proben (n=3) konnte nur eine 0,59-fache Konzentrierung der MNZ erreicht werden. Dennoch bildeten sich im Durchschnitt $6,5 (\pm 3,2) \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}/\text{cm}^2$ in Kultur aus. Mittels FACS-Analyse erfolgte der positive Nachweis von typischen Stammzelloberflächenantigenen.

In den vier nicht-koaguierten Proben konnten die MNZ auf das 4,48-fache konzentriert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in anderen Studien: Hermann et al (2008) beschrieb eine Konzentrierung mittels BMAC-Verfahren um das 3,8-fache, während Sauerbier et al (2011) eine Anreicherung um das 4,6-fache erreichte. Bei beiden kam es zu keiner Koagulation des Aspirates während der Zentrifugation. Sauerbier et al (2011, Part A) und Gutwald et al (2009) konnten mit einem ähnlichen Studienprotokoll durch das BMAC-Verfahren wesentlich mehr KbE kultivieren ($41,4 \pm 15,6 \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}$ und $86 \pm 50 \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}$). Die Anzahl an gewonnenen MNZ betrug bei Gutwald $40 (\pm 26) \times 10^6 \text{ MNZ}/\text{ml}$ und bei Sauerbier $17,2 (\pm 13,5) \times 10^3 \text{ MNZ}/\mu\text{l}$ Aspirat. Sauerbier konnte die MNZ bis auf das 4-fache konzentrieren ($79,4 \times 10^3 \text{ MNZ}/\mu\text{l}$). Gutwald machte keine Angaben zur Konzentration. Er führte seine Untersuchung an 6 Schafen durch, womit ein Vergleich mit den Ergebnissen am Menschen nicht direkt möglich ist. Aus den gewonnenen MNZ unserer Studie ließen sich im Gegensatz dazu wesentlich weniger mesenchymale Stammzellen ($3,7 \pm 3,9 \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}$) ausbilden. Die Ursache ist allerdings nicht in der Menge an gewonnenen MNZ und deren Konzentrierung zu suchen, da sich diese Daten ähnlich mit den Ergebnissen anderer Studien verhalten. Es zeigt sich in unserer Nachuntersuchung eine direkte Korrelation zwischen MNZ und KbE, die allerdings nur beim Aspirat statistisch signifikant war. Somit bleibt zu hinterfragen, ob zu wenig mesenchymale Stammzellen in den MNZ vorhanden oder diese in ihrer Funktion beeinträchtigt waren. Es wurde ebenfalls die Verwendung von Natriumzitrat als Antikoagulantium in Frage gestellt. In allen beschriebenen Studien wurden die Aspirationsnadeln, wie auch die Entnahmespritzen mit Heparin gespült und angereichert (Gutwald et al 2009, Sauerbier et al 2011, Hermann et al 2008). Als Kontrolle wurden in der hier beschriebenen Untersuchung zusätzlich 3 Spritzen zu je 5ml Heparin abgenommen. Es zeigte sich lediglich ein geringer Unterschied in der Ausbildung von KbE (Zitrat: $4,5 \pm 3,7 \text{ KbE}$ (n = 7); Heparin $6,4 \pm 0,7 \text{ KbE}$ (n=3)). Somit läßt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob das Antikoagulantium auf die verminderte Ausbildung von KbE einen Einfluß hatte. In einer

Studie von Dettke et al (2012) wurde im Rahmen einer Leukophorese die Auswirkung von Heparin und Zitrat auf periphere Blutprogenitorzellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten keinen relevanten Unterschied der beiden Antikoagulantien im Einfluß auf periphere Progenitorzellen. Eine weitere Ursache für die geringe Ausbildung an KbE könnte sein, dass die Aspiration des gesamten Knochenmarkes an der gleichen Stelle durchgeführt und auf multiple Einstichstellen verzichtet wurde. Muschler et al (1997) empfiehlt, dass das Aspirationsvolumen pro Einstichstelle nicht mehr als 2ml betragen sollte. Muschler (1997) untersuchte die unterschiedliche Anzahl an KbE in 1 ml und 2 ml Knochenmarkaspirat. Im 1 ml Aspirat waren 36×10^6 KbE vorzufinden, während im 2 ml Aspirat die Anzahl auf 2400 KbE sank ($p < 0,001$). 4x1 ml Aspirat enthielt doppelt soviel Progenitorzellen, als 1x4 ml Aspirat. Ein größeres Volumen würde somit die Konzentration an Osteoprogenitorzellen durch die Verdünnung mit peripherem Blut verringern. In unserer Nachuntersuchung wurde das Aspirat mit je 12 x 5 ml Spritzen gewonnen, was die geringe Anzahl an KbE erklären könnte. Ebenfalls wurde die Art der Punktionsnadel als einflussnehmender Faktor auf die Anzahl von KbE diskutiert. Sie hatte keine seitlichen Öffnungsschlitze wie bei einer Jamshidi-Punktionsnadel, sondern war geschlossen. Dadurch könnte der Aspirationsdruck verringert und das Losreißen von osteopotenten Stammzellen von den Knochenmarkbälkchen vermindert worden sein.

Neben der Aspirationstechnik und der richtigen Lokalisation ist häufig auch das Alter und Geschlecht des Patienten für die unterschiedlichen Stammzellpopulationen verantwortlich. Zudem sind die einzelnen Studien oft nicht miteinander vergleichbar, da die Isolierungs- und Kultivierungstechniken oft stark variieren (Janicki & Schmidmaier 2011).

Knochenneubildung

Histomorphometrisch zeigte sich in der Testgruppe nach 3 Monaten eine KNB von 7,4 % ($\pm 4,1$ %) und von 11,8 % ($\pm 6,2$ %) in der Kontrollgruppe ($p = 0,165$), während nach 6 Monaten eine KNB von 13,5 % ($\pm 5,4$ %) in der Testgruppe und von 13,9 % ($\pm 8,5$ %) in der Kontrollgruppe zu sehen war ($p = 0,469$). Der Gehalt an BKEM betrug nach 3 Monaten 42,6 % ($\pm 3,5$ %) in der Testgruppe und 34,9 % ($\pm 11,8$ %) in der Kontrollgruppe ($p = 0,133$), während nach 6 Monaten ein Restgehalt von 36,2 % ($\pm 7,8$ %) in der Testgruppe

und von 39,5 % ($\pm 9,3$ %) in der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde ($p = 0,550$). Es zeigte sich eine reziprok proportionale Korrelation von KNB und KbE ohne statistische Signifikanz. Wegen der hohen Streuung war die Fallzahl in dieser Pilotstudie zu gering, um eine statistische Signifikanz erwarten zu können. Somit ist die Anzahl an in vitro gebildeten KbE nicht aussagekräftig für die Menge an neu gebildetem Knochen in vivo. Aufgrund der unterschiedlichen Studienprotokolle ist ein direkter Vergleich mit anderen Studien nicht möglich und eine einheitliche Aussage schwer definierbar. Sauerbier et al (2011) gab eine KNB von 12,6 % nach 3 Monaten bei einer Anzahl von 41,4 KbE/ 10^6 MNZ an, während er in einer weiteren Studie (2010) eine Knochenneubildung von 19,9 % nach 4 Monaten bei einer Anzahl von 25 KbE/ 10^6 MNZ beschrieb. Gutwald et al (2009) konnte mit einer Anzahl von 86 KbE/ 10^6 MNZ eine Knochenneubildung von 19 % nach 2 Monaten und von 29 % nach 4 Monaten am Schaf feststellen. Bei den Studien von Sauerbier wurde die Konzentrierung mittels BMAC, bei Gutwald mit dem FICOLL-Verfahren durchgeführt. Die Tatsache, dass die Regeneration beim Schaf schneller erfolgt, als beim Menschen, kann als Grund für die höhere Knochenregeneration bei der Studie von Gutwald gedeutet werden. Andere Studien wiederum zeigen nach einer in vitro Vermehrung von autogenen Knochenzellen aus dem krestalen Kieferkamm und dem Tuberbereich eine KNB von 17,9 % nach 6 Monaten bei der Applikation von $17,5 \times 10^6$ Knochenzellen (Fürst et al 2009), sowie eine Knochenneubildungsrate von 30 % nach 4 Monaten bei der Applikation von 4×10^6 Knochenzellen (Hermund et al 2011). Hermund verwendete dabei eine Kombination aus BKEM, autogenem Knochen und Knochenzellen, während Fürst nur eine Kombination aus BKEM und vitro vermehrten Knochenzellen einsetzte. Beide Studien hatten keine Kontrollgruppe. Kasten et al (2008) betont, dass die Anzahl an KbE im Knochenmarkaspirat einen entscheidenden Einfluß auf die spätere KNB hat. Wurde 300 ml Aspirat gewonnen, konnte ein 14-facher Anstieg von KbE nach Konzentrierung erreicht werden, während 30 ml Knochenmarkaspirat eine KbE Anreicherung knapp über jener Menge ergab, die im nativen Knochenmark gemessen wurde. Er schlussfolgerte daraus, dass kleine Volumina nicht für den klinischen Einsatz zur Knochenregeneration geeignet sind. Das würde erklären, warum es in der beschriebenen Nachuntersuchung bei einer Anzahl von 3,7 KbE im Konzentrat zu keiner vermehrten KNB im Vergleich zur Kontrollgruppe gekommen ist.

Aus den Ergebnissen lässt sich tendenziell ein gegenläufiges Verhalten im prozentuellen Anteil an KNB und BKEM ablesen. Dadurch wurde vermutet, dass die Knochenneubildungsrate von der Packungsdichte des Biomaterials abhängt. In der vorliegenden Studie wurden kleine BioOss® Partikel der Größe 0,25-1 mm mit einem Porendurchmesser von 300-1500 µm verwendet. Durch die Koagulation nach Zugabe des autologen Thrombins werden die Partikel noch dichter aneinander gepackt. Größere Partikel (1-2 mm) würden eine lockerere Applikation des Biomaterials und dadurch eine schnellere und vermehrte KNB erlauben. Es gibt drei weitere Studien bei denen BMAC in Kombination mit BKEM im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation angewendet wurde (Rickert et al 2011, Sauerbier et al 2010b, Sauerbier et al 2011). In diesen Studien wurde eine geringere Dichte an Biomaterial (29,0 % - 31,3 %) als in unserer Untersuchung gemessen und eine höhere KNB von 12,6 % - 19,9 % nach einer Einheildauer von 3,4 - 3,8 Monaten beobachtet. Chackartchi et al (2010) hingegen fand in einer bilateralen Sinusliftstudie mittels Mikro - CT Analysen keinen signifikanten Unterschied an neu gebildetem Knochen nach Augmentation von bovinem Biomaterial mit großen Granula (7,99 %, $\pm$ 4,23 %) oder kleinen Granula (14,64 %, $\pm$ 12,03 %). Er hat jedoch in seiner Auswertung nicht zwischen altem Restknochenvolumen und neu gebildetem Knochen unterschieden. Eine Bias in der Bewertung des neuen Knochenvolumens ist daher nicht ausgeschlossen. Aber auch die Porengröße des Materials kann sich determinierend auf die Knochenneubildung auswirken. Knochenersatzmaterialien mit einer Porengröße von weniger als 100 µm verhindern das Einwachsen von Zellen und Blutgefäßen und somit auch die Bildung von neuem Knochen (Hallmann et al 2008). Zhang et al (1999) empfiehlt eine Porengröße von >300 µm für die Sicherstellung einer suffizienten Vaskularisation. Weitere Einflußfaktoren auf die Knochenregeneration können aber nicht nur die makroskopischen Eigenschaften des Biomaterials, sondern auch seine chemische Zusammensetzung, sowie seine Oberflächenbeschaffenheit sein.

Knochenersatzmaterialien

Der Hauptnachteil von transplantierten Stammzellen ist, dass sie zum einen sehr geringe Überlebensraten und zum anderen in unterschiedliche Regionen des Körpers abwandern

und dort zu abnormaler Mineralisation führen können (Rodriguez et al 2012). Deshalb ist es wichtig die Zellen auf ein geeignetes Trägermaterial zu applizieren. Chemische Zusammensetzung und strukturelle Eigenschaften eines Knochenersatzmaterials können entscheidende Auswirkungen auf das Zellverhalten und somit auf die Qualität und Quantität des neugebildeten Knochens haben. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder autogenem Knochen können diese Eigenschaften unterstützt oder verändert werden (Schwartz et al 2008). Herten et al (2009) untersuchten die Zellvitalität von humanen Primärosteoblasten und mesenchymalen Knochenmarkzellen auf unterschiedlichsten Trägermaterialien und kamen zu dem Ergebnis, dass granuläres Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat die Zellvitalität unterstützen und nanopartikuläres Hydroxylapatit die Zellvitalität wesentlich einschränken oder sogar hemmen kann. In vitro konnte gezeigt werden, dass BKEM positive Auswirkung auf die Osteoblastenexpression zeigt. Eine normale RNA-, Osteonectin-, Integrin b1- und PDGF-Expression wurden nachgewiesen. Da die Expression von IL-6 und TNF- α reduziert war, schlussfolgerte man, dass BKEM (BioOss[®]) ein geringes immunogenes Potential besitzt und eine Reduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen bewirken kann. Diese Eigenschaft könnte auch für die geringe Resorptionsrate von BioOss[®] und sein teils langjähriges Bestehen in vivo verantwortlich sein (Amerio et al 2010). Trubiani et al (2010) bestätigt in seiner in vitro Studie die Ergebnisse von Amerio und beschreibt ebenfalls die Bildung von ossärem Sialoprotein, Osteopontin, Calcitonin und Kollagen Typ I, als Beweis einer zunehmenden Reifung von Knochenzellen. BioOss[®] unterstützte somit wesentlich die Differenzierung der Zellen zu einem osteogenen Phänotyp. Die osteogene Differenzierung auf bovinen und alloplastischen Trägermaterialien in vitro wurde auch von Payer (2010) und Schmitt (2008) beschrieben.

In unserer Nachuntersuchung wurde BKEM als Trägermaterial verwendet, da es eines der am häufigsten und am besten dokumentierten Knochenersatzmaterialien der letzten 10 Jahre ist (Hämmerle et al 1998, Jakse et al 2003, Fürst et al 2004, Fürst et al 2009, Gutwald et al 2009, Jensen et al 2009, Payer et al 2010, Sauerbier et al 2010b, Vicente et al 2010, Hermund et al 2011, Rickert et al 2012). Obwohl beschrieben wird, dass während des Herstellungsverfahrens sämtliche organischen Bestandteile und allergen wirksamen Proteine entfernt werden, muss es als potentiell allergenes und pathogenes Material angesehen werden (Spector 1994). In einem umfassenden Review wurde nachgewiesen,

dass Proteine in einigen anorganischen BKEM vorzufinden sind, und dass die vollständige Inaktivierung von BSE Prionen mit den aktuellen Aufbereitungsmethoden nicht bewiesen werden kann (Kim et al 2013). Aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass in der bovinen Knochenmatrix geringe Anteile von Proteinen, welche immunmodulierende Wachstumsfaktoren wie TGF- und BMP-2 enthalten können, vorhanden sind (Schwartz et al 2000). Dadurch vermutet man, dass BKEM auch osteoinduktive Eigenschaften aufweisen könnte (Tajoedin et al 2000). Auch wenn diese osteoinduktive Kapazität zu gering ist, um tatsächlich eine Knochenneubildung zu bewirken, wird der Einsatz von BKEM zusammen mit osteoinduktiven Faktoren als entscheidender Erfolgsfaktor betrachtet (Merkx et al 2003).

Die hier beschriebene Studie zeigt nach 3 Monaten eine KNB von 11,8 % ($\pm$ 6,2 %) auf der Kontrollseite ohne Zusatz von MNZ und nach 6 Monaten von 13,9 % ($\pm$ 8,5 %). Der Anteil an neuem Knochen ist dabei sehr gering. In einer Fallstudie wurde eine Langzeituntersuchung der Knochenneubildung in einem BKEM nach Sinusbodenaugmentation durchgeführt. Histomorphometrisch zeigte sich nach 8 Monaten eine KNB von 29,8 %, nach 2 Jahren von 69,7 % und nach 10 Jahren von 86,7 % (Sartori et al 2003). Die Knochenzunahme wurde auf die zunehmende Resorption der BKEM-Partikel zurückgeführt. Häufig wird eine KNB von 30-34 % in reinem BKEM nach einer Einheildauer von 6-8 Monaten angegeben (Kurkcu et al 2012, Sartori et al 2003, Simunek et al 2008, Piatelli et al 1999, Margolin et al 1998). Aufgrund des geringen Resorptionsverhaltens, weist BioOss[®] eine sehr hohe Langzeitstabilität auf und hat damit den Vorteil auch bei einer geringeren KNB zu einer hohen Implantatstabilität beizutragen. Andere Knochenersatzmaterialien, wie z.B. reines β -Tricalciumphosphat, resorbieren innerhalb weniger Monate und können bei unzureichender Knochenneubildung keine langfristige Implantatstabilität gewährleisten (Kolk et al 2012, Yamada et al 1997, Wiltfang et al 2002, Artzi et al 2004). In der Studie von Kurkcu et al (2012) kam es nach der Applikation von bovinem Hydroxylapatit (BonePlus-xs[®]) und einer Einheildauer von 6,5 Monaten zu einer KNB von 30,13 % ($\pm$ 3,45 %) und nach der Applikation von β -Tricalciumphosphat (Kasios TCP[®]) von 21,09 % ($\pm$ 2,86 %). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine kontrollierte Sinusliftstudie, bei der mehr KNB in BioOss[®] (33,5 % bis 53,7 %), als in β -Tricalciumsulfat (26,0 % bis 37,7 %) nach einer Einheilzeit von 12 Monaten beschrieben wurde (Artzi et al 2005). Cordaro et al (2008) zeigten wiederum beim Vergleich von

anorganischem BKEM (BioOss[®]) und biphasischem Calciumphosphat (Straumann[®] Bone Ceramic) keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einer KNB von 21,6 % ($\pm 10,0\%$) und 19,8 % ($\pm 7,9\%$). In einer in vitro Studie wurde nach Applikation von maxillären Progenitorzellen eine signifikant höhere Bildung von Osteocalcin auf Bio-Oss[®]-Partikeln, als auf β -Tricalciumphosphat (Vitoss[®]) beschrieben. Man schlussfolgerte, dass BKEM bessere osteokonduktive Eigenschaften aufweist, als β -Tricalciumsulfat (Payer et al 2010). Aber es gibt auch in vitro Studien, die beschreiben, dass unter mehreren getesteten Knochenersatzmaterialien deproteinisierter boviner Knochen die geringste Zellproliferation und –differentiation aufweist (Kübler et al 2004, Schmitt et al 2008).

Demineralisierter, gefriergetrockneter Knochen soll durch BMP's und andere nicht kollagene Proteine in dessen Matrix sowohl osteokonduktive, als auch osteoinduktive Eigenschaften haben (Merkx et al 2003). Durch entsprechende Aufbereitung soll der allogene Knochen seine immunogenen Eigenschaften verlieren. Je aggressiver jedoch die Bearbeitung ist, umso geringer werden die osteoinduktiven Eigenschaften des Materials. Gefrorene Allotransplantate weisen eine höhere Immunität als gefriergetrocknete, demineralisierte Allotransplantate auf (Kolk et al 2012). Eine kontrollierte Sinusliftstudie zeigte signifikant mehr Knochenneubildung nach einer Einheilzeit von 6-8 Monaten in einem gefriergetrockneten Allograft-Material (Puros[®]), als in Bio-Oss[®] (28,2 % vs. 12,4 %) (Froum et al 2006). Unterschiedliches Resorptionsverhalten, Porengröße und Kondensationsverfahren können allerdings die Ergebnisse wesentlich beeinflussen.

