

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler**

**Experimentelle Untersuchung unterschiedlicher Knochenersatz-  
materialien in der Zellkultur und am Tiermodell**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Christian Linz

aus Solingen

**Würzburg, Juni 2009**

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

# Experimentelle Untersuchung unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien in der Zellkultur und am Tiermodell

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Linz

aus Solingen

Würzburg, Juni 2009

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kübler

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gbureck

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2009

Der Promovend ist Arzt

den Wichtigsten gewidmet...

**meinen Eltern**

- für alles, was Sie mir ermöglicht haben -

& Lars

## Abkürzungen:

AAA-Knochen	autolyzierter, Antigen-extrahierter, allogener Knochen
A.d.	Aqua dest
AP	alkalische Phosphatase
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
bsp.	beispielsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
CICP	Kollagen-1 Carboxypropeptid
d.h.	das heißt
GMA	Glykolmethacrylat
Kryo	Kryokonservierung
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fötale Kälberserum
GBR	<i>Guided Bone Regeneration</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KEM	Knochenersatzmaterial
Kortikospong	Kortikospongiosa
keV	Kiloelektronenvolt
MAI	Metabolischer Aktivitätsindex
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> /Phosphatpuffer
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
qCT	Quantitative Computertomographie
ROI	<i>Region of interest</i>
s.c.	subkutan
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
vgl.	vergleiche

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Übersicht .....	1
1.1.1	Übersicht und historischer Überblick .....	2
1.2	Grundlagen der Knochenbildung .....	4
1.2.1	Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenität .....	6
1.2.2	Osteoblastenmarker .....	7
1.2.3	Alkalische Phosphatase .....	8
1.2.4	Kollagen Typ I .....	8
1.2.5	Osteokalzin .....	9
1.2.6	Osteopontin .....	9
1.2.7	Fibronektin .....	9
1.3	Autogener Knochen zur Defektheilung und Augmentation .....	10
1.4	Grundlagen der Knochenersatzmaterialien .....	10
1.4.1	Knochenersatzmaterialien allogener Herkunft .....	11
1.4.2	Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft .....	12
1.4.3	Knochenersatzmaterialien alloplastischer Herkunft .....	12
1.5	Die Sinusbodenelevation .....	14
1.5.1	Anatomie des Sinus maxillaris .....	15
1.5.2	Chirurgie des Sinuslifts .....	16
1.6	Zielsetzung .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Zellkulturversuche .....	17
2.1.1	Gewinnung der humanen osteoblastären Zellen .....	17
2.1.2	Isolation der humanen osteoklastären Zellen und Zellkultivierung .....	17
2.1.3	Zugabe der Knochenersatzmaterialien zur Zellkultur .....	18
2.1.4	Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität .....	19
2.1.5	Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) .....	20
2.1.6	Bestimmung des Kollagen Typ I .....	21
2.1.7	Bestimmung des Osteokalzins .....	21
2.1.8	Messung des Osteopontins .....	22
2.1.9	Indirekte Immunfluoreszenz .....	22
2.1.10	Statistik .....	23
2.2	Tierexperimentelle Untersuchungen .....	23
2.2.1	Versuchstiere und Tierhaltung .....	23
2.2.2	Studiendesign und zeitlicher Verlauf .....	24

2.2.3	Anästhesie, Vorbereitung, prä-, intra- und postoperative Medikation .....	24
2.2.4	Die Sinusliftoperation .....	25
2.2.5	Postoperative Haltung der Schafe .....	27
2.2.6	Knochenersatzmaterialien.....	27
2.2.7	Intravitale Fluoreszenzmarkierung .....	28
2.2.8	Euthanasie der Tiere.....	30
2.2.9	Gewinnung der Proben .....	30
2.2.10	Auswertung der Proben .....	31
2.2.11	Einbettung der Proben in Technovit.....	34
2.2.12	Erstellen der Trenndünnschliffe .....	35
2.2.13	Kontakt-Mikroradiographie .....	38
2.2.14	Polychrome Sequenzmarkierung .....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1	Ergebnisse der <i>in-vitro</i> -Versuche.....	41
3.1.1	pH- Messung nach Zugabe der Knochenersatzmaterialen .....	41
3.1.2	Beurteilung der Zellproliferation und Zellaktivität .....	41
3.1.3	Wachstumskurve.....	42
3.1.4	WST-1-Test .....	45
3.1.5	BrdU-Test.....	46
3.1.6	Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) .....	47
3.1.7	Konzentration an Kollagen Typ I.....	48
3.1.8	Konzentration an Osteokalzin .....	49
3.1.9	Konzentration an Osteopontin .....	50
3.1.10	Indirekte Immunzytochemie.....	51
3.2	Ergebnisse der <i>in-vivo</i> -Versuche .....	55
3.2.1	Klinische Beurteilung der Proben .....	55
3.2.2	Quantitative Computertomographie (qCT).....	55
3.2.3	Kontakt-Mikroradiographie .....	62
3.2.4	Polychrome Sequenzmarkierung .....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Zellkulturversuche .....	78
4.2	Tierexperimentelle Untersuchungen.....	83
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>94</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht

Knöcherne Defekte können im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter anderem durch Traumata, Infektionen oder radikale Tumorchirurgie entstehen. Die Beschaffenheit eines Knochens, sowohl qualitativ als auch quantitativ, ist die Voraussetzung für eine vollwertige funktionelle Regeneration und Rehabilitation solcher Knochendefekte.

Bei Augmentationen, wie zum Beispiel der Sinusbodenelevation, d.h. der vertikalen Erhöhung des Kieferhöhlenbodens zur Aufnahme von Implantaten, ist diese Knochenbeschaffenheit von entscheidender Bedeutung.

Für diese Eingriffe stellt autogener Knochen als Transplantat nach wie vor den Goldstandard im Bereich des Knochenersatzes auf dem mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Fachgebiet dar. Dieser kann je nach Indikation und benötigter Menge aus dem Kinn, dem Kieferwinkel, vom Tuber maxillae, der Kalotte, den Rippen, aus der Tibia oder dem Becken gewonnen werden<sup>1-4</sup>.

Eine intraorale Knochenentnahme, zum Beispiel aus Kinn oder Kieferwinkel, kann mit geringerem operativem Mehraufwand in Lokalanästhesie erfolgen. Die zu gewinnende Knochenmenge ist allerdings auf ein gewisses Maximum limitiert und somit bei höhergradiger Atrophie oft unzureichend.

Vorteil der extraoralen Knochenentnahme, beispielsweise aus Tibia oder Becken, ist die größere zu gewinnende Knochenmenge. Deutlicher Nachteil ist eine zusätzlich notwendige chirurgische Intervention.

Die bei der Entnahme des autologen Knochens entstehenden höheren Kosten, ein größeres Risiko und eine zusätzliche Entnahmemorbidität sowie eventuelle Infektionen, Blutungen, Hämatombildungen, Nervenschädigungen, Schmerzen und funktionelle Defizite sind zu berücksichtigen<sup>5,6</sup>.

Vor dem Hintergrund dieser Problematik haben sich Knochenersatzmaterialien (KEM) als gute Alternative in der klinischen Anwendung bewährt.

---

Für die Heilung eines Knochendefektes sind drei grundsätzliche Parameter von entscheidender Bedeutung:

- die Defektgröße
- die Qualität des Transplantates bzw. die mechanische Stabilität im Defekt
- die Qualität des Transplantatlagers.

Diese Parameter lassen jenseits einer kritischen Grenze keine Spontanheilung mehr zu. Solche Defekte kritischer Größe sind nicht nur von ihrer Ausdehnung, sondern auch von ihrer Lokalisation und der jeweiligen Spezies abhängig. Jenseits der individuellen, kritischen Defektgröße wird eine Spontanabheilung des Knochens nicht mehr beobachtet. Es kommt zu einer funktionell minderwertigen Auffüllung des Defektes mit Granulationsgewebe, was eine definitive knöcherne Ausheilung verhindert.

Die Transplantatqualität bzw. die Eigenschaften des Knochenersatzmaterials sind demnach der Ansatzpunkt, um die Qualität von knöchernen Rekonstruktionen zu verbessern.

Die Suche nach einem geeigneten Material zur Defektüberbrückung ist dabei nahezu so alt wie die Operation selbst.

### **1.1.1 Übersicht und historischer Überblick**

Um einen Defektersatz zu erzielen wurden bereits früh Anstrengungen unternommen, durch Einlagerung unterschiedlicher Materialien die knöcherne Regeneration zu fördern.

Xenogene Implantate zur knöchernen Defektausheilung wurden bereits 1668 erstmals durch van Meekeren beschrieben. Er führte mit einem Stück Kalotte vom Hund eine Kranioplastik bei einem Soldaten mit traumatischem Defekt des Schädeldaches durch <sup>40</sup>.

Im Jahre 1889 implantierte der Chirurg Senn zur Therapie chronischer Osteomyelitiden Rinderknochen, die mittels Salzsäure demineralisiert worden waren. Dieser fungierte als Trägermaterial für Iodoform. Er konnte sowohl einen positiven Effekt auf die Entzündung als auch eine knöcherne Regeneration des Defektes aufzeigen <sup>41</sup>.

Maatz und Bauermeister stellten 1957 den „Kieler Knochenpan“ vor, bei dem es sich ebenfalls um ein xenogenes Knochenmaterial vom Kalb handelte. Durch Eiweißdenaturierung mittels Wasserstoffperoxid erfolgte eine immunologische Inaktivierung des Knochenmaterials <sup>42</sup>. Dieses xenogene Material konnte relativ gute Erfolge aufweisen <sup>43,44</sup>.

Allerdings war es durch dieses Verfahren nicht möglich die organische Matrix vollständig zu entfernen. Aus diesem Grund wird der „Kieler Knochenspan“ heute wegen seiner potentiellen Antigenität und Infektiösität nicht mehr eingesetzt <sup>45-48</sup>.

Autogene Transplantate wurden von Walter 1820 in die rekonstruktive Chirurgie eingeführt, indem er autogenen Knochen aus Schädeltrepanationen replantierte <sup>49</sup>. Die osteogenetische Potenz der im autogenen Knochentransplantat erhaltenen vitalen, periostalen Zellen hat Ollier bereits im Jahre 1867 nachgewiesen <sup>50</sup>. Axhausen gelang 1908 der Nachweis, dass Zellen des Periostes und des Knochenmarks im Transplantat nach dessen Replantation vital bleiben und zur Knochenneubildung beitragen <sup>51</sup>. Damit war das autogene Knochentransplantat als Goldstandard in der Therapie von Knochendefekten etabliert und ist bis dato von keiner Alternative in der klinischen Anwendung abgelöst worden.

Unter den ersten routinemäßig erfolgreich verwendeten alloplastischen Knochenersatzmaterialien waren nichtreaktive Metalle wie rostfreier Stahl, Tantalum und Vitallium. Stabile hitzebehandelte Acrylpolymere wurden ebenso eingesetzt wie Methylmethacrylate (Knochenzement), Silikone und andere Kompositmaterialien <sup>52, 53</sup>.

Diese bioinerten Materialien wurden in den vergangenen Jahren zunehmend von bioaktiven Stoffen abgelöst. Diese Weiterentwicklung ist der Bildung von Carbonathydroxylapatit auf der Materialoberfläche, das dem Knochenapatit sehr ähnlich ist, zuzuschreiben. Zu dieser Gruppe zählen Materialien wie bioaktive Glaskeramiken <sup>54</sup>, Kalziumphosphatmaterialien wie Hydroxylapatit <sup>55</sup>, Trikalziumphosphat, biphasische Kalziumphosphate <sup>55-57</sup>, ungesinterte Apatite, sowie unterschiedlich plasmabeschichtete Metallimplantate aus Titan. Die Beschichtung dieser Implantate erfolgt mit Hydroxylapatit, amorphem Kalziumphosphat, Trikalziumphosphat, Tetrakalziumphosphat oder Kalziumoxid. <sup>58, 59</sup>.

Weitere, aktuell in der klinischen Anwendung befindliche Knochenersatzmaterialien sind Knochenabkömmlinge wie die demineralisierte Knochenmatrix, prozessierter Rinderknochen, humaner allogener Knochen aus der Knochenbank und korallines Material wie korallines Hydroxylapatit <sup>60</sup>.

Definitionsgemäß handelt es sich bei den alloplastischen wie auch bei den allogenen Materialien um Implantate ohne vitale Zellen <sup>61</sup>, die in Materialien mit osteokonduktiver und osteoinduktiver Wirkung unterteilt werden können.

Im Zusammenhang mit einer möglichen implantologischen Versorgung des atrophien Kiefers wurden diese technischen Entwicklungen mit großem Interesse verfolgt. Der mögliche Einsatz beschäftigte bereits die Pioniere der Implantologie. Im Zusammenhang mit der Problematik eines atrophien Oberkiefers implantierten Geiger und Pesh<sup>70</sup> bereits 1977 im Tierversuch Keramikimplantate unter Penetration des Sinus maxillaris ohne postoperative Komplikationen. Ebenfalls im Jahre 1977 elevierte und transplantierte Tatum<sup>71</sup> die Sinusmembran unter Verwendung der modifizierten Caldwell- Methode (Eröffnung der Kieferhöhle vom Mundvorhof, Fossa canina, aus). Boyne und James<sup>72</sup> publizierten im Jahre 1980 selbiges Verfahren unter Verwendung von autogenen Beckenkammknochen. Vassos<sup>73</sup> beschrieb ein Schneideimplantat mit breiter, flacher Oberfläche zur Anhebung der Schneiderschen Membran. Smiler und Holmes berichteten im Jahre 1987 über die Verwendung von nichtresorbierbaren Materialien zur Sinusbodenelevation. Damit fanden die Knochenersatzmaterialien im Zuge der vertikalen Erhöhung des Sinusbodens ihren Einzug.

## 1.2 Grundlagen der Knochenbildung

Die Knochenbildung wird in eine enchondrale, indirekte und eine desmale, direkte Ossifikation differenziert.

Bei der **enchondralen, indirekten Ossifikation** werden ortsnahe mesenchymale Stammzellen chemotaktisch angezogen. Mit Beginn des Differenzierungsprozesses werden sie zur Proliferation angeregt. Nach 5 bis 7 Tagen sind Chondrozyten in Knorpelformationen zu beobachten, welche auf die nachfolgende Gefäßeinsprossung mit reaktiver Hypertrophie und Verkalkung reagieren. Nach 9 bis 12 Tagen bilden die anschließend auftretenden Osteoblasten zunächst eine nicht mineralisierte Matrix: das Osteoid. Dieses besteht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Kollagen Typ I. Das Osteoid kalzifiziert infolge durch Ausfällung von Kalzium-Phosphat und seiner Umlagerung zu Hydroxylapatitkristallen. Nach 12 bis 18 Tagen beginnt mit dem Erscheinen der Osteoklasten der Prozess des *Remodelings* mit dem Ersatz des Geflechtknochens durch Lamellenknochen.

Die enchondrale Knochenbildung wird nach 28 Tagen mit der Differenzierung des Knochenmarks und der Rarefizierung des Trabekelwerkes abgeschlossen. Dieser Mechanismus ist bei der sekundären Knochenheilung zu finden, bei der ein Defektdurchbau über einen fixierten Knorpelkallus erreicht wird <sup>7,8</sup>.

Bei der **direkten, desmalen Ossifikation** differenzieren sich mesenchymale Stammzellen direkt in knochenbildende Zellen unter Umgehung des Knorpelstadiums <sup>8</sup>. Dieser Mechanismus ist im Rahmen der primären Knochenheilung, zum Beispiel bei Frakturspalten von weniger als 200  $\mu\text{m}$ , zu beobachten <sup>9</sup>. Kleine kortikale Defekte unterhalb einer kritischen Defektgröße werden ebenfalls auf diese Art geschlossen <sup>10,11</sup>.

Unabhängig davon, ob die initiale knöchernen Matrix über ein Knorpelmodell enchondral oder direkt desmal gebildet wird, wird zunächst Geflechtknochen abgelagert. Dieser Knochentyp mit einer wenig organisierten Matrix herrscht in der frühen Phase der Knochenbildung, bei der primären Spaltheilung und der sekundären Heilung von Frakturen vor. Infolgedessen wird dieser Knochentyp von Osteoklasten abgebaut und durch lamellären Knochen ersetzt, der eine hoch organisierte mineralisierte Matrix mit unterstützenden Haverschen Kanälen besitzt und entsprechend der funktionellen Belastung des Knochens ausgerichtet ist. Bei der primären Spaltheilung und der sekundären Heilung von Knochenbrüchen über einen Kallus wird dieser Prozess *Remodeling* genannt und kann bis zu 6 Monate oder mehrere Jahre nach initialer Frakturheilung anhalten. Lamellärer Knochen ist dem Geflechtknochen aufgrund seines hohen Organisationsgrades und seiner funktionellen Ausrichtung mechanisch deutlich überlegen.

Lamellärer Knochen gliedert sich in eine kortikale, äußere Schale und in ein trabekuläres, spongiöses Inneres. Die dichte und relativ zellarme Kortikalis verleiht dem Knochen seine mechanische Stabilität, während die zellreiche Spongiosa mit dem Trabekelwerk eine große Oberfläche besitzt und hauptsächlich für die biologische Aktivität des Knochens verantwortlich ist. Die Trabekel werden von Endost mit *bone lining cells* ausgekleidet. In der Spongiosa ist das Knochenmark mit seinen mesenchymalen und hämopoetischen Stammzellen, osteoblastischen und osteoklastischen Zellen, Gefäßen mit endothelialen Zellen, Fibroblasten und Fettzellen lokalisiert.

Lamellärer Knochen ist aus primären und sekundären Osteonen aufgebaut, die wiederum aus konzentrischen Lamellen bestehen. Zwischen diesen haben sich Osteozyten durch Ablagerung von extrazellulärer Matrix (Osteoid), welche sekundär mineralisiert, eingemauert. Sie stehen über Zellfortsätze untereinander in Kontakt, die ihrer Ernährung per Diffusion dienen. Im Zentrum der Osteone liegt ein ernährendes Haversches Gefäß. Die Länge der Osteone kann 2-3 mm betragen. Gefäßführende Volkmannsche Kanäle verbinden von lateral her größere Blutgefäße des Periostes mit den Haverschen Gefäßen.

Die Reparation eines knöchernen Defektes kann durch Osteoinduktion, Osteokonduktion oder Osteogenität erfolgen.

### 1.2.1 Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenität

Der Begriff der **Osteoinduktion** wird für die Fähigkeit eines Materials verwendet, undifferenzierte mesenchymale Stammzellen chemotaktisch anzuziehen und diese dann am Einsatzort zur Proliferation und osteoblastärer Differenzierung zu stimulieren. Dies setzt das Vorhandensein entweder zellulärer Elemente im Transplantat oder bestimmter zellulärer, stimulierender Produkte in der Implantatmatrix voraus. Dabei spielen v.a. *Bone Morphogenic Proteins (BMPs)*, *Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )* und *Insulin-like Growth Factor (IGF)* eine Rolle.

Diese Eigenschaft wird neben dem frischen, vitalen, autogenen Knochentransplantat auch allogenen Knochenersatzmaterialien zugeschrieben. Dies setzt allerdings eine Demineralisation der extrazellulären Matrix voraus, um die in dieser Matrix befindlichen morpho- und mitogenen Proteine freizulegen und damit diffusibel zu machen.

**Osteokonduktive** Materialeigenschaften ermöglichen eine reizlose Inkorporation als Füll- oder Augmentationsmaterial in den Knochen. Entlang der Leitstruktur des eingebrachten Materials wachsen Osteoblasten ein. Es kommt zur echten Knochenneubildung durch die Leitschienenstruktur des Materials. Dieser Prozess schließt die Differenzierung und Reifung der einwachsenden Zellen ein.

Dieser Vorgang ist nur bei Materialien möglich, die eine geeignete Oberflächenstruktur, Biokompatibilität, Porosität und geeignete chemische Faktoren aufweisen. Diese Eigenschaften sind maßgeblich für den Grad der osteokonduktiven Potenz eines Materials verantwortlich.

Idealerweise wird das eingebrachte Material dabei schleichend resorbiert und neugebildeter Knochen funktioneller Bestandteil des skelettalen Systems.

**Osteogenität** beschreibt die Fähigkeit eines Materials, in Abwesenheit undifferenzierter Zellen, Knochen zu produzieren. Dies setzt die Anwesenheit vitaler, bereits differenzierter Osteoblasten oder zumindest deren direkten Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) voraus. Diese können aus den zur Verfügung stehenden Bausteinen direkt knöcherne Strukturen herstellen.

Diese Eigenschaft ist lediglich dem frischen, vitalen, autogenen Knochentransplantat zu eigen, welches darüber hinaus auch über osteokonduktive und –induktive Eigenschaften verfügt.

Die Qualität eines Knochentransplantates oder eines Knochenersatzmaterials kann durch seine osteogenen, osteokonduktiven oder osteoinduktiven Eigenschaften bestimmt werden.

Darüber hinaus lassen sich die Kallusdistraction und die geleitete Knochenregeneration, *Guided Bone Regeneration (GBR)*, als weitere Prinzipien zur Behandlung von knöchernen Defekten anführen.

Im Rahmen der Knochenbildung werden - von den Osteoblasten als Effektorzellen - spezifische Knochenmarker exprimiert.

### **1.2.2 Osteoblastenmarker**

Die osteoblastäre Differenzierung mit den Stadien Proliferation, Sekretion und Reifung der extrazellulären Matrix und ihrer Mineralisation ist mit der Expression und Synthese typischer Marker assoziiert. In der Proliferationsphase wird von den Zellen das knochentypische Kollagen Typ I, Fibronectin und *TGF-β* synthetisiert. In der Phase der Matrixproduktion und –reifung werden verstärkt alkalische Phosphatase (AP), Osteokalzin und Osteopontin exprimiert. Osteokalzin und Osteopontin zeigen ihren Expressionsgipfel zu Beginn des Mineralisationsprozesses. Osteopontin zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem ersten Expressionsgipfel bereits während der Proliferationsphase der Osteoprogenitoren und einem zweiten Gipfel am Anfang der Matrixmineralisation.<sup>12-14</sup>.

### 1.2.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (AP) ist ein membranständiges Enzym, welches von Osteoblasten in drei Isoformen gebildet wird<sup>15</sup>. Die Wirkmechanismen der AP sind die Freisetzung anorganischen Phosphates, die Zerstörung lokaler Inhibitoren der Mineralisierung sowie die Funktion als kalziumbindendes Protein und als  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase<sup>16</sup>. Die Expression der AP steigt mit dem Ende der Proliferation beim Übergang von Präosteoblasten zu Osteoblasten deutlich an.

Erhöhte Serumwerte der AP deuten auf eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten hin, beispielsweise bei gesteigertem Knochenumbau (Frakturheilung, Wachstum), Knochenstoffwechselerkrankungen (z.B. Osteomalazie), primären und sekundären Neubildungen des Knochens und vielen Knochenerkrankungen (z.B. M. Paget)<sup>17</sup>.

### 1.2.4 Kollagen Typ I

Kollagen Typ I stellt die organische Hauptkomponente der Knochenmatrix und des straffen und lockeren Bindegewebes dar<sup>18</sup>. Die parallel angeordneten Kollagenfibrillen setzen sich aus Tropokollagenmolekülen zusammen, die wiederum aus einer  $\alpha$ -Tripelhelix und drei umeinander gewundenen  $\alpha$ -Proteinketten (zwei  $\alpha 1$ - und eine  $\alpha 2$ ) aufgebaut sind<sup>18,19</sup>. Das Translationsprodukt sind die  $\alpha$ -Proteinketten, die sich im endoplasmatischen Retikulum zu Prokollagenmolekülen (Tripelhelices) zusammenlagern und sezerniert werden. Extrazellulär werden nichthelikale C- und N-terminale Peptidreste abgespalten, wodurch die Tropokollagenmoleküle entstehen. Diese lagern sich zu Kollagenfibrillen zusammen und werden durch Quervernetzung der Lysinseitenketten und durch Aggregation mit der Grundsubstanz wie Proteoglykanen stabilisiert<sup>19</sup>.

Die Kollagenfasern sind für die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes, insbesondere die Zugfestigkeit, verantwortlich und unterliegen ständigen Umbauvorgängen, die eine schnelle Adaptation an sich ändernde biomechanische Beanspruchungen garantieren. Kollagenfasern halten einem Zug von ca.  $6 \text{ kg/mm}^2$  Faserquerschnitt stand<sup>19</sup>.

Der Nachweis der C-terminalen Propeptidreste kann Anhaltspunkt für die Produktion von Kollagen sein.

### **1.2.5 Osteokalzin**

Das niedermolekulare Osteokalzin wird von den Osteoblasten gebildet und stellt einen großen Anteil der nicht-kollagenen Matrixproteine dar. Pro Molekül besitzt es drei  $\gamma$ -Carboxyglutaminreste, welche kalziumbindende Eigenschaften aufweisen und eine wichtige Rolle bei der Bildung von Hydroxylapatit spielen<sup>20, 21</sup>. Die Bildung von Osteokalzin ist Vitamin-K-abhängig und kann durch Glukokortikoide gehemmt werden. Die Konzentration von Osteokalzin im Serum lässt auf die osteoblastäre Aktivität schließen. Weiterhin spielt sie eine entscheidende Rolle in der Chemotaxis von Präosteoklasten und in der osteoklastären Differenzierung<sup>22</sup>. Insgesamt stellt es einen sensitiven und spezifischen Marker der Osteoblastenaktivität dar. Die zunehmende Reifung der extrazellulären Matrix geht mit einem Konzentrationsanstieg von Osteokalzin einher.

### **1.2.6 Osteopontin**

Osteopontin ist ebenfalls ein nicht-kollagenes Protein der extrazellulären Matrix (EZM). Es wird von sich differenzierenden Osteoblasten produziert und ist in der Lage, Kalzium zu binden.<sup>20, 21</sup>. Damit spielt es sowohl bei der Mineralisation in der Spätphase der Differenzierung als auch bei der Vermittlung der Zelladhäsion von Osteoblasten und Osteoklasten eine wichtige Rolle<sup>23</sup>. Dies erklärt sein biphasisches Expressionsmuster mit einem ersten Gipfel in der Frühphase der Osteoblastendifferenzierung, in der die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. Ein zweiter Gipfel wird in der Spätphase der Differenzierung, in der es zur Mineralisation der EZM kommt, erreicht<sup>24</sup>.

### **1.2.7 Fibronektin**

Fibronektin ist ein nicht-kollagenes Glykoprotein der EZM. Es ist an der Zelloberfläche lokalisiert. Wie die meisten Proteine der EZM hat es seine Funktion in Zell-Matrix-Interaktionen, Zell-Zell-Interaktionen und in der Regulation der Zellaktivität durch Bindung an Integrine<sup>25</sup>. Fibronektin wird während des gesamten osteoblastären Differenzierungsprozesses exprimiert.

### 1.3 Autogener Knochen zur Defektheilung und Augmentation

Das autogene Knochentransplantat ist nach wie vor der Goldstandard bei der Rekonstruktion knöcherner Strukturen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich. Die für die Gewinnung notwendige zusätzliche Knochenentnahme bedingt allerdings eine erhöhte Entnahmemorbidität und verlängerte Operationszeiten, was zu einer höheren Belastung des Patienten führt. Ein weiterer Nachteil des autologen Transplantates besteht darin, dass seine Makro- und Mikrostruktur meist nicht den biomechanischen Anforderungen der Defektregion entsprechen und erst durch lang-samen Umbau eine Adaptation an die Empfängerregion stattfinden muss.

Morphologisch kann autogener Knochen in eine dichte Knochenschicht, die Kompakta, und eine poröse Knochenschicht, die Spongiosa, eingeteilt werden. Die Porosität der Spongiosa bedingt eine schnelle Vaskularisation nach Transplantation, eine hohe Zelldichte und eine hohe Diffusibilität für lösliche Faktoren. Dies führt zu einem wesentlich beschleunigten Einbau und Umbau des Spongiosatransplantates im neuen Transplantatlager. Kompaktatransplantate erfahren einen langsameren, wohl nie vollständigen Umbau<sup>26</sup>. Allerdings besitzt die Kompakta gegenüber der Spongiosa eine höhere mechanische Stabilität, was im mechanisch belasteten Transplantatlager von Bedeutung ist.

Es ist davon auszugehen, dass beim frei transplantierten autogenen Knochen die meisten der zellulären Elemente ischämieinduziert absterben oder nach Apoptoseinduktion zugrunde gehen<sup>27</sup>.

Grundsätzlicher Nachteil des autogenen Knochens ist die mit seiner Gewinnung verbundene zusätzliche Entnahmemorbidität und die begrenzte Verfügbarkeit. Knochenersatzmaterialien hingegen stehen ohne zusätzliche chirurgische Intervention unbegrenzt zur Verfügung.

### 1.4 Grundlagen der Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien (KEM), wie auch Transplantate, können nach ihrer Herkunft eingeteilt werden (Tab. 1).

**Tabelle 1: Einteilung nach Herkunft der KEM / Transplantate**

autogen / autolog	Empfänger und Spender identisch
allogen / homogen	genetisch differente Individuen der gleichen Spezies
xenogen / heterogen	Individuen verschiedener Spezies
alloplastisch	synthetische, künstlich hergestellte Materialien.

Sie können allein, als Gemische und als Trägermatrices für mesenchymale Stammzellen oder osteoblastäre Zellen Verwendung finden.

Charakteristisch für ein KEM sind seine Biokompatibilität, seine Fähigkeit zur Zelladhärenz, seine Platzhalterfunktion und seine Fähigkeit zur Integration in das Wirtsgewebe.

Diese Fähigkeiten sind wichtig, da jenseits der individuellen kritischen Defektgröße eine Spontanabheilung des Knochens nicht mehr beobachtet werden kann.

#### **1.4.1 Knochenersatzmaterialien allogener Herkunft**

Im Gegensatz zum autogenen Knochentransplantat werden beim allogenen (homogenen) Transplantat keine vitalen Zellen übertragen. Dies geschieht, um eine Abstoßungsreaktion durch den Empfänger zu vermeiden. Eine Aufbereitung des allogenen Transplantates mit Zerstörung zellulärer Elemente ist notwendig, um eine potentielle Antigenität und autolytische Reaktion zu verhindern. Hier hat sich das Verfahren der Gefriertrocknung und Lyophilisation von Knochenimplantaten bewährt<sup>30</sup>. Alternative physikalische und chemische Verfahren konnten sich nicht durchsetzen, da sie negative Einflüsse auf die mechanische Stabilität, die Eiweißstrukturen der Knochenmatrix oder toxische und / oder kanzerogene Nebenwirkungen aufwiesen<sup>31</sup>. Sowohl das osteoinduktive als auch das osteokonduktive Potential des Implantates werden durch dieses Verfahren beträchtlich gemindert. Auch ist die Bereitstellung allogener Knochenimplantate in einer Knochenbank mit hohem finanziellem und materiellem Aufwand verbunden.