Zahlreiche Untersuchungen versuchen mit der Zugabe von bioaktiven Faktoren zu einem Knochenersatzmaterial die Knochenregeneration zu verbessern. In einer Minipig Studie, welche mit BKEM und BMP-7 durchgeführt wurde, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Knochenneubildung nach 6 Monaten (38,6 % Kontrollseite vs. 80 % Testseite) (Terheyden et al 1999). In einer weiteren Studie an Schafen konnte wiederum kein signifikanter Unterschied in der KNB zwischen bovinem Knochenersatzmaterial (BKEM) (46,9 %) und BKEM in Kombination mit PRP (51,1 %) festgestellt werden (Jakse et al 2003). Froum et al (2002) bestätigte diese tierexperimentelle Studie, indem er am Menschen ebenfalls keine statistisch signifikante Zunahme an Knochenneubildung nach der Zugabe von Plättchenfaktoren zu einem BKEM finden konnte. Im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation an 15 Patienten mit einer Kombination aus BKEM und Blut

wurde eine KNB von 14,7 % nach 4 - 9,5 Monaten erreicht (Yildirim et al 2000). Mit einer Kombination von BKEM und autogenem Knochen konnte wiederum ein prozentueller Anteil von 19 % KNB nach 6-9 Monaten Einheilzeit festgestellt werden (Yildirim et al 2011). Während an Tiermodellen oft eine KNB von 34-57 % mit der Kombination aus BKEM und Wachstumsfaktoren oder autogenem Knochen beobachtet werden kann, fällt die Knochenregeneration beim Menschen in der gleichen Nachuntersuchungszeit geringer aus (Browaeys et al 2007).

In der Literatur findet man bis jetzt auch noch keine Evidenz, dass die Zugabe von mesenchymalen Stammzellen zu einem BKEM die Knochenneubildung in vivo erhöht. Die einzelnen Studien sind zu unterschiedlich in ihrer Durchführung. Fürst et al (2009) beschreibt eine Knochenneubildung von 17,9 % (± 4.6 %) nach 6 Monaten Einheilzeit in einem Gemisch aus BKEM und expandierten autogenen Knochenzellen (AKZ). In einer Studie mit 26 Patienten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Knochenneubildung in einem BKEM mit autogenen Knochenzellen (14,3 % ± 1.8 %) zu einem BKEM vermengt mit konzentrierten MNZ (12,6 % ± 1.7 %) nach einer Einheildauer von 3-4 Monaten gefunden werden (Sauerbier et al 2011). In drei weiteren kontrollierten Studien konnte ebenfalls durch die Beimengung von konzentrierten MNZ zu einem BKEM nach einer durchschnittlichen Einheildauer von 4-6 Monaten keine höhere KNB erzielt werden, als in BKEM mit der Applikation von autogenem Knochen (Rickert et al 2011: 17,7 %; Fürst et al 2009: 17,9 %; Sauerbier et al 2010a: 19,9 %). Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass die KNB mit MNZ zu einem früheren Zeitpunkt gleich ausfällt, wie nach einer längeren Einheildauer ohne Applikation von Zellen oder bioaktiven Faktoren. Diese Studienergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die zusätzliche Applikation von MNZ zu einem BKEM eine ähnlich hohe Knochenregeneration, wie die Zugabe von autologem Knochen nach der gleichen Zeitdauer, bewirken kann. Die Dichte der Partikel beeinflusst dabei wesentlich die Vaskularisationsrate und dadurch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen (Galindo-Moreno et al 2011).

Die Überlegungen zur Herstellung eines optimalen Knochenersatzmaterials sind somit komplex und beinhalten die Materialzusammensetzung, mechanische Struktur, Oberflächenbeschaffenheit, Abbaueigenschaften und -produkte, sowie die Kombination mit biologischen Faktoren und die Veränderung dieser Eigenschaften im Verlauf zur Zeit

(Hutmacher et al 2007). Bis heute gibt es noch keine perfekte Trägermatrix für die Applikation von MSZ, da die Evidenz der aktuellen Studien sehr gering ist (Khojasteh et al 2012).

Mesenchymale Stammzellen zur in vivo Regeneration

Es gibt nur eine geringe Anzahl klinischer Studien, die eine Kombination von MSZ mit Knochenersatzmaterialien zur Therapie von craniofacialen und craniomaxillären Defekten untersucht haben. Erste Studien wurden mit Hydroxylapatit (Quarto et al 2001, Meijer et al 2008), HA/TCP (Shayesteh et al 2008), β -Tricalciumphosphat (Mesimaki et al 2009), gefriergetrocknetem, autologem Knochen (Lee et al 2010) und bovinem Knochenersatzmaterial (Hermund et al 2011, Sauerbier et al 2011, Rickert et al 2012) durchgeführt. Allerdings wurde größtenteils die Knochenregeneration radiologisch evaluiert. Eine Quantifizierung der KNB anhand von Biopsien und histomorphometrischer Auswertung ist eher selten (Soleymani et al 2008, Hermund et al 2011, Sauerbier et al 2011, Rickert et al 2012). Rickert konnte eine statistisch signifikant höhere Knochenneubildung in BKEM mit Chair-Side konzentrierten Knochenmarkzellen ($17,7 \pm 7,3$ %) feststellen, während Soleymani eine KNB von 41,34 % nach Kultivierung der gewonnenen Zellen im Labor beschrieb.

Die größte Herausforderung einer Stammzelltransplantation ist die Gewinnung einer für den klinischen Einsatz relevanten Menge an osteogenen Progenitorzellen (Khojasteh et al 2012). Es wird eine Mindestanzahl an MSZ benötigt, um eine ausreichende KNB in vivo gewährleisten zu können. In einer Studie mit 60 Patienten wurden je 20 ml autologes Knochenmarkaspirat vom Becken gewonnen und die konzentrierten Progenitorzellen in persistierende Knochendefekte von atrophierten Tibiadiaphysen appliziert. Bei 7 Patienten heilte der Defekt nicht aus. In diesen Fällen wurden <1000 Progenitorzellen/ml Konzentrat appliziert, während bei den erfolgreich ausgeheilten Defekten >1500 Progenitorzellen/ml Konzentrat injiziert wurden (Hernigou et al 2005). Eine in vitro Vermehrung hat den Vorteil ausreichend MSZ unabhängig vom Alter zur Verfügung stellen zu können, welche die Fähigkeit beibehalten BMP's, TGF- β , und andere Wachstumsfaktoren oder Zytokine zu produzieren. Da die MSZ nach der Gewinnung kultiviert und amplifiziert werden müssen, wird diskutiert, ob eine zu lange

Kultivierungsdauer zu einer kompletten Reifung der Zellen führt und dadurch die Osteoinduktivität in vivo sinkt (Castano-Izquierdo et al 2007). Castano-Izquierdo (2007) besagt, dass die größte Knochenneubildungsrate nach der Applikation jener MSZ erfolgte, die am kürzesten kultiviert wurden. Eine zu extensive Kultivierung von MSZ führt zu einer zunehmenden Alterung mit Abnahme der Wachstumspotenz (Jones et al 2001). Im Gegensatz dazu beschreibt Yoon et al (2007), dass eine Kultivierung von 14 Tagen unter stabilen osteogenen Bedingungen effektiver ist, als eine kurze Kultivierungsdauer. Möglicherweise ist die unterschiedliche Spenderregion der verwendeten MSZ ausschlaggebend für diese widersprüchlichen Ergebnisse (Khojasteh et al 2012). Deshalb soll durch geschlossene Chair-side Zellkonzentrierungssysteme eine Zellvermehrung im Labor vermieden werden. BMAC Harvest Systems gibt eine Anzahl von $89,1 \pm 8 \times 10^6$ MNZ/ml Konzentrat und eine Anzahl von 3040 KbE/ml an (Heeschen et al 2007). In unserer Untersuchung wurden mehr KbE ($4,5 \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}$) aus den MNZ des Knochenmarkaspirates ($39,8 \pm 19,5 \times 10^6 \text{ MNZ/ml}$), als aus den mit dem BMAC-Verfahren konzentrierten MNZ ($85,9 \pm 63,9 \times 10^6 \text{ MNZ/ml}$) ($3,7 \text{ KbE}/10^6 \text{ MNZ}$) gebildet. Ohgushi et al (1999) beschreibt, dass 1 MSZ/ 10^5 MNZ im Knochenmarkaspirat vorzufinden ist und mit zunehmendem Alter sogar abnimmt. Auch Kern et al (2006) beschreibt weniger als 1 MSZ/ 10^4 MNZ. Die ex vivo Vermehrung der MNZ ist somit Voraussetzung, um eine Mindestdosis von 2×10^6 MSZ/kg Körpergewicht des Empfängers zu erhalten (Rhode et al 2008). Dennoch wird die Zahl und Funktion der KbE von Alter, Menopause und verschiedenen Erkrankungen stark beeinflusst (Muschler et al 1997). Ebenfalls besteht die Frage, ob durch den Konzentrierungsprozess die Aktivität der konzentrierten Zellen beeinflusst werden könnte. Schon Seeger et al (2007) bestätigte, dass die gewonnene Zellanzahl nicht vollständig die Funktionalität der Zellen in vivo widerspiegelt. Hermann et al (2008) konnte zeigen, dass die Migrationskapazität nach Konzentrierung mit dem BMAC-System sogar höher war, als nach der Konzentrierung mit dem FICOLL-Verfahren und schlussfolgerte, dass es durch die Konzentrierung mittels BMAC-System zu keiner Einschränkung der Zellfunktion kommt. Dieses Ergebnis wird auch von anderen Autoren, die ein geschlossenes Zellisolierungssystem mit der offenen, laborunterstützten Methode, verglichen haben, bestätigt (Pierini et al 2012, Kasten et al 2008).

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einsatz von MSZ im Vergleich zur azellulären Knochendefektheilung zu einer Zunahme der Osteogenese führt (Atika et al

2004, Lin et al 2008, Khojasteh et al 2008, Henrich et al 2009, Niemeyer et al 2009, Zhang et al 2010). Die Ergebnisse der zellinduzierten Knochenregeneration in humanen Studien belegen ebenfalls, dass die Kombination von MSZ mit einem Knochenersatzmaterial zu ähnlichen Resultaten führt, wie die Kombination von Knochenersatzmaterial und autologem Knochen (Rickert et al 2011, Sauerbier et al 2011, Sauerbier et al 2010a, Fürst et al 2009). Studien am Sinusliftmodell zeigen allerdings bessere vorhersagbare Ergebnisse, als bei vertikalen Augmentationen (Khojasteh et al 2012). In Zukunft wird die zusätzliche Applikation von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in die entsprechende osteogene Zelllinie im Rahmen der Knochenregeneration eine wesentliche Rolle spielen (Torroni et al 2009, Lee et al 2009). Erste Studienergebnisse zeigen bereits jetzt eine vermehrte KNB bei der Kombination von autologen MSZ mit Wachstumsfaktoren oder BMP-2 (Akita et al 2004, Kim et al 2007, Yamada et al 2004, Ito et al 2006, Miura et al 2006).

Konklusion

Um die postoperative Morbidität nach der Entnahme autogener Knochentransplantate weitestgehend zu vermeiden, werden häufig Alternativen durch den Einsatz von Knochenersatzmaterialien gesucht. Der Hauptnachteil dieser Materialien im Gegensatz zu autogenem Knochen ist, dass sie keine osteoinduktiven Eigenschaften besitzen. Sie sind meistens osteokonduktiv, biokompatibel und verfügen über physikalische und chemische Eigenschaften, die das Einsprossen von Blutgefäßen und die Anlagerung von Osteoprogenitorzellen positiv beeinflussen können. Das Knochenersatzmaterial mit der höchsten klinischen Evidenz ist boviner, deproteinisierter Knochen, da er in seiner Struktur der menschlichen Spongiosa sehr ähnlich ist. Die Oberflächenbeschaffenheit und die Porengröße ermöglichen optimale Bedingungen für das Einwachsen von Kapillaren und Knochen. Zusätzlich ist bovines Knochenersatzmaterial besonders resorptionsstabil und kann über Jahre stabil in der augmentierten Region vorhanden sein. Allerdings fehlt auch diesem die osteoinduktive Kapazität, wodurch sich teilweise sehr lange Einheilzeiten von über 6 Monaten ergeben. Im Rahmen der in vivo Regeneration sollen die Materialien durch die Beimengung von Osteoprogenitor – oder mesenchymalen Vorläuferzellen „aktiviert“ werden, indem sie osteoinduktive Eigenschaften erhalten. Jedoch führte die Beimengung von unkonzentrierten oder nicht amplifizierten Zellen zu keiner vermehrten Knochenneubildung in vivo, da die Anzahl an gewonnenen Progenitorzellen zu gering ist. Ihre Kultivierung im Labor ist sehr aufwendig, zeit- und kostenintensiv, und bedarf eines Labors mit entsprechendem Standard, um eine Infektion der Zellen zu vermeiden. Die erfolgreiche Anwendung von geschlossenen Systemen, sog. Chair-side Zentrifugen, fand bis jetzt hauptsächlich in der Gefäßchirurgie statt. Studienergebnisse zeigen, dass die KNB teilweise gleich ausfällt, wie bei Knochenersatzmaterialien, die mit autogenem Knochen vermischt wurden. Trotzdem ist der Einsatz dieser Technik für die tägliche Praxis eher ungeeignet, da die Knochenmarkaspiration aufwendig ist und absolut steriler Bedingungen bedarf. Die leichtere Gewinnung von adipösen Stammzellen zur Knochenregeneration könnte hier in Erwägung gezogen werden. Zu bedenken ist zusätzlich, dass die Qualität und die Aktivität der gewonnenen Zellen auch sehr vom Alter, Geschlecht und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten abhängig ist. Im

Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie gibt es noch wenig vergleichbare klinische Studien, welche die in vivo Regeneration mit einer Kombination von MSZ und Knochenersatzmaterialien beschreiben. Zu unterschiedlich sind die verwendeten Stammzellquellen, Kultivierungsmethoden, Trägermaterialien, beigemengte Wachstumsfaktoren, sowie Messparameter und die Datenauswertung. Einheitliche Studienprotokolle mit einer größeren Patientenzahl sind somit dringend notwendig.

In unserer prospektiven Pilotstudie ist es nicht möglich aufgrund der großen Streuung der Ergebnisse eine eindeutige Schlussfolgerung zu ziehen. Es ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an KbE und dem Anteil an neu gebildetem Knochen zu erkennen. Die KNB war im Durchschnitt sowohl nach 3, als auch nach 6 Monaten in der Test- und der Kontrollgruppe sehr gering. Als Ursache wurde eine zu dichte Packung der kleinen BioOss Granula, ein zu geringes Aspirationsvolumen und die einmalige Aspiration an nur einer Stelle des Beckenknochens vermutet. Dennoch leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für die Auswahl zukünftiger Studienprotokolle und die Erstellung von Metaanalysen.

Die Techniken zur in vivo Regeneration von Knochendefekten sind noch lange nicht ausgereift. Die zusätzliche Beimengung von Wachstumsfaktoren und osteoinduktiven Proteinen zu mesenchymalen Stammzellen führte in präklinischen und klinischen Untersuchungen zu eindeutig mehr Knochenneubildung. Der Schwerpunkt zukünftiger Studien liegt somit hauptsächlich in der Kombination von Zellen und bioaktiven Molekülen auf einer geeigneten Trägermatrix. Weiters sollten zukünftige Studiendesigns und Datenanalysen einheitlicher durchgeführt werden, um fortschrittliche Ergebnisse im Bereich der zellinduzierten Knochenregeneration in vivo erhalten zu können.

Literaturverzeichnis

Aghaloo, T. L., & Moy, P. K. (2007) Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *The International journal of oral & maxillofacial implants* **22 Suppl**: 49-70

Akita, S., Fukui, M., Nakagawa, H., Fujii, T., & Akino, K. (2004) Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**: 252-259

Albrektsson, T., Zarb, G., Worthington, P., & Eriksson, A. R. (1986) The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success *The International journal of oral & maxillofacial implants* **1**: 11-25

Amerio, P., Vianale, G., Reale, M., Muraro, R., Tulli, A., & Piattelli, A. (2010) The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production *Clinical oral implants research* **21**: 650-655

Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012) Bone tissue engineering: Recent advances and challenges *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **40**: 363-408

Annersten S (1940) Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Fracturcallus. *Acta Chirurgica Scandinavia Supplementum* 60:1-181 74

Araujo, M. G., Liljenberg, B., & Lindhe, J. (2010) Beta-tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: An experimental study in the dog *Clinical oral implants research* **21**: 445-454

Arora, N. S., Ramanayake, T., Ren, Y. F., & Romanos, G. E. (2009) Platelet-rich plasma: A literature review *Implant dentistry* **18**: 303-310

Artzi, Z., Kozlovsky, A., Nemcovsky, C. E., & Weinreb, M. (2005) The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material *Journal of clinical periodontology* **32**: 193-199

Artzi, Z., Weinreb, M., Givol, N., Rohrer, M. D., Nemcovsky, C. E., Prasad, H. S., & Tal, H. (2004) Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: A 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis *The International journal of oral & maxillofacial implants* **19**: 357-368

Assmus, B., Honold, J., Schachinger, V., Britten, M. B., Fischer-Rasokat, U., Lehmann, R., Teupe, C., Pistorius, K., Martin, H., Abolmaali, N. D., Tonn, T., Dimmeler, S., & Zeiher, A. M. (2006) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction *The New England journal of medicine* **355**: 1222-1232

Atwood, D. A., & Coy, W. A. (1971) Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges *The Journal of prosthetic dentistry* **26**: 280-295

Augthun, M., Yildirim, M., Spiekermann, H., & Biesterfeld, S. (1995) Healing of bone defects in combination with immediate implants using the membrane technique *The International journal of oral & maxillofacial implants* **10**: 421-428

Avila, G., Wang, H. L., Galindo-Moreno, P., Misch, C. E., Bagramian, R. A., Rudek, I., Benavides, E., Moreno-Riestra, I., Braun, T., & Neiva, R. (2010) The influence of the bucco-palatal distance on sinus augmentation outcomes *Journal of periodontology* **81**: 1041-1050

Axhausen G (1909) Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik aufgrund von Tierversuchen. *Langenbecks Arch Klin Chir* **88**: 23–145

Baker, R. D., & Connoles, P. W. (1977) Preprosthetic augmentation grafting--autogenous bone *Journal of oral surgery (American Dental Association : 1965)* **35**: 541-551

Bardenheuer A (1892) Über Unterkiefer- und Oberkiefer-Resection. *Verh Dtsch Ges Chir* **21**: 123–130

Barth A (1893) Über histologische Befunde nach Knochentransplantationen. *Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie* 46:409-417

Barth A (1895) Histologische Untersuchungen ueber Knochenimplantationen. *Beiträge zur pathologischen Anatomie* 17:65-142

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo *Experimental hematology* **30**: 42-48

Batista, M. A., Leivas, T. P., Rodrigues, C. J., Arenas, G. C., Belitardo, D. R., & Guarniero, R. (2011) Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* **66**: 1787-1792

Beaumont, C., Schmidt, R. J., Tatakis, D. N., & Zafiroopoulos, G. G. (2008) Use of engineered bone for sinus augmentation *Journal of periodontology* **79**: 541-548

Becker, W., Dahlin, C., Becker, B. E., Lekholm, U., van Steenberghe, D., Higuchi, K., & Kultje, C. (1994) The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: A prospective multicenter study *The International journal of oral & maxillofacial implants* **9**: 31-40

Becktor, J. P., Isaksson, S., & Sennerby, L. (2004) Survival analysis of endosseous implants in grafted and nongrafted edentulous maxillae *The International journal of oral & maxillofacial implants* **19**: 107-115

Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S., & Owen, M. E. (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures *Journal of cell science* **102 (Pt 2)**: 341-351

Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., & Goldstein, S. (1999) Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration *Nature medicine* **5**: 753-759

- Boyan, B. D., Ranly, D. M., McMillan, J., Sunwoo, M., Roche, K., & Schwartz, Z. (2006) Osteoinductive ability of human allograft formulations *Journal of periodontology* **77**: 1555-1563
- Boyne, P. J., & James, R. A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone *Journal of oral surgery (American Dental Association : 1965)* **38**: 613-616
- Boyne, P. J., Marx, R. E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E., Lilly, L. C., Alder, M., & Nummikoski, P. (1997) A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **17**: 11-25
- Browaeys, H., Bouvry, P., & De Bruyn, H. (2007) A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures *Clinical implant dentistry and related research* **9**: 166-177
- Buck, B. E., Malinin, T. I., & Brown, M. D. (1989) Bone transplantation and human immunodeficiency virus. an estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) *Clinical orthopaedics and related research* (**240**): 129-136
- Bulgin, D., Hodzic, E., & Komljenovic-Blitva, D. (2011) Advanced and prospective technologies for potential use in craniofacial tissues regeneration by stem cells and growth factors *The Journal of craniofacial surgery* **22**: 342-348
- Buser, D. Membrangeschützte Knochenregeneration in der Implantologie, *Quintessenz Verlag, Berlin* (2010)
- Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J. P., Lussi, A., Mettler, D., & Schenk, R. K. (1998) Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs *Clinical oral implants research* **9**: 137-150

Butz, F., Bachle, M., Ofer, M., Marquardt, K., & Kohal, R. J. (2011) Sinus augmentation with bovine hydroxyapatite/synthetic peptide in a sodium hyaluronate carrier (PepGen P-15 putty): A clinical investigation of different healing times *The International journal of oral & maxillofacial implants* **26**: 1317-1323

Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., Lynch, S. E., & Nevins, M. (2003) Periodontal regeneration in human class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **23**: 213-225

Cancedda, R., Mastrogiacomo, M., Bianchi, G., Derubeis, A., Muraglia, A., & Quarto, R. (2003) Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone *Novartis Foundation symposium* **249**: 133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41

Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **9**: 641-650

Caplan, A. I. (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine *Journal of cellular physiology* **213**: 341-347

Carinci, F., Piattelli, A., Degidi, M., Palmieri, A., Perrotti, V., Scapoli, L., Martinelli, M., Laino, G., & Pezzetti, F. (2006) Genetic effects of anorganic bovine bone (bio-oss) on osteoblast-like MG63 cells *Archives of Oral Biology* **51**: 154-163

Carlsen, A., Gorst-Rasmussen, A., & Jensen, T. (2013) Donor site morbidity associated with autogenous bone harvesting from the ascending mandibular ramus *Implant dentistry*

Castano-Izquierdo, H., Alvarez-Barreto, J., van den Dolder, J., Jansen, J. A., Mikos, A. G., & Sikavitsas, V. I. (2007) Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential *Journal of biomedical materials research. Part A* **82**: 129-138

Cawood, J. I., & Howell, R. A. (1988) A classification of the edentulous jaws *International journal of oral and maxillofacial surgery* **17**: 232-236

CELESNIK, F. (1965) Reconstruction of the alveolar bone in advanced atrophy of the jaw *Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie* **10**: 37-41

Chackartchi, T., Iezzi, G., Goldstein, M., Klinger, A., Soskolne, A., Piattelli, A., & Shapira, L. (2011) Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: A prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study *Clinical oral implants research* **22**: 473-480

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007) Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**: 2739-2749

Chiapasco, M., Casentini, P., & Zaniboni, M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry *The International journal of oral & maxillofacial implants* **24 Suppl**: 237-259

Chiapasco, M., Ferrini, F., Casentini, P., Accardi, S., & Zaniboni, M. (2006) Dental implants placed in expanded narrow edentulous ridges with the extension crest device. A 1-3-year multicenter follow-up study *Clinical oral implants research* **17**: 265-272

Chiapasco, M., Romeo, E., Casentini, P., & Rimondini, L. (2004) Alveolar distraction osteogenesis vs. vertical guided bone regeneration for the correction of vertically deficient edentulous ridges: A 1-3-year prospective study on humans *Clinical oral implants research* **15**: 82-95

Chiapasco, M., Romeo, E., Casentini, P., & Rimondini, L. (2004) Alveolar distraction osteogenesis vs. vertical guided bone regeneration for the correction of vertically deficient edentulous ridges: A 1-3-year prospective study on humans *Clinical oral implants research* **15**: 82-95

Chiapasco, M., & Zaniboni, M. (2009) Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: A systematic review *Clinical oral implants research* **20 Suppl 4**: 113-123

Chiapasco, M., Zaniboni, M., & Rimondini, L. (2007) Autogenous onlay bone grafts vs. alveolar distraction osteogenesis for the correction of vertically deficient edentulous ridges: A 2-4-year prospective study on humans *Clinical oral implants research* **18**: 432-440

Cochran, D. L., Schenk, R., Buser, D., Wozney, J. M., & Jones, A. A. (1999) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants *Journal of periodontology* **70**: 139-150

Connolly, J. F. (1995) Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair *Clinical orthopaedics and related research* (**313**): 8-18

Corbella, S., Taschieri, S., Samaranayake, L., Tsesis, I., Nemcovsky, C., & Del Fabbro, M. (2013) Implant treatment choice after extraction of a vertically fractured tooth. A proposal for a clinical classification of bony defects based on a systematic review of literature *Clinical oral implants research*

Cordaro, L., Amade, D. S., & Cordaro, M. (2002) Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement *Clinical oral implants research* **13**: 103-111

Cordaro, L., Bosshardt, D. D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G., & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with bio-oss or straumann bone ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial *Clinical oral implants research* **19**: 796-803

Cordaro, L., Bosshardt, D. D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G., & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with bio-oss or straumann bone ceramic: Histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial *Clinical oral implants research* **19**: 796-803

Cordioli, G., Mazzocco, C., Schepers, E., Brugnolo, E., & Majzoub, Z. (2001) Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. clinical and histological findings *Clinical oral implants research* **12**: 270-278

- Cosci, F., & Luccioli, M. (2000) A new sinus lift technique in conjunction with placement of 265 implants: A 6-year retrospective study *Implant dentistry* **9**: 363-368
- Davis, W. H., Delo, R. I., Ward, W. B., Terry, B., & Patakas, B. (1975) Long term ridge augmentation with rib graft *Journal of maxillofacial surgery* **3**: 103-106
- de Boer, H. H. (1988) The history of bone grafts *Clinical orthopaedics and related research* **(226)**: 292-298
- De Kok, I. J., Peter, S. J., Archambault, M., van den Bos, C., Kadiyala, S., Aukhil, I., & Cooper, L. F. (2003) Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: Preliminary findings *Clinical oral implants research* **14**: 481-489
- de Vicente, J. C., Hernandez-Vallejo, G., Brana-Abascal, P., & Pena, I. (2010) Maxillary sinus augmentation with autologous bone harvested from the lateral maxillary wall combined with bovine-derived hydroxyapatite: Clinical and histologic observations *Clinical oral implants research* **21**: 430-438
- Degidi, M., Artese, L., Rubini, C., Perrotti, V., Iezzi, G., & Piattelli, A. (2006) Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using bio-oss *Oral diseases* **12**: 469-475
- Dettke, M., Buchta, C., Wiesinger, H., Maas, J. H., Strate, A., & Chen, Y. (2012) Anticoagulation in large-volume leukapheresis: Comparison between citrate- versus heparin-based anticoagulation on safety and CD34 (+) cell collection efficiency *Cytotherapy* **14**: 350-358
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement *Cytotherapy* **8**: 315-317
- Donath, K., & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. the sage-schliff (sawing and grinding) technique *Journal of oral pathology* **11**: 318-326

Donos, N., Mardas, N., & Chadha, V. (2008) Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: Systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy)*Journal of clinical periodontology* **35**: 173-202

Draenert, F. G., Huetzen, D., Kammerer, P., & Wagner, W. (2011) Bone augmentation in dental implantology using press-fit bone cylinders and twin-principle diamond hollow drills: A case series*Clinical implant dentistry and related research* **13**: 238-243

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*Cell* **126**: 677-689

Esposito, M., Coulthard, P., Thomsen, P., & Worthington, H. V. (2005) Interventions for replacing missing teeth: Different types of dental implants*The Cochrane database of systematic reviews* **(1)**: CD003815

Esposito, M., Grusovin, M. G., Felice, P., Karatzopoulos, G., Worthington, H. V., & Coulthard, P. (2009) Interventions for replacing missing teeth: Horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment*The Cochrane database of systematic reviews* **(4)**:**CD003607**. doi: CD003607

Esposito, M., Grusovin, M. G., Rees, J., Karasoulos, D., Felice, P., Alissa, R., Worthington, H. V., & Coulthard, P. (2010) Interventions for replacing missing teeth: Augmentation procedures of the maxillary sinus*The Cochrane database of systematic reviews* **(3)**:**CD008397**. doi: CD008397

Esposito, M., Grusovin, M. G., Worthington, H. V., & Coulthard, P. (2006) Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment*The Cochrane database of systematic reviews* **(1)**: CD003607

Farre-Guasch, E., Prins, H. J., Overman, J. R., Ten Bruggenkate, C. M., Schulten, E. A., Helder, M. N., & Klein-Nulend, J. (2013) Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of one-step surgical procedures*Tissue engineering.Part B, Reviews* **19**: 69-82

Farrell, C. D., Kent, J. N., & Guerra, L. R. (1976) One-stage interpositional bone grafting and vestibuloplasty of the atrophic maxilla *Journal of oral surgery (American Dental Association : 1965)* **34**: 901-906

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells *Cell and tissue kinetics* **3**: 393-403

Friedenstein, A. J., Latzinik, N. V., Gorskaya, Y., Luria, E. A., & Moskvina, I. L. (1992) Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells *Bone and mineral* **18**: 199-213

Froum, S. J., Wallace, S. S., Elian, N., Cho, S. C., & Tarnow, D. P. (2006) Comparison of mineralized cancellous bone allograft (puros) and anorganic bovine bone matrix (bio-oss) for sinus augmentation: Histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **26**: 543-551

Froum, S. J., Wallace, S. S., Tarnow, D. P., & Cho, S. C. (2002) Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: Three bilateral case reports *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **22**: 45-53

Fu, Q., Rahaman, M. N., Bal, B. S., Brown, R. F., & Day, D. E. (2008) Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique *Acta biomaterialia* **4**: 1854-1864

Fuerst, G., Strbac, G. D., Vasak, C., Tangl, S., Leber, J., Gahleitner, A., Gruber, R., & Watzek, G. (2009) Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? *Clinical oral implants research* **20**: 135-139

Fuerst, G., Strbac, G. D., Vasak, C., Tangl, S., Leber, J., Gahleitner, A., Gruber, R., & Watzek, G. (2009) Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? *Clinical oral implants research* **20**: 135-139

Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F., & Watzek, G. (2004) Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: Preliminary findings *Clinical oral implants research* **15**: 733-740

Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F., & Watzek, G. (2004) Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: Preliminary findings *Clinical oral implants research* **15**: 733-740

Gaggl, A., Schultes, G., & Karcher, H. (2000) Vertical alveolar ridge distraction with prosthetic treatable distractors: A clinical investigation *The International journal of oral & maxillofacial implants* **15**: 701-710

Galindo-Moreno, P., Avila, G., Fernandez-Barbero, J. E., Mesa, F., O'Valle-Ravassa, F., & Wang, H. L. (2008) Clinical and histologic comparison of two different composite grafts for sinus augmentation: A pilot clinical trial *Clinical oral implants research* **19**: 755-759

Galindo-Moreno, P., Padial-Molina, M., Fernandez-Barbero, J. E., Mesa, F., Rodriguez-Martinez, D., & O'Valle, F. (2010) Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: Influence of clinical variables *Clinical oral implants research* **21**: 221-227

Garcia-Godoy, F., & Murray, P. E. (2006) Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration *Stem cells and development* **15**: 881-887

Garg, A.K. Knochen – Biologie, Gewinnung und Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie, *Quintessenz Verlag, Berlin* (2006)

Gellrich, N. C., Held, U., Schoen, R., Pailing, T., Schramm, A., & Bormann, K. H. (2007) Alveolar zygomatic buttress: A new donor site for limited preimplant augmentation procedures *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **65**: 275-280

GERRY, R. G. (1956) Alveolar ridge reconstruction with osseous autograft: Report of case *Journal of oral surgery* **14**: 74-78

Glass, Y., Eickholz, P., Nentwig, G.H., Dannewitz, B. (2008) Glossar der Grundbegriffe für die Praxis – Knochenersatz- und Aufbaumaterialien, *Parodontologie*, 19(4):465-474

Gonshor, A., McAllister, B. S., Wallace, S. S., & Prasad, H. (2011) Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation procedure *The International journal of oral & maxillofacial implants* **26**: 123-131

Gottlow, J., Laurell, L., Lundgren, D., Mathisen, T., Nyman, S., Rylander, H., & Bogentoft, C. (1994) Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: A longitudinal study in monkeys *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **14**: 436-449

Griffin, M., Iqbal, S. A., & Bayat, A. (2011) Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **93**: 427-434

Grove, J. E., Bruscia, E., & Krause, D. S. (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells *Stem cells (Dayton, Ohio)* **22**: 487-500

Gruber, R., Kandler, B., Fuerst, G., Fischer, M. B., & Watzek, G. (2004) Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation in vitro *Clinical oral implants research* **15**: 575-580

Gutwald, R., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Kister, C., Lysek, D. A., Maglione, M., Xavier, S. P., Oshima, T., Schmelzeisen, R., & Sauerbier, S. (2010) Mesenchymal stem cells and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: Comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep *The British journal of oral & maxillofacial surgery* **48**: 285-290

Gutwald, R., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Kister, C., Lysek, D. A., Maglione, M., Xavier, S. P., Oshima, T., Schmelzeisen, R., & Sauerbier, S. (2010) Mesenchymal stem cells and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: Comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep *The British journal of oral & maxillofacial surgery* **48**: 285-290

Haas, R., Baron, M., Donath, K., Zechner, W., & Watzek, G. (2002) Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep *The International journal of oral & maxillofacial implants* **17**: 337-346

Haas, R., Baron, M., Donath, K., Zechner, W., & Watzek, G. (2002) Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep *The International journal of oral & maxillofacial implants* **17**: 337-346

Hallman, M., Lundgren, S., & Sennerby, L. (2001) Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue *Clinical implant dentistry and related research* **3**: 87-96

Hallman, M., Mordenfeld, A., & Strandkvist, T. (2009) Bone replacement following dental trauma prior to implant surgery--status *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology* **25**: 2-11

Hallman, M., Sennerby, L., & Lundgren, S. (2002) A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture *The International journal of oral & maxillofacial implants* **17**: 635-643

Hallman, M., & Thor, A. (2008) Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry *Periodontology 2000* **47**: 172-192

Hammerle, C. H., Chiantella, G. C., Karring, T., & Lang, N. P. (1998) The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants *Clinical oral implants research* **9**: 151-162

Hammerle, C. H., Jung, R. E., Yaman, D., & Lang, N. P. (2008) Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: A report of twelve consecutive cases *Clinical oral implants research* **19**: 19-25

Harle, F. (1975) Visor osteotomy of the atrophic mandible for the absolute raising of the crest *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* **30**: 561

Harle, F. (1975) Visor osteotomy to increase the absolute height of the atrophied mandible. A preliminary report *Journal of maxillofacial surgery* **3**: 257-260

Hatano, N., Shimizu, Y., & Ooya, K. (2004) A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants *Clinical oral implants research* **15**: 339-345

Hatano, N., Shimizu, Y., & Ooya, K. (2004) A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants *Clinical oral implants research* **15**: 339-345

Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow *Bone* **13**: 81-88

Heliotis, M., Lavery, K. M., Ripamonti, U., Tsiridis, E., & di Silvio, L. (2006) Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest *International journal of oral and maxillofacial surgery* **35**: 265-269

Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., von Hesler, C., Andrassy, J., Kevy, S. V., Jacobson, M. S., & Heeschen, C. (2008) Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity *Cell transplantation* **16**: 1059-1069

Hermund, N. U., Stavropoulos, A., Donatsky, O., Nielsen, H., Clausen, C., Reibel, J., Pakkenberg, B., & Holmstrup, P. (2011) Reimplantation of cultivated human bone cells from the posterior maxilla for sinus floor augmentation. histological results from a randomized controlled clinical trial *Clinical oral implants research*

Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., & Rouard, H. (2005) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. influence of the number and concentration of progenitor cells*The Journal of bone and joint surgery.American volume* **87**: 1430-1437

Herten, M., Rothamel, D., Schwarz, F., Friesen, K., Kogler, G., & Becker, J. (2009) Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability*Clinical oral investigations* **13**: 149-155

Hjorting-Hansen, E. (2002) Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review*Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* **6**: 6-14

Hjorting-Hansen, E. (2002) Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review*Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* **6**: 6-14

Hjorting-Hansen, E., Worsaae, N., & Lemons, J. E. (1990) Histologic response after implantation of porous hydroxylapatite ceramic in humans*The International journal of oral & maxillofacial implants* **5**: 255-263

Hosokawa, R., Kikuzaki, K., Kimoto, T., Matsuura, T., Chiba, D., Wadamoto, M., Sato, Y., Maeda, M., Sano, A., & Akagawa, Y. (2000) Controlled local application of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR. an experimental study in beagle dogs*Clinical oral implants research* **11**: 345-353

Howell, T. H., Fiorellini, J. P., Paquette, D. W., Offenbacher, S., Giannobile, W. V., & Lynch, S. E. (1997) A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease*Journal of periodontology* **68**: 1186-1193

Howlett, C. R., Cave, J., Williamson, M., Farmer, J., Ali, S. Y., Bab, I., & Owen, M. E. (1986) Mineralization in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells*Clinical orthopaedics and related research* (**213**): 251-263

Hurzeler, M. B., Quinones, C. R., Kirsch, A., Gloker, C., Schupbach, P., Strub, J. R., & Caffesse, R. G. (1997) Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. part I. evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix *Clinical oral implants research* **8**: 476-486

Hutmacher, D., Hurzeler, M. B., & Schliephake, H. (1996) A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications *The International journal of oral & maxillofacial implants* **11**: 667-678

Hutmacher, D. W., & Cool, S. (2007) Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **11**: 654-669

Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, C. X., Tan, K. C., & Lim, T. C. (2007) State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **1**: 245-260

Ito, K., Yamada, Y., Naiki, T., & Ueda, M. (2006) Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma *Clinical oral implants research* **17**: 579-586

Jafarian, M., Eslaminejad, M. B., Khojasteh, A., Mashhadi Abbas, F., Dehghan, M. M., Hassanizadeh, R., & Houshmand, B. (2008) Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **105**: e14-24

Jager, M., Jelinek, E. M., Wess, K. M., Scharfstadt, A., Jacobson, M., Kevy, S. V., & Krauspe, R. (2009) Bone marrow concentrate: A novel strategy for bone defect treatment *Current stem cell research & therapy* **4**: 34-43

Jakobsen, C., Sorensen, J. A., Kassem, M., & Thygesen, T. H. (2013) Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: A systematic review of the literature *Journal of oral rehabilitation*

Jakobsen, C., Sorensen, J. A., Kassem, M., & Thygesen, T. H. (2013) Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: A systematic review of the literature *Journal of oral rehabilitation* **40**: 693-706

Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmeier, R., & Lorenzoni, M. (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. an experimental study on sheep *Clinical oral implants research* **18**: 517-524

Jakse, N., Seibert, F. J., Lorenzoni, M., Eskici, A., & Pertl, C. (2001) A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting *Clinical oral implants research* **12**: 488-494

Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R., & Pertl, C. (2003) Influence of PRP on autogenous sinus grafts. an experimental study on sheep *Clinical oral implants research* **14**: 578-583

Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R., & Pertl, C. (2003) Influence of PRP on autogenous sinus grafts. an experimental study on sheep *Clinical oral implants research* **14**: 578-583

Janicki, P., & Schmidmaier, G. (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? combining scaffolds with growth factors and/or stem cells *Injury* **42 Suppl 2**: S77-81

Jensen, S. S., Aaboe, M., Pinholt, E. M., Hjorting-Hansen, E., Melsen, F., & Ruyter, I. E. (1996) Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes *The International journal of oral & maxillofacial implants* **11**: 55-66

Jensen, S. S., Broggini, N., Hjorting-Hansen, E., Schenk, R., & Buser, D. (2006) Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs *Clinical oral implants research* **17**: 237-243

Jensen, S. S., & Terheyden, H. (2009) Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials*The International journal of oral & maxillofacial implants* **24 Suppl**: 218-236

Jensen, S. S., Yeo, A., Dard, M., Hunziker, E., Schenk, R., & Buser, D. (2007) Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs*Clinical oral implants research* **18**: 752-760