Eine Osteoinduktion durch allogene Knochenimplantate ist nur nach vorheriger Demineralisation möglich, was eine Freisetzung der *BMPs* aus der Knochenmatrix bewirkt<sup>32</sup>. Diese führen dann zu einer Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen aus dem Implantatlager<sup>33</sup>.

Als allogenes KEM befindet sich im klinischen Einsatz unter anderem die demineralisierte Knochenmatrix (*DBM*, Grafton<sup>®</sup>)<sup>34, 35</sup>, die Knochenmatrixgelatine<sup>36</sup> und der autolytierte, antigenextrahierte, allogene Knochen (*AAA-Knochen*)<sup>37</sup>, die sich durch ihre Behandlung nach Demineralisation im sauren Milieu unterscheiden.

Letztlich kann bei den allogenen Knochenersatzmaterialien (demineralisierte Knochenmatrix, humaner Bankknochen) ein Infektionsrisiko oder ein allergisierendes Potential nie völlig ausgeschlossen werden.

### 1.4.2 Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft

Ein häufig in der Klinik eingesetztes xenogenes KEM ist Bio-Oss<sup>®</sup>. Dabei handelt es sich um ein aus Rinderspongiosa produziertes Hydroxylapatit, welches durch thermische und chemische Behandlung (Pyrolyse) von allen organischen Bestandteilen befreit wurde. Die ursprüngliche Mineralstruktur bleibt dabei weitgehend erhalten. Gemäß seiner bovinen Herkunft hat Bio-Oss<sup>®</sup> variable Porengrößen von mehreren hundert µm. Bio-Oss<sup>®</sup> besitzt eine der humanen Spongiosa ähnliche Makro- und Mikrostruktur mit einer spezifischen Oberfläche von ca. 80 m<sup>2</sup>/g<sup>38</sup>. Es wird nicht mehr als resorbierbares Material eingestuft und bleibt nach der Implantation formstabil. Seine Wirkungsweise bei der Knochenregeneration ist osteokonduktiv<sup>39</sup>.

### 1.4.3 Knochenersatzmaterialien alloplastischer Herkunft

Unbegrenzte Verfügbarkeit, eine fehlende Entnahmemorbidität und ein fehlendes Infektionspotential sind die Vorteile von Knochenersatzmaterialien alloplastischer Herkunft. Dem steht die ausschließlich osteokonduktive Wirkung der Materialien bei der Knochenregeneration gegenüber. Sie werden synthetisch produziert und sind oft nicht resorbierbar. Sie persistieren folglich als Fremdkörper. Hierdurch ergibt sich in dieser sehr heterogenen Gruppe die Gefahr einer Implantatdislokation mit konsekutiver Infektion des Materials.

Neben vollsynthetischen Materialien mit reiner Platzhalterfunktion wie Polymethylmethacrylat, Polyethylen, Polytetrafluorethylen, Polyamid und Silikon existieren auch Materialien, die weitestgehend knochenintegrierende Eigenschaften aufweisen. Das bedeutet, sie gehen mit dem umgebenden Knochengewebe einen Verbund ein und werden teilweise knöchern durchbaut. Zu diesen Materialien zählen u.a. die Kalziumphosphat- und Glaskeramiken.

Im klinischen Einsatz erfahren insbesondere Hydroxylapatite eine weit verbreitete Anwendung. Sie werden voll- oder halbsynthetisch aus Korallen, Algen oder tierischem Knochengewebe hergestellt.

Es können Hydroxylapatite, die bei Zimmertemperatur wie Algipore<sup>®</sup> (auf Algenbasis) und Bio-Oss<sup>®</sup> (siehe 1.4.2.) hergestellt werden, von solchen unterschieden werden, die bei hohen Temperaturen (> 450 °C) wie Osteograf<sup>®</sup> / N und PepGen P-15 (modifiziert mit einer synthetischen Peptidkette) produziert werden.

*Algipore*<sup>®</sup> ist eine Kalziumphosphatkeramik mit der kristallinen Struktur des Hydroxylapatits. Die Produktion erfolgt aus Rotalgen. Dieses Material besitzt interkonnektierende Mikroporositäten mit einer daraus resultierenden spezifischen Oberfläche von circa 20 m<sup>2</sup>/g<sup>38</sup>. Seine Resorptionszeit wird mit 12-24 Monaten angegeben.

*Osteograft*<sup>®</sup>/*N* ist ein natürliches (bovines), mikroporöses Knochenersatzmaterial aus Hydroxylapatit. In einem Hochtemperaturprozess (Sintern) bei 1100 °C werden alle organischen Bestandteile entfernt. Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite zeigen mit Porositäten von 1-20 µm und einer spezifischen Oberfläche von 1 m<sup>2</sup>/g geringere Werte als die Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite.

*PepGen P-15*<sup>®</sup> wird ebenfalls zu den Hoch-Temperatur-Hydroxylapatiten gerechnet. Zusätzlich liegt bei diesem synthetisch hergestellten Hydroxylapatit eine Peptidkette mit 15 Aminosäuren vor, die zellbindende Eigenschaften aufweist. Insgesamt kann bei den Hydroxylapatiten nur von einer geringen Resorption ausgegangen werden.

Bedeutsam in der Gruppe der alloplastischen KEM sind die Trikalziumphosphate. Sie können in α- und β- Trikalziumphosphate eingeteilt werden und besitzen eine spezifische Oberfläche von ca. 1 m<sup>2</sup>/g.

Bei *Biobase*<sup>®</sup> handelt es sich um ein synthetisch produziertes α- Trikalziumphosphat, das kristallin, porös und resorbierbar ist. Die Resorptionszeit wird mit 9-48 Monaten angegeben. An der Grenzfläche führt eine hydrolytische Korrosion zu einer kalzium- und phosphationenreichen Reaktionsschicht.

*Cerasorb*<sup>®</sup> ist ein β- Trikalziumphosphat welches eine schnellere Resorption als die α- Trikalziumphosphate aufweist.

Biogläser sind meist Glaskeramiken mit osteokonduktiver Wirkung, die aus variablen Anteilen von Silizium-, Kalzium-, Natrium- und anderen Oxiden bestehen.

*Biogran*<sup>®</sup> ist biodegradierbar und resorbierbar (6-24 Monate). Es besteht aus einem Silikatgel und einer umgebenden Hülle aus Kalziumphosphaten, wobei die Granula eine Größe von 300-350µm haben. Die spezifische Oberfläche liegt bei 0,2 m<sup>2</sup>/g<sup>38</sup>.

*Perioglas*<sup>®</sup> hat eine variabelere Partikelgröße von 90-710 µm und ist ebenfalls biodegradierbar. Beide Biogläser zeichnen sich durch eine spezifische Oberfläche von bis zu 0,6 m<sup>2</sup>/g aus und weisen offene Mikro- und Makroporositäten von bis zu ca. 60 % der Oberfläche auf. In der Grenzschicht zu organischem Gewebe kommt es zur Ausbildung einer mit Kalziumphosphat angereicherten Gelschicht aus Siliziumoxid.

## 1.5 Die Sinusbodenelevation

Die implantologische Versorgung nach Zahnverlusten ist heute ein Standardverfahren in der dentoalveolären Chirurgie sowie in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.

Enossale Dentalimplantate benötigen zur Osteointegration und stabilen Einheilung ein adäquates Knochenvolumen. Kritisches Minimum ist ein vertikales Knochenangebot im Oberkiefer von 7 mm. Studien haben gezeigt, dass kürzere Implantate (bis zu 10 mm) weniger erfolgreich inseriert werden können als längere. Demnach ist ein Knochenangebot > 10 mm im Oberkiefer die geeignete Ausgangssituation einer erfolgreichen Implantation<sup>62</sup>. Eine unzureichende Höhe des Alveolarkammes bei Atrophie im posterioren Oberkieferbereich ist also ein limitierender Faktor bei der Planung von enossalen Dentalimplantaten<sup>63</sup>.

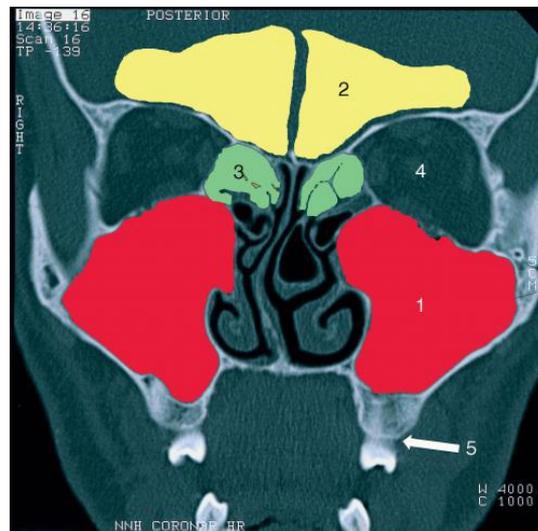
Die Ursache der Atrophie sind eine nach Zahnverlusten und -extraktionen gesteigerte osteoklastische Aktivität der Schneiderschen Membran der Kieferhöhle<sup>64</sup> sowie der Pneumatisationsgrad des Sinus maxillaris bei gesteigertem intraantralem Druck<sup>65</sup>. Eine Altersatrophie des Knochens (senile Osteoporose) wird auch für den Bereich des bezahnten Kieferareales beschrieben und führt ebenfalls zu einem verringerten Knochenangebot.

Die verminderte Knochenhöhe und die insuffiziente Knochenqualität führen, aus oben genannten Gründen, gerade im Oberkiefer zum vermehrten Verlust von enossalen Implantaten. Verglichen mit mandibulären Einheilraten von 91 bis 99 % zeigen sich maxillär Erfolgsaussichten von nur 81 bis 89 %<sup>66-68</sup>.

Die Methode der Sinusbodenaugmentation hat sich bei unzureichender vertikaler Knochenhöhe im Oberkiefer als gut prognostizierbare Methode erwiesen<sup>69</sup>. Die Augmentation hat das Ziel, die Knochenmenge zur Verankerung von Titanimplantaten auf ein adäquates Maß zu vergrößern, um die Primärstabilität der Implantate zu verbessern. Die Augmentation kann mit autogenem Knochen, Knochenersatzmaterial oder einem Gemisch aus beidem erfolgen.

### 1.5.1 Anatomie des Sinus maxillaris

Anatomisch ist die Kieferhöhle die geräumigste der Nasennebenhöhlen (Abb. 1). Sie kann als Pyramide beschrieben werden, deren Basis sich medial zur Nasenhöhle befindet. Die Spitze liegt am Processus zygomaticus maxillae.



**Abb. 1:** Lage der verschiedenen Nasennebenhöhlen: Sinus maxillaris (1, rot), Sinus frontalis (2, gelb), Sinus ethmoidalis (3, grün), der Orbita (4) und des Alveolarfortsatzes mit Zähnen (5) in einer computertomographischen Aufnahme.

Sie grenzt kranial an die Orbita, medial an die Nasenhöhle, und dorsal an die Fossa pytergopalatina. Der Alveolarfortsatz der Oberkieferzähne bildet den von ventral nach dorsal ansteigenden Kieferhöhlenboden. Der tiefste Punkt der Kieferhöhle liegt über dem zweiten Prämolaren und ersten Molaren, wo der Kieferhöhlenboden Ausbuchtungen zeigt. Hier besteht physiologisch der engste Kontakt zwischen Zähnen und Sinus maxillaris. Der Boden ist ventral dicker als dorsal. Im Bereich des unbezahnten Oberkiefers kann er papierdünn sein. Häufig zeigt er sich mit Septen durchzogen.

Die Schleimhaut der Nasennebenhöhle liegt fest, ohne Submukosa, am Knochen an. Im Bereich der Kieferhöhle wird die Schleimhaut als Schneidersche Membran bezeichnet.

### **1.5.2 Chirurgie des Sinuslifts**

Nach der Freilegung, durch Abklappen der Gingiva und Inzision des Periosts, wird die laterale Kieferhöhlenwand in einem ca. 1-2 cm<sup>2</sup> großen Bezirk mit einem kugelförmigen Diamantbohrer geschwächt. Dabei ist auf die Intaktheit der innen anhaftenden Kieferhöhlenmembran (Schneidersche Membran) zu achten. Nach der Präparation erfolgt die Elevation der Membran (*lifting*). Es entsteht ein Hohlraum zwischen Schneiderscher Membran und Kieferhöhlenboden. Durch Auffüllung dieses Raumes mit autogenem Knochen und / oder KEM kann eine Erhöhung der vertikalen Knochenhöhe im Oberkiefer erreicht werden (Abb.3).

### **1.6 Zielsetzung**

Ziel bei der Verwendung von autogenen Knochentransplantaten oder Knochenersatzmaterialien (KEM) ist die Knochenneubildung im Augmentationsbereich.

Das Ziel dieser Untersuchung war sowohl der *in-vitro*-, als auch der *in-vivo*-Vergleich von klinisch gebräuchlichen KEM untereinander. Daneben wurden die KEM mit dem Goldstandard des autogenen Knochens verglichen.

Die vergleichende Untersuchung erfolgte hierzu in der Zellkultur an humanen osteoblastären Zellen und tierexperimentell unter Verwendung des Schafmodells.

## 2 Material und Methoden

Die durchgeführten Untersuchungen gliederten sich in *in-vitro*-Versuche an humanen osteoblastären Zellen und *in-vivo*-Tierversuche am Schaf.

### 2.1 Zellkulturversuche

#### 2.1.1 Gewinnung der humanen osteoblastären Zellen

Die humanen Knochenzellen für die Zellversuche wurden von einer 42jährigen Patientin im Rahmen einer Zystektomie mit Osteoplastik am Unterkiefer gewonnen. Hierzu wurde ihr spongioser Beckenkamm entnommen. Die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission lag vor. Eine schriftliche Einwilligung der Patientin zur experimentellen Verwendung des überschüssigen Beckenknochens existierte.

Es wurde eine circa 2 cm<sup>2</sup> große Probe steril gewonnen und nach einer Verweilzeit von maximal 30 Minuten in einem sterilen Behälter, wie im Folgenden beschrieben, weiter verarbeitet.

#### 2.1.2 Isolation der humanen osteoblastären Zellen und Zellkultivierung

Die Isolation der osteoblastären Zellen erfolgte unter einer *Laminar-Flow*-Werkbank. Die gewonnenen Proben wurden zerkleinert, anschließend dreimalig mit *PBS* gewaschen und auf Kulturschalen verteilt. Das beigefügte Kulturmedium bestand aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*, 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml und 2 mM L-Glutamin. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Die Explantation der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und dokumentiert. Eine Inkubation der Kulturschalen erfolgte bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre aus 95 % Sauerstoff und 5 % CO<sub>2</sub>. Der Wechsel des Kulturmediums fand zweimal wöchentlich statt. Bei Erreichen einer 80 %-iger Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert (EDTA-Trypsin) und in Kulturflaschen subkultiviert. Die Zellen der Passagen 2 bis 4 wurden für die Experimente verwendet.

Dazu wurden die Zellen bei Erreichen einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-*Multiwell*-Platten zusammen mit 1 mg des entsprechenden Knochenersatzmaterials ausplattiert. Für die indirekte Immunzytochemie erfolgte die Kultivierung der Zellen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/Kammer auf gekammerten Objektträgern gemeinsam mit 1 mg des jeweiligen Knochenersatzmaterials. Für die ersten drei Tage wurden die Zellen mit dem Standardkulturmedium kultiviert. Danach erfolgte ein Wechsel auf ein Differenzierungsmedium, das neben dem Standardmedium 50 µg/ml Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerolphosphat enthielt. Das Differenzierungsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt.

An den Tagen 10, 20 und 30 nach Ausplattierung der Zellen wurde die Zellzahl bestimmt, der WST-1-Test, ein *ELISA* und immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt.

Die Ermittlung von Wachstumskurve und WST-1-Test erfolgte an einem gemeinsamen *Well*. An einem weiteren *Well* wurden der BrdU-Test und die Aktivität der alkalische Phosphatase bestimmt. Ein drittes *Well* diente der Bestimmung von Kollagen Typ I, Osteokalzin und Osteopontin.

Es ergaben sich demnach für jedes KEM 27 Probenansätze (3 Kulturen für die verschiedenen Messungen x dreifache Messung x 3 Zeitpunkte). Als Kontrolle dienten die ohne Knochenersatzmaterial kultivierten osteoblastären Zellen. Um für jede Versuchsgruppe exakt gleiche Kulturbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Mitführung der Kontrollen auf derselben *Multiwell*-Platte.

### **2.1.3 Zugabe der Knochenersatzmaterialien zur Zellkultur**

Nach dem Ausplattieren der osteoblastären Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-*Multiwell*-Platten und mit einer Dichte von 10.000 Zellen/Kammer auf gekammerten Objektträgern in jeweils 2 ml Medium setzten sich die Zellen innerhalb einer Stunde auf dem Boden der Träger ab.

Um eine vollständige Verbindung des Kulturmediums mit dem teils porösen KEM zu gewährleisten, wurde 1 mg des jeweiligen KEM mit dem Kulturmedium (2 ml) für jeweils 10 Minuten einem Vakuum ausgesetzt. Danach wurde das imprägnierte KEM den Zellkulturen in einer Konzentration von 0,5 mg/ml beigelegt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu garantieren erfolgte eine pH-Messung direkt nach Zugabe des KEM. Weitere Messergebnisse wurden nach 10, 20 und 30 Tagen erhoben.

Die in der Tabelle 2 aufgelisteten Knochenersatzmaterialien kamen zum Einsatz.

**Tabelle 2: Die *in-vitro* verwendeten Knochenersatzmaterialien**

Material	
Bio-Oss <sup>®</sup>	bovine xenogene Knochenmatrix/Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatit
Algipore <sup>®</sup>	Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatit
Osteograft <sup>®</sup> /N	Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit
PepGen P-15 <sup>®</sup>	Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit mit einem synthetischen P-15-Peptid
Bio-Base <sup>®</sup>	$\alpha$ -Trikalziumphosphate
Cerasorb <sup>®</sup>	$\beta$ - Trikalziumphosphate
Biogran <sup>®</sup>	bioaktives Glas
Perioglas <sup>®</sup>	bioaktives Glas
Grafton <sup>®</sup>	demineralisierte allogene Knochenmatrix

#### 2.1.4 Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität

Die Ermittlung der Zellproliferation erfolgte mittels Wachstumskurven. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von 5000/cm<sup>2</sup> in 24-*Multimell*-Platten ausplattiert und die Zellzahl nach 10, 20 und 30 Tagen festgestellt. Die Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und 2 ml *DMEM* + 10 % FKS löste die Zellen. Zur Zählung wurde die Suspension zentrifugiert (5 Minuten, 1000 U/min) und das *Pellet* erneut im Kulturmedium aufgenommen. Eine Verdünnung der Suspension im Verhältnis 1:10 mit isotoner Lösung ging der Zellzählung voraus. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einem Volumen von 0,5 ml mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Z1; Beckman Coulter, Fullerton CA, USA).

Zusätzlich erfolgte, ebenfalls nach 10, 20 und 30 Tagen, eine Zellvitalitätsbestimmung mittels eines WST-1-Tests (Roche, Schweiz).

Dabei handelt es sich um einen Farbnachweistest, basierend auf dem Umsatz von Tetrazoliumsalz – dem WST-1. Dieses wurde von vitalen Zellen mittels mitochondrialer Succinatdehydrogenase reduktiv zu wasserlöslichem Formazan aufgespalten. Das Produkt spiegelte den Zellmetabolismus und die Zellintegrität wieder. Die Intensität des Farbumschlags verhielt sich dabei proportional zum Enzymumsatz und damit zur Zellvitalität sowie zur metabolischen Aktivität der Zelle.

Nach Abpipettieren des Mediums wurden die Zellen dreimal mit *PBS* gewaschen und dann 500  $\mu$ l *DMEM* mit 50  $\mu$ l WST-1 Reagenz hinzugefügt. Die Inkubation der Proben erfolgte nun für eine Stunde bei 37°C in einer Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Messung der Absorption des Reaktionsproduktes erfolgte anschließend photometrisch mittels eines *ELISA-readers* (Biorad, Deutschland) im Mediumüberstand bei einer Wellenlänge von 450 nm. Als Kontrolle diente bei jeder Messung eine Probe von 500  $\mu$ l Kulturmedium plus 50  $\mu$ l WST-1 Reagenz als Leerwert. Eine Zellproliferation und Zellvitalitätsbestimmung erfolgte im Weiteren nach 10, 20 und 30 Tagen durch einen BrdU-*ELISA*.

Die DNA-Synthese kann durch das Thymidinanalogon 5-Bromo-2-deoxy-Uridine (BrdU) verfolgt werden. Es wird anstatt Thymidin eingebaut und anschließend mit Hilfe von fluorochromgekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht. Die Zellen wurden hierzu 2 Stunden mit dem BrdU-*Labeling Reagent* (1:100) inkubiert. Nach Absaugen und Zugabe von 200  $\mu$ l Fix-Denat für 30 Minuten erfolgte eine Zugabe von 100  $\mu$ l anti-BrdU-Antikörperlösung (1:100 verdünnt) pro *Well*. Das Waschen der Zellen und das Zugeben des Substrates (100  $\mu$ l/*Well*) erfolgte nach 90 Minuten. Sobald eine Blaufärbung einsetzte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu$ l Schwefelsäure (0,5 M) gestoppt. Die Absorption des Reaktionsproduktes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 370 nm gemessen.

### **2.1.5 Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase (AP)**

Durch Messung der hydrolytischen Spaltung von p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und anorganisches Phosphat (*Alkaline phosphatase kit*, Sigma, USA) konnte die Aktivität der AP bestimmt werden. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte erneut 10, 20 und 30 Tage nach dem Ausplattieren.

Im Anschluss an das 3-malige Waschen der Zellen mit *PBS* wurde 500  $\mu$ l Substrat-Lösung hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 500  $\mu$ l 0,05 M NaOH gestoppt. Die Absorptionsermittlung des Reaktionsproduktes im Mediumüberstand erfolgte anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines *ELISA*.

Zehn  $\mu$ l HCl wurden hinzugefügt und die Absorption erneut bei 405 nm gemessen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ergab sich aus der Subtraktion der beiden Werte.

### 2.1.6 Bestimmung des Kollagen Typ I

Zur Quantifizierung des Kollagen Typ-I-Anteils im Kulturmedium verwendeten wir einen *ELISA* für CICP nach dem Sandwichprinzip (Metra<sup>TM</sup> CICP *EIA* Test). Dieses Verfahren basierte auf Messung der Konzentration des C-Peptids des Prokollagens Typ I und fand 10, 20 und 30 Tage nach Ausplattierung statt. Einhundert  $\mu\text{l}$  Standardmedium, Kontrolllösung und 1:12 verdünnte Proben des Kulturmediums wurden in beschichtete Vertiefungen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen mit Waschpuffer ausgewaschen und 100  $\mu\text{l}$  anti-CICP-Antikörperlösung hinzugefügt. Nach 50-minütiger erneuter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen abermals mit Waschpuffer ausgewaschen und 100  $\mu\text{l}$  Enzymkonjugat hinzugefügt. Nach 50-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen erneut mit Waschpuffer gewaschen und 100  $\mu\text{l}$  Substrat-Lösung hinzugegeben. Der Stopp der Reaktion nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1 M NaOH. Die Bestimmung der optischen Dichte fand photometrisch bei 405 nm statt.

### 2.1.7 Bestimmung des Osteokalzins

Für die Konzentrationsmessung des Osteokalzins im Kulturmedium nach 10, 20 und 30 Tagen kam ein kompetitiver *ELISA*-Test (Metra<sup>TM</sup> NovoCalcin *EIA* Test) zum Einsatz. 25  $\mu\text{l}$  Standard-, Kontroll- und Probenmaterial wurden in beschichtete Vertiefungen pipettiert, gefolgt durch Zugabe von 125  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung gegen Osteokalzin. Nach 2-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen mit Waschpuffer ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Enzymkonjugat für eine Stunde, gefolgt vom Auswaschen mit Waschpuffer. Die Substratlösung (150  $\mu\text{l}$ ) wurde für 30 Minuten belassen. Das Hinzufügen von 50  $\mu\text{l}$  1 M NaOH beendete die Reaktion. Die Durchführung dieses Tests erfolgte ebenfalls 10, 20 und 30 Tage nach Plattierung in die 24 Loch-*Multimell*-Platten. Die Bestimmung der optischen Dichte der Standardgruppe, der Referenzgruppe und der verschiedenen Proben geschah mittels eines *ELISA-readers* zu oben genannten Zeitpunkten bei einer Absorption von 405 nm.

### 2.1.8 Messung des Osteopontins

Eine Quantifizierung des frühen Differenzierungsmarkers Osteopontin im Kulturmedium wurde mit einem *Human-Osteopontin-ELISA-kit* (IBL, Hamburg, Deutschland) nach dem Sandwichprinzip durchgeführt. Zeitpunkt der Bestimmung war erneut nach 10, 20 und 30 Tagen. Hierzu wurden 100 µl Standards, Kontrollen und Mediumüberstände in die antikörperbeschichteten Vertiefungen pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wurde 7-malig mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl markierte Antikörperlösung (*anti-human-OPN*) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C erfolgte eine 9-malige Waschung mit Waschpuffer, gefolgt durch die Zupipettierung von 100 µl Chromogen. Ein Farbumschlag nach blau erfolgte nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Reaktion wurde mit 100 µl Stopp-Lösung abgebrochen. Die optische Bestimmung der Dichte von Kontrollen, Standards und Proben geschah nach weiteren 30 Minuten photometrisch bei 450 nm.

### 2.1.9 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) erfolgte an osteoblastären Zellen, die mit dem jeweiligen Knochenersatzmaterial (0,5 mg/ml) auf gekammerten Objektträgern kultiviert wurden. Nach einem Zeitraum von 10 und 30 Tagen wurden die Zellen mit eiskaltem 80 %-igem Methanol (5 Minuten, -20 °C) gefolgt von Aceton (5 Minuten, -20 °C) fixiert. Nach Inkubation der Proben mit dem Primärantikörper für 24 Stunden (siehe Tab. 3) bei Raumtemperatur in einer feuchten Atmosphäre wurden die Proben dreimal mit *PBS* für jeweils 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation mit den entsprechenden sekundären fluorochromgekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:100). Um eine adäquate Färbung der Nuclei zu ermöglichen war zur Gegenfärbung der Zellkerne Propidiumiodid (Sigma, München, Deutschland) in einer Konzentration von 500 µg/ml beigemischt.

Die Kontrollen wurden mit dem Sekundärantikörper allein inkubiert.

**Tabelle 3: Übersicht für die IIF verwendeten primären Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Anti- humanes Kollagen Typ I	Maus, monoklonal	1:30
Anti- humanes Osteopontin	Ratte, monoklonal	1:30
Anti- humanes Fibronectin	Maus, monoklonal	1:30
Anti- humanes Integrin $\beta_1$	Maus, monoklonal	1:30

Die Bildakquirierung erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Solms, Deutschland).

### 2.1.10 Statistik

Im Rahmen der statistischen Analyse erfolgte die Anwendung des *Student's t-Test*. Unterschiede wurden bei  $p \leq 0,05$  als signifikant angesehen. Die Statistik wurde mittels SPSS 11.0 Software für Macintosh erstellt.

## 2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

### 2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Um eine mit dem Menschen möglichst vergleichbare Situation zu erzielen, war die Auswahl des Tiermodells für die Versuche von entscheidender Bedeutung. Die Tierexperimente wurden von der zuständigen Ethikkommission gebilligt und von der zuständigen Bezirksregierung (Antragsnummer 50.203.2 K43, 36/01) genehmigt.

Als Versuchstiere wurden zwölf ausgewachsene weibliche Merinowollschafe ausgewählt, die 4-5 Jahre alt waren. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug  $73,6 \pm 8,6$  kg.

Es erfolgte eine tierartsspezifische Haltung auf Heu unter Zufütterung von Trocken- und Kraftfutter ad libitum. Die Versuchstiere wurden in einem 20 x 10 Meter großen Freigehege unter strikter Berücksichtigung des Herdentriebes der Schafe gehalten. Lediglich zur Operationsvorbereitung und direkt postoperativ wurden die Tiere in Boxen, aufgestellt auf Stroh, isoliert. Während des Beobachtungszeitraumes standen alle Tiere unter ständiger veterinärmedizinischer Überwachung. Die Versuchsbedingungen waren für alle Tiere identisch.

### **2.2.2 Studiendesign und zeitlicher Verlauf**

Die Tierversuche erfolgten in einer Kooperation der Kliniken für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Köln, dem Institut für Anatomie der Universität Köln, dem Institut für Kreislaufforschung der deutschen Sporthochschule Köln und dem Institut für experimentelle Medizin der Universität Köln. Die Tiere wurden im Institut für experimentelle Medizin untergestellt und operiert.

Die Versuchsanordnung bezog insgesamt 12 Tiere ein. Die Tiere wurden in vier Gruppen zu je drei Tieren randomisiert.

Die drei Tiere der ersten Gruppe wurden vier Wochen nach der Operation euthanasiert, die der zweiten Gruppe nach acht Wochen. Nach 12 beziehungsweise 16 Wochen post operationem erfolgte die Probengewinnung aus den drei Tieren der dritten beziehungsweise vierten Gruppe.

Somit konnten vier postoperative Einheitszeitpunkte definiert werden: 4, 8, 12 und 16 Wochen.

Bei jedem Tier wurde eine bilaterale Sinusliftoperation durchgeführt.

In jeder Gruppe fanden jeweils vier Knochenersatzmaterialien sowie einmal Kortikospongiosa und einmal Spongiosa Verwendung, so dass alle sechs Kieferhöhlen, welche bei drei Tieren pro Zeitpunkt zur Verfügung standen, ausgenutzt wurden.

### **2.2.3 Anästhesie, Vorbereitung, prä-, intra- und postoperative Medikation**

Die Operationen erfolgten nach einem standardisierten Protokoll.

Nach Anlage eines venösen Zuganges in einen der Vorderläufe wurde die gewichtsadaptierte intravenöse Narkose mit Disoprivan 2 % eingeleitet.

Die Operation erfolgte in Allgemeinanästhesie unter kontrollierter Beatmung, bei Narkoseaufrechterhaltung durch Applikation von Isofluran und Midazolam.

Die Tiere wurden für den Eingriff in Bauchlage gelagert, die Extremitäten längs ausgelagert und mit Klettverschlussbändern fixiert. Als Vorbereitung auf die Operation wurden die Tiere auf Höhe der beiden Sinus geschoren (Abb. 2). Es erfolgte eine Hautdesinfektion mit gefärbtem Cutasept F (Bodechemie, Hamburg, Deutschland). Zusätzlich wurde eine Pansensonde gelegt.

Die Schafe erhielten während der Operation sowie mindestens 3 Tage post-operativ eine prophylaktische Antibiotikagabe mit Penicillindihydrostreptomycin (antiMedica GmbH, Deutschland) i.m. Die postoperative Analgesie erfolgte mittels Subkutangabe von Rimadyl® (Pfizer GmbH, Deutschland) für 3 Tage.

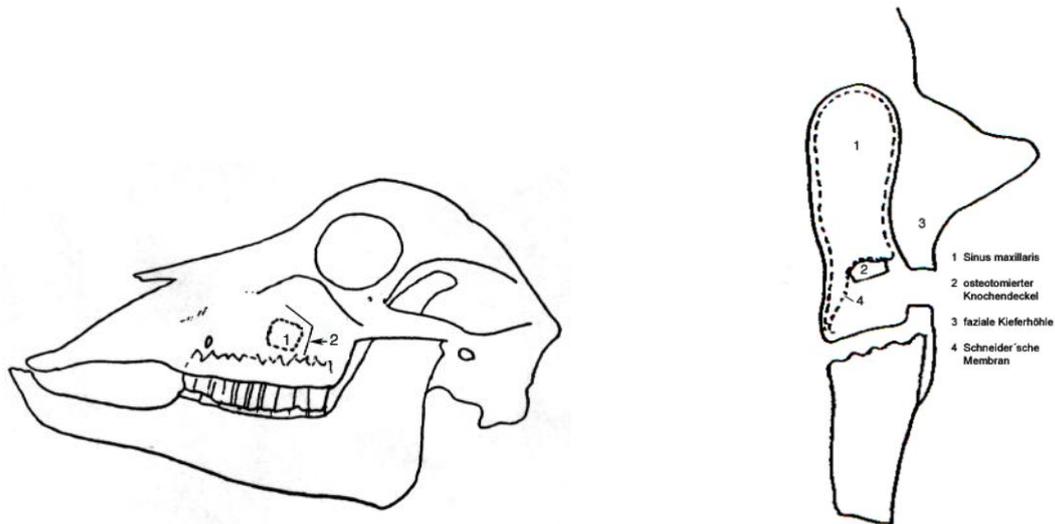
#### 2.2.4 Die Sinusliftoperation

Der chirurgische Eingriff wurde bilateral unter aseptischen Bedingungen im Operationssaal der experimentellen Medizin der Universität zu Köln durchgeführt.

Auf der Höhe des Sinus maxillaris erfolgte von extraoral, nach Infiltration eines Lokalanästhetikums (Xylocain 1% mit Adrenalin), ein infraorbitaler, winkelförmiger 2 x 2 cm langer Hautschnitt. Durch Abklappen eines Haut- und Unterhautfettlappens resultierte die Darstellung der fazialen Kieferhöhlenwand. Das Periost wurde scharf inzidiert und mittels Raspatorium von der fazialen Kieferhöhlenwand gelöst. Die Blutstillung erfolgte durch Diathermie oder Ligatur. Anschließend erfolgte eine Schwächung der Kieferhöhlenwand unter Osteotomie eines 1 x 1 cm großen Knochendeckels (Abb. 3). Auf eine adäquate Wasserkühlung wurde geachtet.



**Abb. 2:** intubiertes Schaf mit angelegtem Pansenrohr, Operationsgebiet rasiert und desinfiziert.

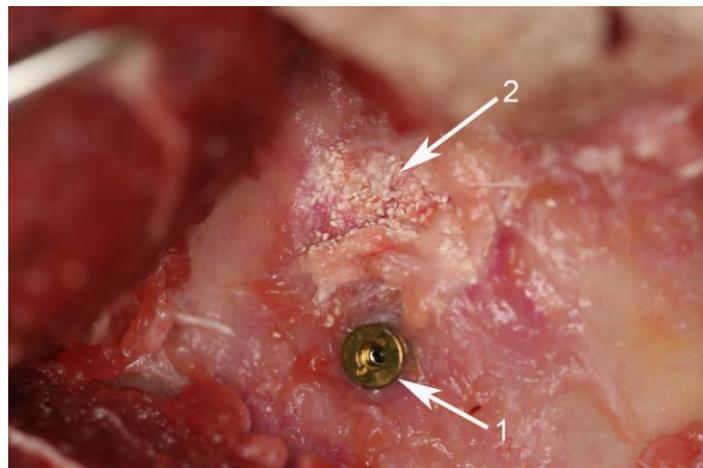


**Abb. 3: a) Seitliche Aufsicht Schädel mit Schnittführung (2) und Osteotomie (1).**

**b) Coronale Schnittansicht der Kieferhöhe.**

Im Anschluss wurde die geschwächte Kieferhöhlenwand unter Wahrung der Kieferhöhlenschleimhaut (Schneidersche Membran) mittels Sinusliftinstrumenten eleviert (Abb.3). Nach der Anhebung dieses Deckels erfolgte das Einbringen von circa  $0,5 \text{ cm}^3$  autogenen Knochens oder  $0,5 \text{ g}$  KEM nach Herstellerangaben durch die fazial eröffnete Kieferhöhlenwand. Die autogene Spongiosa und Kortikospongiosa wurde vor Einlagerung mit einem Luer *gecrusht*. Das Einbringen erfolgte unter Wahrung der Integrität der Kieferhöhlenschleimhaut.

In unmittelbarer Nachbarschaft der elevierten Kieferhöhlenmembran erfolgte nun die Implantation eines Xive-Implantates (Xive® S Cell + D3,8 / L8, LOT: 103266131038, Xive, Deutschland) (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Dargestellte faziale Kieferhöhlenwand mit inseriertem Implantat (1) und durch Osteotomie eingebrachtes KEM (2).**

Der Wundverschluss erfolgte zweischichtig mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0 und 0). Die unbehaarte Haut wurde anschließend mit Aluspray versiegelt, einerseits um einen aseptischen Sprühverband zu schaffen, andererseits um die Haut vor Sonneneinstrahlung zu schützen.

Im Fall einer Verletzung der Kieferhöhlenschleimhaut wurde die Kontinuitätsunterbrechung mittels Ethicon EDP23 Episorb® *Dura Patch* (LOT: SP8GKJB0) abgedichtet oder mittels einer Vicryl-4.0-Naht verschlossen.

Die durchschnittliche Operationsdauer betrug 60 bis 90 Minuten.

### 2.2.5 Postoperative Haltung der Schafe

Direkt nach der Operation wurden die Tiere in Boxen isoliert. Nach eintägigem Aufenthalt in der Einzelbox wurden die Tiere zurück in die Herde integriert. Die weitere postoperative Unterbringung der Schafe differierte nicht zu der bereits beschriebenen präoperativen Haltung.

### 2.2.6 Knochenersatzmaterialien

Im Rahmen der *in-vitro*-Versuche wurden die Knochenersatzmaterialien Cerasorb®, Biogran®, PepGen P-15®, und Bio-Oss® für die Tierversuche ausgewählt (Tab. 4).

**Tabelle 4: Die *in-vivo* verwendeten Knochenersatzmaterialien**

Material	Art und Hersteller	Partikelgröße	Menge	LOT
Cerasorb®	β- Trikalziumphosphat (Curasan, Deutschland)	500- 1000µm	1g	6TM302C
Biogran®	bioaktives Glas (Implant Innovations, USA)	300- 355 µm	1g	237575
PepGen P-15®	Hydroxylapatit mit P-15-Kette (Dentsply, USA)	0,25- 0,42mm	1g	03L3182A
Bio-Oss®	natürliche Knochenmatrix (Geistlich Biomaterials, Schweiz)	0,25- 1 mm	1g	030108

Das Einbringen der Materialien erfolgte gemäß der durch den Hersteller angegebenen Standards.

### 2.2.7 Intravitale Fluoreszenzmarkierung

Die Dynamik verkalkender Gewebe konnte durch die intravitale Applikation von Fluoreszenzmarkern analysiert werden. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild ließen sich so Knochenan- und umbauvorgänge nachweisen, die durch Mineralisationsprozesse gekennzeichnet waren. Fluorochrome wurden in kalzifizierende Gewebe eingebaut, wobei die Farbstoffe mit dem Kalzium einen Chelatkomplex bildeten. Damit konnten Neubildungen zeitlich eindeutig identifiziert werden und ergaben bereits im Einzelpräparat Informationen über die Dynamik der Hartgewebebildung.

Da Kalzifikation, Knochenumbau und das Remodeling des Knochens an eine intakte Mikro-zirkulation gebunden waren, kam es nur im vitalen Knochen zu einer Markierung. Durch die Anfärbung mit Fluorochromen lassen sich also auch Rückschlüsse auf Vaskularisation und Re-vaskularisation des Knochens ziehen.

Durch Mehrfachmarkierung mit unterschiedlichen Fluorochromen war es möglich, die verschiedenen Phasen des Knochenumbaus oder der knöchernen Einheilung darzustellen.

Während des Einheilprozesses wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Fluorochrome Xylenorange (orange) 90 mg/kg; Calcin (grün) 15 mg/kg, Alizarin complexone (rot) 30 mg/kg, Oxytetracyclin (gelb) 30 mg/kg subkutan appliziert. Um eine Anfärbung des osteogenetisch aktiven Knochens zu gewährleisten wurden die Farbstoffe mit saurem pH-Wert zur besseren Gewebeverträglichkeit als 3 %-ige Lösung in 2 %-igem Natriumbikarbonat abgepuffert und steril filtriert. Die Applikation erfolgte in der Reihenfolge der folgenden Tabelle 5 und Abbildung 5.

**Tabelle 5: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe**

Fluoreszenzfarbstoff	Dosierung	Farbe
3 % Xylenorange 5g+3,34g 2 %NaHCO <sub>3</sub> in 167ml Aqua dest (A.d)	90 mg/kg	orange
3 % Calcin 1g+0,66g 2 %NaHCO <sub>3</sub> in 33,33ml A.d.	15 mg/kg	grün
3 % Alizarin complexone 1g+0,66g 2 %NaHCO <sub>3</sub> in 33,33ml A.d.	30 mg/kg	rot
3 % Oxytetracyclin 5g+3,34g 2 %NaHCO <sub>3</sub> in 167ml A.d.	20 mg/kg	gelb

Die Markierung mit Fluorochromen war nur bei osteogenetisch intakten Zellen möglich und zeigte Kalzifizierung, Knochenumbau oder Remodeling an.

Die Applikation des ersten Markers Xylenolorange erfolgte am Tag 14 nach der Operation (Zeitpunkt 0, Gruppe1). In einem vierwöchigen Rhythmus wurde nun jeweils ein weiterer Farbmarker appliziert (Abb. 5).

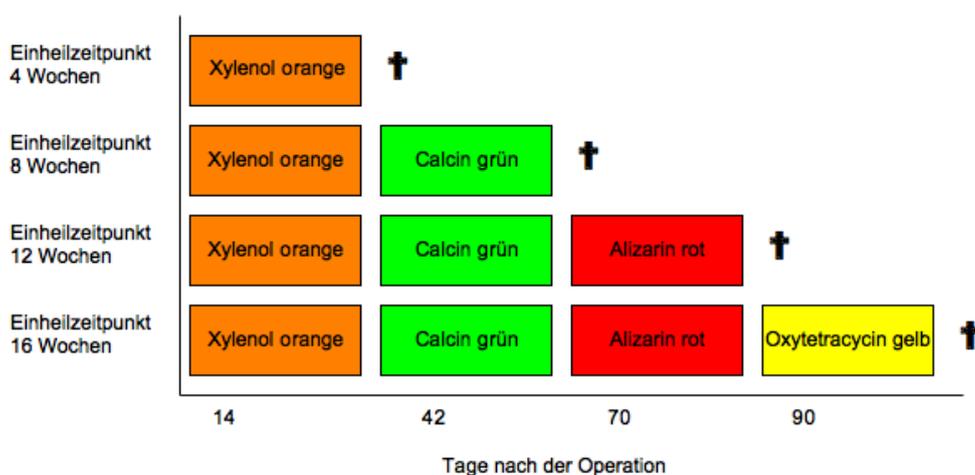
Bei den Gruppen 2+3+4 erfolgte die subkutane Injektion des zweiten Farbmarkers Calcin grün somit am Tag 42 nach der Operation.

Bei Gruppe 3+4 wurde der 3. Marker Alizarin rot am Tag 70, bei Gruppe 4 der letzte Marker Oxytetracyclin gelb am Tag 98 post operationem injiziert (Abb.5).

Die Tiere der ersten Gruppe erhielten demnach nur Xylenolorange, die der zweiten Gruppe zusätzlich Calcin grün. In der dritten Gruppe wurden mit zusätzlich Alizarin rot insgesamt drei Marker appliziert. Die zur letzten Gruppe gehörigen Tiere erhielten alle vier Marker.

Die Tiere wurden nach unterschiedlichen Einheilzeitpunkten (nach 4, 8, 12 und 16 Wochen) euthanasiert und die Proben gewonnen.

In den Versuchsgruppen konnte somit durch die Sequenzmarkierung die Kalzifikation nach 4, 8, 12 und 16 Wochen im Bereich der augmentierten Sinusböden dargestellt werden.



**Abb. 5:** Applikation der Fluoreszenzmarker.

Die verwendeten Fluoreszenzmarker erfüllten das Gebot, keine lokale oder generalisierte Toxizität zu besitzen, welche die Knochenbildung und somit den Versuchsablauf beeinflussen können. Außerdem wurden sie nicht durch die Fixierung und die Einbettung in Methylmethacrylat verändert. Dadurch konnten intravital markierte Knochen auch mit anderen histologischen Färbungen versehen werden.

### **2.2.8 Euthanasie der Tiere**

Zur Euthanasie der Tiere, sortiert nach den unterschiedlichen Einheitszeitpunkten, erfolgte erneut die Anlage eines peripheren Venenzuganges. Hierüber wurde Disoprivan 2 % appliziert, bis die Tiere anästhesiert waren, die Spontanatmung aber nicht sistierte. Im Anschluss erfolgte eine intravenöse Vollheparinisierung mit Liquemin (Heparin- Natrium - 300 IE / kg Körpergewicht), um einer postmortalen Blutkoagulation entgegenzuwirken.

Nach Lagerung in Rückenlage auf dem Operationstisch wurden bis zum Eintritt des Herzstillstandes insgesamt 40 ml Nacoren (Merial GmbH, Deutschland) verabreicht.

### **2.2.9 Gewinnung der Proben**

Unmittelbar nach der Todesfeststellung durch eine Veterinärmedizinerin wurden über bilaterale Schnitte die zervikalen Gefäßnervenscheiden präpariert und die Halsgefäße dargestellt. Beidseits wurde in die A. carotis externa ein großlumiger Katheter platziert und durch Ligaturen fixiert. Mittels einer Pumpe wurde mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, 6 Liter) gespült, bis über die eröffneten Vv. jugulares internae klare Flüssigkeit austrat.

Die nachfolgende Perfusionsfixation mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, pH 7,4, 4 Liter) in 0,1 % PBS erfolgte auf dem gleichen Wege.

Nach Absetzen des Kopfes und Gewinnung der Proben durch wassergekühlte Osteotomie mit einer Pendel- und Stichsäge erfolgte die Nachfixation durch Immersion in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 % PBS.

Im Anschluss wurden die Proben zunächst 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 % PBS immersionsfixiert, bevor weitere Untersuchungen folgten.

## 2.2.10 Auswertung der Proben

### 2.2.10.1 Klinische Beurteilung der Proben anhand von Scores

Die Proben wurden klinisch nach folgendem Scoresystem beurteilt:

Stabile Einheilung des Implantates: ja = 1, nein = 0

Makroskopische Einheilung des Knochenersatzmaterials: ja = 1, nein = 0

Um eine größtmögliche Konstanz zu gewährleisten, erfolgte die Vergabe der Scores immer durch denselben Untersucher.

Darüber hinaus erfolgte die Auswertung durch eine quantitative Computertomographie.

### 2.2.10.2 Quantitative Computertomographie (qCT)

Die Sinusproben der 12- und 16-Wochen-Gruppe wurden mit einem quantitativen Computertomographen (XCT Research Bone Scanner M, der Firma Stratech Medizintechnik GmbH, Pforzheim) gemessen. Mittels dieser Untersuchung konnten die Knochendichte sowie der Gehalt an Knochensalzen in einer *Region of Interest (ROI)* bestimmt werden. Die Messungen wurde aufgrund der zu späten Einheilzeitpunkten zu erwartenden deutlicheren Unterschiede nur an den Proben der 12- und 16-Wochen-Gruppe durchgeführt.

#### Technische Daten (laut Herstellerangaben):

Röntgenröhre: Hochspannung 50 kV, Anodenstrom < 0.3 mA, mittlere Röntgenenergie 37 keV, Energieverteilung nach Filterung 18 keV (FWHM)

Detektoren: 12 Halbleiterdetektoren mit Verstärker

Positionierhilfe: Diodenlaser <1 mW

Computer: DOS- kompatibler Computer mit hochauflösendem Farbmonitor

Mechanik: Translation - Rotations Prinzip  
 Rotationswinkel 186 °  
 Messgeschwindigkeit max. 40 mm/sec  
 Auflösung 70-500 µm  
 Maximale axiale Weglänge 170 mm  
 Zentrale Durchtrittsöffnung 50 mm

Gewicht: < 45 kg

Abmessungen: B\*H\*T 550 mm\*620 mm\*930 mm

Stromversorgung: 100-240 V, 50-60 Hz, 100 W

Strahlenquelle:

Als Strahlenquelle wurde eine Röntgenröhre verwendet. Die Hochspannungserhaltung wurde auf einem konstanten Wert gehalten. Die Regelelektronik hielt den Anodenstrom und somit die Intensität der Röntgenstrahlung konstant, eine spezielle Filterung absorbierte die niederenergetischen Anteile des Röntgenspektrums.

Strahlenexposition während der Messung:

Bei 58 kV und 220  $\mu$ A, Cer Filter

Ortsdosisleistung bei eingeschalteter Röntgenstrahlung:

<i>Scoutview:</i>	ca. 40 cm Abstand	6,0 $\mu$ Sv/h
	ca. 1m Abstand	2,2 $\mu$ Sv/h
CT- Stan:	ca. 40 cm Abstand	0,06 $\mu$ Sv/h
	ca. 1 m Abstand	0,02 $\mu$ Sv/h

*Software:* XCT 5.50 D Research + M

Messeinstellungen:

*Voxelsize* : 0,1 mm

*CT-Scan*: 15 min/5 Schnitte

*Scoutview*: ca. 1 min., je nach Größe der Knochenprobe

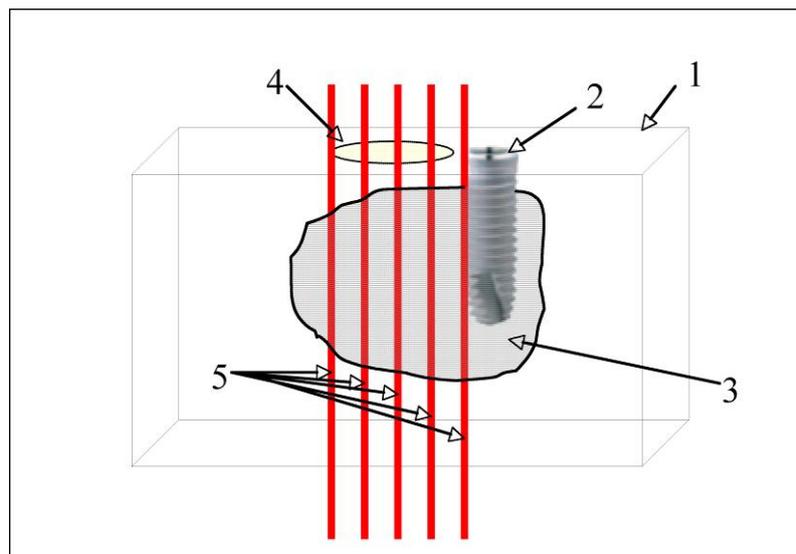
*Scoutview*: ca. 1 min., je nach Größe der Knochenprobe

### 2.2.10.2.1 Durchführung der qCTs

Das Gerät wurde mit einem Standardphantom (Cone Phantom) 0,550 1/cm kalibriert. Intermitierend erfolgte die Qualitätsprüfung während der Messungen mit dem gleichen Phantom.

Die Knochenprobe wurde in einer formalingefüllten 50 ml *Tube* positioniert und der zu messende Bereich distal der Fassvorrichtung gelagert. Somit durchquerte der Messstrahl die Probe rechtwinkelig zur Knochenachse.

Mit Hilfe des Positionierungslasers wurde das proximale Ende der Probe gesucht und der *Scoutview* (Oberflächenscan) gestartet. Beim *Scoutview* wurde die Probe mäanderförmig abgescannt und der Messstrahl dabei quer durch die Probe geführt. Man erhielt ein farblich codiertes digitales Rasterbild mit hellen knochendichten und dunklen Weichteilanteilen (falls vorhanden). Anhand dieses *Scoutviews* wurden die 5 Schnittlinien mit einem Abstand von 0,5 mm positioniert. Schnitt 5 lag dabei möglichst implantatnah, Schnitt 1 implantatfern (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** Schema der angeordneten CT-Schnitte (5, links Schnitt 1 rechts Schnitt 5) in der gewonnenen Knochenprobe (1) durch das KEM (3) mit eingebrachtem Implantat (2). (4) Osteotomie in der fazialen Kieferhöhlenwand.

Nach Positionierung der Schnittebenen wurde der *CT-Scan* gestartet. Der *Scan* erfolgte in proximaler Richtung. Der Messstrahl durchquerte die Probe ebenfalls rechtwinkelig zur Knochenachse, das Messsystem wurde jedoch nach jedem Laserscan um  $12^\circ$  gedreht. Da der Winkelabstand der Detektoren relativ zur Quelle  $1,0^\circ$  betrug, ergaben sich nach 15 *CT-Scan*positionen 180 Winkelschnitte, die für die Berechnung des *CT-Bildes* ausgewertet wurden.

### 2.2.10.2.2 Auswertung der pQCTs

In jedes CT-Bild wurden zwei *Regions of Interests (ROIs)* positioniert:

- ortsständiger, trabekulärer Knochen (TO)
- Knochenersatzmaterial, Spongiosa oder Kortikospongiosa (KORT)

Die Messung erfolgte an den Proben der Tiere der 12- und 16-Wochengruppe. Die Werte wurden nur zu diesen beiden späten Zeitpunkten gewählt, da erst nach dieser Zeit erst mit interpretationsfähigen Dichtewerten zu rechnen ist. Es wurde die totale Knochendichte für die beiden definierten *ROIs* ermittelt, die 5 Werte einer *ROI* gemittelt und die Standardabweichung errechnet.

### 2.2.11 Einbettung der Proben in Technovit

Im Anschluss an die qCT-Untersuchungen wurden die formalinfixierten Proben in Kunststoff eingebettet.

Über eine aufsteigende Glykolmethacrylat-Reihe (GMA), anschließende Infiltration mit einem Gemisch aus GMA / Technovit 7200 VLC und abschließend mit reinem Technovit 7200 VLC, wurde das Gewebe entwässert und kunststoffinfiltriert (Tab. 6).

**Tabelle 6: Kunststoffinfiltration in GMA / Technovit 7200 VLC**

Tag	Medium	Ratio
1	GMA / A.d.	50 / 50
2	GMA / A.d.	70 / 30
3	GMA / A.d.	90 / 10
4	GMA	100
5	GMA / 7200 VLC	50 / 50
6	7200 VLC	100
7-8	7200 VLC	100
9-10	7200 VLC	100

Die Einbettung der Proben erfolgte mittels des unter Licht härtenden Fixierungskunststoffs Technovit 7210 VLC. Der Kunststoff wurde in einem Photopolymerisationsgerät zweiphasig auspolymerisiert.

Im ersten Abschnitt (Phase 1, 120 Minuten) gewährleistete Licht schwächerer Intensität eine Polymerisationstemperatur unter 40 °C und verhinderte somit die Blasenbildung. Hohe Temperaturen und rascher Temperaturanstieg würden zur Verdampfung des Monomers führen. In dieser Phase erfolgte die weitestgehende Polymerisation des Einbettungsmediums.

In der zweiten Phase erfolgte die Auspolymerisierung des in die Probe filtrierten Kunststoffes mittels intensiveren Blaulichts. Bei Gewebeproben einer Dicke von bis zu 10 mm dauerte dieser Vorgang mindestens 8 Stunden.

### **2.2.12 Erstellen der Trenndünnschliffe**

Zur Anfertigung der Trenndünnschliffe wurde ein EXAKT- Trennschleifsystem (Exakt Apparatebau, Deutschland) benutzt (Abb. 7-11).

Die endgültige Probendicke betrug circa 100 µm.

Trennung der Proben:

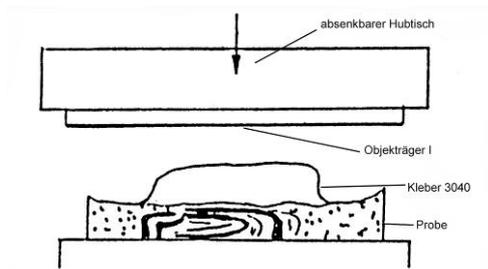
Im ersten Schritt wurde die Probe mittels einer Säge mit Präzisions-Parallelführung (Exakt 310 CP, Exakt Apparatebau, Deutschland) in zwei Hälften zerteilt (Abb.11).

Das eingesetzte Implantat diente zur Orientierung. Die entstehenden Schnittflächen verliefen optimalerweise durch die elevierte Sinusmembran.

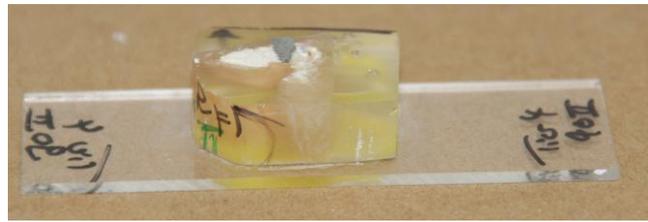
Schleifen der Proben:

Im folgenden Arbeitsgang erfolgte die Fixierung der Proben an der Gegenseite zur Schnittfläche planparallel auf Objektträgern (Abb. 7, 8).

Hierzu wurde die Schnittseite durch ein Vakuum angesogen. Auf der Gegenseite wurde ein spezieller Kleber (Technovit Exakt Kleber 3040) aufgetragen und ein Objektträger planparallel auf die Probe abgesenkt (Abb. 7).

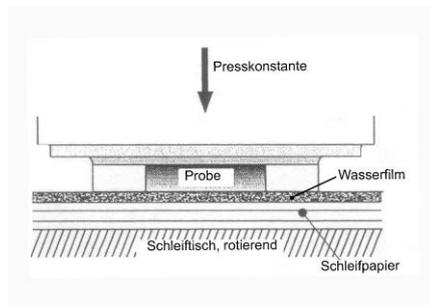


**Abb. 7: Planparalleles Fixieren der Probe auf dem Objektträger (OT1).**



**Abb. 8: Auf Objektträger (OT1) aufgebrachte Probe.**

Die Entfernung von Unebenheiten und Kratzern der Schnittfläche erfolgte mittels eines Mikro-Schleifsystems (Exakt 400 CS, Exakt Apparatebau, Deutschland) (Abb. 9).

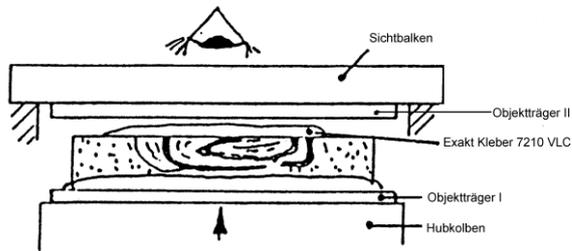


**Abb. 9: a) Schleifprinzip (schematisch).**



**b) Exakt Mikro- Schleifsystem.**

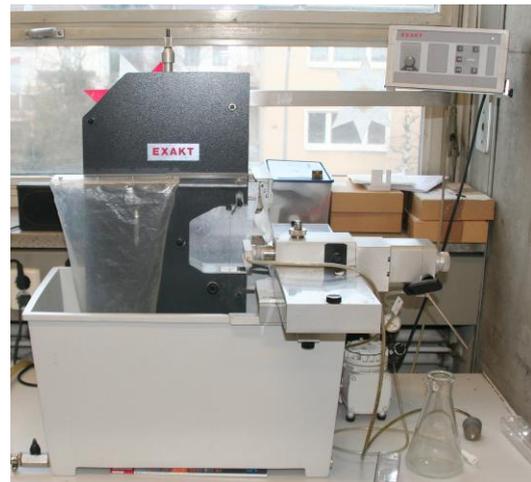
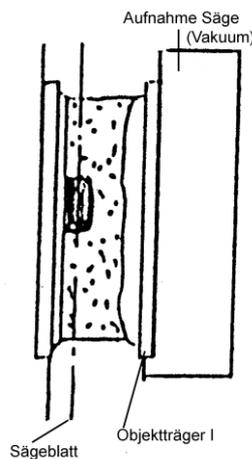
Anschließend folgte die planparallele Verklebung der nun geschliffenen Schnittfläche mit einem weiteren Objektträger durch einen transparenten Kleber (Technovit Exakt Kleber 7210 VLC). Das Verkleben erfolgte durch das Anheben der Probe, auf der transparenter Kleber aufgetragen war, gegen einen weiteren Objektträger nach der sogenannten Sandwichtechnik. Der Verbindungsvorgang konnte durch einen Sichtbalken verfolgt werden, um eventuelle Luftblasen auszugleichen (Abb. 10).



**Abb. 10: a) Schema der planparallelen Verklebung von OT1 mit Probe und OT2 mittels Exakt Kleber.**

**b) Hubtisch zur planparallelen Verklebung.**

Unter erneuter Verwendung der Säge mit Präzisions- Parallelführung (Abb. 11b) wurde dieser zweite Objektträger circa 200  $\mu\text{m}$  hinter dem ursprünglichen Block abgetrennt (Abb. 11a).



**Abb. 11: links a) Schema zum Sägen der Proben und rechts b) Exaktsäge (Exakt, Apparatebau).**

Dieser Schnitt wurde im nächsten Arbeitsschritt mittels Mikro-Schleifsystem (Exakt 400 CS mit Mess- und Steuereinheit AW 110, Exakt Apparatebau, Deutschland) auf die endgültige Schichtdicke von 100  $\mu\text{m}$  (+/- 5  $\mu\text{m}$ ) geschliffen und poliert (gleiches Prinzip wie oben beschrieben, siehe Abb. 8).

Während aller Arbeitsschritte erfolgten Messkontrollen der Proben und Objektträger. Eine durchgehende planparallele Verarbeitung der Proben wurde eingehalten.