Jensen, T., Schou, S., Stavropoulos, A., Terheyden, H., & Holmstrup, P. (2012) Maxillary sinus floor augmentation with bio-oss or bio-oss mixed with autogenous bone as graft in animals: A systematic review*International journal of oral and maxillofacial surgery* **41**: 114-120

John, H. D., & Wenz, B. (2004) Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation*The International journal of oral & maxillofacial implants* **19**: 199-207

Jones, E., & Yang, X. (2011) Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status*Injury* **42**: 562-568

Jung, R. E., Cochran, D. L., Domken, O., Seibl, R., Jones, A. A., Buser, D., & Hammerle, C. H. (2007) The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration*Clinical oral implants research* **18**: 319-325

Jung, R. E., Glauser, R., Scharer, P., Hammerle, C. H., Sailer, H. F., & Weber, F. E. (2003) Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans*Clinical oral implants research* **14**: 556-568

Jung, R. E., Thoma, D. S., & Hammerle, C. H. (2008) Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: A systematic review*Journal of clinical periodontology* **35**: 255-281

Kang, S. J., Shin, S. I., Herr, Y., Kwon, Y. H., Kim, G. T., & Chung, J. H. (2011) Anatomical structures in the maxillary sinus related to lateral sinus elevation: A cone beam computed tomographic analysis *Clinical oral implants research*

Karring, T., Nyman, S., Gottlow, J., & Laurell, L. (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies *Periodontology 2000* **1**: 26-35

Kasten, P., Beyen, I., Egermann, M., Suda, A. J., Moghaddam, A. A., Zimmermann, G., & Luginbuhl, R. (2008) Instant stem cell therapy: Characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro *European cells & materials* **16**: 47-55

Kent, J. N., & Block, M. S. (1989) Simultaneous maxillary sinus floor bone grafting and placement of hydroxylapatite-coated implants *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **47**: 238-242

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., & Bieback, K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**: 1294-1301

Khaled, E. G., Saleh, M., Hindocha, S., Griffin, M., & Khan, W. S. (2011) Tissue engineering for bone production- stem cells, gene therapy and scaffolds *The open orthopaedics journal* **5 Suppl 2**: 289-295

Khaled, E. G., Saleh, M., Hindocha, S., Griffin, M., & Khan, W. S. (2011) Tissue engineering for bone production- stem cells, gene therapy and scaffolds *The open orthopaedics journal* **5 Suppl 2**: 289-295

Khojasteh, A., Behnia, H., Dashti, S. G., & Stevens, M. (2012) Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: A review of the literature *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **70**: 972-982

Khojasteh, A., Eslaminejad, M. B., & Nazarian, H. (2008) Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **106**: 356-62; discussion 363

Khojasteh, A., Morad, G., & Behnia, H. (2013) Clinical importance of recipient site characteristics for vertical ridge augmentation: A systematic review of literature and proposal of a classification *The Journal of oral implantology* **39**: 386-398

Kim, B. C., Yoon, J. H., Choi, B., & Lee, J. (2013) Mandibular reconstruction with autologous human bone marrow stem cells and autogenous bone graft in a patient with plexiform ameloblastoma *The Journal of craniofacial surgery* **24**: e409-11

Kim, J., Kim, I. S., Cho, T. H., Lee, K. B., Hwang, S. J., Tae, G., Noh, I., Lee, S. H., Park, Y., & Sun, K. (2007) Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells *Biomaterials* **28**: 1830-1837

Kim, S. W., Lee, I. K., Yun, K. I., Kim, C. H., & Park, J. U. (2009) Adult stem cells derived from human maxillary sinus membrane and their osteogenic differentiation *The International journal of oral & maxillofacial implants* **24**: 991-998

Kim, Y., Nowzari, H., & Rich, S. K. (2013) Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: A systematic review *Clinical implant dentistry and related research* **15**: 645-653

Kirmeier, R., Payer, M., Wehrsuetz, M., Jakse, N., Platzer, S., & Lorenzoni, M. (2008) Evaluation of three-dimensional changes after sinus floor augmentation with different grafting materials *Clinical oral implants research* **19**: 366-372

Klein, M., Goetz, H., Pazen, S., Al-Nawas, B., Wagner, W., & Duschner, H. (2009) Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography *Clinical oral implants research* **20**: 67-74

Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., Heiland, M., Wolff, K. D., & Smeets, R. (2012) Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*

Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones *Journal of Biomedical Materials Research* **49**: 328-337

Kubler, A., Neugebauer, J., Oh, J. H., Scheer, M., & Zoller, J. E. (2004) Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: An in vitro study *Implant dentistry* **13**: 171-179

Kurkcu, M., Benlidayi, M. E., Cam, B., & Sertdemir, Y. (2012) Anorganic bovine-derived hydroxyapatite versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation. A comparative histomorphometric study *The Journal of oral implantology*

Kurkcu, M., Benlidayi, M. E., Cam, B., & Sertdemir, Y. (2012) Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation: A comparative histomorphometric study *The Journal of oral implantology* **38 Spec No**: 519-526

Le Blanc, K., & Pittenger, M. (2005) Mesenchymal stem cells: Progress toward promise *Cytotherapy* **7**: 36-45

Le Blanc, K., & Ringden, O. (2006) Mesenchymal stem cells: Properties and role in clinical bone marrow transplantation *Current opinion in immunology* **18**: 586-591

Lee, D. Z., Chen, S. T., & Darby, I. B. (2012) Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: A clinical and histomorphometric study *Clinical oral implants research* **23**: 918-924

Lee, J., Sung, H. M., Jang, J. D., Park, Y. W., Min, S. K., & Kim, E. C. (2010) Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **68**: 188-194

Lee, K., Chan, C. K., Patil, N., & Goodman, S. B. (2009) Cell therapy for bone regeneration--bench to bedside *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **89**: 252-263

Lekholm, U., Gunne, J., Henry, P., Higuchi, K., Linden, U., Bergstrom, C., & van Steenberghe, D. (1999) Survival of the branemark implant in partially edentulous jaws: A 10-year prospective multicenter study *The International journal of oral & maxillofacial implants* **14**: 639-645

Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Vasilic, N., & Kenney, E. B. (2002) Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A reentry study *Journal of periodontology* **73**: 198-205

Levander G (1934) On the formation of new bone in bone transplantation. *Acta Chirurgica Scandinavica* 74:425

Lexer E (1929) Knochenneubildung im Bindegewebe osteoblastischer Herkunft. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie* 217:1-32

Lin, Y., Tang, W., Wu, L., Jing, W., Li, X., Wu, Y., Liu, L., Long, J., & Tian, W. (2008) Bone regeneration by BMP-2 enhanced adipose stem cells loading on alginate gel *Histochemistry and cell biology* **129**: 203-210

Linde, A., Alberius, P., Dahlin, C., Bjurström, K., & Sundin, Y. (1993) Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis *Journal of periodontology* **64**: 1116-1128

Lindhe J., Lang N., Karring Th. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, Blackwell Munksgaard, 5th Edition* (2008)

Liu, X., & Ma, P. X. (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering *Annals of Biomedical Engineering* **32**: 477-486

Lohberger, B., Payer, M., Rinner, B., Bartmann, C., Stadelmeyer, E., Traunwieser, E., Devaney, T., Jakse, N., Leithner, A., & Windhager, R. (2011) Human intraoral harvested mesenchymal stem cells: Characterization, multilineage differentiation analysis, and 3-dimensional migration of natural bone mineral and tricalcium phosphate scaffolds *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*

Lu, J., Descamps, M., Dejou, J., Koubi, G., Hardouin, P., Lemaitre, J., & Proust, J. P. (2002) The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone *Journal of Biomedical Materials Research* **63**: 408-412

Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., Endresen, K., Ilebekk, A., Mangschau, A., Fjeld, J. G., Smith, H. J., Taraldsrud, E., Groggaard, H. K., Bjornerheim, R., Brekke, M., Muller, C., Hopp, E., Ragnarsson, A., Brinchmann, J. E., & Forfang, K. (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction *The New England journal of medicine* **355**: 1199-1209

Lundgren, A., Lundgren, D., & Taylor, A. (1998) Influence of barrier occlusiveness on guided bone augmentation. an experimental study in the rat *Clinical oral implants research* **9**: 251-260

Lundgren, S., Cricchio, G., Palma, V. C., Salata, L. A., & Sennerby, L. (2008) Sinus membrane elevation and simultaneous insertion of dental implants: A new surgical technique in maxillary sinus floor augmentation *Periodontology 2000* **47**: 193-205

Lyford, R. H., Mills, M. P., Knapp, C. I., Scheyer, E. T., & Mellonig, J. T. (2003) Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: A case series *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **23**: 417-425

Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A., & Robey, P. G. (2001) In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: Effect of carrier particle size and shape *Biotechnology and bioengineering* **72**: 96-107

- Mardon, H. J., Bee, J., von der Mark, K., & Owen, M. E. (1987) Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats *Cell and tissue research* **250**: 157-165
- Margolin, M. D., Cogan, A. G., Taylor, M., Buck, D., McAllister, T. N., Toth, C., & McAllister, B. S. (1998) Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: A comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral *Journal of periodontology* **69**: 911-919
- Marie, P. J., & Fromigue, O. (2006) Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells *Regenerative medicine* **1**: 539-548
- Martin, I. P., Baldomero, H., Bocelli-Tyndall, C., Emmert, M., Hoerstrup, S. P., Ireland, H., Passweg, J., & Tyndall, A. (2013) The survey on cellular and engineered tissue therapies in europe in 2011 *Tissue engineering. Part A*
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **85**: 638-646
- Maulitz, R. C. (1978) Rudolf virchow, julius cohnheim and the program of pathology *Bulletin of the history of medicine* **52**: 162-182
- McAllister, B. S., Haghighat, K., & Gonshor, A. (2009) Histologic evaluation of a stem cell-based sinus-augmentation procedure *Journal of periodontology* **80**: 679-686
- McWilliams, C. A. (1917) The treatment of bony defects of the lower jaw *Annals of Surgery* **65**: 283-296
- Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., & van Blitterswijk, C. A. (2008) Cell based bone tissue engineering in jaw defects *Biomaterials* **29**: 3053-3061
- Merkx, M. A., Maltha, J. C., & Stoelinga, P. J. (2003) Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: A review of clinical reports *International journal of oral and maxillofacial surgery* **32**: 1-6

Merli, M., Migani, M., Bernardelli, F., & Esposito, M. (2006) Vertical bone augmentation with dental implant placement: Efficacy and complications associated with 2 different techniques. A retrospective cohort study *The International journal of oral & maxillofacial implants* **21**: 600-606

Mesimäki, K., Lindroos, B., Tornwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., & Suuronen, R. (2009) Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells *International journal of oral and maxillofacial surgery* **38**: 201-209

Metzler, P., von Wilmslow, C., Zimmermann, R., Wiltfang, J., & Schlegel, K. A. (2012) The effect of current used bone substitution materials and platelet-rich plasma on periosteal cells by ectopic site implantation: An in-vivo pilot study *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* **40**: 409-415

Misch, C. E., & Dietsh, F. (1993) Bone-grafting materials in implant dentistry *Implant dentistry* **2**: 158-167

Misch, C. M. (1997) Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement *The International journal of oral & maxillofacial implants* **12**: 767-776

Miura, M., Miura, Y., Sonoyama, W., Yamaza, T., Gronthos, S., & Shi, S. (2006) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region *Oral diseases* **12**: 514-522

Mott, D. A., Mailhot, J., Cuenin, M. F., Sharawy, M., & Borke, J. (2002) Enhancement of osteoblast proliferation in vitro by selective enrichment of demineralized freeze-dried bone allograft with specific growth factors *The Journal of oral implantology* **28**: 57-66

Muschler, G. F., Boehm, C., & Easley, K. (1997) Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **79**: 1699-1709

Muschler, G. F., Boehm, C., & Easley, K. (1997) Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume *The Journal of bone and joint surgery.American volume* **79**: 1699-1709

Nevins, M., Giannobile, W. V., McGuire, M. K., Kao, R. T., Mellonig, J. T., Hinrichs, J. E., McAllister, B. S., Murphy, K. S., McClain, P. K., Nevins, M. L., Paquette, D. W., Han, T. J., Reddy, M. S., Lavin, P. T., Genco, R. J., & Lynch, S. E. (2005) Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial *Journal of periodontology* **76**: 2205-2215

Niemeyer, P., Szalay, K., Luginbuhl, R., Sudkamp, N. P., & Kasten, P. (2010) Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model *Acta biomaterialia* **6**: 900-908

Nissan, J., Marilena, V., Gross, O., Mardinger, O., & Chaushu, G. (2012) Histomorphometric analysis following augmentation of the anterior atrophic maxilla with cancellous bone block allograft *The International journal of oral & maxillofacial implants* **27**: 84-89

Nkenke, E., & Stelzle, F. (2009) Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: A systematic review *Clinical oral implants research* **20 Suppl 4**: 124-133

Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J., & Planten, S. (1980) Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue *Journal of clinical periodontology* **7**: 394-401

Oberdahlhoff H (1947) Zur Frage der Knochenneubildung. *Chirurgie* **17/18**:123-129

Obwegeser, H. (1951) Free cartilage and bone transplantation to the maxillary region with penicillin *Osterreichische Zeitschrift fur Stomatologie* **48**: 130-138

Ohgushi, H., & Caplan, A. I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering *Journal of Biomedical Materials Research* **48**: 913-927

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., & Ueda, M. (2005) Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits*Clinical oral implants research* **16**: 622-629

Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., & Iizuka, T. (2002) Expression of bone morphogenetic protein in the course of osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2*Clinical oral implants research* **13**: 80-85

Ollier L (1867) *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. Victor Masson et Fils, Paris*

Orringer, J. S., Shaw, W. W., Borud, L. J., Freymiller, E. G., Wang, S. A., & Markowitz, B. L. (1999) Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap*Plastic and Reconstructive Surgery* **104**: 793-797

Parma-Benfenati, S., Tinti, C., Albrektsson, T., & Johansson, C. (1999) Histologic evaluation of guided vertical ridge augmentation around implants in humans*The International journal of periodontics & restorative dentistry* **19**: 424-437

Payer, M., Lohberger, B., Stadelmeyer, E., Bartmann, C., Windhager, R., & Jakse, N. (2010) Behaviour of multipotent maxillary bone-derived cells on beta-tricalcium phosphate and highly porous bovine bone mineral*Clinical oral implants research* **21**: 699-708

Payer, M., Lohberger, B., Strunk, D., Reich, K. M., Acham, S., & Jakse, N. (2013) Effects of directly autotransplanted tibial bone marrow aspirates on bone regeneration and osseointegration of dental implants*Clinical oral implants research*

Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Iezzi, G., Piattelli, A., Giardino, R., Bassi, M., Donati, D., & Marchetti, C. (2008) Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: A histomorphometric study in minipigs*Journal of clinical periodontology* **35**: 539-546

- Pierini, M., Dozza, B., Lucarelli, E., Tazzari, P. L., Ricci, F., Remondini, D., di Bella, C., Giannini, S., & Donati, D. (2012) Efficient isolation and enrichment of mesenchymal stem cells from bone marrow *Cytotherapy* **14**: 686-693
- Piersma, A. H., Ploemacher, R. E., & Brockbank, K. G. (1983) Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route *British journal of haematology* **54**: 285-290
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science (New York, N.Y.)* **284**: 143-147
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science (New York, N.Y.)* **284**: 143-147
- Pjetursson, B. E., Rast, C., Bragger, U., Schmidlin, K., Zwahlen, M., & Lang, N. P. (2009) Maxillary sinus floor elevation using the (transalveolar) osteotome technique with or without grafting material. part I: Implant survival and patients' perception *Clinical oral implants research* **20**: 667-676
- Pjetursson, B. E., Tan, W. C., Zwahlen, M., & Lang, N. P. (2008) A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation *Journal of clinical periodontology* **35**: 216-240
- Plachokova, A. S., Nikolidakis, D., Mulder, J., Jansen, J. A., & Creugers, N. H. (2008) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review *Clinical oral implants research* **19**: 539-545
- Pollick, S., Shors, E. C., Holmes, R. E., & Kraut, R. A. (1995) Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **53**: 915-22; discussion 922-3

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutevov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells *The New England journal of medicine* **344**: 385-386

Raghoobar, G. M., Brouwer, T. J., Reintsema, H., & Van Oort, R. P. (1993) Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: A preliminary report *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **51**: 1198-203; discussion 1203-5

Raghoobar, G. M., Schortinghuis, J., Liem, R. S., Ruben, J. L., van der Wal, J. E., & Vissink, A. (2005) Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical oral implants research* **16**: 349-356

Ramirez-Fernandez, M. P., Calvo-Guirado, J. L., Delgado-Ruiz, R. A., Mate-Sanchez Del Val, J. E., Negri, B., & Penarrocha Diago, M. (2012) Ultrastructural study by backscattered electron imaging and elemental microanalysis of biomaterial-to-bone interface and mineral degradation of bovine xenografts in maxillary sinus floor elevation *Clinical oral implants research*

Richter, H. E., Jr, Sugg, W. E., Jr, & Boyne, P. J. (1968) Stimulation of osteogenesis in the dog mandible by autogenous bone marrow transplants *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **26**: 396-405

Richter, W., & Diederichs, S. (2009) Regenerative medicine in orthopaedics. cell therapy - tissue engineering - in situ regeneration *Der Orthopade* **38**: 859-67; quiz 868-9

Rickert, D., Sauerbier, S., Nagursky, H., Menne, D., Vissink, A., & Raghoobar, G. M. (2011) Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: A prospective randomized clinical trial *Clinical oral implants research* **22**: 251-258

- Rickert, D., Slater, J. J., Meijer, H. J., Vissink, A., & Raghoobar, G. M. (2012) Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review *International journal of oral and maxillofacial surgery* **41**: 160-167
- Riecke, B., Heiland, M., Hothan, A., Morlock, M., Amling, M., & Blake, F. A. (2011) Primary implant stability after maxillary sinus augmentation with autogenous mesenchymal stem cells: A biomechanical evaluation in rabbits *Clinical oral implants research* **22**: 1242-1246
- Rocchietta, I., Fontana, F., & Simion, M. (2008) Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: A systematic review *Journal of clinical periodontology* **35**: 203-215
- Roldan, J. C., Jepsen, S., Miller, J., Freitag, S., Rueger, D. C., Acil, Y., & Terheyden, H. (2004) Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7 *Bone* **34**: 80-90
- Roldan, J. C., Jepsen, S., Schmidt, C., Knuppel, H., Rueger, D. C., Acil, Y., & Terheyden, H. (2004) Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7 *Clinical oral implants research* **15**: 716-723
- Rossa, C., Jr, Marcantonio, E., Jr, Cirelli, J. A., Marcantonio, R. A., Spolidorio, L. C., & Fogo, J. C. (2000) Regeneration of class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs *Journal of periodontology* **71**: 775-784
- Runyan, C. M., & Taylor, J. A. (2010) Clinical applications of stem cells in craniofacial surgery *Facial plastic surgery : FPS* **26**: 385-395
- Ruskin, J. D., Hardwick, R., Buser, D., Dahlin, C., & Schenk, R. K. (2000) Alveolar ridge repair in a canine model using rhTGF-beta 1 with barrier membranes *Clinical oral implants research* **11**: 107-115

Rydygier LR (1908) Zum osteoplastischen Ersatz nach Unterkieferresektion. *Zentralbl Chir* 45: 1321–1323

Sartori, S., Silvestri, M., Forni, F., Icaro Cornaglia, A., Tesei, P., & Cattaneo, V. (2003) Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (bio-oss). A case report with histomorphometric evaluation *Clinical oral implants research* 14: 369-372

Sauerbier, S., Palmowski, M., Vogeler, M., Nagursky, H., Al-Ahmad, A., Fisch, D., Hennig, J., Schmelzeisen, R., Gutwald, R., & Fasol, U. (2009) Onset and maintenance of angiogenesis in biomaterials: In vivo assessment by dynamic contrast-enhanced MRI *Tissue engineering.Part C, Methods* 15: 455-462

Sauerbier, S., Rickert, D., Gutwald, R., Nagursky, H., Oshima, T., Xavier, S. P., Christmann, J., Kurz, P., Menne, D., Vissink, A., Raghoobar, G., Schmelzeisen, R., Wagner, W., & Koch, F. P. (2011) Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: A controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial--per-protocol analysis *Tissue engineering.Part A* 17: 2187-2197

Sauerbier, S., Stricker, A., Kuschnierz, J., Buhler, F., Oshima, T., Xavier, S. P., Schmelzeisen, R., & Gutwald, R. (2010a) In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method *Tissue engineering.Part C, Methods* 16: 215-223

Sauerbier, S., Stubbe, K., Maglione, M., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Oshima, T., Xavier, S. P., Brunnberg, L., Schmelzeisen, R., & Gutwald, R. (2010b) Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures--an experimental study in sheep *Tissue engineering.Part C, Methods* 16: 1033-1039

Saulacic, N., Somoza-Martin, M., Gandara-Vila, P., & Garcia-Garcia, A. (2005) Relapse in alveolar distraction osteogenesis: An indication for overcorrection *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 63: 978-981

Schaaf, H., Streckbein, P., Lendeckel, S., Heidinger, K., Gortz, B., Bein, G., Boedeker, R. H., Schlegel, K. A., & Howaldt, H. P. (2008) Topical use of platelet-rich plasma to influence bone volume in maxillary augmentation: A prospective randomized trial *Vox sanguinis* **94**: 64-69

Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Suselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A. M., & REPAIR-AMI Investigators (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction *The New England journal of medicine* **355**: 1210-1221

Schincaglia, G. P., & Nowzari, H. (2001) Surgical treatment planning for the single-unit implant in aesthetic areas *Periodontology 2000* **27**: 162-182

Schlegel, A. K. (1996) Bio-oss bone replacement material. long-term results with bio-oss bone replacement material *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO* **106**: 141-149

Schlegel, K. A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S., & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute *The International journal of oral & maxillofacial implants* **18**: 53-58

Schlegel, K. A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S., & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute *The International journal of oral & maxillofacial implants* **18**: 53-58

Schmitt, S. C., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Kuschnierz, J., Al-Ahmad, A., Huebner, U., Schmelzeisen, R., & Gutwald, R. (2008) Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects *Journal of materials science. Materials in medicine* **19**: 1441-1450

Schroeder, J. E., & Mosheiff, R. (2011) Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence *Injury* **42**: 609-613

Schwartz, Z., Doukarsky-Marx, T., Nasatzky, E., Goultschin, J., Ranly, D. M., Greenspan, D. C., Sela, J., & Boyan, B. D. (2008) Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow *Clinical oral implants research* **19**: 1233-1245

Schweiberer, L. (1970) Experimental studies on bone transplantation with unchanged and denaturated bone substance. A contribution on causal osteogenesis *Hefte zur Unfallheilkunde* **103**: 1-70

Seebach, C., Schultheiss, J., Wilhelm, K., Frank, J., & Henrich, D. (2010) Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro *Injury* **41**: 731-738

Seeger, F. H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: A comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction *European heart journal* **28**: 766-772

Seeger, F. H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: A comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction *European heart journal* **28**: 766-772

Seeger, F. H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: A comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction *European heart journal* **28**: 766-772

Seibert, J., & Nyman, S. (1990) Localized ridge augmentation in dogs: A pilot study using membranes and hydroxyapatite *Journal of periodontology* **61**: 157-165

Seibert, J. S. (1983) Reconstruction of deformed, partially edentulous ridges, using full thickness onlay grafts. part I. technique and wound healing *The Compendium of continuing education in dentistry* **4**: 437-453

Shayesteh, Y. S., Khojasteh, A., Soleimani, M., Alikhasi, M., Khoshzaban, A., & Ahmadbeigi, N. (2008) Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **106**: 203-209

Siemssen, S. O., Kirkby, B., & O'Connor, T. P. (1978) Immediate reconstruction of a resected segment of the lower jaw, using a compound flap of clavicle and sternomastoid muscle *Plastic and Reconstructive Surgery* **61**: 724-735

Simion, M., Baldoni, M., Rossi, P., & Zaffe, D. (1994) A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **14**: 166-180

Simion, M., Dahlin, C., Rocchietta, I., Stavropoulos, A., Sanchez, R., & Karring, T. (2007) Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: An experimental study in dogs *Clinical oral implants research* **18**: 86-94

Simion, M., Rocchietta, I., Kim, D., Nevins, M., & Fiorellini, J. (2006) Vertical ridge augmentation by means of deproteinized bovine bone block and recombinant human platelet-derived growth factor-BB: A histologic study in a dog model *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **26**: 415-423

Simunek, A., Kopecka, D., Somanathan, R. V., Pilathadka, S., & Brazda, T. (2008) Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: A comparative histologic and histomorphometric study *The International journal of oral & maxillofacial implants* **23**: 935-942

Slater, B. J., Kwan, M. D., Gupta, D. M., Panetta, N. J., & Longaker, M. T. (2008) Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering *Expert opinion on biological therapy* **8**: 885-893

Smiler, D., Soltan, M., & Lee, J. W. (2007) A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells *Implant dentistry* **16**: 42-53

Smiler, D. G., Johnson, P. W., Lozada, J. L., Misch, C., Rosenlicht, J. L., Tatum, O. H., Jr, & Wagner, J. R. (1992) Sinus lift grafts and endosseous implants. treatment of the atrophic posterior maxilla *Dental clinics of North America* **36**: 151-86; discussion 187-8

Snyder, M. B. (2012) Treatment of a large postextraction buccal wall defect with mineralized allograft, beta-TCP, and rhPDGF-BB: A growth factor-mediated bone regenerative approach *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **32**: 705-711

Sohn, D. S., Kim, W. S., An, K. M., Song, K. J., Lee, J. M., & Mun, Y. S. (2010) Comparative histomorphometric analysis of maxillary sinus augmentation with and without bone grafting in rabbit *Implant dentistry* **19**: 259-270

Sollazzo, V., Palmieri, A., Scapoli, L., Martinelli, M., Girardi, A., Alviano, F., Pellati, A., Perrotti, V., & Carinci, F. (2010) Bio-oss(R)acts on stem cells derived from peripheral blood *Oman medical journal* **25**: 26-31

Sollazzo, V., Palmieri, A., Scapoli, L., Martinelli, M., Girardi, A., Alviano, F., Pellati, A., Perrotti, V., & Carinci, F. (2010) Bio-oss(R)acts on stem cells derived from peripheral blood *Oman medical journal* **25**: 26-31

Spector, M. (1994) Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration *Clinics in plastic surgery* **21**: 437-444

Spin-Neto, R., Stavropoulos, A., Coletti, F. L., Faeda, R. S., Pereira, L. A., & Marcantonio, E., Jr (2013) Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation *Clinical oral implants research*

Srouji, S., Kizhner, T., Ben David, D., Riminucci, M., Bianco, P., & Livne, E. (2009) The schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: In vivo and in vitro study *Calcified tissue international* **84**: 138-145

Stavropoulos, A., Becker, J., Capsius, B., Acil, Y., Wagner, W., & Terheyden, H. (2011) Histological evaluation of maxillary sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5-coated beta-tricalcium phosphate: Results of a multicenter randomized clinical trial *Journal of clinical periodontology* **38**: 966-974

Stavropoulos, A., Becker, J., Capsius, B., Acil, Y., Wagner, W., & Terheyden, H. (2011) Histological evaluation of maxillary sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5-coated beta-tricalcium phosphate: Results of a multicenter randomized clinical trial *Journal of clinical periodontology* **38**: 966-974

Stevens, M. R., Emam, H. A., Alaily, M. E., & Sharawy, M. (2010) Implant bone rings. one-stage three-dimensional bone transplant technique: A case report *The Journal of oral implantology* **36**: 69-74

Stoelinga, P. J., de Koomen, H. A., Tideman, H., & Huijbers, T. J. (1983) A reappraisal of the interposed bone graft augmentation of the atrophic mandible *Journal of maxillofacial surgery* **11**: 107-112

Summers, R. B. (1994) A new concept in maxillary implant surgery: The osteotome technique *Compendium (Newtown, Pa.)* **15**: 152, 154-6, 158 passim; quiz 162

Szabo, G., Huys, L., Coulthard, P., Maiorana, C., Garagiola, U., Barabas, J., Nemeth, Z., Hrabak, K., & Suba, Z. (2005) A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: Histologic and histomorphometric evaluation *The International journal of oral & maxillofacial implants* **20**: 371-381

Tadic, D., Peters, F., & Epple, M. (2002) Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites *Biomaterials* **23**: 2553-2559

Tadjoedin, E. S., de Lange, G. L., Holzmann, P. J., Kulper, L., & Burger, E. H. (2000) Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range *Clinical oral implants research* **11**: 334-344

Tatum, H., Jr (1986) Maxillary and sinus implant reconstructions *Dental clinics of North America* **30**: 207-229

Tawil, G., & Mawla, M. (2001) Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (bio-oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (bio-gide): A clinical report of immediate and delayed implant placement *The International journal of oral & maxillofacial implants* **16**: 713-721

Terheyden, H., Jepsen, S., Moller, B., Tucker, M. M., & Rueger, D. C. (1999) Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs *Clinical oral implants research* **10**: 510-521

Terheyden, H., Jepsen, S., & Rueger, D. R. (1999) Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: A preliminary study *International journal of oral and maxillofacial surgery* **28**: 461-463

Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., & Rueger, D. R. (2001) Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: An experimental study in miniature pigs. part I: Prefabrication *International journal of oral and maxillofacial surgery* **30**: 373-379

Terheyden, H., Menzel, C., Wang, H., Springer, I. N., Rueger, D. R., & Acil, Y. (2004) Prefabrication of vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1--part 3: Dosage of rhOP-1, the use of external and internal scaffolds *International journal of oral and maxillofacial surgery* **33**: 164-172

Terry, B. C., Albright, J. E., & Baker, R. D. (1974) Alveolar ridge augmentation in the edentulous maxilla with use of autogenous ribs *Journal of oral surgery (American Dental Association : 1965)* **32**: 429-434

Thor, A., Franke-Stenport, V., Johansson, C. B., & Rasmusson, L. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: Preliminary histomorphometric results *International journal of oral and maxillofacial surgery* **36**: 1164-1171

Thor, A., Franke-Stenport, V., Johansson, C. B., & Rasmusson, L. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: Preliminary histomorphometric results *International journal of oral and maxillofacial surgery* **36**: 1164-1171

Thorwarth, M., Schlegel, K. A., Wehrhan, F., Srouf, S., & Schultze-Mosgau, S. (2006) Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulated anorganic bovine material in vivo *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **101**: 309-316

Tinti, C., & Parma-Benfenati, S. (1998) Vertical ridge augmentation: Surgical protocol and retrospective evaluation of 48 consecutively inserted implants *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **18**: 434-443

Tonetti, M. S., Hammerle, C. H., & European Workshop on Periodontology Group C (2008) Advances in bone augmentation to enable dental implant placement: Consensus report of the sixth european workshop on periodontology *Journal of clinical periodontology* **35**: 168-172

Torroni, A. (2009) Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: State of the art *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **67**: 1121-1127

Tortelli, F., & Cancedda, R. (2009) Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: A tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro *European cells & materials* **17**: 1-14

Triplett, R. G., & Schow, S. R. (1996) Autologous bone grafts and endosseous implants: Complementary techniques *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **54**: 486-494

Trubiani, O., Fulle, S., Traini, T., Paludi, M., la Rovere, R., Orciani, M., Caputi, S., & Piattelli, A. (2010) Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial *European cells & materials* **20**: 72-83

Tsuchida, H., Hashimoto, J., Crawford, E., Manske, P., & Lou, J. (2003) Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**: 44-53

Turgeman, G., Pittman, D. D., Muller, R., Kurkalli, B. G., Zhou, S., Pelled, G., Peyser, A., Zilberman, Y., Moutsatsos, I. K., & Gazit, D. (2001) Engineered human mesenchymal stem cells: A novel platform for skeletal cell mediated gene therapy *The journal of gene medicine* **3**: 240-251

Urist, M. R. (1965) Bone: Formation by autoinduction *Science (New York, N.Y.)* **150**: 893-899

Vahabi, S., Amirizadeh, N., Shokrgozar, M. A., Mofeed, R., Mashhadi, A., Aghaloo, M., Sharifi, D., & Jabbareh, L. (2012) A comparison between the efficacy of bio-oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration *Chang Gung medical journal* **35**: 28-37

Valentini, P., & Abensur, D. J. (2003) Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: A clinical report of long-term results *The International journal of oral & maxillofacial implants* **18**: 556-560

van den Bergh, J. P., ten Bruggenkate, C. M., Disch, F. J., & Tuinzing, D. B. (2000) Anatomical aspects of sinus floor elevations *Clinical oral implants research* **11**: 256-265

van Steenberghe, D., Lekholm, U., Bolender, C., Folmer, T., Henry, P., Herrmann, I., Higuchi, K., Laney, W., Linden, U., & Astrand, P. (1990) Applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: A prospective multicenter study on 558 fixtures *The International journal of oral & maxillofacial implants* **5**: 272-281

von Arx, T., & Buser, D. (2006) Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: A clinical study with 42 patients *Clinical oral implants research* **17**: 359-366

Wang, H. L., & Al-Shammari, K. (2002) HVC ridge deficiency classification: A therapeutically oriented classification *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **22**: 335-343

Walther, Ph (1821) Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. *J Chir Augenheilkd* **2**: 571–583

Warnke, P. H., Springer, I. N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M., Russo, P. A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., & Terheyden, H. (2004) Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man *Lancet* **364**: 766-770

Weber, H. P., Crohin, C. C., & Fiorellini, J. P. (2000) A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants *Clinical oral implants research* **11**: 144-153

Wikesjo, U. M., Qahash, M., Huang, Y. H., Xiropaidis, A., Polimeni, G., & Susin, C. (2009) Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications *Orthodontics & craniofacial research* **12**: 263-270

Wikesjo, U. M., Qahash, M., Thomson, R. C., Cook, A. D., Rohrer, M. D., Wozney, J. M., & Hardwick, W. R. (2004) rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration *Clinical oral implants research* **15**: 194-204

Winter L (1943) Operative oral surgery. *2nd edn.* Henry Kimpton, London, p 814

Wiltfang, J., Merten, H. A., Schlegel, K. A., Schultze-Mosgau, S., Kloss, F. R., Rupprecht, S., & Kessler, P. (2002) Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs *Journal of Biomedical Materials Research* **63**: 115-121

Wu, W., Chen, X., Mao, T., Chen, F., & Feng, X. (2006) Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES* **12**: 268-276

Wulf, G. G., Chapuy, B., & Trumper, L. (2006) Mesenchymal stem cells from bone marrow. phenotype, aspects of biology, and clinical perspectives *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* **101**: 408-413

Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J. M., & Daculsi, G. (1997) Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios *Biomaterials* **18**: 1037-1041

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., & Nagasaka, T. (2004) Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: Tissue-engineered bone regeneration *Tissue engineering* **10**: 955-964

Yildirim, M., Spiekermann, H., Biesterfeld, S., & Edelhoff, D. (2000) Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material bio-oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans *Clinical oral implants research* **11**: 217-229

Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S., & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft bio-oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans *The International journal of oral & maxillofacial implants* **16**: 23-33

Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S., & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft bio-oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: A histologic and histomorphometric clinical study in humans *The International journal of oral & maxillofacial implants* **16**: 23-33

Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. A., & Evans, G. R. (2007) In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model *Tissue engineering* **13**: 619-627

Zerbo, I. R., de Lange, G. L., Joldersma, M., Bronckers, A. L., & Burger, E. H. (2003) Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: A histological and histomorphometric study *Clinical oral implants research* **14**: 759-766

Zhang, R., & Ma, P. X. (1999) Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. preparation and morphology *Journal of Biomedical Materials Research* **44**: 446-455

Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Lee, E. S., Tan, L. G., Mattar, C. N., Fisk, N. M., Choolani, M., & Chan, J. (2010) Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects *Biomaterials* **31**: 608-620

Anhang

Patienteninformation und Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der klinischen Prüfung

Die Wirkung eines Konzentrates von multipotenten Knochenmarkszellen¹ auf die Knochregeneration und die Osseointegration² von Zahnimplantaten nach Sinusbodenelevation³

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Sie haben sich dazu entschlossen, an der oben genannten klinischen Prüfung teilzunehmen. Die Aufklärung darüber erfolgt in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch.

Die Teilnahme an einer klinischen Prüfung ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile in Ihrer medizinischen Betreuung entstehen.

Klinische Prüfungen sind notwendig, um verlässliche neue medizinische Forschungsergebnisse zu gewinnen. Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung einer klinischen Prüfung ist jedoch, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser klinischen Prüfung schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum Informationsgespräch mit Ihrem Arzt/Ihrer Ärztin sorgfältig durch und zögern Sie nicht Fragen zu stellen.

Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der klinischen Prüfung vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer/in an dieser klinischen Prüfung im Klaren sind.

Zu dieser klinischen Prüfung sowie zur Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurde von der zuständigen Ethikkommission eine befürwortende Stellungnahme abgegeben.

¹Sog. Vorläuferzellen mit der Fähigkeit sich in unterschiedliche Zellarten zu differenzieren (z.B. Knochenzellen)

²knöchernes Einheilen von in diesem Fall Zahnimplantaten

³Anheben des Kieferhöhlenbodens um in diesem Bereich für eine spätere Implantation Knochen aufbauen zu können

Der beidseits im Oberkiefer geplante Kieferaufbau (Sinuslift) und das nachfolgende Setzen von Implantaten sind bewährte Routineeingriffe. Die beigelegten Standardaufklärungsbögen („Aufbaumethoden“ Pro Compliance Nr.: MKG 33 und „Zahnimplantat“ Pro Compliance Nr.: MKG 17) erklären ausführlich diese Eingriffe und beschreiben auch mögliche Komplikationen. Bitte dokumentieren Sie auch auf diesen Bögen Ihr Einverständnis zu den geplanten Eingriffen.

Im Folgenden werden Sie im Speziellen über die für die klinische Prüfung relevanten Details informiert.

Was ist das Ziel der klinischen Prüfung?

Das Ziel dieser klinischen Prüfung ist es zu prüfen, ob das Einbringen eines Knochenmarkaspirates in den bei Ihnen notwendigen Knochenaufbau eine nachweisbare Verbesserung der Knochenregeneration und der Einheilung der gesetzten Implantate bewirkt. Die dazu verwendeten Zellen werden von Ihnen selbst, unmittelbar vor dem Knochenaufbau, aus dem Knochenmark vom Becken entnommen und durch ein Konzentrierungsverfahren aussortiert.

Was ist Routinebehandlung? Was ist Teil der klinischen Prüfung?

Der beidseitige Kieferaufbau (Sinuslift) ist ein chirurgisches Standardverfahren in der Implantologie. Als Knochenaufbaumaterial verwendet man dazu entweder Eigenknochen (entnommen aus der Kieferregion, dem Schienbein oder dem Hüftknochen) oder Knochenersatzmaterialien. In Ihrem Fall wird der Kieferaufbau beidseits mit einem geprüften und bewährten Knochenersatzmaterial (BioOss®) durchgeführt. Teil der klinischen Prüfung ist es, dass auf einer Seite Knochenmarkszellen in das Knochenersatzmaterial eingebracht werden. Diese werden im Rahmen des Knochenaufbaus („Sinuslift-Operation“) (siehe unten) von Ihrem Becken entnommen.

Um die Integration des Knochenersatzmaterials in den Körper im Verlauf zur Zeit exakt zu untersuchen, sind MRT-Untersuchungen⁴ direkt nach der OP, nach 1, 2, 3 und 6 Monaten nötig. Dieses Verfahren ist mit keiner Strahlenbelastung verbunden und gibt uns wichtige Informationen über die Neubildung von Blutgefäßen im Bereich des Knochenaufbaus.

Auch das Setzen der Implantate – 6 Monate nach dem Kieferaufbau – ist ein chirurgisches Standardverfahren in der Implantologie. Entsprechend der prothetischen Planung werden insgesamt 4 – 8 geprüfte und bewährte Implantate gesetzt. Teil der klinischen Prüfung ist es, dass zur Kontrolle und Messung der Knochenregeneration (Knochenheilung) aus dem Kieferaufbau Knochenproben entnommen werden. Die ersten Knochenproben werden 12 Wochen nach dem Kieferaufbau in einem kleinen zusätzlichen Eingriff in lokaler Anästhesie entnommen. Die zweite Serie von Knochenproben wird im Rahmen der Implantation 24 Wochen nach dem Knochenaufbau entnommen und bedeutet keinen zusätzlichen Eingriff.