### 2.2.13 Kontakt-Mikroradiographie

Zur Darstellung der Knochenneubildung im Bereich des elevierten Kieferhöhlenbodens und des eingebrachten Materials wurden Kontakt-Mikroradiographien angefertigt. Mit niedriger Röntgenintensität und verlängerter Belichtungszeit konnten so auch feinste knöcherne Strukturen radiographisch dargestellt werden.

#### 2.2.13.1 Durchführung der Kontakt-Mikroradiographien

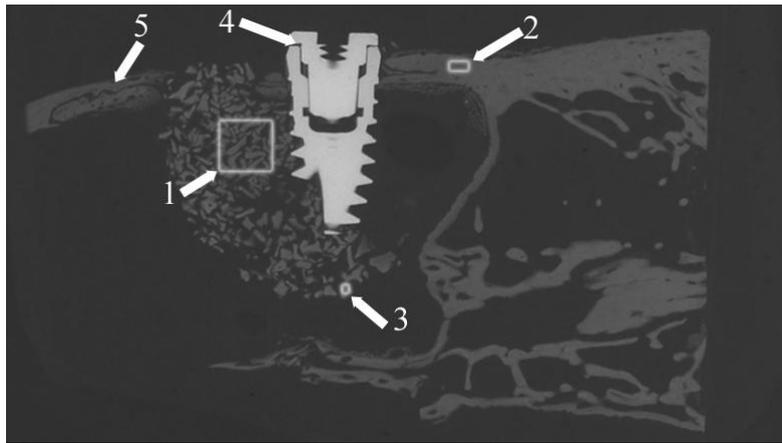
Durch direkten Kontakt des Objektes mit dem Film (Agfa Structurix D4 DW ETE 13 x18cm) erfolgte eine dimensionstreue Abbildung. Die Belichtung erfolgte mit 30 kV für 30 Sekunden. Als Röntgengerät verwendeten wir das *Hewlett-Packard Cabinet X Ray System (Faxitron Series, HP)*. Die Objekte wurden hierfür auf eine Dicke von  $100 \pm 5 \mu\text{m}$  geschliffen und poliert.

#### 2.2.13.2 Auswertung der Mikroradiographien

Die entwickelten Röntgenbilder wurden eingescannt (Auflösung 600 dpi, 8 bit, grau) und als Grafik im *.tiff*-Format gespeichert. Die Bilder wurden im Programm *Image J 1.35d* (Weiterentwicklung von *NIH-Image v 1.62* für *Apple MacIntosh*) geöffnet. Vor der Flächenberechnung erfolgte einer Vergrößerung auf 200 %. Der Auflösungsmaßstab wurde mit *Set scale* unter dem Menüpunkt *Analyze* auf 24,45 Pixel pro mm (313 pixel/12,8 mm) eingestellt bzw. überprüft. Die Festlegung der ROI erfolgte mittels des Rahmenwerkzeuges. Hierbei war zu beachten, dass die Eckpunkte der ROI im KEM positioniert wurden. Mit dem Befehl *Crop* unter dem Menüpunkt *Image* wurde die Markierung (ROI) (Abb.12) herausgeschnitten und in einem neuen Bild geöffnet. Das neue Bild wurde im *.jpeg*-Format gespeichert. Die Definition zweier Referenzausschnitte erfolgte auf dieselbe Art und Weise. Mittels des Rahmenwerkzeuges wurde ein Bereich in der Kortikalis des ortständigen Knochens und einer im KEM ausgewählt. Die Ecken und Flächen beider Rechtecke lagen sicher und ausschließlich in dem entsprechenden Material. Die Festlegung der Grenzwerte erfolgte nun an diesen Bildern, mittels des *Look up Tables (LUT)* (unterer und oberer Grenzwert für den Grauwert, Menüpunkt *Image, Adjust, Threshold*). Es wurden die Grenzwerte für den Ausschnitt Knochen und den Ausschnitt KEM definiert. Unter dem Menüpunkt *Process/Binary/Threshold* wurden die festgelegten Grenzwerte für Knochen auf das Bild angewendet (*Apply LUT*). So war es möglich, die Knochenneubildung um das eingelagerte KEM in der ROI zu bestimmen. Anschließend wurde das nunmehr binäre Bild invertiert (*Edit, Invert*). Unter dem Menüpunkt *Analyze* wurde mit dem Befehl *Measure* die Fläche des markierten Areal (=Knochens) berechnet. Sie wurde in Prozent der gesamten Fläche des Ausschnitts angegeben und konnte so

in  $\text{mm}^2$  umgerechnet oder prozentual ausgedrückt werden. Die beschriebene zusätzliche Bestimmung der Grenzwerte für das KEM diente zu Kontrollzwecken.

Auf diese Weise wurden die vier Knochenersatzmaterialien sowie die eingebrachte Spongiosa und Kortikospongiosa gemessen.



**Abb. 12:** Kontakt-Mikroradiographie des Sinus maxillaris; Schema der *Region of Interests (ROIs)* im Querschnitt. (1) ROI im KEM, (2) Ausschnitt kortikaler Knochen, (3) Ausschnitt KEM, (4) inseriertes Implantat, (5) ortsständiger Knochen der fazialen Kieferhöhlenwand.

#### 2.2.14 Polychrome Sequenzmarkierung

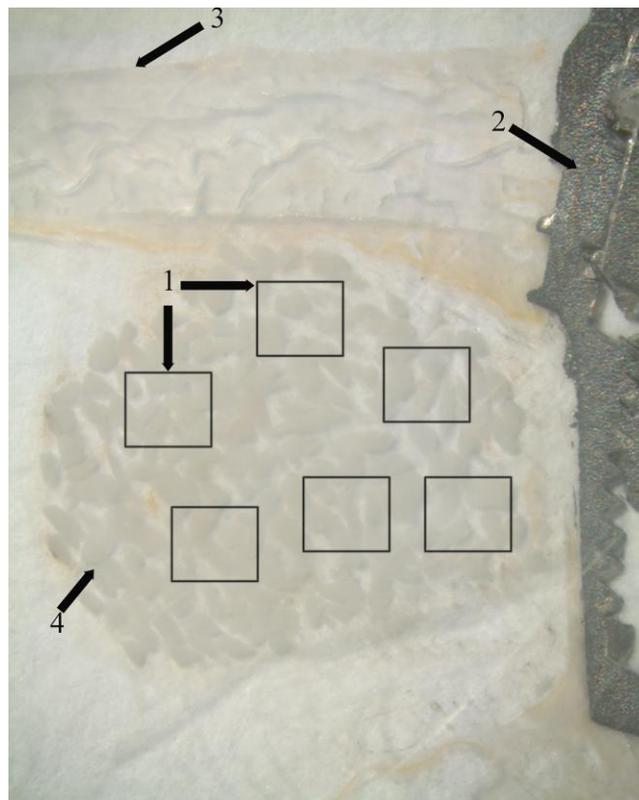
Bei der Fluoreszenzmikroskopie traf kurzwellige Strahlung auf ein fluoreszenzfähiges Molekül. Einzelne Elektroden wurden dadurch auf äußere, energiereichere Bahnen gehoben (Exzitation). Von dort aus kehrten sie unter Abstrahlung von langwelligerem Licht wieder auf die ursprüngliche Bahn zurück (Emission).

Durch die Markierung mit fluorochromen Farbstoffen wurden die Regionen der Knochenapposition in zeitlich genau definierten Intervallen markiert. Die Lokalisation der Knochenneubildung zu definierten Zeitpunkten konnte so gezeigt werden. Als Marker verwendeten wir Xylenolorange (orange), Calcin (grün), Alizarin complexone (rot) und Oxytetracyclin (gelb) (siehe auch Kapitel 2.2.7).

Die Bildaufnahme erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Leica *FireCam* (Version 1.7.1, Leica *Microsystems Imaging Solutions Ltd.* England). Als Mikroskop fungierte ein Leica-Fluoreszenzmikroskop mit einer DC500- Kamera; Verwendeter Filter: Fluo D, *Intensity* 100 %, *Field* 4.

Die Bildaquirierung geschah grundsätzlich im *Auto-Mode*. Bei der Analyse wurde über die Proben bei 100-facher Vergrößerung ein Gitternetz (1mm<sup>2</sup> bei 10x Vergrößerung, 10er Skalierung á 0,1 mm) gelegt und so die Präparatefläche in 100 gleich große Felder unterteilt. Die durch das Gitternetz gebildeten 121 Schnittpunkte wurden dem Fluoreszenzmarker, auf dem die Positionierung erfolgte, zugeordnet (*Point-Counting-Verfahren*). Insgesamt fand die Definition von sechs gleichgroßen *ROIs* (Abb. 13) statt. Die Auszählung erfolgte durch fünf unabhängige Personen unter gleichen Bedingungen. Die Ergebnisse der Einzelauswerter wurden bis zum Ende der Auszählung nicht kommuniziert, die Auswertung erfolgte einfach verblindet. Die Ergebnisse der Einzelauswerter wurden addiert und gemittelt.

Bei der Auswertung der *Regions of Interest* schloss man die Bereiche des Rasters, die leer waren, d.h. kein KEM oder ortsständigen Knochen enthielten, aus der Zählung aus. Die Auswertung erfolgte in % in Relation zur Gesamtsumme (G) abzüglich der Leerfelder (L):  $(X/(G-L)) \cdot 100$



**Abb. 13:** Schema zur Verteilung der *ROIs* (1) im Transplantat. Hier beispielhaft am KEM (4) PepGen P-15, 8 Wochen, (2) Implantat, (3) faciale Kieferhöhlenwand.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der *in-vitro*-Versuche

Die folgenden Ergebnisse wurden auf die Kontrolle (entspricht 100 %) bezogen. Diese wurden mit den verschiedenen Materialien auf derselben *Multivell*- Platte mitkultiviert, um identische Bedingungen zu garantieren.

#### 3.1.1 pH- Messung nach Zugabe der Knochenersatzmaterialien

Die Zugabe der verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu den Zellkulturen beeinflusste den pH- Wert im Medium zu keiner Zeit. Die durchgeführten pH-Wert-Messungen direkt nach Zugabe sowie nach 10, 20 und 30 Tagen, schwankten über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 7,54 und 7,72.

Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

#### 3.1.2 Beurteilung der Zellproliferation und Zellaktivität

Die Zellproliferation, die Zellvitalität und metabolische Aktivität in Gegenwart der jeweiligen KEM wurde nach 10, 20 und 30 Tagen mittels Wachstumskurven, WST-1-Test und BrdU- Test bestimmt.

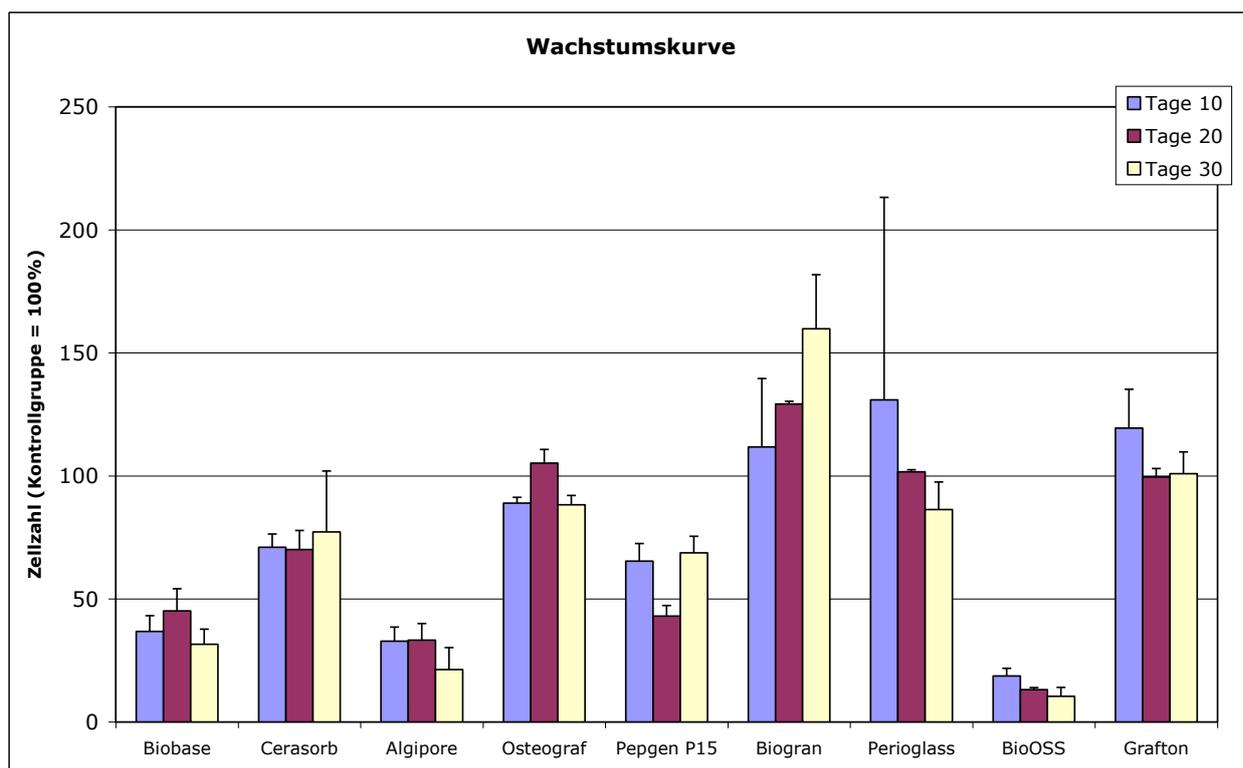
### 3.1.3 Wachstumskurve

Die Versuchsgruppen mit Bio-Base<sup>®</sup>, Cerasorb<sup>®</sup>, Algipore<sup>®</sup>, PepGen P-15<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> wiesen signifikant ( $p < 0,05$ ) verminderte Zellzahlen auf. In Gegenwart von Bio-Oss<sup>®</sup> wurden die schlechtesten Wachstumswerte ermittelt (siehe Abb. 14).

Bei Kultivierung mit Osteograf/N<sup>®</sup>, Perioglas<sup>®</sup> und Grafton<sup>®</sup> präsentierten die osteoblastären Zellen eine ähnliche Wachstumsentwicklung wie die Kontrollgruppe.

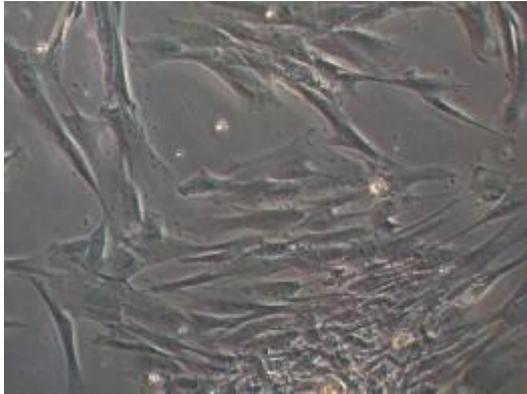
Die Versuchsgruppe mit Biogran<sup>®</sup> erreichte die höchste Proliferation. Die Werte lagen über denen der Kontrollgruppe. So lagen nach 30 Tagen die für Biogran<sup>®</sup> ermittelten Werte bei  $>150\%$  der Kontrolle.

Bei den für Perioglas<sup>®</sup> erhobenen Werten nach 10 Tagen fiel eine sehr hohe Standardabweichung auf (Abb. 14).



**Abb. 14:** Wachstumskurve humaner osteoblastärer Zellen in Anwesenheit verschiedener KEM nach 10, 20 und 30 Tagen.

A: Kontrolle



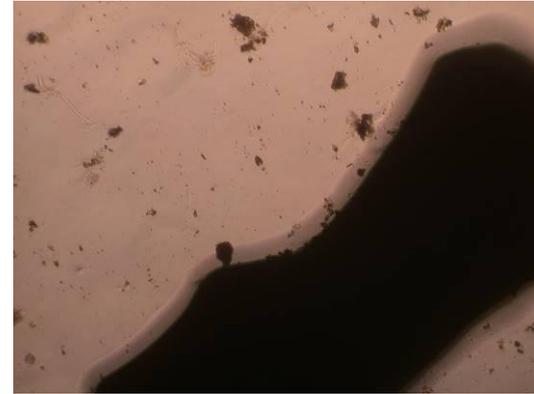
B: Biobase<sup>®</sup>,



C: Cerasorb<sup>®</sup>



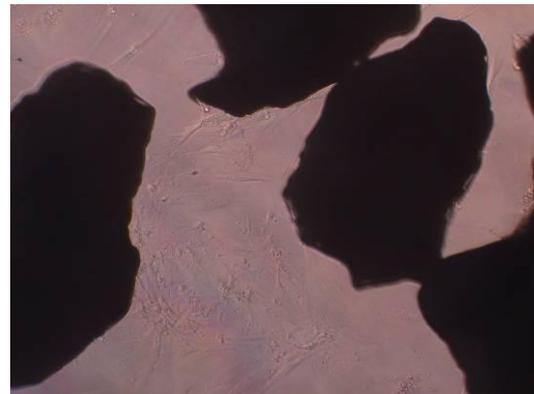
D: Algipore<sup>®</sup>

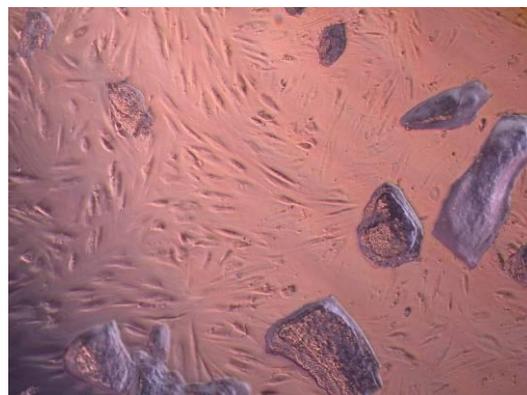
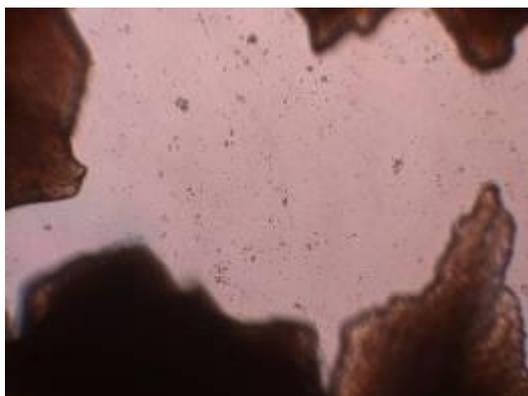


E Osteograf<sup>®</sup>/ N



F: PepGen P-15<sup>®</sup>,



G: Biogran<sup>®</sup>H: Perioglas<sup>®</sup>I: Bio-Oss<sup>®</sup>J: Grafton<sup>®</sup>

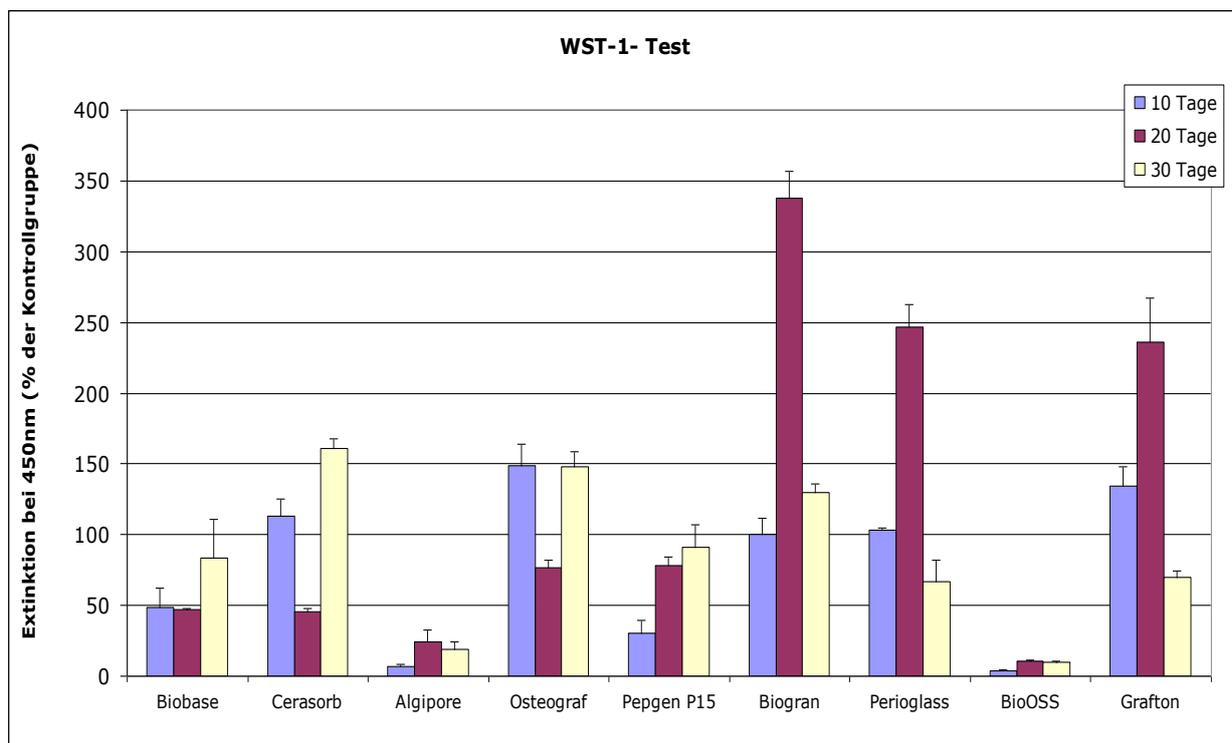
**Abb. 15** Zellkultur humaner osteoblastärer Zellen in Gegenwart von Knochenersatzmaterialien am Tag 20 nach dem Ausplattieren: (A) Kontrolle ohne Knochenersatzmaterial, Vergrößerung 200x;(B) Biobase, Vergrößerung 100x;(C) Cerasorb, Vergrößerung 100x;(D) Algipore, Vergrößerung 100x;(E) Osteograf/ N, Vergrößerung 100x; (F) PepGen P-15, Vergrößerung 100x;(G) Biogran, Vergrößerung 50x;(H) Perioglas, Vergrößerung 100x;(I) Bio-Oss, Vergrößerung 100x; (J) Grafton, Vergrößerung 100x.

### 3.1.4 WST-1-Test

Der WST-1- Test zur Bestimmung der Zellvitalität zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Wachstumskurven. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wiesen die osteoblastären Zellen, zu denen Bio-Oss<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ) und Alqipore<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ) hinzugefügt wurden, wiederum eine signifikant verminderte Vitalität auf. Hier zeigte Bio-Oss<sup>®</sup> erneut die schlechtesten Werte.

Die für Biogran<sup>®</sup> ermittelte metabolische Zellaktivität lag im Gegensatz dazu über dem Niveau der Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ).

Die übrigen KEM differierten nicht signifikant. Auffällig waren isoliert hohe nach 20 Tagen gemessene Werte für Biogran<sup>®</sup> (337 % der Kontrolle), Perioglas<sup>®</sup> (247 % der Kontrolle) und Grafton<sup>®</sup> (236 % der Kontrolle), die damit weit über der Kontrollgruppe lagen. Des Weiteren wiesen Cerasorb<sup>®</sup> und Osteograf/N<sup>®</sup> nach 10 und 30 Tagen eine höhere metabolische Aktivität als die Kontrollgruppe auf, während die ermittelten Zahlen nach 20 Tagen unter dem Niveau der Kontrolle lagen (siehe Abb. 16).



**Abb. 16** Ermittlung der Zellvitalität humaner osteoblastärer Zellen mittels des WST1-Tests am Tag 10, 20 und 30 nach Ausplattieren der Zellen in Gegenwart der verschiedenen KEM.

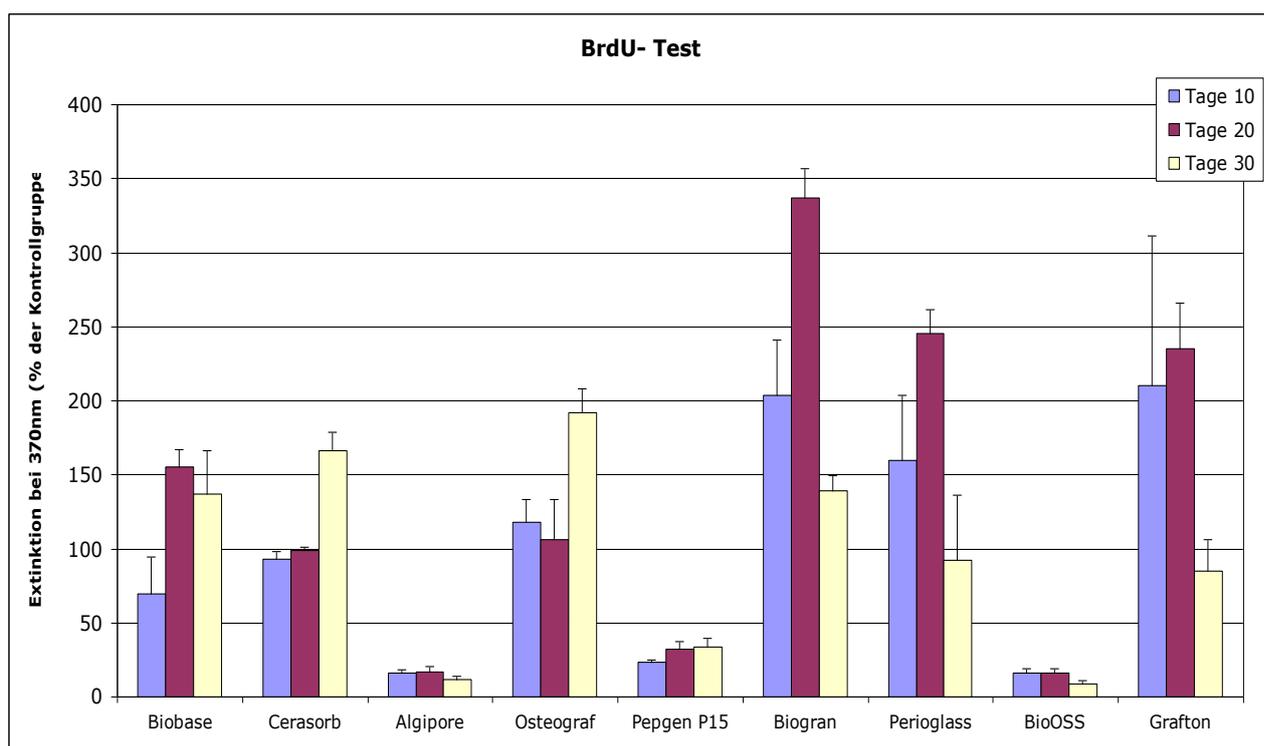
### 3.1.5 BrdU-Test

Die im BrdU- Test ermittelte DNA-Synthese bekräftigte die Ergebnisse des WST-1- Tests und der Wachstumskurven.

Die mit Grafton<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ), Biogran<sup>®</sup> ( $p < 0.01$ ) und Perioglas<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ) kultivierten osteoblastären Zellen zeigten eine signifikant höhere Aufnahme von BrdU als die Kontrollgruppe. Analog zum WST-1 Test fielen nach 20 Tagen Spitzen für Biogran<sup>®</sup> (337 %), Perioglas<sup>®</sup> (245 %) und Grafton<sup>®</sup> (235 %) weit über der Kontrollgruppe auf.

Die Gruppen, die mit PepGen P-15<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ), Bio-Oss<sup>®</sup> ( $p < 0.01$ ) und Aligpore<sup>®</sup> ( $p < 0.01$ ) versetzt wurden, zeigten Werte, die signifikant unter dem Kontrollgruppenniveau von 100 % lagen.

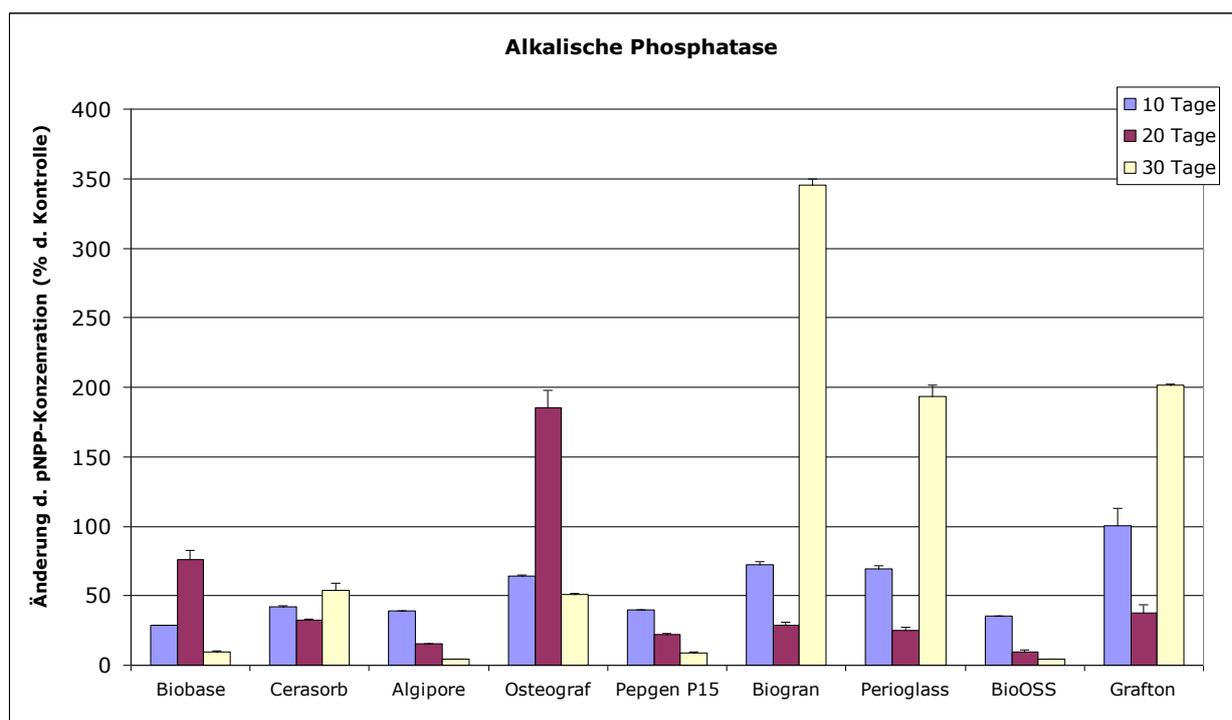
Die BrdU- Aufnahme von Osteograf/N<sup>®</sup>, Bio-Base<sup>®</sup> und Cerasorb<sup>®</sup> lag mit denen der Kontrollgruppe gleich auf, beziehungsweise nicht signifikant darüber (siehe Abb. 17).