Zur Vermessung des Knochenaufbaus werden auch Computertomographie- Untersuchungen (dreidimensionale Röntgenuntersuchungen) benötigt. Die erste Computertomographie des Oberkiefers vor der Behandlung ist dabei eine Routineuntersuchung. Die Computertomographie-Untersuchungen unmittelbar und 12 Monate nach erfolgtem Kieferaufbau dienen ausschließlich Studienzwecken.

⁴Magnetresonanztomographie unter Kontrastmittelzugabe zur Überprüfung der Bildung von Blutgefäßen im Knochenaufbau

Eingriffe und Untersuchungen, die ausschließlich der klinischen Prüfung dienen:

- Blutabnahme vor der Operation zur Kreatininbestimmung (im Rahmen der Magnetresonanz-Untersuchung)
- Gewinnung multipotenter Knochenmarkszellen (Beckenpunktion)
- Qualitätskontrolle der Knochenmarkszellen (histologisches Labor)
- MRT Untersuchungen am ersten Tag nach dem Eingriff, sowie 1, 2, 3 und 6 Monate nach dem Eingriff
- Knochenproben 3 und 6 Monate nach dem Kieferaufbau
- Computertomographie des Oberkiefers unmittelbar nach Kieferaufbau, sowie 6 und 12 Monate nach Kieferaufbau

Welche Schritte umfasst die Behandlung/klinische Prüfung?

Gewinnung multipotenter Knochenmarkszellen:

Im Zuge des bei Ihnen geplanten Knochenaufbaus („Sinuslift“) erfolgt die Gewinnung durch Punktion (siehe Aufklärungsbogen „Knochenmarkpunktion“: IP4, 08/05) und Aufziehen von 60 ml Knochenmark mit einer sterilen Nadel und Spritze am Hüftknochen. Der Eingriff erfolgt in lokaler Betäubung unter Sedierung mit Dormicum in Bauch- oder Linksseitenlage. Sie werden für diesen Eingriff tagesklinisch an der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie aufgenommen und werden am gleichen Tag wieder entlassen.

Die Wunde wird mit einer Naht oder einem Pflasterverband verschlossen.

Kieferaufbau:

Durch den Verlust von Zähnen auf beiden Seiten unterlag Ihr Oberkieferknochen einem starken Abbau. Um bei Ihnen künstliche Zahnwurzeln in Form von Titanimplantaten einsetzen zu können, muss 6 Monate vor der Implantation ein innerer Knochenaufbau am Kieferhöhlenboden (Sinuslift-Operation) auf beiden Seiten im Oberkiefer durchgeführt werden (s. Abb. bzw Aufklärungsbogen: „Aufbaumethoden“ Pro Compliance Nr.: MKG 33).

Auf einer Seite wird der Knochenaufbau mit reinem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss® = Kontrollseite) durchgeführt, auf der anderen Seite (Testseite) wird dem Knochenersatzmaterial das Knochenmarkspunktat beigemischt (ob die Kontroll- bzw. Testseite bei Ihnen links oder rechts liegt, wird unmittelbar vor dem Knochenaufbau zufällig mittels Los entschieden). Die Dauer dieses Eingriffes beträgt ca. 90 – 120 Minuten.

Knochenproben:

3 Monate nach dem Knochenaufbau werden zur Beurteilung der Knochenheilung und -neubildung in einem kurzen Eingriff (ca. 15 Minuten) in lokaler Betäubung links und rechts am Oberkiefer kleine Knochenproben entnommen und mikroskopisch ausgewertet.

6 Monate nach dem Knochenaufbau werden im Rahmen der Implantation weitere Knochenproben entnommen.

Implantation:

6 Monate nach dem beidseitigen Knochenaufbau (Sinuslift) werden beidseits 3 – 4 herkömmliche Titan-Zahnimplantate (Xife®, Fa. Dentsply-Friadent, Mannheim, Deutschland) gesetzt. Der Eingriff erfolgt in lokaler Betäubung und dauert ca. 60 – 90 Minuten (s. Aufklärungsbogen Zahnimplantate: „Zahnimplantat“ Pro Compliance Nr.: MKG 17).

Implantatfreilegung:

6 Monate nach der Implantation werden die Implantate in einem kleinen Eingriff (30 min.) operativ freigelegt und für die prothetische Versorgung vorbereitet.

Messungen im Rahmen der klinischen Prüfung. Folgende Parameter werden untersucht:

- Prüfung des entnommenen Knochenmarkspunktates auf Zell-Quantität und Qualität
- Messung der Angiogenese⁵ im Knochenaufbau mittels kontrastmittelunterstütztem MRT
- Histologische Messung der Knochenneubildung in den Knochenproben
- Vergleich von Implantatfestigkeit (Perio-Test® und Insertionstorque) zwischen Test- und Kontrollseite als Maß der Implantateinheilung
- Röntgenologische Untersuchung der Volumenstabilität des Knochenaufbaus

⁵Neubildung von Blutgefäßen

⁶ Es handelt sich dabei um eine Vorstufe von Zellen, die sich erst zu Knochenzellen entwickeln, wenn sie sich im entsprechenden Zielorgan befinden

Werden die Knochenmarkszellen auch für andere Zwecke verwendet?

Die von Ihnen entnommenen Zellen dienen ausschließlich dieser klinischen Prüfung, und werden nicht für andere Behandlungen bzw. bei anderen Patienten verwendet.

Ein Teil der Zellen wird im Labor einer Qualitätskontrolle unterzogen (zum Nachweis, ob es sich um vitale und knochenbildende Vorläuferzellen⁶ handelt). Diese werden an der Abteilung für Stammzellforschung (Doz. Dr. Strunk Dirk, Universitätsklinik Graz) für maximal 3 Jahre aufbewahrt.

Ich stimme der Zellaufbewahrung zu:

ja ☐

nein ☐

Die Vernichtung der Proben kann auch nach der Zustimmung zur Studie jederzeit von Ihnen verlangt werden.

Welche anderen Behandlungsmöglichkeiten gibt es?

Der Kieferaufbau kann auch **ohne multipotente Knochenmarkszellen** beidseits ausschließlich mit Knochenersatzmaterial erfolgen.

Der Kieferaufbau kann auch **ohne multipotente Knochenmarkszellen** beidseits ausschließlich mit Eigenknochen (z.B. vom Schienbein entnommen) bzw. mit einem Gemisch aus Eigenknochen und Knochenersatzmaterial erfolgen.

Alternativ können Ihre fehlenden Zähne auch durch einen nicht Implantat getragenen Zahnersatz ersetzt werden, wie z.B.: - Vollprothesen

Was sind multipotente Knochenmarkszellen?

Diese Zellen findet man in Knochenmark, Blut und verschiedenen Organen (Knochen, Knorpel, Haut, Darm...). Es handelt sich um Vorläuferzellen, die sich noch zu organspezifischen Zellen weiterentwickeln können. Sie haben damit bedeutendes Heilungsvermögen (Regenerationspotenzial).

Idee dieser klinischen Studie ist es, das Heilungsvermögen (Regenerationspotenzial) von Knochenmarkszellen auszunützen und durch ihre Beimengung zum herkömmlichen Knochenersatzmaterial eine höhere und eventuell auch schnellere Knochenheilung und -neubildung zu bewirken.

Diese Art der Therapie befindet sich jedoch trotz erster Erfolge in klinischer Erprobung und ist als Standardtherapieform noch nicht zugelassen und genehmigungspflichtig.

Ergeben sich Vorteile durch die Teilnahme an der klinischen Prüfung?

Mit der Anwendung von multipotenten Knochenmarkszellen im Rahmen von Knochenaufbauten kann möglicherweise die Knochenheilung und Knochenneubildung gesteigert werden und somit eine bessere Implantateinheilung stattfinden.

Das bedeutet für Sie, dass möglicherweise auf der Testseite eine bessere Knochenregeneration nachweisbar ist. Es ist jedoch auch möglich, dass es zu keiner nachweislich verbesserten Knochenregeneration kommt.

Auf der Kontrollseite kommt es in jedem Fall zu einer herkömmlich funktionierenden Knochenheilung.

Die Ergebnisse dieser klinischen Prüfung sollen jedenfalls dazu beitragen, dass für zukünftige Patienten Wege zur Verbesserung, Beschleunigung und Vereinfachung der Behandlung von Kieferdefekten gefunden werden.

Mit Ihrer Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung unterstützen Sie die Wissenschaft auf einem Weg, der letztendlich zu höherem Patientenkomfort führen soll. Als Entschädigung für die zusätzlichen Beschwerlichkeiten, die Sie damit auf sich nehmen, entfallen für Sie die gesamten Operationskosten und die Kosten für Knochenersatzmaterialien und Implantate.

Gibt es Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen?

Über Wirkung und Nebenwirkungen, die im Rahmen der Behandlung mit multipotenten Knochenmarkszellen im zahnärztlichen Bereich auftreten können, gibt es bislang keine gesicherten Daten.

Eine Unverträglichkeit im Sinne einer allergischen Reaktion kann, da es sich ja um körpereigene Zellen handelt, die weder verändert noch vermehrt werden, ausgeschlossen werden.

Wie mit jeder neuen Substanz können jedoch auch bei der Anwendung von multipotenten Knochenmarkszellen bisher unbekannte Nebenwirkungen, wie zum Beispiel ein eventuell zu starkes oder sogar unkontrolliertes Wachstum der Knochenzellen auftreten. Ergebnisse aus Tierversuchen zeigten jedoch keinerlei solche Nebenwirkungen.

Darüber hinaus können die im Rahmen dieser klinischen Prüfung durchgeführten Maßnahmen zu folgenden Beschwerden führen:

1) Punktion am Hüftknochen:

- Schmerzen, Schwellung, leichte Nachblutung
- mögliche anhaltende Schmerzen im Bereich der Entnahmeregion am Hüftknochen
- mögliches Taubheitsgefühl im Bereich der Entnahmeregion klingt in der Regel nach einigen Tagen von selbst ab
- mögliche postoperative Entzündungen sollen durch Antibiotika-Gabe verhindert werden

2) Entnahme der Knochenproben aus dem Knochenaufbau:

- leichter Wundschmerz, geringe Schwellung

Müssen zusätzlich zur Routinemedikation Arzneimittel eingenommen werden?

Bei Kieferaufbauten und Implantatoperationen werden routinemäßig Antibiotika (Clindamycin 300 mg 3 x 1 für 5 Tage) und Schmerzmittel (Diclofenac 50 mg 3 x 1 für 4 Tage) verschrieben.

Hat die Teilnahme an der klinischen Prüfung sonstige Auswirkungen auf die Lebensführung und welche Verpflichtungen ergeben sich daraus?

Zusätzliche ambulante Klinikaufenthalte:

- Entnahme von Knochenprobe nach 3 Monaten (ca. 15 Minuten Operationszeit)
- Durchführung von Panoramaröntgen zur Planung des Knochenaufbaus, zur Planung der Implantation und zur Verlaufskontrolle nach Implantatsetzung.
- Durchführung von Nasennebenhöhlen – CT Aufnahmen vor dem Knochenaufbau, unmittelbar nach dem Knochenaufbau, sowie 6 und 12 Monate nach dem Knochenaufbau.
- Anfertigung von kontrastmittelunterstützten Magnetresonanztomographien direkt nach der Operation, sowie 1, 2, 3, und 6 Monate postoperativ zum Nachweis des Einwachsens von Blutgefäßen in den Knochenaufbau.

Postoperative Empfehlungen nach Knochenentnahme am Hüftknochen:

- normale Belastung (gehen, stehen...) sofort möglich
- Rad fahren, laufen... nach einer Woche
- kein Extremsport, keine Sauna und kein heißes Bad für 14 Tage

Was ist zu tun beim Auftreten von Symptomen, Begleiterscheinungen und/ oder Verletzungen?

Sollten im Verlauf der klinischen Prüfung irgendwelche Symptome, Begleiterscheinungen oder Verletzungen auftreten, bitten wir Sie, diese Ihrem Arzt/Ihrer Ärztin umgehend mitzuteilen (Telefonnummern, etc. siehe unten).

Informationen für gebärfähige Frauen - Schwangerschaftstests

Schwangere und stillende Frauen dürfen an dieser klinischen Prüfung NICHT teilnehmen.

Als gebärfähige Frau dürfen Sie an der klinischen Prüfung nur teilnehmen,

- wenn ein Arzt vor und einmal monatlich während der klinischen Prüfung das Nichtvorliegen einer Schwangerschaft (Schwangerschaftstest) feststellt.

- wenn Sie sich verpflichten während der Dauer eine zuverlässige Art der Empfängnisverhütung (Pille, Spirale) zu praktizieren.

Sollten Sie dennoch während der klinischen Prüfung schwanger werden oder den Verdacht haben, dass Sie schwanger geworden sind, informieren Sie bitte umgehend Ihre/n Prüfarzt/-ärztin (Tel. s. unten).

Es ist mit keiner direkten fruchtschädigenden Wirkung durch Ihre Teilnahme an der Untersuchung zu rechnen. Da sich aus Ihrer Teilnahme jedoch die Notwendigkeit ergibt in regelmäßigen Abständen strahlenbelastende Untersuchungen (Röntgen, Computertomographie) durchzuführen, ist im Falle einer Schwangerschaft die Teilnahme an der Studie abzubrechen.

Wann wird die klinische Prüfung vorzeitig beendet?

Sie können jederzeit auch ohne Angabe von Gründen Ihre Teilnahmebereitschaft widerrufen und aus der klinischen Prüfung ausscheiden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre weitere medizinische Betreuung entstehen.

Ihr/e Prüfarzt/-ärztin wird Sie über alle neuen Erkenntnisse, die in Bezug auf diese klinische Prüfung bekannt werden sollten und für Sie wesentlich werden könnten, umgehend informieren. Auf dieser Basis können Sie Ihre Entscheidung zur weiteren Teilnahme an dieser klinischen Prüfung laufend neu überdenken.

Es ist aber auch möglich, dass Ihr/e Prüfarzt/-ärztin entscheidet, Ihre Teilnahme an der klinischen Prüfung vorzeitig zu beenden, ohne vorher Ihr Einverständnis einzuholen. Die Gründe hierfür können sein:

- a) Sie entsprechen nicht den Erfordernissen der klinischen Prüfung;
- b) Ihr/e behandelnde/r Arzt/Ärztin hat den Eindruck, dass eine weitere Teilnahme an der klinischen Prüfung nicht in Ihrem Interesse ist.

Sofern Sie sich dazu entschließen, vorzeitig aus der klinischen Prüfung auszuschneiden, oder Ihre Teilnahme aus einem der oben genannten Gründe vorzeitig beendet wird, ist es für Ihre eigene Sicherheit wichtig, dass Sie die normale Routinebehandlung weiter fortsetzen.

In welcher Weise werden die im Rahmen dieser klinischen Prüfung gesammelten Daten verwendet?

Sofern gesetzlich nicht etwas anderes vorgesehen ist, haben nur die Prüfer/innen und deren Mitarbeiter/innen sowie in- und ausländische Gesundheitsbehörden Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt werden. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht.

Die Weitergabe der Daten im In- und Ausland erfolgt ausschließlich zu statistischen Zwecken und Sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser klinischen Prüfung werden Sie nicht namentlich genannt.

Entstehen für die Teilnehmer Kosten? Gibt es einen Kostenersatz oder eine Vergütung?

Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Prüfung entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten.

Für Ihre Teilnahme an dieser klinischen Prüfung erhalten Sie eine Vergütung entsprechend den folgenden Bedingungen:

Durch Ihre Teilnahme an unserer Untersuchung erhalten Sie eine Vergütung in der Form, dass sowohl Operations-, als auch Materialkosten (Implantate, Knochenersatzmaterial) für Sie entfallen, sofern die Teilnahme an der Studie bis zum Studienabschluss erfolgt. Sollte Ihr Ausscheiden von der Studienteilnahme aus medizinischen oder anderen schwerwiegenden Gründen erfolgen, entstehen für Sie keine weiteren Kosten.

Möglichkeit zur Diskussion weiterer Fragen

Für weitere Fragen im Zusammenhang mit dieser klinischen Prüfung stehen Ihnen Ihr/e Prüfarzt/-ärztin und seine/ihre Mitarbeiter/innen gerne zur Verfügung. Auch Fragen, die Ihre Rechte als Patient/in und Teilnehmer/in an dieser klinischen Prüfung betreffen, werden Ihnen gerne beantwortet.

Kontaktpersonen:

1) Univ.-Doz. DDr. Michael Payer

erreichbar unter: +43 (316) 385-82936

2) Univ.-Ass. Dr. Angelika Wildburger

erreichbar unter: +43(316) 385-80887

2) Univ.-Prof. DDr. Norbert Jakse

erreichbar unter: +43 (316) 385-82921

Einwilligungserklärung

Name des/der Patienten/in in Druckbuchstaben:

Geb.-Datum:.....

Code:.....

Ich erkläre mich bereit, an der klinischen Prüfung

Die Wirkung von multipotenten Knochenmarkszellen auf Knochregeneration und die Osseointegration von Zahnimplantaten nach Sinusbodenelevation

teilzunehmen.

Ich bin von Frau/Herrn Dr. ausführlich und verständlich über multipotente Knochenmarkszellen, mögliche Belastungen und Risiken sowie über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Prüfung, die bestehende Versicherung, sowie die sich für mich daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text dieser Patientenaufklärung und Einwilligungserklärung, die insgesamt 14 Seiten umfasst, gelesen. Aufgetretene Fragen wurden mir vom/von der Prüfarzt/-ärztin verständlich und genügend beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit mich zu entscheiden. Ich habe zurzeit keine weiteren Fragen mehr.

Ich werde den ärztlichen Anordnungen, die für die Durchführung der klinischen Prüfung erforderlich sind, Folge leisten, behalte mir jedoch das Recht vor, meine freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden, ohne dass mir daraus Nachteile für meine weitere medizinische Betreuung entstehen.

Ich bin zugleich damit einverstanden, dass meine im Rahmen dieser klinischen Prüfung ermittelten Daten aufgezeichnet werden. Um die Richtigkeit der Datenaufzeichnung zu überprüfen, dürfen zuständige Behörden beim/bei der Prüfarzt/-ärztin Einblick in meine personenbezogenen Krankheitsdaten nehmen.

Beim Umgang mit den Daten werden die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet.

Eine Kopie dieser Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim/bei der Prüfarzt/-ärztin.

.....
(Datum und Unterschrift der Patientin/des Patienten)

.....
(Datum, Name und Unterschrift der/des verantwortlichen Ärztin/Arztes)

Patientenprüfbogen

Patient/in: _____ **Patientenprüfnummer** ____

Alter: _____

Geschlecht: _____

1) Knochenmarkgewinnung

Datum:

(Knochenmarkspunktion)

Becken: _____ ml

2) Kieferaufbau

Datum:

(Beidseitiger Sinuslift und Stammzellapplikation auf der Testseite)

Testseite _____ **Regio** _____

Bio-Oss® _____ mg + Knochenmarkzellkonzentrat _____ ml appliziert

Kontrollseite _____ **Regio** _____

Bio-Oss® _____ mg appliziert

3) Knochenbiopsie I

Datum:

(Knochenbiopsie bds. in der augmentierten Region 3 Monate nach Augmentation)

Testseite: Regio: ____

Kontrollseite: Regio: ____

4) Implantation und Knochenbiopsie II

Datum:

(Bds. Implantation und Knochenbiopsie II in der augmentierten Region 6 Monate nach Augmentation)

Biopsie:

Testseite: Regio: ____

Kontrollseite: Regio: ____

Implantation:

	Typ	Position	Länge/Durchmesser	Torque
Testseite:	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
Kontrollseite:	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____
	_____	_____	_____	_____

5) Messung der Implantatstabilität (Periotest®)

Torquecontrol (bei Implantation)

Datum:

Testseite:	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____

Kontrollseite:	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____

Periotest® (bei Freilegung, 4 Monate nach Implantation)

Datum:

Testseite:	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____

Kontrollseite:	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____
	Pos _____	Periotest _____

Periotest® (9 Monate nach Implantation)

Datum:

Testseite:

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Kontrollseite:

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Periotest® (12 Monate nach Implantation)

Datum:

Testseite:

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Kontrollseite:

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

Pos_____

Periotest_____

6) Panoramaröntgen

- prae Augm.: Datum: _____
- post Augm.: Datum: _____
- prae Impl.: (6 Monate nach Augm.): Datum: _____
- post. Impl.: Datum: _____
- 4 Monate nach Impl (bei Freilegung): Datum: _____
- 12 Monate nach Impl : Datum: _____

7) CT OK - Dental/NNH

- **prae OP** (Augmentation): Datum: _____

Volumetrische Vermessung des Knochenaufbaus:

- **post OP** (Augmentation): Datum: _____

Testseite: _____ cm³ Kontrollseite: _____ cm³

- **6 Monate post OP**(nach Augm., präimpl.):Datum: _____

Testseite: _____ cm³ Kontrollseite: _____ cm³

- **12 Monate post OP**(nach Augmentation):Datum: _____

Testseite: _____ cm³ Kontrollseite: _____ cm³

Angelika Wildburger
Michael Payer
Norbert Jakse
Dirk Strunk
Nathalie Etchard-
Liechtenstein
Sebastian Sauerbier

Impact of autogenous concentrated bone marrow aspirate on bone regeneration after sinus floor augmentation with a bovine bone substitute – a split-mouth pilot study

Authors' affiliations:

Angelika Wildburger, Michael Payer, Norbert Jakse, Department of Oral Surgery and Radiology, Medical University of Graz, Graz, Austria
Dirk Strunk, Institute of Experimental and Clinical Cell Therapy & Spinal Cord Injury-Tissue Regeneration Center, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria
Nathalie Etchard-Liechtenstein, Stem Cell Research Unit, Medical University of Graz, Graz, Austria
Sebastian Sauerbier, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Medical University of Freiburg, Freiburg, Germany

Corresponding author:

Angelika Wildburger
Department of Oral Surgery and Radiology
Medical University of Graz
Auenbruggerplatz 12, Graz A-8044, Austria
Tel.: +4331638512936
Fax: +4331638516858
e-mail: angelika.wildburger@medunigraz.at

Key words: bone regeneration, bone substitutes, clinical research, clinical trials, guided tissue regeneration, sinus floor elevation

Abstract

Purpose: Mesenchymal stem cells (MSC) with biomaterials have osteoinductive potential. The aim of this study was to evaluate early bone formation in xenogenic sinus grafts in a direct comparison with and without MSCs after 3 and 6 months. Literature on bone formation in pure xenogenic graft materials after 3 months in a human model is still lacking.

Materials and methods: In a split-mouth design, seven patients with a bilateral highly atrophic posterior maxilla were included. The test side was grafted with MSCs from concentrated bone marrow aspirate admixed to the bone graft material. On the control side, pure bovine bone material was applied. Biopsies were taken navigated after 3 and 6 months.

Results: After 3 months, new bone formation in the control group was 11.8% (SD 6.2%) and in the test group 7.4% (SD 4.1%). After 6 months, the control group showed 13.9% (SD 8.5%) of new bone and the test group 13.5% NB (SD 5.4%). The fraction of bovine bone material after 3 months was 42.6% (SD 3.5%) in the test group and 34.9% (SD 11.8%) in the control group. After 6 months, the biomaterial content was comparable at both sides (test 36.2%, SD 7.8%; control 39.5%, SD 9.3%).

Conclusions: There was no significant difference in new bone formation between the test and control group with $n = 7$. The results may be dominated by the high mineral content of the biomaterial but could nevertheless be valuable for meta-analysis in the future.

Implant placement in the posterior maxilla is often difficult because of qualitative and quantitative limitations of the residual bone (Beaumont et al. 2008). Sinus floor elevation, introduced by Boyne & James (1980) and Tatum (1986), has been developed to a safe and effective surgical technique for implant placement (van den Bergh et al. 2000; Schlegel et al. 2003; Beaumont et al. 2008; Cordaro et al. 2008; Lundgren et al. 2008; Rickert et al. 2011).

Various grafting materials have been applied in sinus floor elevation. Autogenous bone, allografts, xenografts and alloplastic materials, as well as combinations of various materials, have been used (Hallman et al. 2002; Schlegel et al. 2003; Cordaro et al. 2008; Kirmeier et al. 2008). Autogenous bone is still considered as the gold standard for bone reconstruction because of its osteoinductive and osteoconductive properties and

the absence of immunologic resistance (Jakse et al. 2001; Schlegel et al. 2003; Hallman & Thor 2008). However, autogenous bone harvesting is often accompanied by donor-site morbidity and tends to higher resorption in the healing period than deproteinised bovine bone material, which allows the penetration of vital bone layers through the interconnecting pores of the avital hydroxyapatite trabecular structure without being resorbed (Yildirim et al. 2001; Schlegel et al. 2003; Szabo et al. 2005). A major drawback of alloplastic and xenogenic bone graft materials is the lack of osteoinductivity and the subsequent long healing time before implant placement (John & Wenz 2004). Furthermore, they are not very suitable as exclusive material for large reconstructions (Khaled et al. 2011; Rickert et al. 2011). Allogenic bone material has an osteoinductive potential because of the bone morphogenetic protein (BMPs)

Date:
Accepted 3 June 2013

To cite this article:
Wildburger A, Payer M, Jakse N, Strunk D, Etchard-Liechtenstein N, Sauerbier S. Impact of autogenous concentrated bone marrow aspirate on bone regeneration after sinus floor augmentation with a bovine bone substitute – a split-mouth pilot study.
Clin. Oral Impl. Res. 00, 2013, 1–17
doi: 10.1111/clr.12228

© 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

1

released from the bone during the demineralisation process [Boyan et al. 2006]. But the concentration varies, and histological studies document a slower bone formation in allografts than in autogenous bone grafts [Buser et al. 1998].

Studies therefore aim to find tools to accelerate and raise bone formation in bone substitutes [Jakse et al. 2003, 2007; Thorwarth et al. 2006; Thor et al. 2007; Pieri et al. 2008; Shayesteh et al. 2008; Janicki & Schmidmaier 2011; Rickert et al. 2011]. A recent animal study shows that natural bone mineral seeded with concentrated mononuclear bone marrow cells (MNCs) including mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the iliac crest show bone-forming kinetics similar to regions reconstructed with autogenous bone alone [Gutwald et al. 2010]. Furthermore, Herten concluded that hydroxyapatite (i.e. Bio-Oss®) supports cell viability and allows cell proliferation [Herten et al. 2009]. Multipotential MSCs have the unique capability of differentiating between a variety of cell types based on the inducing signals received from the recipient tissue [Pieri et al. 2008; Gonshor et al. 2011]. Because the number of MSCs in bone marrow aspirates is low, one proposal is to concentrate these cells. Preliminary studies have shown predictable results with MSCs isolated by the FICOLL method [Fuerst et al. 2004; Sauerbier et al. 2010a]. But limitations of this method – such as a time-consuming procedure, high costs and the need for a good manufacturing practice laboratory – make it poorly suited for daily practice. Closed systems for a chair-side concentration of MSCs have therefore been introduced [Hermann et al. 2008; Sauerbier et al. 2010b; Rickert et al. 2011]. In a prospective randomised clinical trial, Rickert found a significantly higher bone formation after sinus augmentation with a bovine bone material and an MSC concentrate than in the control group with a mixture of a bovine bone material and autogenous bone after 3 months [Rickert et al. 2011]. However, there are no evaluations documented in literature of early new bone formation after 3 months in pure xenogenic bone material in a human model.

Aim of this study was to evaluate early bone formation in xenogenic sinus grafts [bovine bone material, BBM] in a direct comparison with and without concentrated MSC after 3 and 6 months in humans. The histomorphometric data should confirm the hypothesis that a BBM in a combination with concentrated MSC evokes a higher new bone formation than a BBM alone.

Material and methods

The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the Medical University of Graz, Austria [reference number of the present project 20-138 ex 08/09] and conforms to the Declaration of Helsinki. CONSORT 2010 checklist for randomized trials was conducted [Table S1]. In a randomised controlled split-mouth design, seven patients (average age 58 years, range 47–72) with a bilateral highly atrophic maxilla (residual bone height <3 mm) requiring sinus augmentation and implant treatment were included. Patients with metabolic disease, a history of radiotherapy in the head or neck region, therapy with bisphosphonates or corticosteroids and intolerance for local anaesthesia were excluded from the study. Informed consent was obtained from all patients. The test graft was a bovine bone mineral (BBM) [Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland] mixed with a concentrate of mononuclear bone marrow cells (MNC) including mesenchymal stem cells (MSC) harvested from the posterior iliac crest. The control-site graft was BBM alone. Biopsies for histomorphometric analysis were taken navigated [ExpertEase® System, Dentsply-Friadent] at the planned implant sites 3 and 6 months after sinus augmentation. Implants were inserted after 6 months simultaneously with second biopsy harvesting. Orthopantomograms were taken pre- and post-grafting (Fig. 1a,b) as well as pre- and post-implantation. Additionally, CT scans were taken pre- and post-augmentation and after 6 months before implantation to evaluate the pristine bone before augmentation and the augmented bone volume after grafting. Furthermore, CT

scans were taken for virtual planning of the splint for navigated biopsy surgeries and implantations.

Harvesting of mononuclear bone marrow cells

All patients were treated under sedation with 7.5 mg Dormicum® [Midazolamhydrochlorid] p.o. and 3 mg Dormicum® i.v. Local anaesthesia was applied in the region of the bone puncture with 1.7 ml Ultracain dental® (4% Articain, Sanofi Aventis, Vienna, Austria). The right pelvic bone was punctured 2 cm laterocaudally from the superior posterior iliac crest. With four 15-ml syringes, each containing 2 ml of sodium citric acid solution (3.13%, B.Braun GmbH, Austria), 60 ml of bone marrow was collected. The aspirate was transferred into a chair-side system (BMAC®, Bone Marrow Procedure Pack, Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) to isolate mononuclear cells directly in the operating room. The process of concentrating the bone marrow aspirates took about 15 min. Two millilitre of each – bone marrow aspirate and bone marrow concentrate – was further tested for MSC content and quality.

Surgical procedure

The maxillary bone was grafted internally utilising a lateral window in a modified technique, as described by Kent & Block [1989]. A lateral approach was prepared in the lateral maxillary sinus wall with a hard metal and a diamond round bur. The Schneiderian membrane was carefully released from the maxillary sinus floor and elevated into the sinus. Preoperative randomizing was performed to determine test and control site in each case [Randomizer for Clinical Trials, Institute for Medical Informatics, Statistics and Documentation, Medical Univ. Graz]. The bony floor of the maxillary sinus on the test site was augmented with Bio-Oss® (0.25–1 mm, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) mixed with 3 ml of MSC concentrate (Fig. 2a). The control site was augmented with Bio-Oss® alone (Fig. 2b). About 3.5 ml of bone graft material was augmented at each site. A collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich Pharma AG) was applied to cover the buccal sinus wall defect of the grafted sites and fixed with two titanium pins. On the test side, the membrane was soaked with the cell concentrate-thrombin mix. The mucoperiosteal flap was replaced, and wound closure was conducted with non-resorbable suture material Daiflon 5.0 (B.Braun, Melsungen AG). Patients were released from hospital 2 h after surgery. They were instructed in postoperative

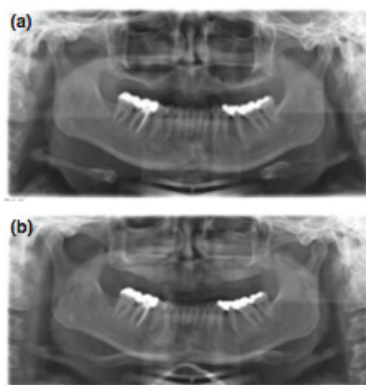


Fig. 1. (a) X-ray depicting the high atrophy of the maxillary jaw before the augmentative surgery. (b) X-ray depicting the situation of the maxillary sinus after augmentation and before the 3-month biopsy.

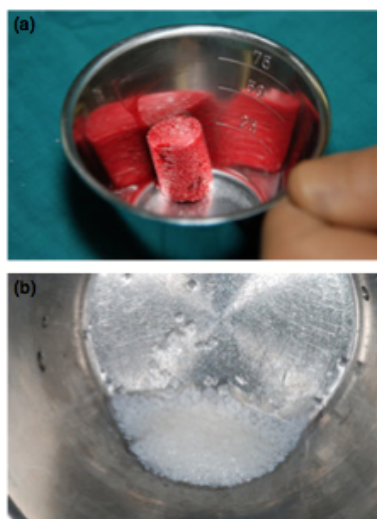


Fig. 2. [a] The image depicts the mixture of bovine bone mineral (BBM) with concentrated bone marrow aspirate (BMAC). Because BMAC is applied in combination with autologous thrombin it forms a stable, cohesive fabric with the biomaterial, which enables good handling abilities. [b] For the control side the bovine bone mineral (BBM) was mixed with physiologic saline solution.

hygiene and behaviour. All patients received antibiotics postoperatively (Penicillin + Clavulanacid 1 g, 2 × 1) and anti-inflammatories (Diclofenac 50 mg, 3 × 1). One week postoperatively, the patients were allowed to wear dentures relined with a soft liner.

Cell culture

The samples were cultured in a laboratory and evaluated for colony-forming units (CFUs) and bone-specific clusters of differentiation (CD) by FACS analysis. 3 ml of bone marrow aspirate concentrate and 1 ml autologous thrombin produced from venous blood (Thrombin Kit, Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) were mixed with 2 g of BBM (Bio-Oss® 0.25–1 mm, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). The harvest of bone marrow aspirates was performed by the same surgeon in all patients.

Harvest of biopsies and implant placement

Biopsies for histomorphometric evaluation were taken navigated in the planned implant sites 3 and 6 months after sinus augmentation. Surgical templates for guided implantation (ExpertEase® System, Dentsply-Friadent, Germany) were prefabricated for taking the biopsies and for implant placement. In each

appointment, one biopsy was taken with a trephine burr (2.8 mm internal diameter, 18 mm length; Komet dental, Salzburg, Austria) bilaterally from the regions of the second premolar or the first molar correlating with the results of the randomisation (Randomizer for Clinical Trials, Institute for Medical Informatics, Statistics and Documentation, Medical Univ. Graz). The 6-month biopsies were taken at the time of implant placement. During surgery of the 6-month biopsies, six to eight implants (Xive, Dentsply-Friadent, Germany) were inserted depending on the residual teeth and the alveolar bone volume. Trephine burrs including the bony probes were stored in 4% formaldehyde solution (Merck, Darmstadt, Germany).

Histomorphometric evaluation

The entire area of the trephine biopsy above the pristine bone of the sinus was defined as region of interest (ROI) and histomorphometrically evaluated (Fig. 3a). Histological evaluation and histomorphometric analysis were performed at the Hard Tissue Research Laboratory, Department of Oral- and Maxillofacial Surgery, University Hospital Freiburg. Two histology specialists judged the correctness of the marked area in the histomorphometry before the area was analysed. Percentage values were determined for the new bone forma-

tion (NBF) and the bovine bone material (BBM). The bone biopsies were prepared as described in a study by Sauerbier et al. (2011). The burrs with the bone biopsies were fixed in formalin for 48 h, rinsed in water and dehydrated in stages in increasing concentrations of alcohol (70%, 80%, 90% and 100%) for 3 days in each concentration. After dehydration, the samples were infiltrated with resin (Technovit 7200 VLC, Heareus-Kulzer, Hanau, Germany) for 2 weeks. The resin was polymerised in a UV light chamber for 10 h. Sections were prepared with the method of Donath & Breuner (1982). After hardening, two sections of 300–400 µm thickness were cut with a diamond micro saw (Microslice, IBS, Cambridge, GB) parallel to the axis of the burr. The sections were placed on an acrylic slide (Maertin, Freiburg, Germany) and reduced to a thickness of approximately 100 µm on a rotating grinding plate (Struers, Ballerup, Denmark). To differentiate between Bio-Oss® particles, pristine and newly formed bone, the samples were stained with Azur II and Pararosanilin. Histomorphometric analysis was conducted with a light microscope (Axiovert 135, Zeiss, Koehn, Germany) (Gutwald et al. 2010). Marking of the various tissues and measurement was conducted with the computer software AnalysISD Soft Imaging system (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany). During the whole analysis, histologists were blinded to the samples' groups.

Statistical analysis

The results concerning the parameters NBF and BBM (Bio-Oss®) were explained with descriptive intention to treat analysis and expressed as percentage and standard deviation.

Results

Bone marrow aspiration

In all patients, 60 ml of bone marrow could be aspirated without any complications. Two millilitre was separated for further laboratory investigations. The centrifugation in the BMAC® system resulted in each case in 5–6 ml of bone marrow concentrate. In three cases, bone marrow aspirates coagulated during the centrifugation process.

Sinus grafting

During the following bilateral sinus lift procedures, a small perforation of the Schneiderian membrane occurred in three sinuses (one from the control group and two from the test group) because of hindered preparation in

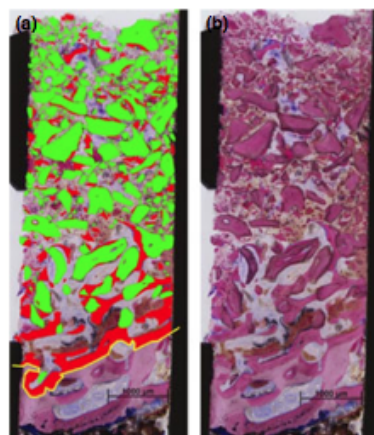


Fig. 3. [a] The average new bone formation was measured in an area of interest (ROI), which was defined in the histological slices as the area of the trephine burr biopsies above the pristine bone. It is separated from the unevaluated area by the yellow line shown in the image. For histomorphometric evaluation bovine bone mineral (BBM) was marked green and newly formed bone (NB) was marked in red colour. [b] Biopsies were taken after 3 and 6 months. The specimen were stained with Pararosanilin Azur II.

the presence of a sinus floor septum or cicatrization of the membrane due to past sinus operations, such as the closure of the sinus following tooth extraction. In these cases, a collagen membrane (Bio-Gide®, Geistlich Pharma AG) was inserted and caused uneventful healing. Neither postoperative loss of bone particles through the nose nor postoperative inflammation of the sinus was observed in the following period.

Biopsies

As described in Material and Methods, biopsies were taken from all patients after 3 and 6 months without sinus perforation. The mean length of the harvested biopsies was 8 mm. Because of insufficient osseointegration of the bone substitute and therefore incomplete collection of the biopsy, one 6-month biopsy from the test group was excluded from the study.

Fifty-two implants were planned and placed computer-assisted with primary stability. Six to eight implants in each patient were inserted at the same time with second biopsy harvesting. The average dental implant healing time was 4 months. Sufficient prosthetic treatment could be achieved in all patients.

Analysis of MSC quality and quantity

In three cases, coagulation occurred during the concentration process. Only four cases showed a regular process of concentration. A mean of 40×10^6 mononuclear cells (MNCs) per millilitre aspirate were obtained. MNCs were, on average, 4.48-fold enriched after BMAC centrifugation, with no coagulation observed ($121 \times 10^6/\text{ml}$). An average of 4.43 CFU/million MNCs were isolated from the non-coagulated samples. In the coagulated samples, the MNC numbers were on average 0.59-fold after processing. After

coagulation, 3.83 CFU/million MNCs were found. FACS analysis showed a regular mesenchymal stem cell (MSC) morphology and FACS profile (positive for CD 90, CD 73, CD 105; negative for CD 14, CD 19 and CD 45).

Histology

The samples from test and control site were similar. The biopsies showed newly formed mature lamellar bone interconnecting and tightly integrating BBM granules. New bone and BBM formed dense trabecular structures. Soft tissue was well perfused with no signs of inflammation. NBF appeared dark red and could be easily identified from the BBM particles with Azur II Pararosanilin staining. NBF was even found in the macropores of the BBM particles. Blood vessels could be detected in all biopsy samples (Fig. 3b).