**Abb. 17** Ermittlung der DNA- Synthese – und somit der Zellproliferation – osteoblastärer Zellen nach 10, 20 und 30 Tagen in Anwesenheit verschiedener KEM.

### 3.1.6 Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP)

Bei der Aktivitätsbestimmung der AP zeigten die Zellen wiederholt in Gegenwart von Bio-Oss<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ), Algipore<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ), PepGen P-15<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ) und Bio-Base<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verminderte Werte. Die Aktivitätsbestimmung der AP ergab bei Zugabe von Cerasorb<sup>®</sup> und Osteograf/N<sup>®</sup>, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikant verringerte Aktivität, wobei in Gegenwart von Osteograf/N<sup>®</sup> isoliert hohe Werte nach 20 Tagen auffielen. Die Aktivität der AP der Zellen mit Biogran<sup>®</sup> ( $p < 0,01$ ) und Grafton<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ) war nach 30 Tagen signifikant höher als die der Kontrollgruppe (s. Abb. 18). Einer anfänglichen Verringerung folgte nach 30 Tagen ein signifikanter Anstieg der alkalischen Phosphataseaktivität. Perioglas<sup>®</sup> zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, aber einen zu Biogran<sup>®</sup> und Grafton<sup>®</sup> analogen Anstieg nach 30 Tagen.



**Abb. 18:** Aktivität der AP osteoblastärer Zellen in Anwesenheit der unterschiedlichen KEM nach 10, 20 und 30 Tagen.

### 3.1.7 Konzentration an Kollagen Typ I

Die ermittelten Messwerte für Typ- I- Kollagen im Kulturmedium fielen bei den Versuchsgruppen, zu denen Algipore® ( $p < 0,01$ ), PepGen P-15® ( $p < 0,01$ ), Biogran® ( $p < 0,01$ ), Perioglas® ( $p < 0,01$ ) und Bio-Oss® ( $p < 0,01$ ) hinzugefügt wurde, signifikant geringer aus.

Die übrigen Materialien zeigten keine signifikanten Unterschiede und lagen mit der Kontrollgruppe nahezu auf einer Stufe (Abb. 19).

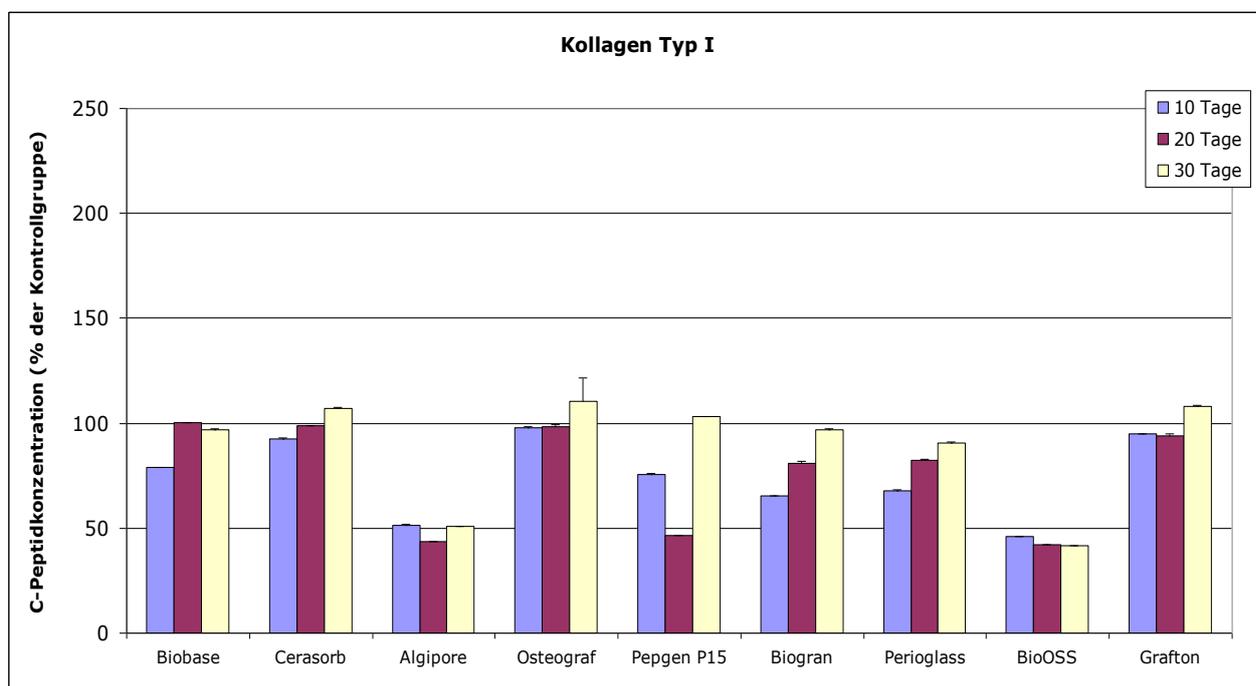


Abb. 19 Kollagen Typ I Konzentration, als Hauptbestandteil der EZM, im Kulturmedium humaner osteoblastärer Zellen in Gegenwart der verschiedenen KEM 10, 20 und 30 Tage nach Ausplattieren.

### 3.1.8 Konzentration an Osteokalzin

Mit Ausnahme von Cerasorb<sup>®</sup> und Grafton<sup>®</sup> waren die ermittelten Osteokalzinkonzentrationen bei allen Materialien ( $p < 0,01$ ), verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant verringert.

Wie Abb. 20 zeigt, lagen die Werte von Cerasorb<sup>®</sup> fast auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

In der Graftongruppe wurden Osteokalzinkonzentrationen gemessen, die signifikant über denen der Kontrollgruppe lagen ( $p < 0,01$ ).

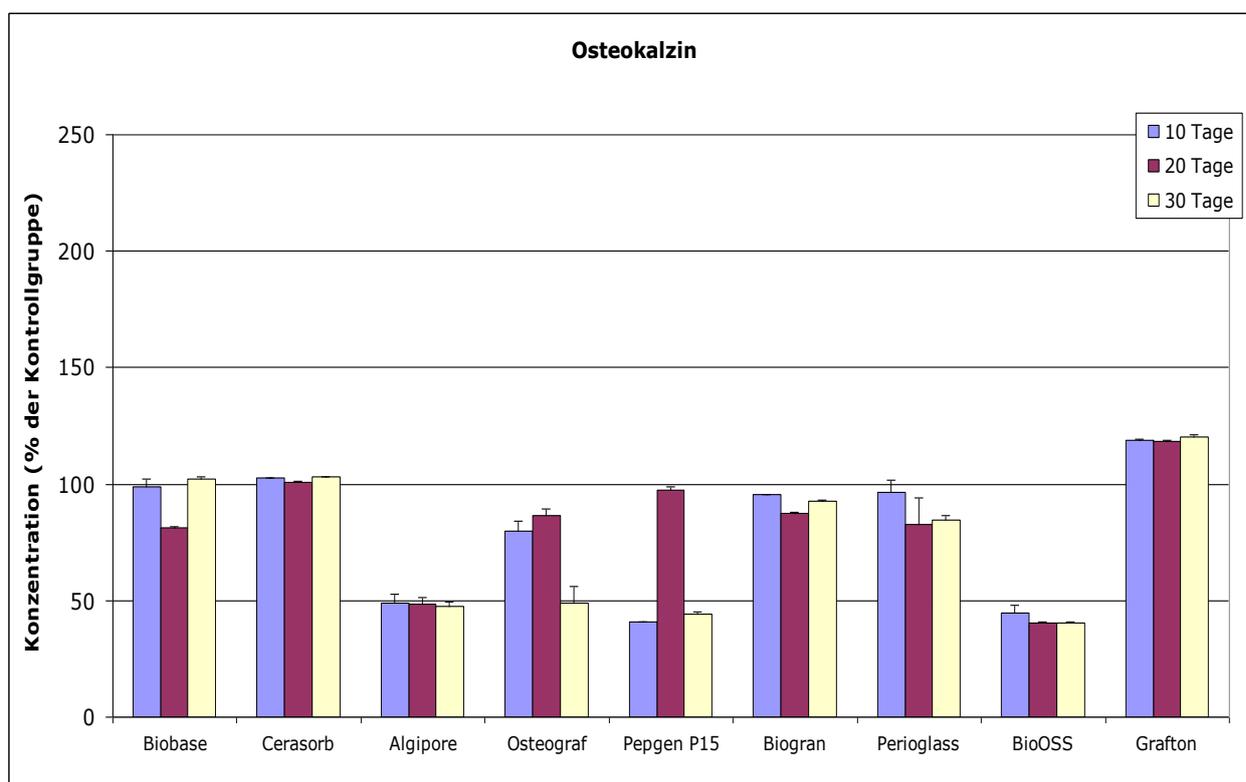


Abb. 20: Osteokalzinkonzentration im Kulturmedium in Anwesenheit der KEM nach 10, 20 und 30 Tagen.

### 3.1.9 Konzentration an Osteopontin

Osteopontin als Differenzierungsmarker zeigte in den Proben, die mit Algipore<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ) und Bio-Oss<sup>®</sup> ( $p < 0.05$ ) kultiviert wurden, eine signifikant verminderte Expression. Die Messungen der übrigen Materialien ergaben keine eindeutigen Unterschiede. In den nach 20 Tagen an Biogran<sup>®</sup> durchgeführten Messungen zeigten sich isoliert deutlich erhöhte Werte oberhalb der Kontrollgruppe (140 %) und eine hohe Standardabweichung (79 %) (Abb. 21).

Die mit dem Knochenersatzmaterial Grafton<sup>®</sup> kultivierten Zellen wiesen extrem hohe Osteopontinkonzentrationen auf. Diese Ergebnisse sind wohl durch die humane, allogene Knochenmatrix dieses Materials verfälscht. Die Messwerte repräsentieren die Osteopontinexpression des Knochensatzmaterials und nicht die der kultivierten humanen osteoblastären Zellen. Diese Daten wurden ausgeschlossen.

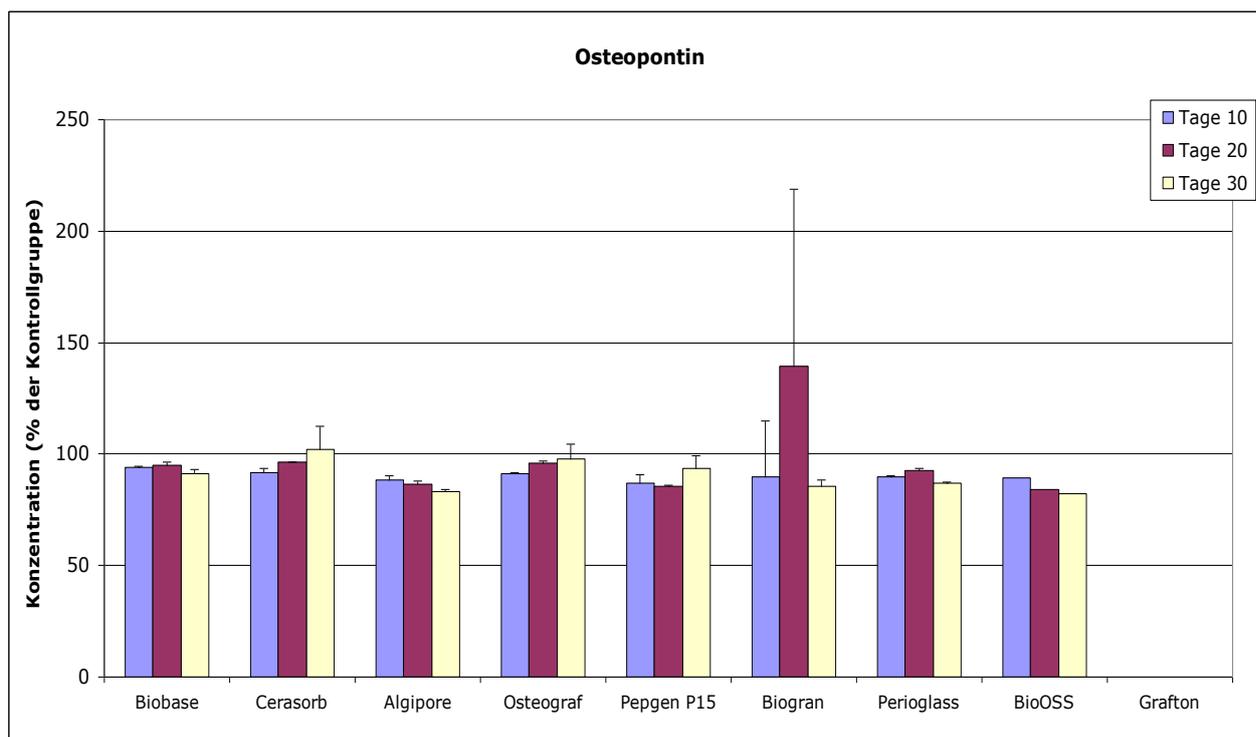


Abb. 21: Osteopontinkonzentration im Kulturmedium der humanen osteoblastären Zellen in Anwesenheit der KEM nach 10, 20 und 30 Tagen.

### 3.1.10 Indirekte Immunzytochemie

Die indirekte Immunzytochemie wurde nach 10 und 30 Tagen durchgeführt. Dabei wurden Primärantikörper gegen Kollagen Typ I, Osteopontin, Fibronectin und dessen Membranrezeptor Integrin  $\beta_1$  sowie sekundäre fluorochromgekoppelte Antikörper verwendet (Abb.22).

Kollagen Typ I, Hauptbestandteil der Knochenmatrix und des Bindegewebes, zeigte eine eindeutige Expression in allen Gruppen. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Färbung zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Osteopontin wird als nicht- kollagenes Protein der extrazellulären Matrix (EZM) von Osteoblasten produziert. Es vermittelt die Zelladhäsion von Osteoblasten und bindet Kalzium. Dies erklärt seinen biphasischen Verlauf mit einem ersten Expressionsmaximum in der Frühphase der Osteoblastendifferenzierung und einem zweiten Expressionsgipfel bei der Mineralisierung der EZM.

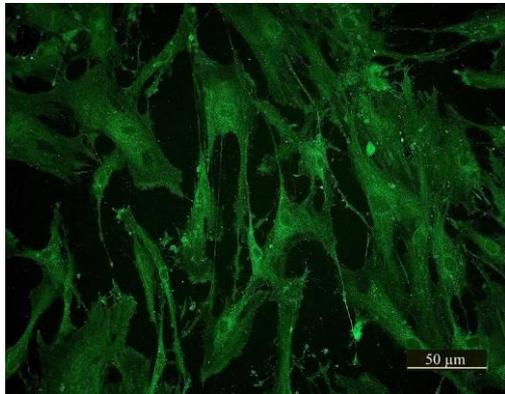
Zehn Tage nach Ausplattierung wiesen die mit Bio-Oss<sup>®</sup> und Algipore<sup>®</sup> kultivierten Gruppen eine geringere Expression von Osteopontin auf, was sich an einer geringeren Intensität der Färbung zeigte. Zum gleichen Zeitpunkt konnte in den mit Biogran<sup>®</sup> und Cerasorb<sup>®</sup> kultivierten Gruppen eine stärkere Anfärbung beobachtet werden. Die übrigen Gruppen wiesen eine zur Kontrolle ähnliche Färbung auf.

Für Fibronectin, ein nicht-kollagenes Protein der extrazellulären Matrix und dessen Membranrezeptor Integrin  $\beta_1$ , zeigten besonders die osteoblastären Zellen, die mit Bio-Oss<sup>®</sup> und Algipore<sup>®</sup> kultiviert wurden, nach 10 und 30 Tagen eine deutlich schwächere Färbung als die übrigen Gruppen. Eine im Vergleich stärkere Expression dieser beiden Strukturmarker der extrazellulären Matrix präsentierten die mit Biogran<sup>®</sup>, Cerasorb<sup>®</sup> und Grafton<sup>®</sup> kultivierten Zellen.

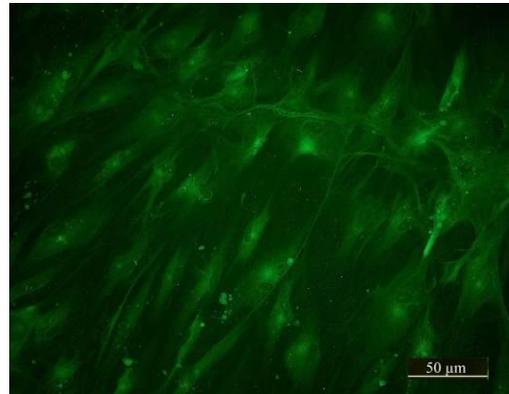
10 Tage:

30 Tage:

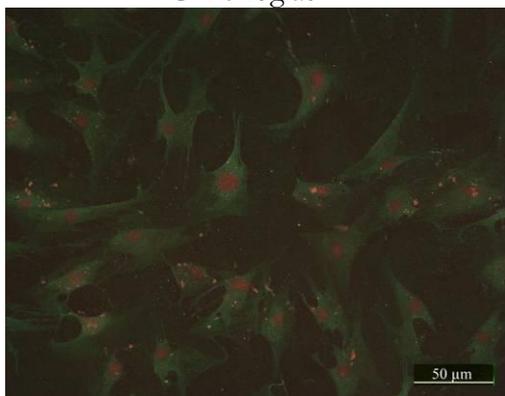
A: Kontrolle



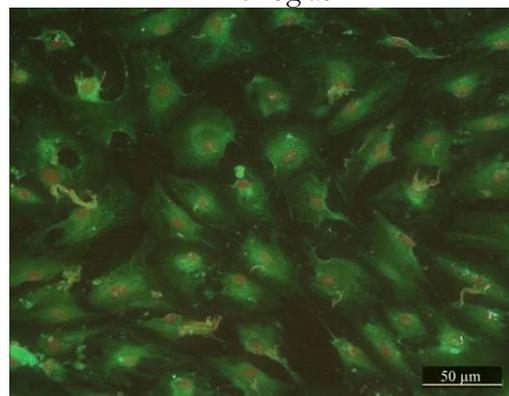
B: Kontrolle



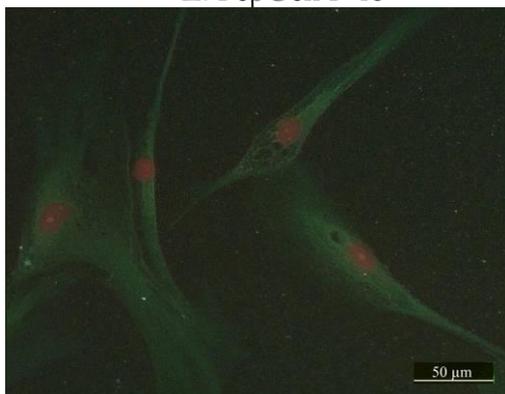
C: Perioglas<sup>®</sup>



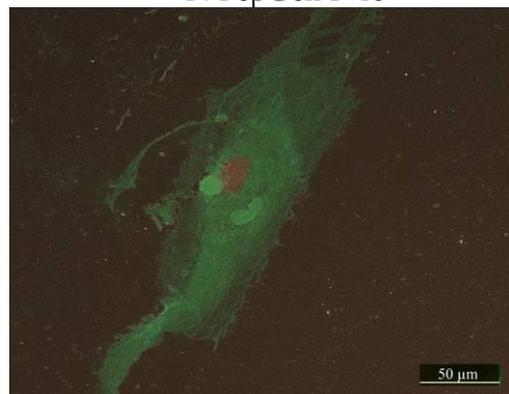
D: Perioglas<sup>®</sup>



E: PepGen P-15<sup>®</sup>



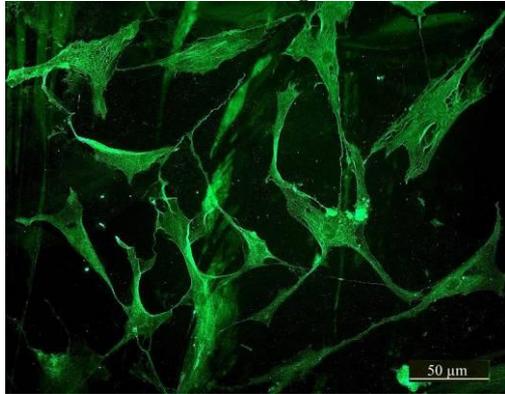
F: PepGen P-15<sup>®</sup>



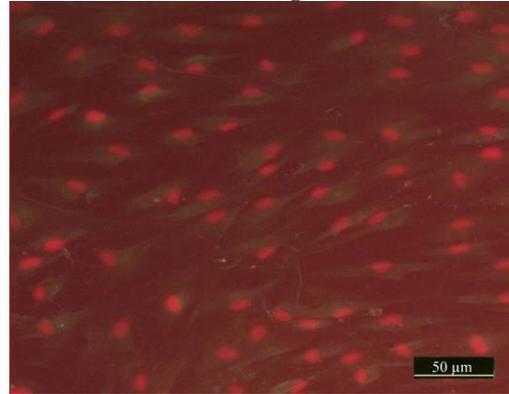
10 Tage:

30 Tage:

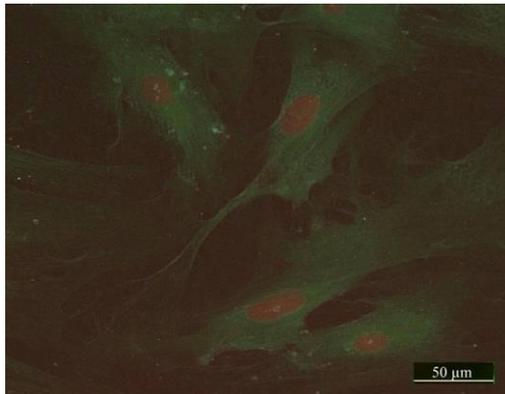
G: Osteograf/N<sup>®</sup>



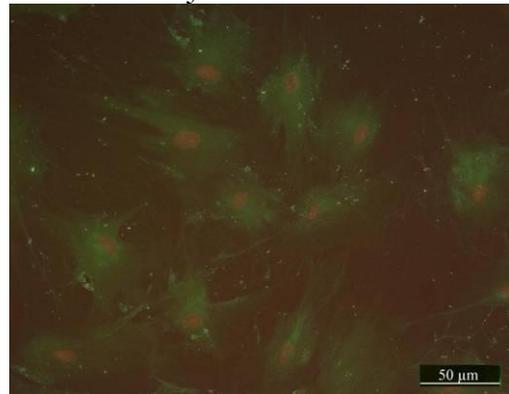
H: Osteograf/N<sup>®</sup>



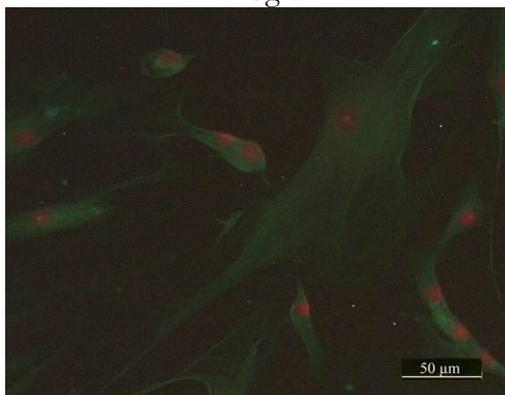
I: Grafton<sup>®</sup>



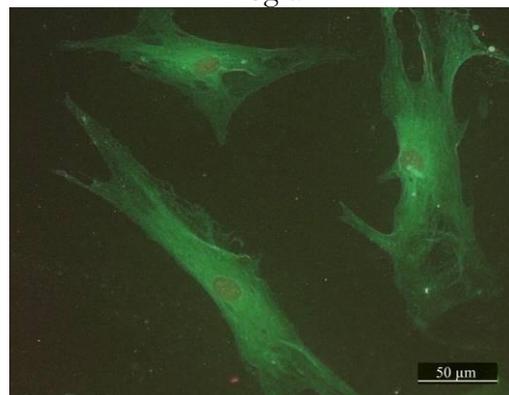
J: Grafton<sup>®</sup>



K: Biogran<sup>®</sup>



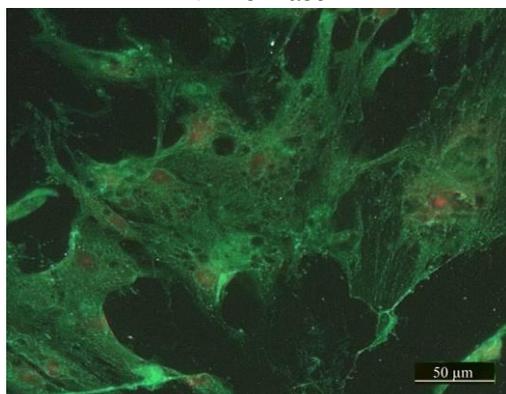
L: Biogran<sup>®</sup>



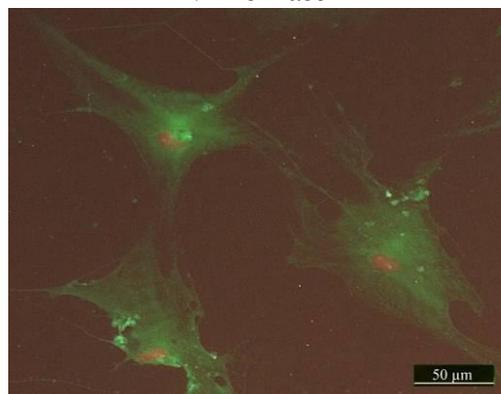
10 Tage:

30 Tage:

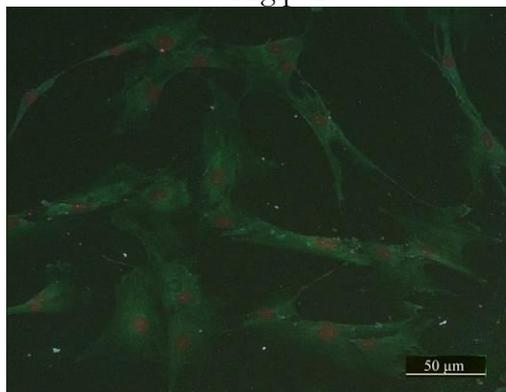
M: Bio-Base®



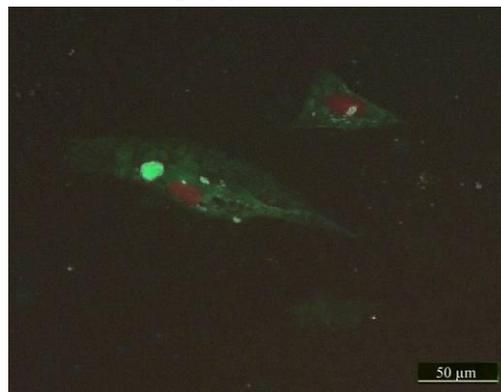
N: Bio-Base®



O: Algipore®



P: Bio-Oss®



**Abb. 22:** Immunfluoreszenzfärbung von Osteopontin (Vergrößerung 100x). In allen Abbildungen ist Osteopontin grün und die Zellkerne leicht rot gefärbt. (A) 10 Tage Kultur ohne KEM, (B) 30 Tage Kultur ohne KEM, (C) 10 Tage Kultur mit Perioglas, (D) 30 Tage Kultur mit Perioglas, (E) 10 Tage Kultur mit PepGen P-15, (F) 30 Tage Kultur mit PepGen P-15, (G) 10 Tage Kultur mit Osteograf/ N, (H) 30 Tage Kultur mit Osteograf/ N, (I) 10 Tage Kultur mit Grafton, (J) 30 Tage Kultur mit Grafton, (K) 10 Tage Kultur mit Biogran, (L) 30 Tage Kultur mit Biogran, (M) 10 Tage Kultur mit Bio-Base, (N) 30 Tage Kultur mit Bio-Base, (O) 10 Tage Kultur mit Algipore, (P) 10 Tage Kultur mit Bio-Oss.

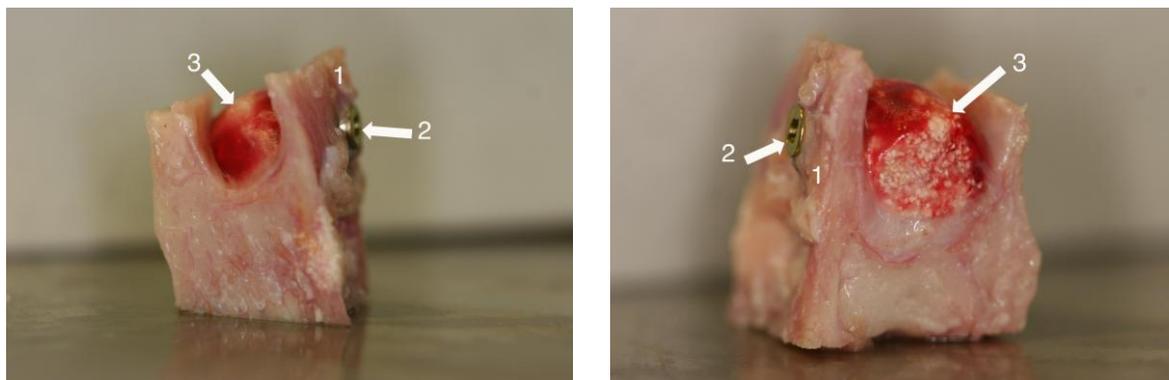
## 3.2 Ergebnisse der *in-vivo*-Versuche

### 3.2.1 Klinische Beurteilung der Proben

Vor der Probengewinnung wurden die Proben nach ihrer Einheilung klinisch beurteilt.

Alle inserierten Xive- Implantate zeigten eine komplikationslose Einheilung. Keines der eingebrachten Implantate war verloren gegangen.

Die verwendeten Knochenersatzmaterialien (KEM) und autogenen Transplantate waren ebenfalls klinisch reizfrei eingeeilt. In der makroskopischen Bewertung der verschiedenen Materialien konnten, wie beispielhaft in Abb. 23 dargestellt, keine Komplikationen oder Abstoßungen festgestellt werden.



**Abb. 23:** Durch Osteotomie gewonnene Probe mit intakterfazialer Kieferhöhle (1), komplikationslos inseriertem Implantat (2) und reizlos inkorporiertem KEM (3).

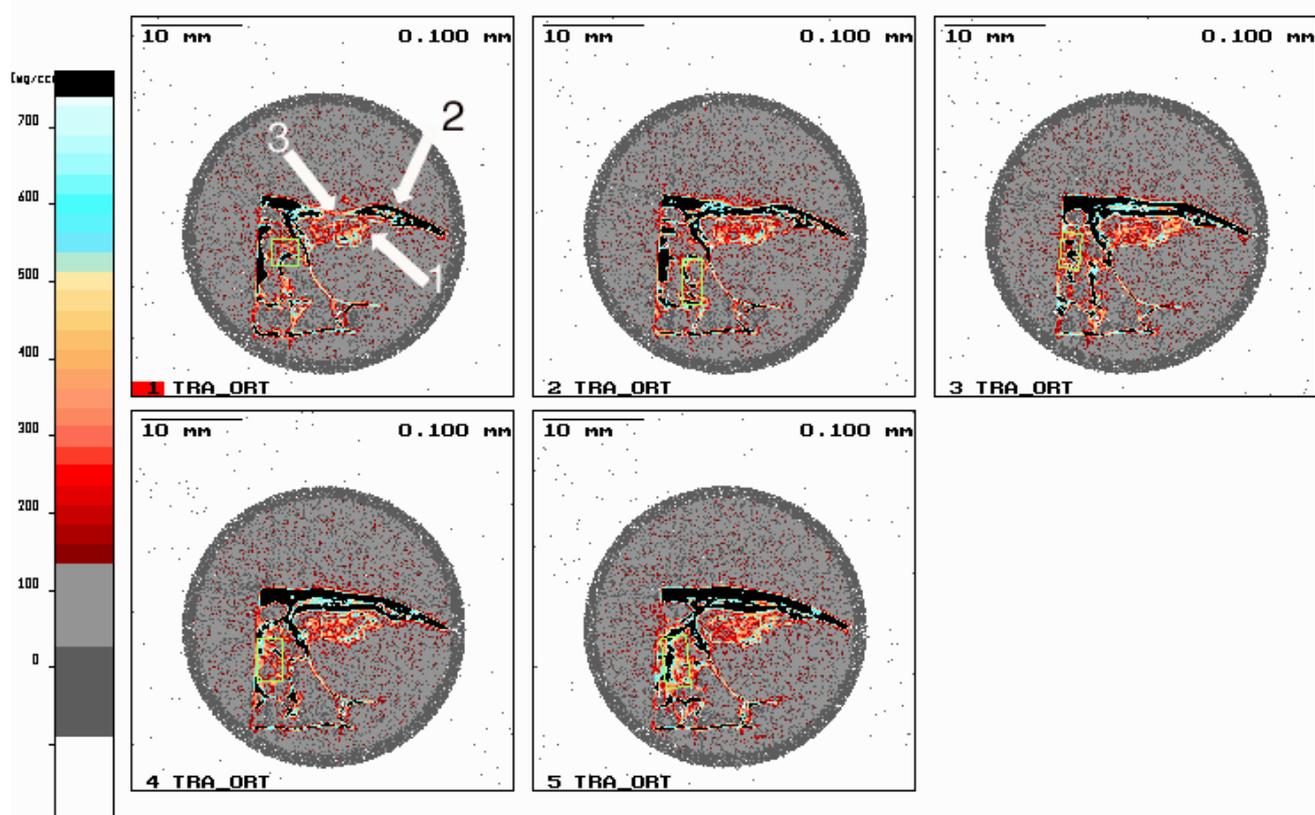
### 3.2.2 Quantitative Computertomographie (qCT)

Mittels der quantitativen Computertomographie wurde die Knochendichte in den zu untersuchenden Proben bestimmt.

Die computertomographische Auswertung erfolgte zu den Beobachtungszeiträumen 12 und 16 Wochen. Von den fünf definierten Messebenen lag die erste implantatfern und die fünfte implantatnah im Knochenersatzmaterial. Die *Regions of Interest* wurden im dichtesten Bereich des KEM platziert. Im ortsständigen Knochen erfolgte die Messung nach gleicher Methodik. Von den ermittelten Werten wurden Mittelwerte berechnet.

Biogran®

In den Schnitten durch das KEM Biogran® fiel die sichtbar geringe Materialmenge auf. Zwischen dem eingebrachten KEM ist es zu einer Knochenanlagerung gekommen. Die ermittelten Dichtewerte lagen nach 12 Wochen mit durchschnittlich  $187 \text{ mg/cm}^3$  deutlich unter den Dichtewerten des ortsständigen, spongiösen Knochens. Im Verlauf der Studie erfolgte nach 16 Wochen ein Anstieg der Knochendichte auf  $280 \text{ mg/cm}^3$ . Verglichen mit den anderen untersuchten Proben war die Dichte des ortsständigen, spongiösen Knochens mit circa  $700 \text{ mg/cm}^3$  auf einem mit den anderen Gruppen vergleichbaren Niveau (Abb. 24).

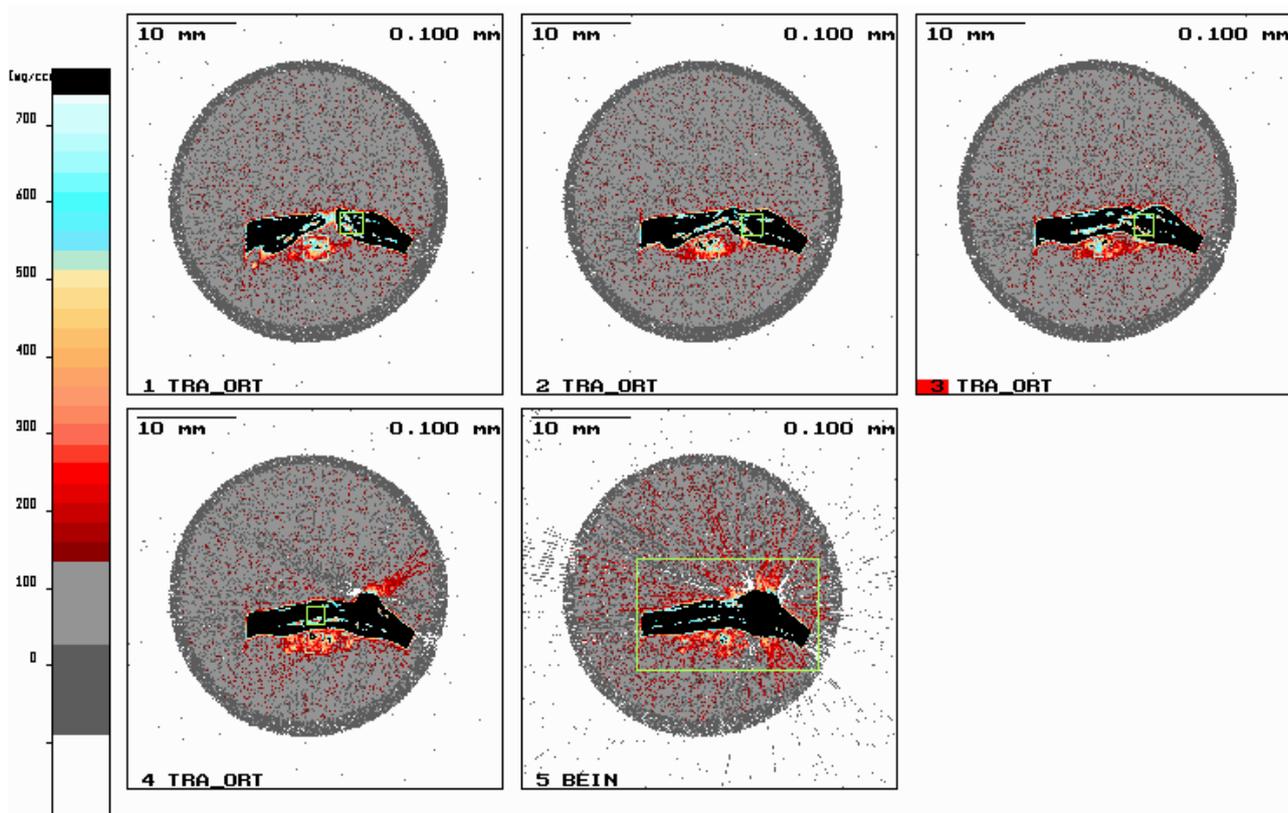


**Abb. 24:** Schnittserie der quantitativen Computertomographie von Biogran 16 Wochen mit erkennbarem KEM (weißer Pfeil 1), der fazialen Kieferhöhlenwand (weißer Pfeil 2) und der noch sichtbaren Osteotomie des Sinuslifts (weißer Pfeil 3). Schnitt 1 implantatfern, Schnitt 5 implantatnah.

### Cerasorb®

Die Knochendichte des ortständigen, spongösen Knochens war mit 600 bis 800 mg/cm<sup>3</sup> mit den übrigen Gruppen vergleichbar.

Bei Betrachtung des eingebrachten KEM Cerasorb® fielen zentral deutlich hyperdense Bereiche auf. Diese hyperdensen Areale erreichten teilweise Dichtewerte des ortständigen Knochens. In der Peripherie des Materials fanden sich zahlreiche hypodense Areale, in denen sehr geringe Dichtewerte ermittelt wurden. Diese konnten sowohl in den 12- als auch 16- Wochen-Gruppen gezeigt werden. Für Cerasorb® wurde eine durchschnittliche Knochendichte von 410 mg/cm<sup>3</sup> bestimmt, wobei es zwischen der 12. und 16. Wochen zu einer Abnahme der Werte kam. Die gemessene Abnahme konnte auch klinisch subjektiv durch eine verminderte Materialmenge bestätigt werden (vgl. Abb. 25).

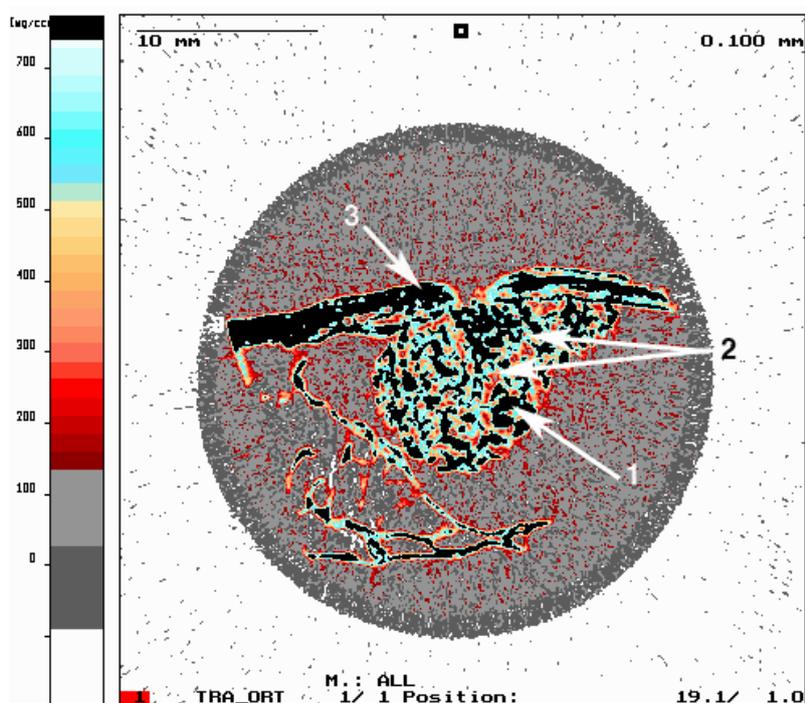


**Abb. 25:** Schnittserie der quantitativen Computertomographie von Cerasorb 16 Wochen. Schnitt 1 implantatfern, Schnitt 5 implantatnah mit deutlichen Abstrahlungen verursacht durch das Implantat.

Bio-Oss®

In der Beurteilung des KEM Bio-Oss® fiel initial die große Materialmenge und deren hohe Dichte auf. Zwischen den einzelnen Partikeln ließen sich Bereiche mittlerer Dichte identifizieren. Während die Bio-Oss®-Granula in den beobachteten Schnitten selbst Werte größer  $800 \text{ mg/cm}^3$  aufwiesen, zeigten sich dazwischen Regionen mit einer Dichte von durchschnittlich  $600 \text{ mg/cm}^3$  in den 5 beurteilten Schnitten. Eine Abnahme der Materialmenge war zwischen 12 und 16 Wochen nicht zu beobachten.

Im ortsständigen Knochen zeigten sich nach 12 Wochen Dichtewerte von circa  $715 \text{ mg/cm}^3$  und nach 16 Wochen von  $465 \text{ mg/cm}^3$  (Abb. 26).

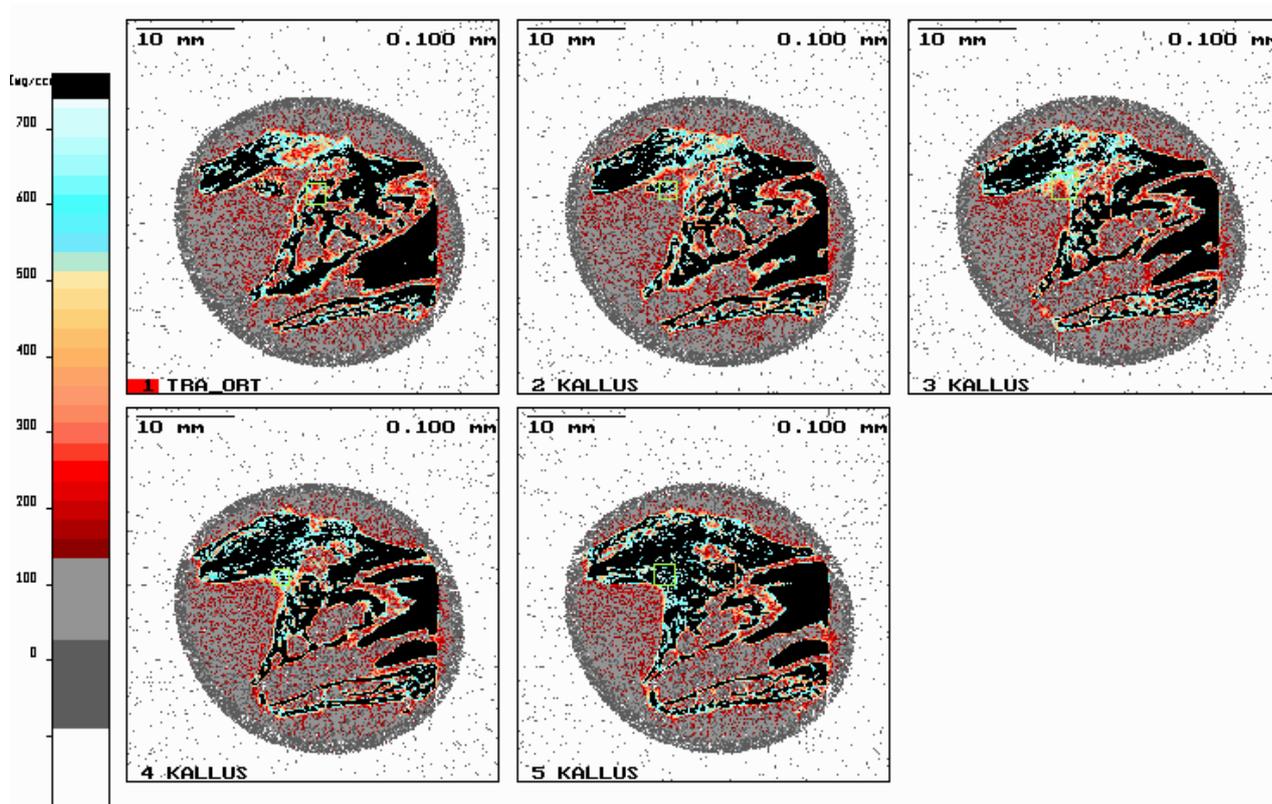


**Abb. 26:** qCT- Schnittbild von Bio-Oss® 16 Wochen. Das Material (weißer Pfeil 1) zeigt ähnlich hohe Dichtewerte wie der ortsständige Knochen (weißer Pfeil 3) und eine deutliche Knochenneubildung um das Material herum (weißer Pfeil 2).

### PepGen P-15<sup>®</sup>

In den beiden Gruppen, bei denen der Kieferhöhlenboden mit PepGen P-15<sup>®</sup> angehoben wurde, zeigte sich die höchste Knochendichte im ortständigen Knochen ( $>1000 \text{ mg/cm}^3$ ). In Relation zu den Werten des ortständigen Knochens waren die für das KEM ermittelten Werte sehr hoch. Innerhalb des Materials wurden nach 12 Wochen Dichtewerte von  $1140 \text{ mg/cm}^3$  gemessen. Auffällig war die sehr hohe Materialdichte von PepGen P-15<sup>®</sup> nach 12 Wochen. Diese sank parallel zur sinkenden Knochendichte im ortständigen Knochen bis zum Studienende nach 16 Wochen ab.

Nach 16 Wochen (siehe auch Abb. 27) lag der für das KEM bestimmte Wert immer noch auf hohem Niveau ( $630 \text{ mg/cm}^3$ ), aber unterhalb der für den ortständigen Knochen gezeigten Resultate ( $800 \text{ mg/cm}^3$ ).



**Abb. 27:** Schnittserie der quantitativen Computertomographie von PepGen P-15, 16 Wochen. Schnitt 1 implantatfern, Schnitt 5 implantatnah. Erkennbar viel, sehr dichtes Material in der Schnittserie.

### Spongiosa

In allen betrachteten Schnitten dieser Gruppe war eine geringe Materialmenge im Bereich der Kieferhöhle auffällig. Die eingebrachte Spongiosa wirkte sehr aufgelockert und wenig kompakt. Die ermittelten Dichtewerte für das autogene Material ( $269 \text{ mg/cm}^3$ ) lagen deutlich unter denen des ortsständigen, spongiösen Knochens mit  $510 \text{ mg/cm}^3$  (s. Abb. 29).

### Kortikospongiosa

Eine klare Unterscheidung von eingebrachtem Transplantat und ortsständiger, fazialer Kieferhöhlenwand war anhand der Dichtewerte im Detail nicht mehr möglich. Die nach 12 Wochen für den ortsständigen Knochen ( $865 \text{ mg/cm}^3$ ) und das eingebrachte Material ( $840 \text{ mg/cm}^3$ ) ermittelten Dichtewerte waren nahezu identisch, was auf eine gute Einheilung des autogenen Knochens schließen lässt. Eine visuelle Unterscheidung von ortsständigen und transplantierten Knochen, in der Betrachtung der Schnitte, war nur schwer möglich (Abb. 28). Die Identifikation des Transplantates erfolgte durch die teilweise noch sichtbare Osteotomie und das als Orientierungshilfe eingebrachte Implantat. Die ermittelten Dichtewerte für das eingebrachte autogene Material sanken nach 16 Wochen auf  $500 \text{ mg/cm}^3$  ab. Bei einer annähernd gleichen Menge der eingebrachten Materialien fiel, in den beobachteten Schnitten im Vergleich zur den Spongiosaprobe, ein großes Materialvolumen und damit eine geringere Resorption auf.

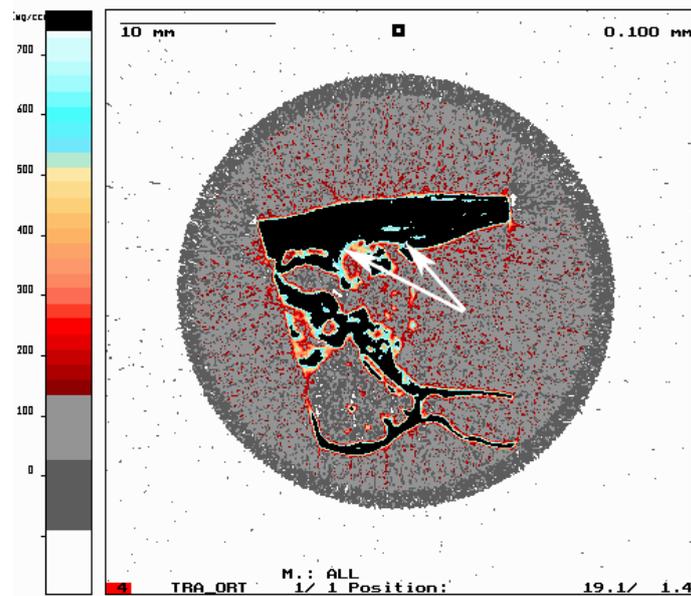


Abb. 28 qCT- Schnittbild von autogenen Knochen (hier Kortikospongiosa) nach 16 Wochen. Eine Verdickung der fazialen Kieferhöhlenwand (weiße Pfeile) im Bereich der Anlagerung ist erkennbar. Eine sichere Unterscheidung zwischen dem eingebrachten und ortsständigen Knochen ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich.

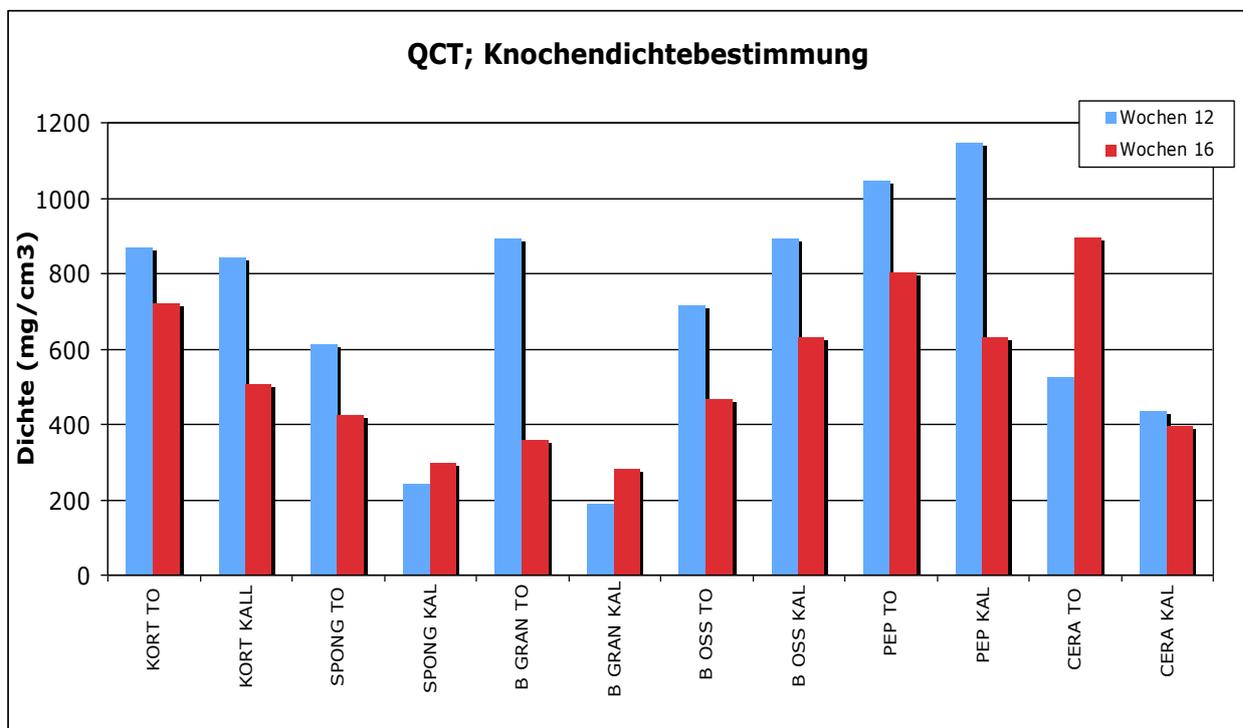


Abb. 29: Knochendichtebestimmung mittels quantitativer Computertomographie; TO = ortsständiger, trabekulärer Knochen, KAL = Knochenersatzmaterial, Spongiosa oder Kortikospongiosa; KORT = Kortikalis, SPONG = Spongiosa, B GRAN = Biogran, B OSS = Bio-Oss, PEP = PepGen P-15, CERA = Cerasorb.

### 3.2.3 Kontakt-Mikroradiographie

Die Bestimmung der Knochenfläche mittels der Kontakt-Mikroradiographie erlaubt die örtlich exakte Darstellung der Knochenbildung über einen Beobachtungszeitraum. Dies bedeutet, dass das Ausmaß der Knochenneubildung in bestimmten Arealen unterschieden werden kann. Dazu wurde eine möglichst große *ROI* im Knochenersatzmaterial positioniert. Die Ecken der gewählten *ROIs* lagen sicher im entsprechenden Material. So konnte die Knochenneubildung in der markierten Fläche bestimmt werden.

Die ermittelte Knochenneubildung für die autogenen Transplantate, wie Spongiosa und Kortikospongiosa, lagen, mit Ausnahme der 12- und 16- Wochenwerte für Bio-Oss<sup>®</sup>, über dem Niveau der übrigen Knochenersatzmaterialien. Insbesondere waren die mit durchschnittlich 32,3 % der gemessenen Fläche hohen Knochenneubildungswerte für Spongiosa nach 8 Wochen sowie mit durchschnittlich 31,3 % für Kortikospongiosa nach 16 Wochen auffällig. Für das autogene kortikospongiöse Transplantat wurde nach 16 Wochen die größte Knochenneubildung gemessen. Die ermittelte Knochenneubildung ist in Abb. 30 dargestellt. Aufgrund des bereits erwähnten Probenverlustes liegen für Kortikospongiosa zum Zeitraum 12 Wochen keine Werte vor.

Bei denen mit dem KEM Biogran<sup>®</sup> elevierten Sinus zeigten sich erst nach 16 Wochen eine deutliche Knochenneubildung um das Material. Für den Beobachtungszeitraum 8 und 12 Wochen lagen die Werte für Biogran<sup>®</sup> am niedrigsten (Abb. 30).

PepGen P-15<sup>®</sup> wies initial die geringste Knochenneubildung (2 % der markierten Fläche) auf. Im Verlauf der Studie kam es nach 8 Wochen zu einem deutlichen Anstieg. Insgesamt blieben die Werte für PepGen P-15<sup>®</sup> aber hinter den KEM Biogran<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> zurück.

Die Cerasorb<sup>®</sup>-Gruppe lag zu allen Beobachtungszeiträumen mit einer Knochenneubildung kleiner 5 % deutlich unter der kortikospongiösen Referenz (31 % Knochenneubildung der markierten Fläche). Bei den ermittelten Werten fiel die geringe Steigerung der neu gebildeten Knochenfläche zwischen dem ersten und letzten Beobachtungszeitpunkt auf (siehe Abb. 30).

Die in Gegenwart von Bio-Oss<sup>®</sup> gemessene Knochenneubildung blieb bis zur 8-Wochen-Gruppe auf einer Stufe mit PepGen P-15<sup>®</sup> und Cerasorb<sup>®</sup>. In den Messungen nach 12 und 16 Wochen kam es allerdings zu einem deutlichen Anstieg der Knochenneubildung in den Proben, bei denen Bio-Oss<sup>®</sup> verwendet worden war. Es wurde zu diesen Zeitpunkten eine mit der Spongiosagruppe vergleichbare Knochenneubildung erreicht (Abb. 30).

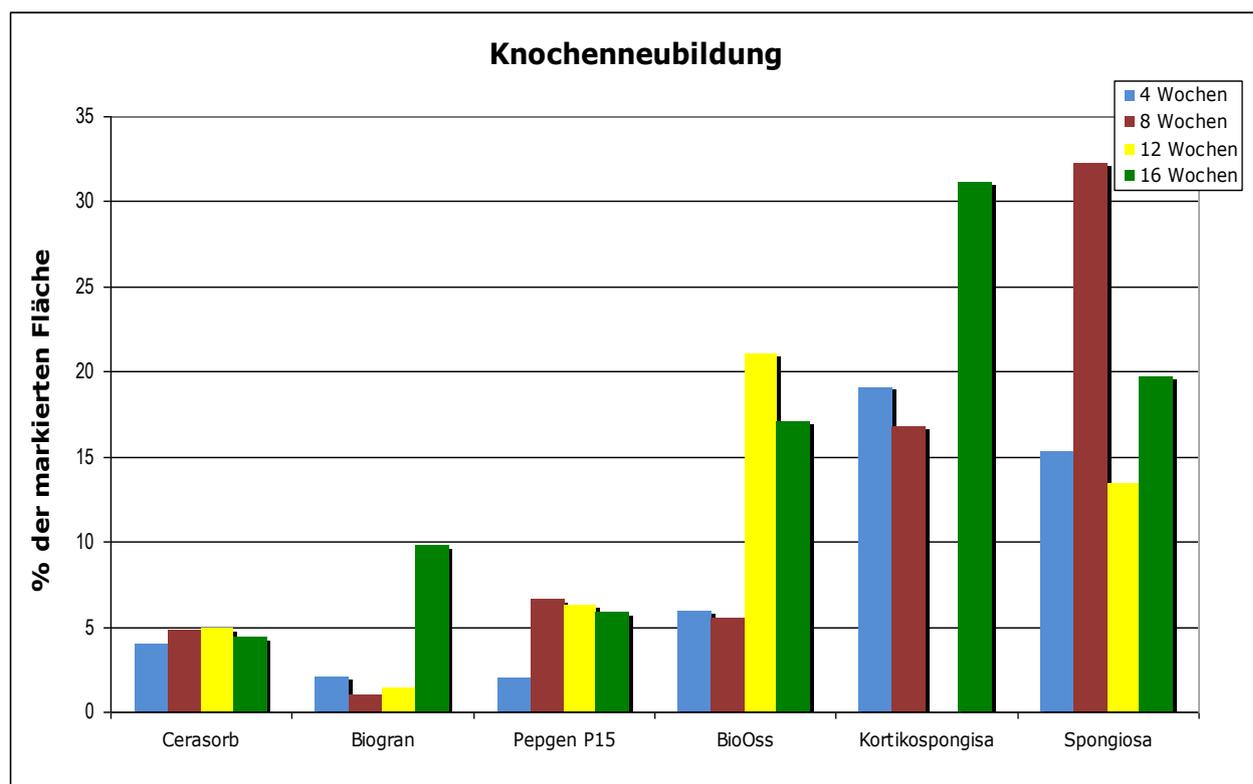


Abb. 30: Messung der Knochenneubildung in Prozent der markierten Fläche der eingebrachten Materialien mittels Kontakt-Mikroradiographie. Aufgrund der geringen Probenanzahl wurde keine Standardabweichung angegeben.