Histomorphometry

The 3-month bone biopsies showed an NBF of 7.4% (SD 4.1%) on the test side and 11.8% (SD 6.2%) on the control side. After 6 months, 13.5% (SD 5.4%) of new bone was evaluated on the test side and 13.9% (SD 8.5%) on the control side. The fraction of bovine bone material after 3 months was 42.6% (SD 3.5%) at the test side and 34.9% (SD 11.8%) at the control side. After 6 months, the biomaterial content was comparable at both sides (test 36.2%, SD 7.8%; control 39.5%, SD 9.3%) [Table 1]. Figure 4 indicates a faster new bone formation on the test side over the whole 6-month healing time, which cannot be confirmed definitely because of the wide and overlapping 95% confidence intervals. The intra-individual data show that the NBF continually increases from 3 to 6 months in every patient of the test group, whereas in the control group, data vary (Fig. 5a). The fraction of BBM has the

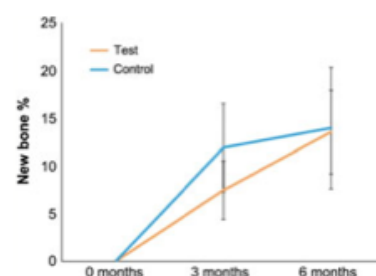


Fig. 4. Biopsies were taken after 3 and 6 months. The chart displays the histomorphometric results of patients ($n = 7$) with orderly concentrated bone marrow aspirate (BMAC) applied to the test side. The light blue line stands for the control side in which bovine bone mineral (BBM) and saline solution were used for augmentation. The orange line symbolizes the test side, where BBM and BMAC were applied. The vertical black lines stand for the 95%-confidence intervals. For individual results see Table 1.

tendency to decrease from 3 to 6 months in both the test and the control group (Fig. 5b).

Discussion

The primary aim of the presented split-mouth study was to obtain valuable histomorphometric data about early bone formation in BBM admixed with a concentrate of MSCs in comparison with a sinus augmentation with pure BBM. A healing time of 6 months was chosen before dental implants were placed in order not to compromise implant survival on the control side. The local ethics committee allowed taking trephine burr biopsies after 3 and 6 months healing time. To the best of our knowledge, there is no description in literature of a split-mouth design evaluating early new bone formation in pure BBM as a control in a human model after 3 months.

Table 1. Percentage values of new bone formation and bovine bone material in the test and the control group after 3 and 6 months of healing time.

Patient ID	% New bone				% Bio-Oss®				Coagulation
	3 months		6 months		3 months		6 months		
	Test	Control	Test	Control	Test	Control	Test	Control	
1	14.2	8.9	15.95	24.2	43.4	40.0	44.2	39.6	Coagulation
2	12.1	20.7	22.2	27.9	37.0	25.7	29.5	20.1	Coagulation
3	7.6	3.2	*	7.8	46.1	50.8	*	46.1	Non-coagulation
4	5.95	7.95	9.15	9.75	38.7	46.4	41.4	42.4	Non-coagulation
5	3.95	12.3	7.6	6.3	42.6	18.3	41.4	47.7	Coagulation
6	4.2	10.9	15.8	12.8	45.2	26.4	24.1	37.1	Non-coagulation
7	4.2	19.3	10.5	8.9	45.8	37.5	37.0	43.7	Non-coagulation
Median	5.95	10.9	13.15	9.75	43.4	37.5	39.2	42.4	
Mean	7.46	11.89	13.53	13.95	42.67	34.99	36.27	39.51	
SD	4.14	6.24	5.47	8.57	3.57	11.89	7.87	9.3	

*No biopsy, unsuccessful sample harvest.

*No biopsy, unsuccessful sample harvest.

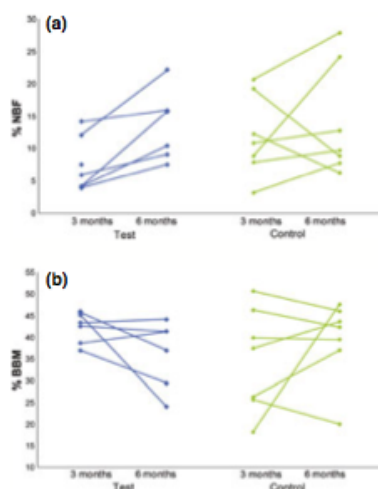


Fig. 5. (a) Intra-individual results of new bone formation (NBF) in the test and the control group after 3 and 6 months. In one patient of the test group the biopsy taken after 6 months failed. (b) Intra-individual results of the fraction of bovine bone material (BBM) in the test and the control group after 3 and 6 months.

The study resulted in NBF data for 14 sinuses treated with pure BBM and a mixture of BBM with a concentrate of MNCs. In three patients, the bone marrow aspirate partially coagulated during centrifugation. The three coagulated bone marrow samples showed no concentration of MNCs in the quality control. The enrichment in the coagulated samples was 0.59-fold, thus a decrease in available MNCs. In the four remaining patients with orderly bone marrow processing, a 4.48-fold MNC increase was achieved. This corresponds with other BMAC studies: Hermann et al. (2008) found a 3.8-fold MNC increase by the BMAC procedure. Sauerbier et al. (2011) achieved a 4.6-fold increase. None of the authors described a coagulation during the concentration process. They and Rickert et al. (2011) flushed the bone marrow aspiration needle and the aspiration syringe with a 1000 U/ml heparin solution before filling 8 ml of citric acid for anticoagulation of 52 ml of bone marrow aspirate into the aspiration syringe. In the present study citric acid was used in the aspiration syringe only. The aspiration needle was not flushed with any anticoagulant, and no heparin solution was used. The authors therefore recommend flushing aspiration needles and syringes with heparin solution in addition to the use of citric acid as anticoagulant to avoid possible coagulation. Despite of the partial coagulation in some samples, none of the results from any of these samples showed a differ-

ence in bone formation values compared with the results of the non-coagulated samples ($n = 4$). It remains questionable whether there is a relationship between the number of MNCs and bone regenerative potential.

After 3 months, the percentage of NB in the grafted material was higher on the control side, whereas after 6 months, NB increased more on the test side. The steeper inclination of the orange line indicates a faster new bone formation on the test side over the whole 6-month healing time. This trend cannot definitely be confirmed because of the wide and overlapping 95% confidence intervals (Fig. 4). Rickert et al. (2011) could demonstrate significantly more bone formation in a mixture of BBM with a concentrate [BMAC] of MNC [$17.7 \pm 7.3\%$] compared with the control group with a mixture of natural bone mineral and autogenous bone [$12.0 \pm 6.6\%$] after a healing time of 4 months. In a sheep model, Gutwald et al. (2010) could also show higher bone regeneration values when BBM was combined with FICOLL-extracted MNCs (29%) compared to autogenous bone as a control group (16%) after 4 months. Fuerst et al. (2009) showed a sufficient bone regeneration (17.9%) with culture-expanded autogenous bone cells after 6 months. But open systems like the FICOLL method are costly, and transfusion regulations have to be applied if the method is not used in an experimental setting. A practical clinical approach therefore requires an approved closed system that can be used chair-side. Sauerbier et al. (2010a) found NBF with BMAC-concentrated MNCs (19.9% NB after 3.7 months) comparable with the FICOLL method (15.5% NB after 6.8 months). Cell isolation protocols have a major impact on the functional activity of bone marrow-derived progenitor cells [Sauerbier et al. 2010a]. As in the studies of Rickert et al. (2011) and Sauerbier et al. (2010b, 2011), no correlation between the number of concentrated MNCs and NBF could be seen. One assumption we made was that the denser the biomaterial the lower the early bone ingrowth. In a bilateral sinus lift procedure, Chackartchi et al. (2011) found no significant difference between the volume of new bone in large granules (7.99%, SD 4.23%) versus small granules (14.64%, SD 12.03%) of a bovine bone material in a micro CT analysis. But they did not distinguish between the residual and new bone volume, which could significantly affect the results. Usually, published data of histomorphometric analysis after augmentation with BBM show values of about 40–50% total mineral content with

varying ratios of NBF and residual graft material [Araujo et al. 2010; Galindo-Moreno et al. 2010]. Galindo-Moreno et al. (2010) found that the density of the graft influences the vascularisation rate and thus the differentiation of mesenchymal cells towards bone-forming cells. In the 3- and 6-month values of the present study, new bone formation in the test group [7.4%, SD 4.1/13.5%, SD 5.4%] was reciprocal to the biomaterial content [42.6%, SD 3.5/36.2, SD 7.8%], while in the control group, new bone volume [11.8%, SD 6.2/13.9%, SD 8.5%] and biomaterial were comparable at both time points [34.9%, SD 11.8/39.5%, SD 9.3%]. The above results raise the question of whether bone regeneration depends on the package density of biomaterial granules. Because of overlapping 95% confidence intervals of the test and control sides, this question cannot be clearly answered. In the present study, small BBM granules [0.25–1 mm] with a pore diameter of 300–1500 μ m had been applied. The clotting of the biomaterial after addition of thrombin made it very dense and compact. Larger granules [1–2 mm] would allow less dense application of the biomaterial and subsequently earlier bone formation. Three other sinus augmentation studies have been completed about BMAC in combination with BBM [Sauerbier et al. 2010b, 2011; Rickert et al. 2011]. It is worth noting that a lower BBM density – ranging from 29.0 to 31.3% – was used in those studies compared with the present one. A higher NBF – ranging from 12.6% to 19.9% – was also found after short healing times ranging from 3.4 to 3.8 months. Even the pore size of biomaterials seems to be a significant determinant of the ability to form bone. Materials with pore sizes of less than 100 μ m may not permit cell and capillary invasion and therefore may not induce bone formation [Hallman & Thor 2008]. In their study, Klein et al. (2009) evaluated the pore size of various bone materials with microcomputed tomography. Their results show that the small particles of Bio-Oss[®] have 62% of pores in the range between 60 and 250 μ m, 5% in the <60 μ m and 33% in the 60–250 μ m fraction. These results underline the assumption that the additional clotting of the biomaterial caused denser packaging of the particles and prohibited new bone formation.

Furthermore, cell number and viability may not reflect the functional capacity of cells *in vivo* [Seeger et al. 2007]. The BMAC method allows cells to not be removed from their natural plasma environment, which could help to sustain their functionality [Hermann et al. 2008]. Gruber et al. (2004)

mentioned that the host response may be increased by several factors produced locally by the transplanted cells, which may enhance vascularisation. MSCs were shown to exhibit immunomodulatory properties and to act in a trophic way by secreting bioactive factors. Beyond the difficulties of *ex vivo* enrichment and characterisation, human bone marrow-derived MSCs show a broad variability between individual MSC populations related to the cell number, *in vitro* growth characteristics and differentiation capacity. Parameters such as age and gender of the donor and aspiration technique and location of bone marrow harvest are also discussed regarding their responsibility for the variability observed between individual MSC populations [Janicki & Schmidmaier 2011]. Furthermore, it is difficult to effectively compare findings of various studies, because the isolation methods and culture conditions of MSC differ amongst investigators [Janicki & Schmidmaier 2011]. However, the number of

cells required for new bone formation and their period of activity are still poorly understood, and literature is scarce [Hermann et al. 2008]. Kasten et al. [2008] noted the influence of the number of CFUs gained from the bone marrow aspirate. Using 300 ml of aspirate could result in a 14-fold increase of CFU, whereas a 30 ml of bone marrow aspirate improved the CFU content only slightly over the unprocessed native bone marrow. He concluded that small volumes should not be used for clinical application because only a sufficient number of progenitors could provide a sufficient concentration of progenitors. In the recent study, successful cell concentration was 4.48-fold. The relation of CFUs to MNCs was not altered by the concentration process.

Within the limits of this controlled clinical study, it can be concluded that no positive impact of BMAC on new bone formation in a BBM, as described in literature could be detected. Nevertheless, more studies with a

standardised study protocol and a larger amount of patients are required.

Acknowledgements: The authors gratefully acknowledge DI Irene Mischak for her support with data analysis, as well as Dr. Heiner Nagursky and Annette Lindner for the histological and histomorphometric analysis of the biopsies.

Source of funding

The bovine bone material for the sinus augmentation and the preparation of the biopsies were funded by GeistlichPharma AG [Wolhusen, Switzerland]. The BMAC® centrifuge for the concentration process of the bone marrow aspirate was provided by the Harvest Technologies Corporation [Plymouth, MA, USA].

References

- Araujo, M.G., Liljenberg, B. & Lindhe, J. (2010) Beta-tricalcium phosphate in the early phase of socket healing: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 21: 445–454.
- Beaumont, C., Schmidt, R.J., Tatakis, D.N. & Zafiroopoulos, G.G. (2008) Use of engineered bone for sinus augmentation. *Journal of Periodontology* 79: 541–548.
- van den Bergh, J.P., ten Bruggenkate, C.M., Disch, F.J. & Tuinzing, D.B. (2000) Anatomical aspects of sinus floor elevations. *Clinical Oral Implants Research* 11: 256–265.
- Boyan, B.D., Ranly, D.M., McMillan, J., Sunwoo, M., Roche, K. & Schwartz, Z. (2006) Osteoinductive ability of human allograft formulations. *Journal of Periodontology* 77: 1555–1563.
- Boyne, P.J. & James, R.A. (1980) Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* [American Dental Association: 1965] 38: 613–616.
- Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J.P., Lussi, A., Mettler, D. & Schenk, R.K. (1998) Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clinical Oral Implants Research* 9: 137–150.
- Chackartchi, T., Iezzi, G., Goldstein, M., Klinger, A., Soskolne, A., Piattelli, A. & Shapira, L. (2011) Sinus floor augmentation using large (1–2 mm) or small (0.25–1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* 22: 473–480.
- Cordaro, L., Bosshardt, D.D., Palattella, P., Rao, W., Serino, G. & Chiapasco, M. (2008) Maxillary sinus grafting with bio-oss or straumann bone ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 19: 796–803.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The sage-schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* 11: 318–326.
- Fuerst, G., Strbac, G.D., Vasak, C., Tangl, S., Leber, J., Gahleitner, A., Gruber, R. & Watzek, G. (2009) Are culture-expanded autogenous bone cells a clinically reliable option for sinus grafting? *Clinical Oral Implants Research* 20: 135–139.
- Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F. & Watzek, G. (2004) Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. *Clinical Oral Implants Research* 15: 733–740.
- Galindo-Moreno, P., Padial-Molina, M., Fernandez-Barbero, J.E., Mesa, F., Rodriguez-Martinez, D. & O'Valle, F. (2010) Optimal microvessel density from composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables. *Clinical Oral Implants Research* 21: 221–227.
- Gonshor, A., McAllister, B.S., Wallace, S.S. & Prasad, H. (2011) Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation procedure. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 26: 123–131.
- Gruber, R., Kandler, B., Fuerst, G., Fischer, M.B. & Watzek, G. (2004) Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein [BMP]-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation *in vitro*. *Clinical Oral Implants Research* 15: 575–580.
- Gutwald, R., Haberstroh, J., Kuschierz, J., Kister, C., Lysek, D.A., Maglione, M., Xavier, S.P., Oshima, T., Schmelzeisen, R. & Sauerbier, S. (2010) Mesenchymal stem cells and inorganic bovine bone mineral in sinus augmentation: comparison with augmentation by autologous bone in adult sheep. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 48: 285–290.
- Hallman, M., Sannerby, L. & Lundgren, S. (2002) A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 17: 635–643.
- Hallman, M. & Thor, A. (2008) Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology* 2000 47: 172–192.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herfler, T., von Hesler, C., Andrassy, J., Kevy, S.V., Jacobson, M.S. & Heesch, C. (2008) Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *Cell Transplantation* 16: 1059–1069.
- Herten, M., Rothamel, D., Schwarz, F., Friesen, K., Kogler, G. & Becker, J. (2009) Surface- and non-surface-dependent *in vitro* effects of bone substitutes on cell viability. *Clinical Oral Investigations* 13: 149–155.
- Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmier, R. & Lorenzoni, M. (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* 18: 517–524.

- Jakse, N., Seibert, F.J., Lorenzoni, M., Eskici, A. & Pertl, C. (2001) A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting. *Clinical Oral Implants Research* 12: 488–494.
- Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R. & Pertl, C. (2003) Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* 14: 578–583.
- Janicki, P. & Schmidmaier, G. (2011) What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 42(Suppl. 2): S77–S81.
- John, H.D. & Wenz, B. (2004) Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 19: 199–207.
- Kasten, P., Beyen, I., Egermann, M., Suda, A.J., Moghaddam, A.A., Zimmermann, G. & Luginbuhl, R. (2008) Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *European Cells & Materials* 16: 47–55.
- Kent, J.N. & Block, M.S. (1989) Simultaneous maxillary sinus floor bone grafting and placement of hydroxylapatite-coated implants. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 47: 238–242.
- Khaled, E.G., Saleh, M., Hindocha, S., Griffin, M. & Khan, W.S. (2011) Tissue engineering for bone production: stem cells, gene therapy and scaffolds. *The Open Orthopaedics Journal* 5(Suppl. 2): 289–295.
- Kirmeier, R., Payer, M., Wehrschuetz, M., Jakse, N., Platzer, S. & Lorenzoni, M. (2008) Evaluation of three-dimensional changes after sinus floor augmentation with different grafting materials. *Clinical Oral Implants Research* 19: 366–372.
- Klein, M., Goetz, H., Pazen, S., Al-Nawas, B., Wagner, W. & Duschner, H. (2009) Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clinical Oral Implants Research* 20: 67–74.
- Lundgren, S., Cricchio, G., Palma, V.C., Salata, L.A. & Sennarby, L. (2008) Sinus membrane elevation and simultaneous insertion of dental implants: a new surgical technique in maxillary sinus floor augmentation. *Periodontology* 2000 47: 193–205.
- Pieri, F., Lucarelli, E., Corinaldesi, G., Iezzi, G., Piattelli, A., Giardino, R., Bassi, M., Donati, D. & Marchetti, C. (2008) Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 539–546.
- Rickert, D., Sauerbier, S., Nagursky, H., Menne, D., Vissink, A. & Raghoobar, G.M. (2011) Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 22: 251–258.
- Sauerbier, S., Rickert, D., Gutwald, R., Nagursky, H., Oshima, T., Xavier, S.P., Christmann, J., Kurz, P., Menne, D., Vissink, A., Raghoobar, G., Schmelzeisen, R., Wagner, W. & Koch, F.P. (2011) Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: a controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial-per-protocol analysis. *Tissue Engineering. Part A* 17: 2187–2197.
- Sauerbier, S., Stricker, A., Kuschnierz, J., Buhler, F., Oshima, T., Xavier, S.P., Schmelzeisen, R. & Gutwald, R. (2010a) In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue Engineering Part C, Methods* 16: 215–223.
- Sauerbier, S., Stubbe, K., Maglione, M., Haberstroh, J., Kuschnierz, J., Oshima, T., Xavier, S.P., Brunnberg, L., Schmelzeisen, R. & Gutwald, R. (2010b) Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures—an experimental study in sheep. *Tissue Engineering Part C, Methods* 16: 1033–1039.
- Schlegel, K.A., Fichtner, G., Schultze-Mosgau, S. & Wiltfang, J. (2003) Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 18: 53–58.
- Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2007) Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 28: 766–772.
- Shayesteh, Y.S., Khojasteh, A., Soleimani, M., Alikhasi, M., Khoshzaban, A. & Ahmadi, N. (2008) Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 106: 203–209.
- Szabo, G., Huys, L., Coulthard, P., Maiorana, C., Garagiola, U., Barabas, J., Nemeth, Z., Hrabak, K. & Suba, Z. (2005) A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 20: 371–381.
- Tatum, H. Jr (1986) Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental clinics of North America* 31: 207–229.
- Thor, A., Franke-Stenport, V., Johansson, C.B. & Rasmusson, L. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 36: 1164–1171.
- Thorwarth, M., Schlegel, K.A., Wehrhan, F., Srou, S. & Schultze-Mosgau, S. (2006) Acceleration of de novo bone formation following application of autogenous bone to particulate danorganic bovine material in vivo. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 101: 309–316.
- Yildirim, M., Spiekermann, H., Handt, S. & Edelhoff, D. (2001) Maxillary sinus augmentation with the xenograft bio-oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 16: 23–33.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*.