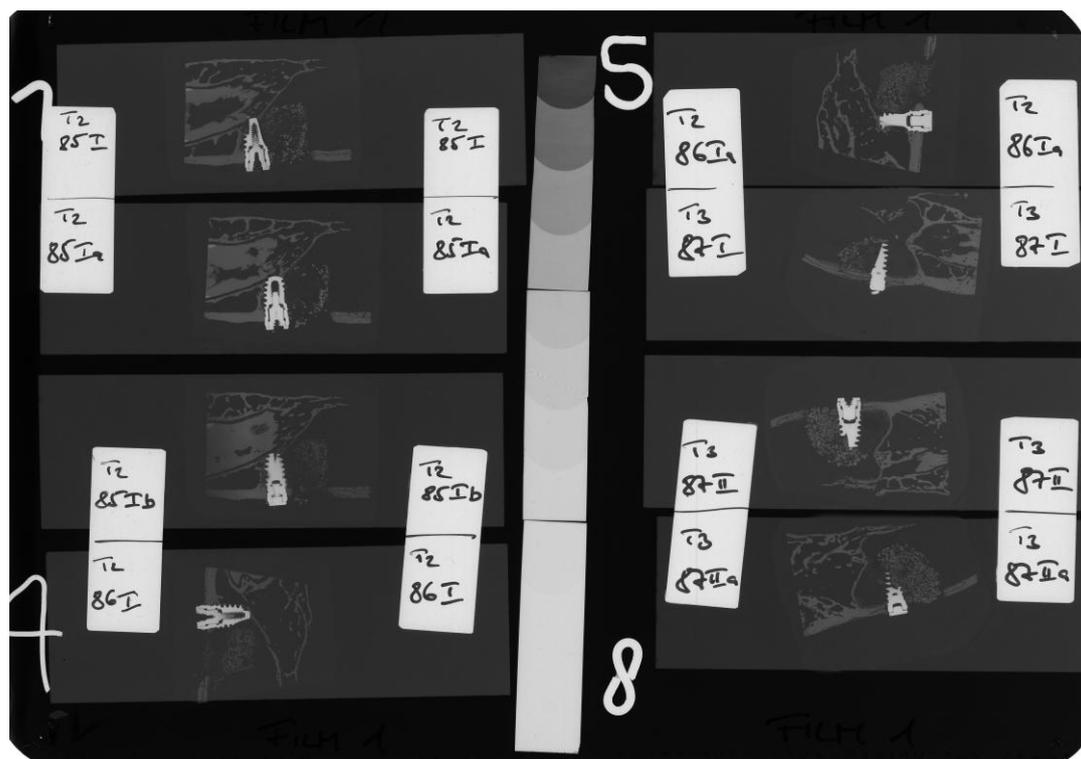


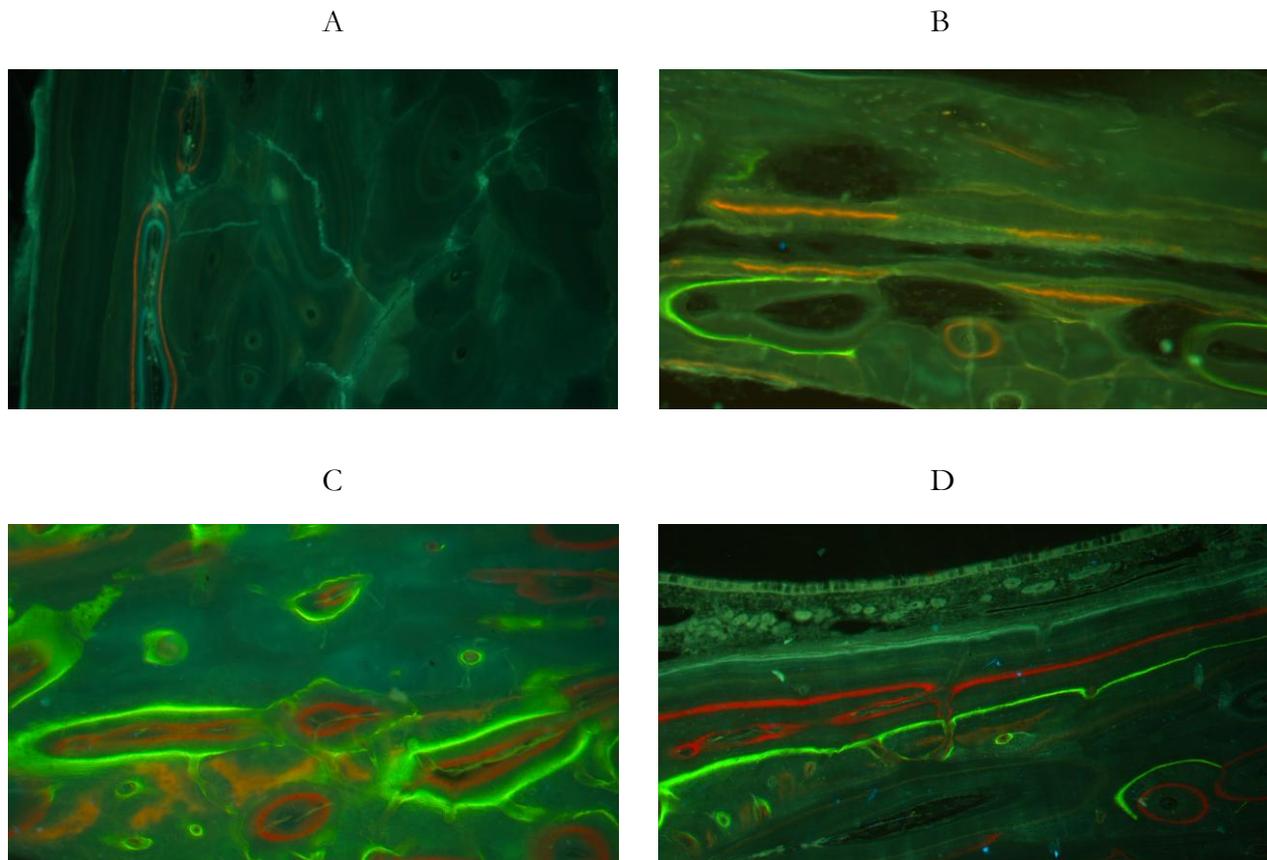
Abb. 31: Mikroradiographiefilm (Agfa®) mit acht Trenndünnschliff-Proben und entsprechender Nummerierung. In der Mitte: Mammographiekeil zur Grauwertbestimmung.

### 3.2.4 Polychrome Sequenzmarkierung

Die Dynamik verkalkender Gewebe konnte durch die intravitale Fluoreszenzmarkierung analysiert werden. Hierzu wurden vier Marker appliziert. Nach 4 Wochen erfolgte die erste Gabe mit Xylenolorange, gefolgt von Calcin (grün) nach 8 Wochen, Alizarin (rot) nach 12 Wochen und abschließend Oxytetracyclin (gelb) nach 16 Wochen.

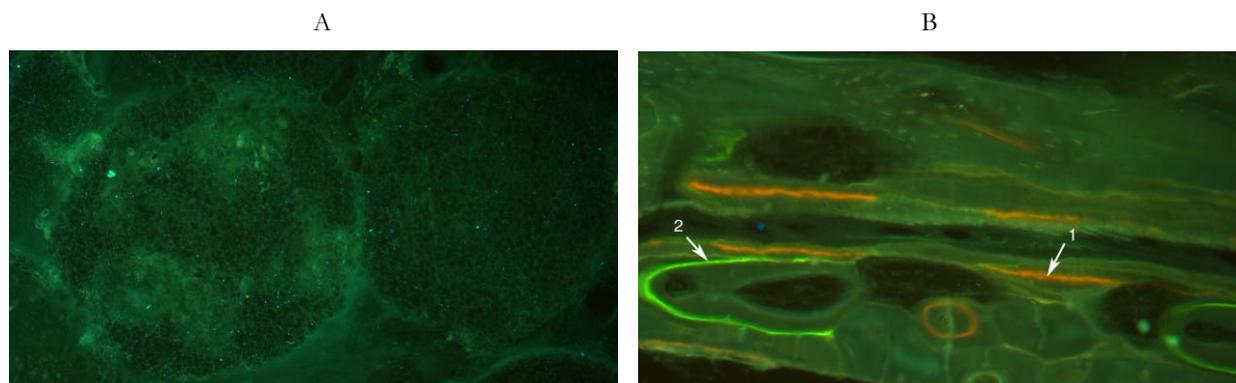
Über alle Einheitszeitpunkte (4 bis 12 Wochen) konnte eine erfolgreiche Einlagerung der Fluoreszenzmarker in den ortsständigen Knochen beobachtet werden.

Lediglich die Einlagerung des in der 16- Wochengruppe applizierten Markers Oxytetracyclin (gelb) fiel, im Vergleich zu den übrigen Markern, in der subjektiven Beurteilung deutlich schwächer aus. Dabei konnte sowohl im ortsständigen Knochen als auch im Knochenersatzmaterial nur eine sehr schwache Intensität der gelben Färbung beobachtet werden (siehe Abb. 32).



**Abb. 32** Einfärbung des ortsständigen Knochens nach (A) 4 Wochen, (B) 8 Wochen, (C) 12 Wochen und (D) 16 Wochen. Sichtbare Bandenbildung der applizierten Marker; schwache Anfärbung von Oxytetracyclin (gelb). Filter FluorD, 100-fache Vergrößerung.

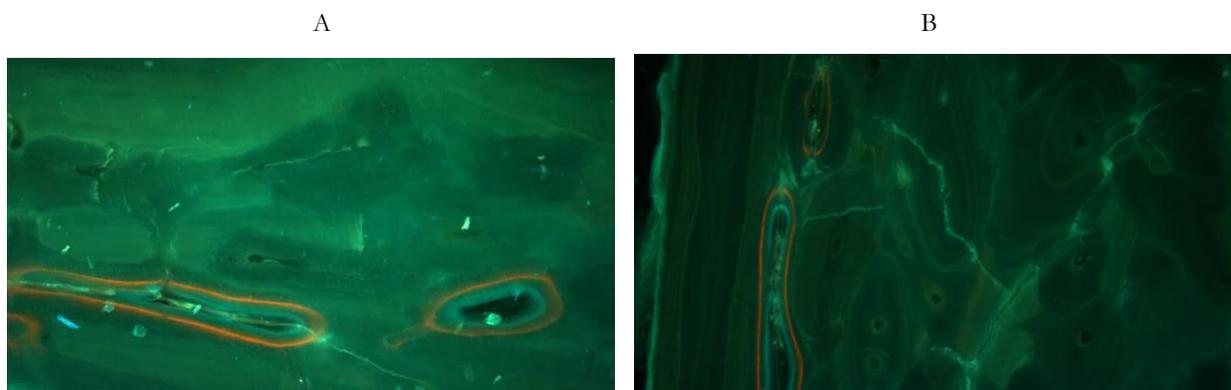
Eine weitere Auffälligkeit in der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung war die fehlende Anfärbung des KEM Cerasorb<sup>®</sup> zu allen Applikationszeitpunkten. In allen beobachteten ROIs unterblieb die Einlagerung ins und um das KEM, während der ortsständige Knochen deutliche Banden aufwies (siehe Abb. 33). Wegen dieser Probleme bei der Auswertung wurde Cerasorb<sup>®</sup> somit aus der Betrachtung ausgeschlossen.



**Abb. 33:** Problematische Einfärbung von Cerasorb beispielhaft nach 8 Wochen (A) im KEM und (B) im ortständigen Knochen – deutliche Bandenbildung der applizierten Marker; weißer Pfeil 1: Xylenolorange und weißer Pfeil 2: Calcin (grün). Filter FluorD, 100-fache Vergrößerung.

#### 3.2.4.1 4 Wochen Einheilzeit

Im ortständigen Knochen zeigte sich eine eindeutige Ablagerung des Xylenoloranges in Form von deutlich erkennbar orangefarbenen Banden (Abb. 34). Insbesondere zeigte sich dieses Ablagerungsmuster zirkulär um die Haverschen Kanäle und als longitudinale Bande in den Randbezirken.



**Abb. 34:** Einlagerung von Xylenolorange im ortständigen Knochen nach 4 Wochen am Beispiel von PepGen P-15 (A) und Biogran (B). Filter FluorD, 100-fache Vergrößerung.

Die Anfärbung der Bio-Oss<sup>®</sup>- Proben war im *Point-Count*-Verfahren mit 2,6 % Xylenolorangeeinlagerung sehr gering. Die Ergebnisse der Auszählung für Biogran (4,75 %) und PepGen P-15 (5,6 %) lagen leicht darüber (siehe Abb. 35).

Bei Betrachtung der autogenen Implantate konnte im Bereich der Kortikospongiosa eine Einlagerung von 6 % mittels *Point-Countings* festgestellt werden. Die besten Ergebnisse in der 4- Wochen- Gruppe erzielten mit 9 % die Sinuslifts, welche mit Spongiosa durchgeführt wurden. Demnach war die Bandenbildung der Fluoreszenzmarker hier noch ausgeprägter als in der Referenzgruppe der Kortikospongiosa (Abb. 35).

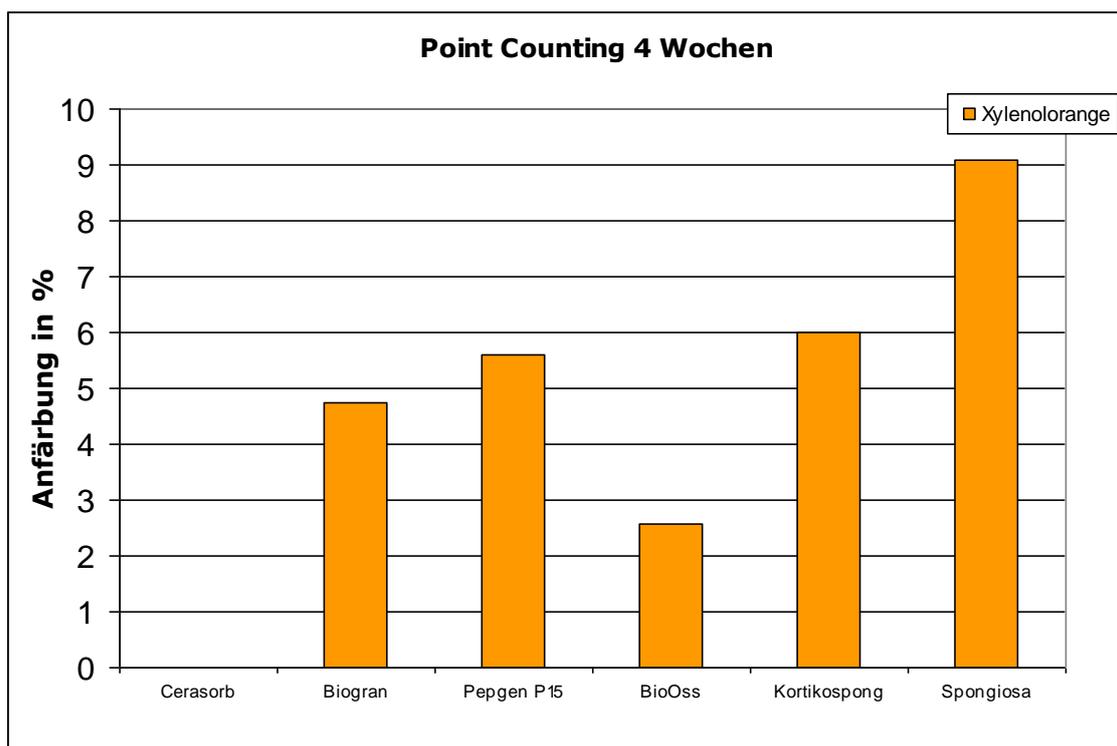
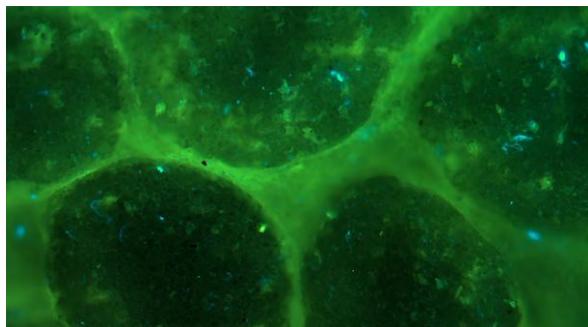
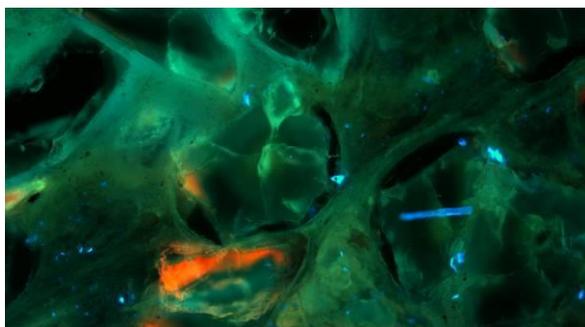
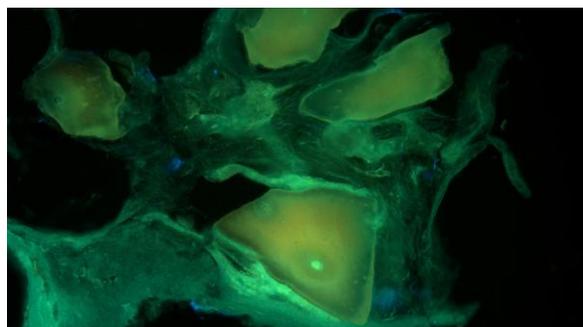
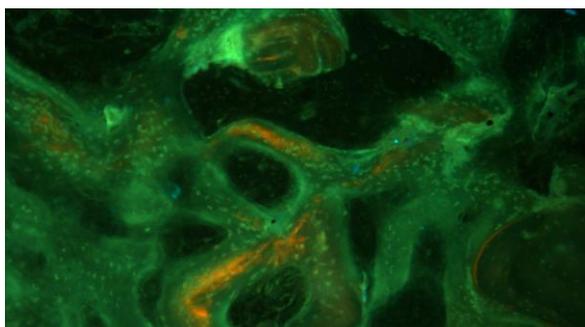


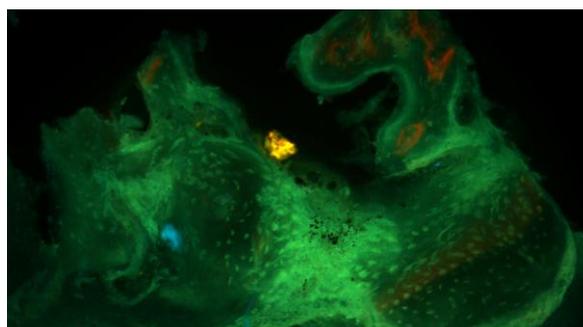
Abb. 35: Ergebnisse *Point-Counting* in der Vierwochengruppe. In Gegenwart des KEM Cerasorb erfolgte keine Einlagerung des Fluoreszenzmarkers.

A: Cerasorb<sup>®</sup>B: Bio-Oss<sup>®</sup>C: Biogran<sup>®</sup>D: PepGen P-15<sup>®</sup>

E: Spongiosa



F: Kortikospongiosa



**Abb. 36: Knochenersatzmaterialien nach 4 Wochen Einheilzeit; Cerasorb (A), Bio-Oss (B), Biogran (C), PepGen P-15 (D), Spongiosa (E) und Kortikospongiosa (F). Filter Fluo D, 100-fache Vergrößerung.**

### 3.2.4.2 8 Wochen Einheitszeit

In der Gruppe mit achtwöchiger Einheitszeit der KEM wurde ebenfalls eine regelgerechte Einlagerung der Marker Xylenolorange und Calcin (grün) im ortsständigen Knochen beobachtet.

Die Ergebnisse des *Point-Countings* entsprachen tendenziell denen der 4- Wochen- Gruppe.

Die Färbung für Bio-Oss<sup>®</sup> zeigte sich erneut schwach. Es erfolgte in der *Point-Count-* Untersuchung eine um ca. 50 % geringere Einlagerung der Marker Xylenolorange (orange) und Calcin (grün) im Vergleich zu den anderen KEM.

Die ermittelten Daten für Biogran<sup>®</sup>, PepGen P-15<sup>®</sup>, Spongiosa und Kortikospongiosa lagen nach 8 Wochen ungefähr auf gleichem Niveau. Erneut zeigte der mit Spongiosa elevierte Sinus die besten Einlagerungswerte der verwendeten Marker (Abb. 37).

Die Einfärbung von PepGen P-15<sup>®</sup> schien aus dem Inneren der Partikel zu beginnen. Es erfolgte eine Farbeinlagerung innerhalb der Granula (Abb. 39).

Auffällig waren die schlechten Anfärbungen für Xylenolorange nach vier Wochen in der Biogran<sup>®</sup>-Gruppe. Die hier ermittelten Werte lagen deutlich unter denen des ersten Beobachtungszeitraumes (4 Wochen). Der ortsständige Knochen zeigte eine bessere Einfärbung mit Xylenolorange als das KEM Biogran<sup>®</sup> selbst (s. Abb. 38).

Die beste Einlagerung von Calcin (grün) wurden in den autogenen Spongiosa- und Kortikospongiosatransplantaten mit je > 6,5% der ausgezählten Punkte beobachtet.

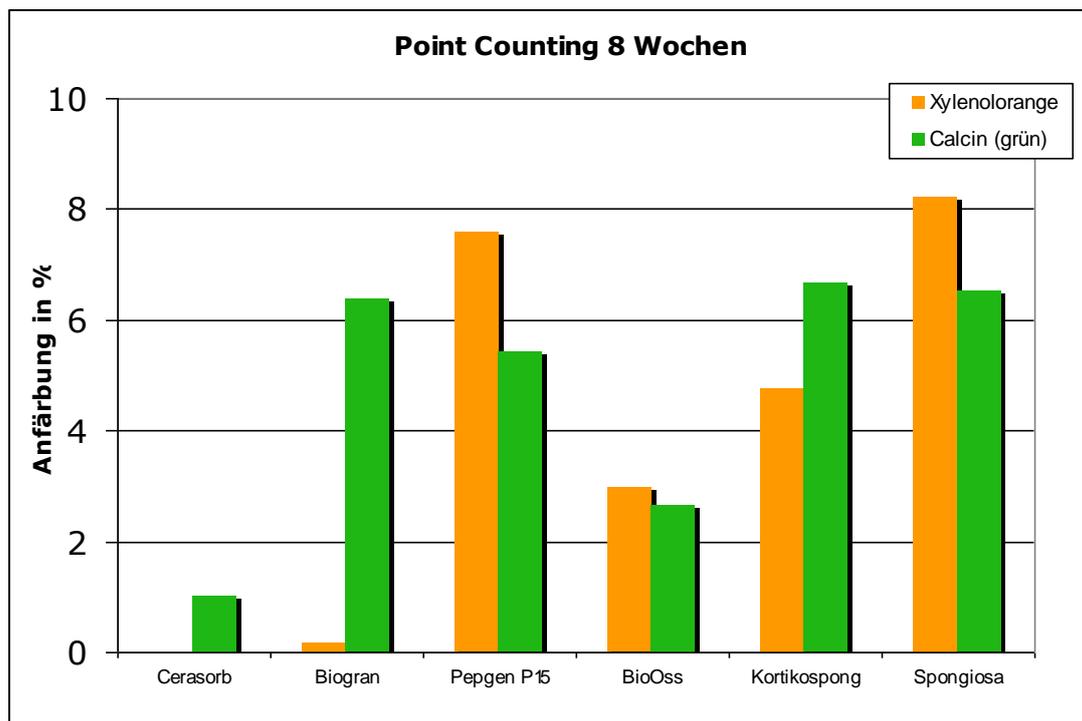


Abb. 37: Ergebnisse *Point-Counting* in der 8- Wochengruppen.

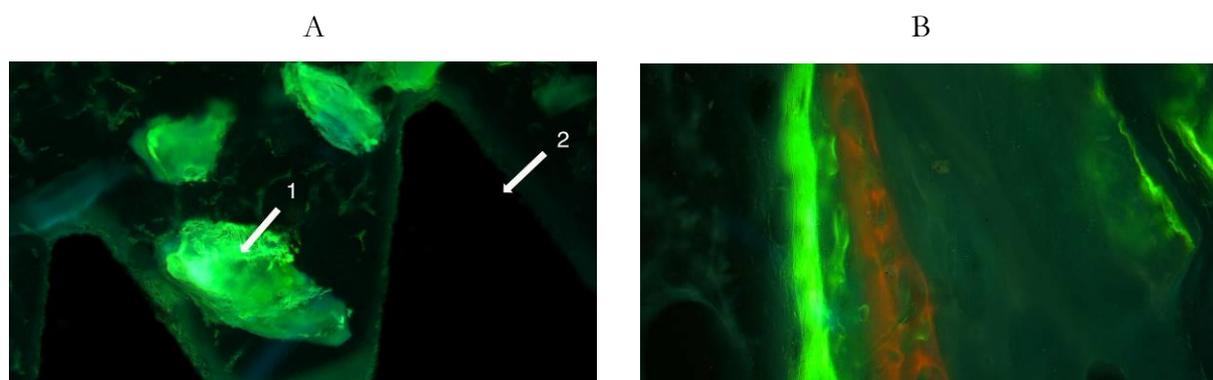
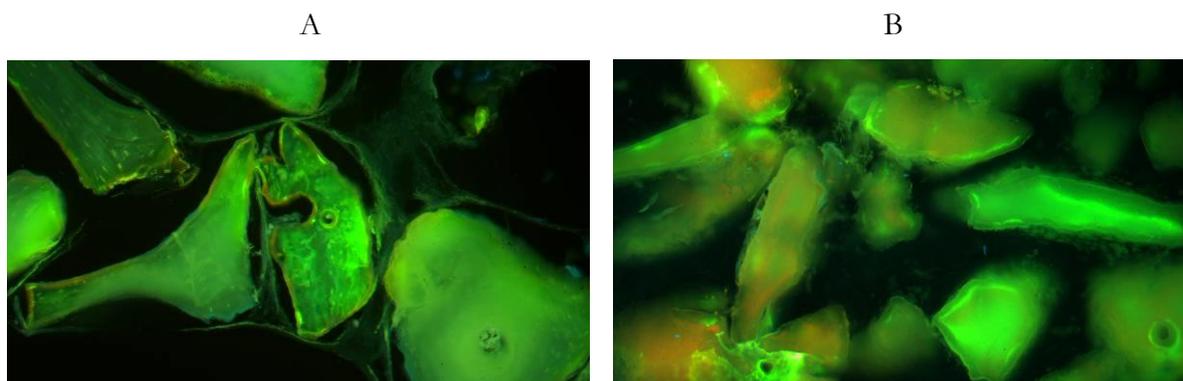


Abb. 38: Anfärbung des KEM Biogran (weißer Pfeil 1 in Bild A) und Darstellung des Implantates (weißer Pfeil 2) sowie des ortsständigen Knochens der Biogran- Probe (B) im Vergleich. Filter Fluo D, 100-fache Vergrößerung.



**Abb. 39:** Einfärbung mit Xylenorange und Calcin (grün) zum Einheitszeitpunkt 8 Wochen; beispielhaft Bio-OSS (A) und PepGen P-15 oberhalb des ortsständigen Knochens (B). Filter Fluo D, 100-fache Vergrößerung

### 3.2.4.3 12 Wochen Einheitszeit

Eine regelrechte Anlagerung aller Marker in der applizierten Reihenfolge zeigte sich auch im ortsständigen Knochen dieser Gruppe (Abb. 41 und 42).

Die für Bio-Oss<sup>®</sup> ermittelten Werte für Xylenorange und Calcin (grün) blieben, im Vergleich zu den vorherigen Gruppen (4 und 8 Wochen), auf ähnlichem Niveau. An der Oberfläche der Partikel waren deutliche Einlagerungen aller applizierten Fluorochrome zu sehen.

Die für Biogran<sup>®</sup> erhobenen Zahlen zeigten sich in Relation zu den übrigen KEM, aber auch im Vergleich zu den 4- und 8- Wochengruppen, vermindert. Die Marker Xylenorange und Calcin (grün) wiesen nach diesem Betrachtungszeitraum eine geringere Einlagerung auf (Abb. 40).

Die zu den früheren Zeitpunkten beobachtete tendenzielle Verteilung der Marker setzte sich auch nach 12 Wochen fort. Erneut erreichte PepGen P-15<sup>®</sup> die besten Ergebnisse unter den beobachteten KEM. Die für Spongiosa ermittelten Werte lagen abermals darüber. Die Probe mit autogener Kortikospongiosa konnte bei dem bereits erwähnten Verlust durch technische Probleme bei der Probenbearbeitung nicht zur Auswertung herangezogen werden.

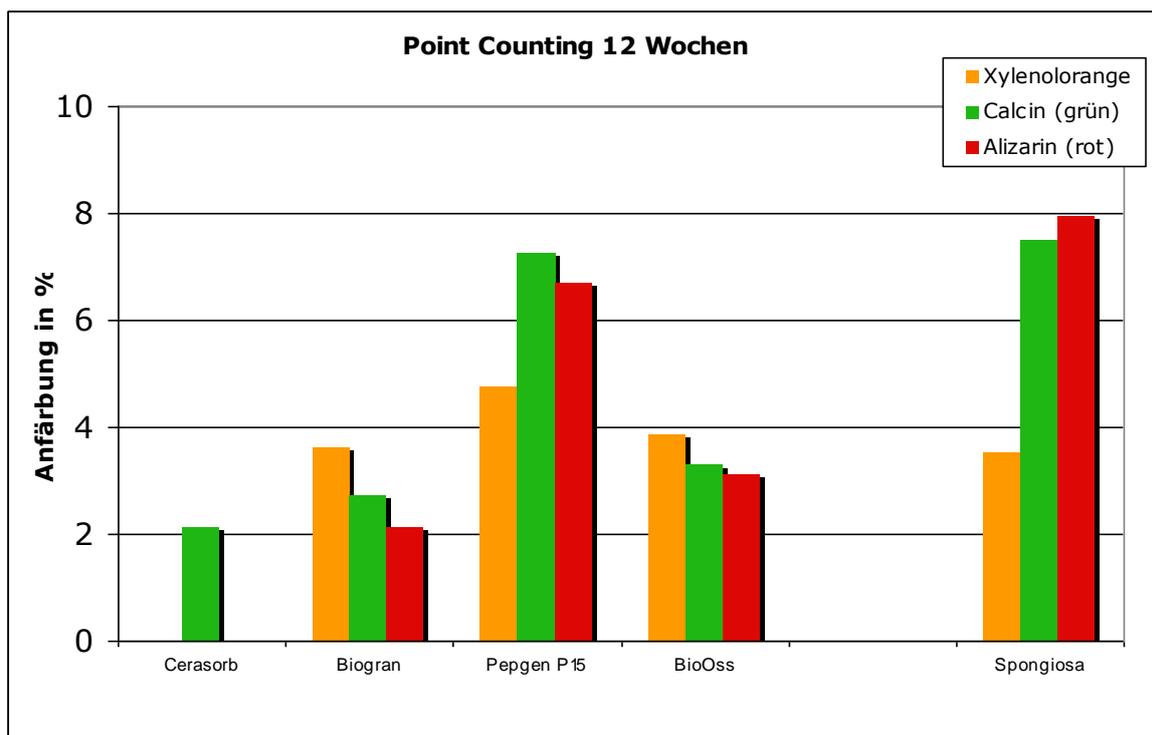


Abb. 40: Ergebnisse *Point-Counting* nach 12 Wochen. Die Kortikospongiosagruppe ging wie oben beschrieben verloren.

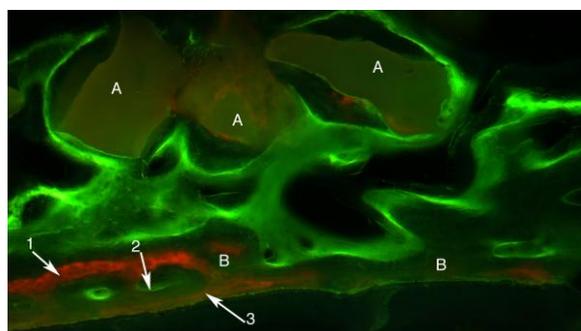
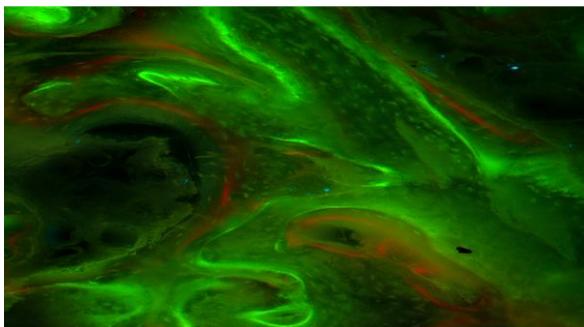
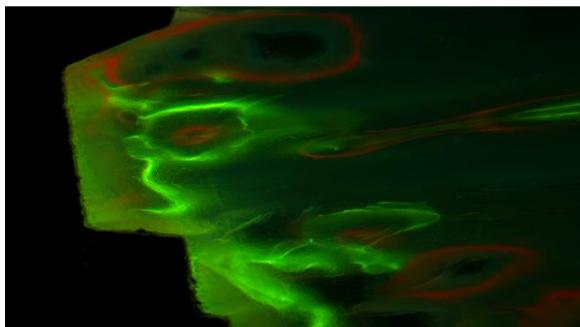


Abb. 41: PepGen P-15 nach 12 Wochen oberhalb des ortsständigen Knochens; A:KEM und B: ortsständiger Knochen, weißer Pfeil 1: Alizarin (rot), weißer Pfeil 2: Calcin (grün) und weißer Pfeil 3: Xylenolorange, Filter Fluo D, 100-fache Vergrößerung

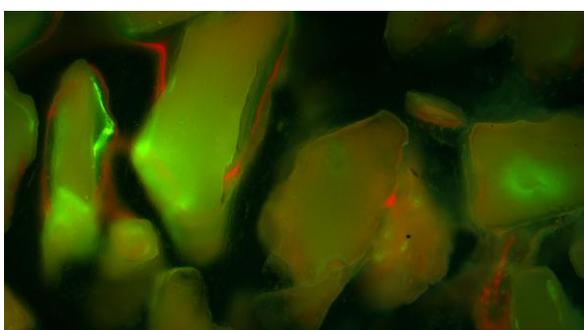
A: Bio-Oss®



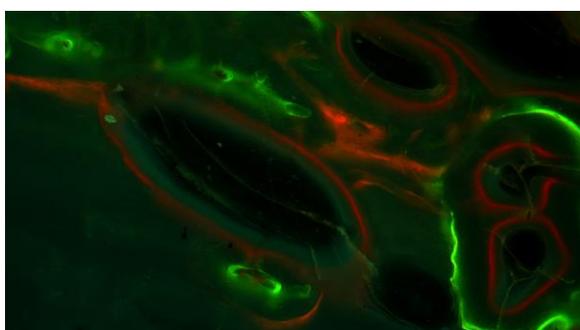
B: ortsständiger Knochen



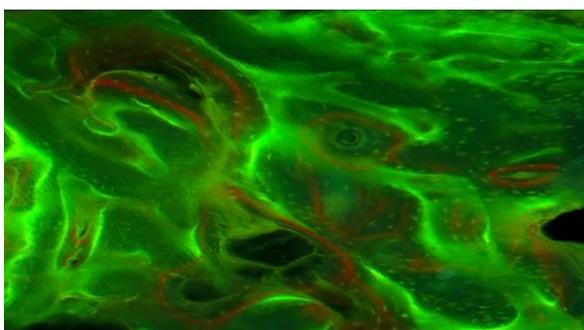
C: PepGen P-15®



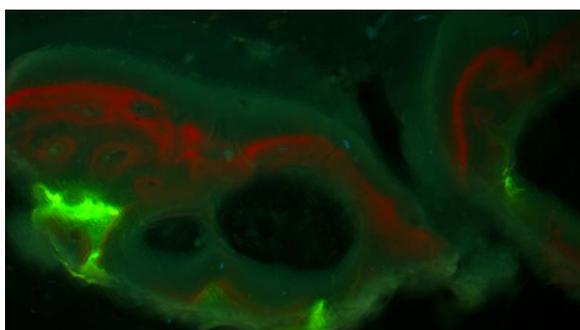
D: ortsständiger Knochen



E: Spongiosa



F: ortsständiger Knochen



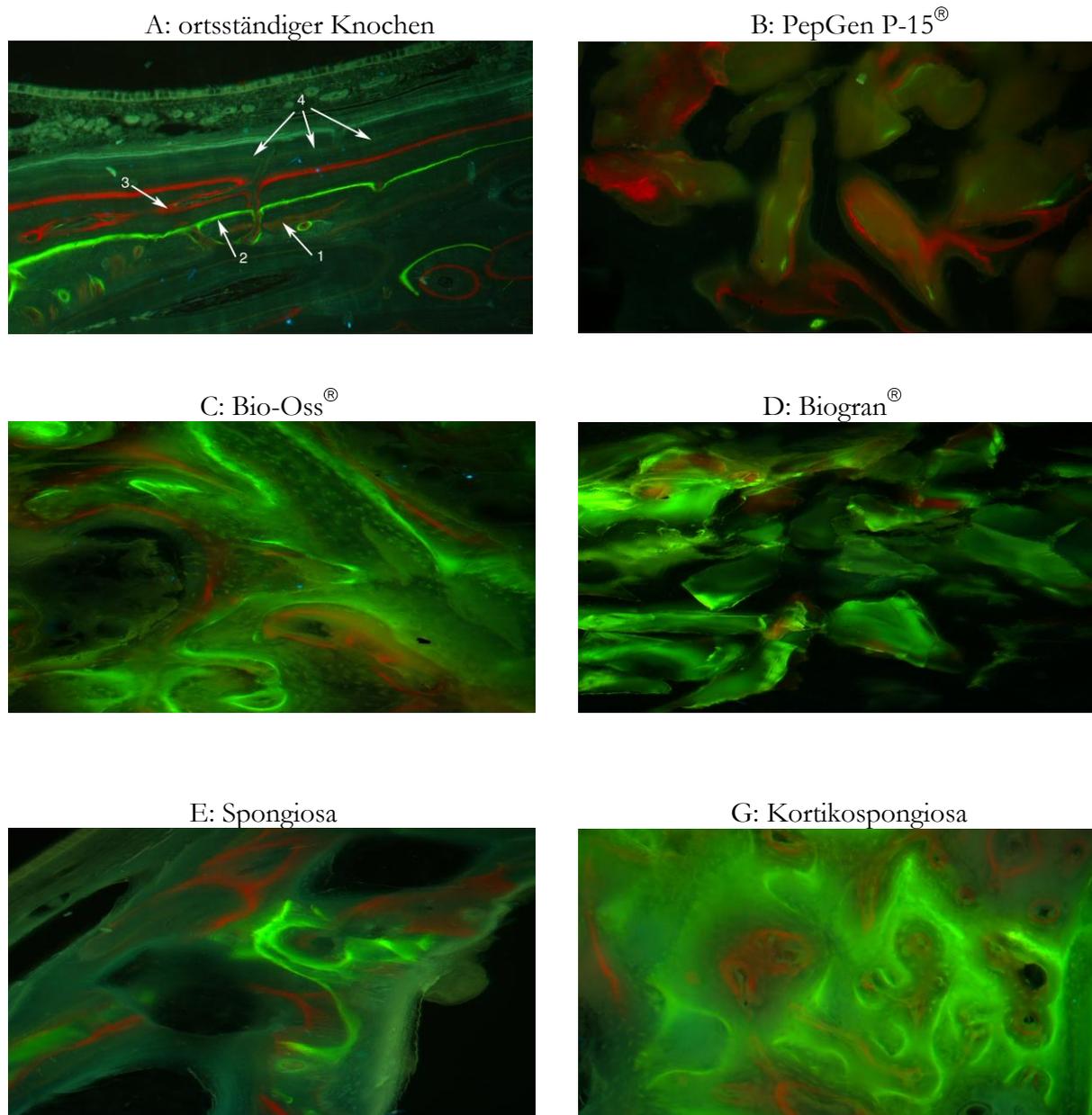
**Abb. 42:** KEM nach 12 Wochen Einheilzeit; linke Spalte eingebrachte Materialien, rechte Spalte ortsständiger Knochen der gleichen Probe im Vergleich. Bio-OSS (A) mit ortsständigem Knochen (B), PepgenP15 (C) mit ortsständigem Knochen (D) und Spongiosa (E) mit ortsständigem Knochen (F). Filter FluorD, 100-fache Vergrößerung.

#### 3.2.4.4 16 Wochen Einheilzeit

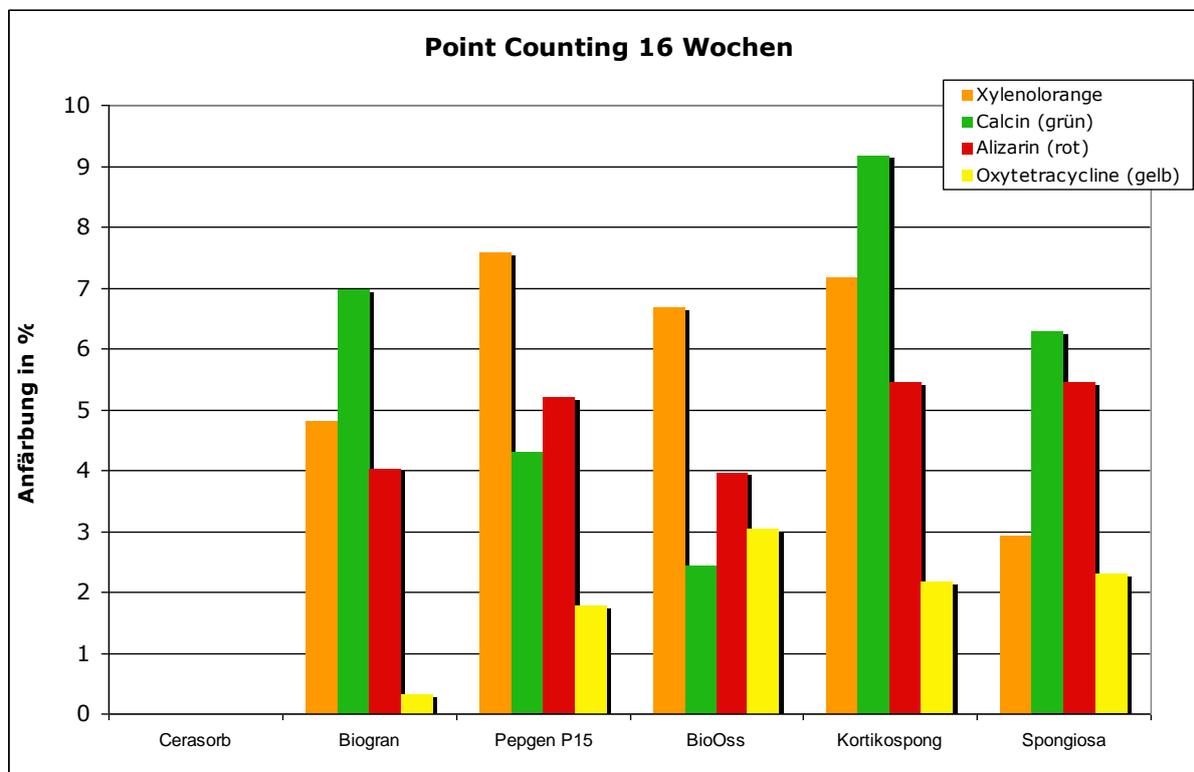
Die Proben nach 16 Wochen präsentierten eine gleichfalls gute Einlagerung der Fluoreszenzmarker im ortsständigen Knochen. Die Einlagerung des letzten Markers Oxytetracyclin (gelb), Applikationszeitpunkt am Tag 98 post operationem, fiel allerdings, im Vergleich zu den übrigen Markern, deutlich schwächer aus. Sowohl im ortsständigen Knochen (Abb. 43) als auch in den beobachteten Materialien war die Ausprägung der gelben Bande, in Gegenüberstellung zu den vorher applizierten Markern, deutlich geringer.

Nach diesem Beobachtungszeitraum lagen die Werte für Biogran<sup>®</sup>, PepGen P-15<sup>®</sup> und Spongiosa, untereinander verglichen, auf ähnlicher Höhe. Die Werte von Biogran<sup>®</sup> und PepGen P-15<sup>®</sup> näherten sich stärker an. Die ermittelten Zahlen für den ersten Marker Xylenolorange waren bei PepGen P-15<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> mehr als doppelt so hoch als die vergleichbaren Werte der Spongiosagruppe. Die Sinusliftproben mit Spongiosa wiesen im Vergleich zu PepGen P-15<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> eine höhere Einlagerung von Calcin (grün) und Alizarin complexone (rot) auf (Abb. 44).

Die tendenzielle Verteilung der Einfärbung mit Xylenolorange, Calin (grün) und Alizarin complexone (rot) blieb auch in dieser Gruppe erhalten. Die Kortikospongiosagruppe zeigte die beste Einlagerung vor der Gruppe mit Spongiosa. Eine klare Differenzierung zwischen dem eingebrachten autogenen Material und dem ortsständigen Knochen konnte zu diesem Beobachtungszeitraum nicht mehr vollzogen werden. Die Unterscheidung erfolgte anhand der Osteotomiestelle und zur Orientierung eingebrachten Implantates. Von den verwendeten KEM zeigte PepGen P-15<sup>®</sup> vor Biogran<sup>®</sup> die besten Ergebnisse.



**Abb. 43:** KEM und autogene Transplantate nach 16 Wochen. Es zeigte sich eine gute Einlagerung der ersten drei Marker (weiße Pfeile 1-3) in allen Proben mit Ausnahme von Cerasorb. Die Beurteilung des letzten applizierten Markers Oxytetracyclin (gelb) (weißer Pfeil 4) erschien schwierig. Filter FluorD, 100-fache Vergrößerung.



**Abb. 44:** Ergebnis *Point-Counting* nach 16 Wochen. Erneut keine Farbeinlagerung in Gegenwart des KEM Cerasorb.

## 4 Diskussion

Autogener Knochen stellt nach wie vor den Goldstandard im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie dar. Er gilt bis heute als das Material der ersten Wahl bei zum Beispiel Defektauffüllungen oder Sinusbodenelevationen. Autogener Knochen erfüllt dabei alle drei Prinzipien der Knochenneubildung, das heißt Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion<sup>32, 74-76</sup>. Osteogenese bezeichnet die Synthese von neuem Knochen durch Präosteoblasten und Osteoblasten in einem Knochentransplantat in Abwesenheit von undifferenzierten Osteoprogenitorzellen. Osteoinduktion beschreibt die Rekrutierung pluripotenter Zellen, wie mesenchymaler Stammzellen, welche zu Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren und nachfolgend neuen Knochen bilden. Es erfolgt also zunächst eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu osteogenen Zellen, die neuen Knochen produzieren können. Osteokonduktive Materialeigenschaften ermöglichen eine reizlose Inkorporation des Transplantates oder Implantates. Die Struktur des osteokonduktiven Materials fungiert dabei als orientierende Leitschiene für eine Knochenregeneration aus dem ortsständigen Knochen.

Ein weiterer Vorteil von autogenem Knochen liegt in seinen angiogenen Fähigkeiten mit einhergehender Gefäßsprossung aus dem umgebenden Gewebe. Eine rasche Revitalisierung des Transplantates und seiner Zellen ist die Folge. Eine zelluläre Teilnahme am lokalen Knochenumsatz mit Knochenumbau und dem funktionell orientierten osteoblastären *Remodeling* ist beim autogenem Knochen gegeben<sup>39</sup>. Dabei wird bereits vorhandener Geflechtknochen in funktionell höherwertigen Lamellenknochen umgebaut. In diesem Zusammenhang spielt die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die kapilläre Gefäßbildung, die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen sowie die Aktivierung von Makrophagen eine entscheidende Rolle<sup>77, 78</sup>. Eine wichtige Aufgabe bei der Knochenneubildung wird dem *Bone Morphogenetic Protein (BMP)* zugeschrieben. Es kann in mineralisierten Geweben wie Knochen nachgewiesen werden. Die Freisetzung von *BMP* in die umgebende Matrix wirkt induktiv auf die Knochenneubildung<sup>32, 79, 80</sup>. Alle diese Bedingungen erfüllt der autogene Knochen am besten. Seine Verwendung hat sich demnach als gut prognostizierbare Methode etabliert<sup>72</sup>.

Die operative Gewinnung autogenen Knochens erfordert jedoch einen erweiterten oder zusätzlichen Eingriff, der mit Mehraufwand, einer entsprechenden Entnahmemorbidität und Mehrkosten verbunden ist. Außerdem steht autogener Knochen nicht unbegrenzt zur Verfügung<sup>81</sup>.

Aus diesem Grund stellen Knochenersatzmaterialien eine gute klinische Alternative dar. Durch lokal osteokonduktive und evtl. osteoinduktive Eigenschaften sind diese Materialien in der Lage, die Knochenneubildung zu unterstützen<sup>82</sup>. Dabei können sie alleine oder in Kombination als Gemisch mit autogenem Knochen verwendet werden<sup>83</sup>.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand im Vergleich der verschiedenen Knochenersatzmaterialien untereinander. Als Referenz dienten autogene Spongiosa und Kortikospongiosa. Dazu wurde die Studie *in-vitro* an humanen osteoblastären Zellen und *in-vivo* am Schafmodell durchgeführt.

#### 4.1 Zellkulturversuche

Bei der Betrachtung und Diskussion von *in-vitro* gewonnenen Ergebnissen stellt sich grundsätzlich die Frage der Übertragbarkeit auf die *in-vivo*-Situation. Sowohl Dodds et al. als auch Mundlos wiesen in ihren Arbeiten darauf hin, dass sich humane Osteoblasten *in-vivo* und *in-vitro* ähnlich verhalten<sup>84, 85</sup>. Damit ist eine unabdingbare Voraussetzung für weitere tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien gegeben.

Die für unsere Versuche verwendeten osteoblastären Zellen stammten aus dem Beckenknochen einer 42jährigen Patientin.

Das Alter und Geschlecht des Knochenspenders sind bei der *in-vitro*- Expression von osteoblastentypischen Markern relevant. Nachweislich liegt die Osteokalzinkkonzentration im Serum von Männern deutlich über der Serumkonzentration von Frauen<sup>86 87</sup>. Mit zunehmendem Alter nimmt diese stetig ab. In der durchgeführten Studie erfolgten vergleichende Untersuchungen an den osteoblastären Zellen einer Patientin. Für alle beobachteten Materialien bestanden demnach die gleichen Versuchsbedingungen und interindividuelle Schwankungen konnten vernachlässigt werden.

In der vorliegenden Studie wurde keine Charakterisierung oder Trennung der Zellpopulation durchgeführt wurde, was bezüglich der Versuche zur Zellproliferation und –differenzierung zu beachten ist.

Die *in-vitro* kontinuierlich durchgeführten pH-Messungen des Kulturmediums zeigten, dass die Zugabe verschiedener Knochenersatzmaterialien keinen beeinflussenden Effekt hat. Eine negative Einwirkung einer pH-Wertverschiebung auf osteoblastäre Zellen eines potentiellen Transplantatlagers kann somit ausgeschlossen werden.

Jäger et al. beobachteten hingegen in ihren Untersuchungen deutliche Einflüsse unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien auf den pH-Wert des Kulturmediums *in-vitro*. Sie empfehlen zur Pufferung dieser pH-Wert-Einflüsse den Einsatz unterschiedlicher Kulturmedien, je nach verwendetem Knochenersatzmaterial<sup>136</sup>. Eine Pufferung von pH-Wert-Einflüssen war nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht notwendig.

Die in den Zellkulturversuchen verwendeten unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erwiesen sich zum Vergleich der KEM als geeignet. Die Bestimmung der Zellproliferation (Wachstumskurven), der Zellvitalitätsbestimmung (WST-1-Test), der Zellvitalitäts- und Proliferationsbestimmung (BrdU-Test) sowie die ermittelten Osteoblastenmarker erwiesen sich gut anwendbar und untereinander vergleichbar. Die ermittelten Ergebnisse korrelierten mit den subjektiven mikroskopischen Beobachtungen (vgl. Abb. 15).

Die von uns in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Knochenersatzmaterialien lassen sich in biologische und synthetische Produkte differenzieren<sup>29</sup> (siehe Tab.2).

Die biologischen Materialien stammen von tierischen oder pflanzlichen Quellen und sind meist Kollagen- oder Hydroxylapatit-Abkömmlinge.

Die Hydroxylapatite können in Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite und Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite unterschieden werden. Die Herstellungstemperatur der Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite liegt bei <450°C, die der Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite bei >450°C.

Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite vom Rinderknochen, beispielsweise Bio-Oss<sup>®</sup>, besitzen eine hohe Porosität und eine sehr große spezifische Oberfläche. Eine gute Adhärenz osteoblastärer Zellen des Transplantatlagers am KEM wird so ermöglicht. Aufgrund dieser Morphologie weisen sie nicht nur eine hohe Stabilität sondern ebenfalls eine gute Osteokonduktivität bei der Knochenheilung und -regeneration auf<sup>96</sup>.

Der Einfluss von in Hydroxylapatiten enthaltenen Matrixproteinen auf die Knochenbildung wird kontrovers diskutiert. Dem möglichen Vorteil einer osteoinduktiven Wirkung der Hydroxylapatite<sup>97, 98</sup> steht die potentielle Krankheitsübertragung und Antigenität gegenüber<sup>99, 100</sup>. Keinen osteoinduktiven Effekt der Matrixproteine in den Hydroxylapatiten attestierten Heymann et al.<sup>101</sup>

Durch die Verwendung von Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatiten aus Algen, wie zum Beispiel Algipore<sup>®</sup>, kann eine Risikominderung zur Übertragung von antigenen Proteinen, Krankheitserregern und Prionen erzielt werden. Die Ultrastruktur dieses pflanzlichen Knochenersatzmaterials ist dem aus Rinderknochen produzierten Bio-Oss<sup>®</sup> sehr ähnlich.

Im *in-vitro*-Teil der vorliegenden Studie wiesen die osteoblastären Zellen, die mit den beiden Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatiten Bio-Oss<sup>®</sup> oder Algipore<sup>®</sup> kokultiviert wurden, die gerings-

ten Proliferations- und Vitalitätsparameter auf. Ähnliche Beobachtungen machten Turhani et al.<sup>102</sup>. Sie zeigten bei der Kokultivierung von osteoblastären Zellen mit Bio-Oss<sup>®</sup> einen Abfall des DNA-Gehaltes sowie eine verminderte Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zu PepGen P-15<sup>®</sup>. Zu gleichen Ergebnissen gelangten auch Wiedmann et al. Sie konnten in einem umfangreichen Vergleich von 16 Biomaterialien in Kokultur mit osteoblastären Zellen *in-vitro* die geringsten Proliferationsraten bei Bio-Oss<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup>-Kollagen nachweisen<sup>103</sup>. Die geringe Expression der Differenzierungsmarker Kollagen Typ I, Osteokalzin und die geringe Aktivität der knochentypischen alkalischen Phosphatase in unserer Studie lassen auf eine gestörte Differenzierung dieser Zellen *in-vitro* schließen. Weder die große Porosität der Granula, noch die Persistenz von Restproteinen der bovinen Matrix sind anscheinend in der Lage die Proliferation und die Differenzierung der osteoblastären Zellen adäquat zu unterstützen. Ursächlich hierfür könnte eine fehlende Adhärenz der Zellen auf den Knochenersatzmaterialien Bio-Oss<sup>®</sup> und Algipore<sup>®</sup> *in-vitro* sein. Diese stellt allerdings einen wichtigen Faktor für die Differenzierung und Knochenneubildung dar<sup>104, 105</sup>. In Gegenwart der beiden Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite konnten in der Zellkultur lichtmikroskopisch keine typischen *Colony Forming Units of fibroblasts (CFU-f)* festgestellt werden. Das Fehlen dieser typischen Formationen lässt auf eine nicht regelgerechte osteoblastäre Differenzierung und Mineralisierung der mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen schließen. Die erwarteten positiven Effekte auf die Osteokonduktivität ließen sich *in-vitro* nicht nachweisen. Ebenfalls scheint ein osteoinduktiver Effekt von Bio-Oss<sup>®</sup> und Algipore<sup>®</sup> *in-vitro* fraglich.

Neben den Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatiten wurden Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite untersucht.

Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite (Osteograf<sup>®</sup>/N, PepGen P-15<sup>®</sup>) werden bei 1100°C gesintert. Ergebnis ist ein reines, hydrophiles, porenreines, natürliches Hydroxylapatit. Im Vergleich zu den Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatiten weisen sie eine geringere Porosität der Granula auf. Der Nachteil dieser geringeren Porosität wird teilweise durch eine kleinere Körnungsgröße der Partikel ausgeglichen. In ihrer Matrix können keine Restproteine nachgewiesen werden.

Wie bereits beschrieben, stellt die Adhärenz der Zellen an das Knochenersatzmaterial einen wichtigen Faktor für die Differenzierung und Knochenbildung dar<sup>104</sup>. Die morphologieabhängige Adhärenz kann durch das Beschichten der Materialoberfläche mit spezifischen zellbindenden Proteinen verbessert werden. Die Bindung von Zellen an Kollagen Typ I wird unter anderem durch ein 15-kettiges Peptid vermittelt. Um eine Adhärenzerhöhung am KEM zu erzielen, wurde dieses Peptid an die Mineralkomponente von Osteograf<sup>®</sup>/N gekoppelt, wodurch das KEM Pep-

Gen P-15<sup>®</sup> entsteht<sup>120, 121</sup>. Daneben moduliert auch die Zell-Matrix-Interaktion die Proliferation und die Differenzierung von osteogenen Zellen<sup>105</sup>.

Verglichen mit der Kontrollgruppe ohne KEM zeigte die vorliegende *in-vitro*- Studie für Osteograf<sup>®</sup>/N indifferente und für PepGen P-15<sup>®</sup> verringerte Effekte im Hinblick auf die Proliferation und die Differenzierung osteoblastärer Zellen. Bezüglich der metabolischen Aktivität, der DNA-Synthese und der gemessenen weiteren osteoblastären Marker waren die für Osteograf<sup>®</sup>/N ermittelten Werte besser als die für PepGen P-15<sup>®</sup>. Ein Vorteil der zusätzlichen Beschichtung von PepGen P-15<sup>®</sup> war demnach nicht erkennbar. Es zeigten sich keine supportiven Effekte auf die Zellzahl und die Differenzierungsmarker im Vergleich mit dem nicht beschichteten Hydroxylapatit Osteograf<sup>®</sup>/N. Die erwartete Biomimetik durch die Nachahmung physiologischer Verhältnisse mittels Ankopplung einer Peptidkette blieb aus. Die *in-vitro*- Ergebnisse für PepGen P-15<sup>®</sup> blieben deutlich hinter der Kontrollgruppe zurück. Diese beiden Hoch-Temperatur-Hydroxylapatite erzielten vor Bio-Oss<sup>®</sup> und Aligpore<sup>®</sup> die im Vergleich schlechtesten Resultate.

Knochenersatzmaterialien synthetischer Herkunft können in Hydroxylapatite, Trikalziumphosphate, Kalziumphosphate und Biogläser eingeteilt werden.

Trikalziumphosphate unterscheidet man in  $\alpha$ - Trikalziumphosphate (Bio-Base<sup>®</sup>) und  $\beta$ - Trikalziumphosphate (Cerasorb<sup>®</sup>). Den  $\alpha$ - Trikalziumphosphaten konnte gegenüber den  $\beta$ - Trikalziumphosphaten bereits durch andere Untersuchungen eine langsamere Resorption nachgewiesen werden. Weiter konnte dargestellt werden, dass  $\alpha$ - Trikalziumphosphate eine Präsenz von Makrophagen für viele Jahre induzieren<sup>125</sup>.

Bezüglich ihrer Fähigkeit zur Förderung der Knochenneubildung und ihrer Resorptionsrate liegen für Trikalziumphosphate konträre Berichte vor<sup>122, 123</sup>. In unserer *in-vitro*- Untersuchung wiesen diese Materialien eine unter der Kontrollgruppe liegende Proliferation auf. Die Vitalitätspareparameter deuteten jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum auf eine vitale Zellkultur hin. Die Expression der Differenzierungsmarker Kollagen Typ I und Osteokalzin bestätigte diese Beobachtungen. Ihre Werte waren mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar. Interessanterweise zeigte die alkalische Phosphatase, verglichen mit der Kontrolle, geringere Werte, welche durch die Heterogenität der Zellen in der Kultur erklärt werden könnten.

Biogläser weisen aufgrund ihrer Formbeständigkeit eine sehr gute Osteokonduktivität auf. Ihre morphologische Struktur mit scharfen Kanten zeigt sich bei Biogran<sup>®</sup> und Perioglas<sup>®</sup> im klinischen Alltag allerdings nachteilig, da sie durch eine Perforation der Schleimhaut die Komplikationsrate erhöht<sup>129, 130</sup>.

Der *in-vitro*-Teil unserer Untersuchungen zeigte bei beiden Biogläsern die besten Werte im Hinblick auf die Proliferationsrate, die Vitalitätsparameter und die Expression der Differenzierungsmarker. Ihre Werte überstiegen dabei teilweise sogar die Ergebnisse der Kontrollgruppe. Von guten osteokonduktiven Eigenschaften dieser Knochenersatzmaterialien kann demnach ausgegangen werden. Ihre hohe Biokompatibilität, ihre Formkonstanz und ihre große Gesamtoberfläche könnten dafür ursächlich sein. Dies würde mit den Untersuchungen von Valimaki und Aro übereinstimmen<sup>131</sup>. Sie konnten tierexperimentell für Biogläser eine bessere Knochenregeneration und einen erhöhten, lokalen Knochenumsatz nachweisen.

Ein weiteres untersuchtes KEM war Grafton<sup>®</sup>.

Bei Grafton<sup>®</sup> handelt es sich um eine demineralisierte, allogene Knochenmatrix (*Demineralized Bone Matrix, DBM*). Die in der demineralisierten Matrix enthaltenden morphogenen Proteine (*BMPs*) sollen osteoinduktive und die Matrix selbst osteokonduktive Eigenschaften aufweisen<sup>133</sup>. Das Risiko einer Krankheitsübertragung unter Verwendung von Grafton<sup>®</sup> scheint aufgrund des Herstellungsverfahrens vernachlässigbar zu sein. Sicher auszuschließen ist sie jedoch nicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, bei denen mit Grafton<sup>®</sup> kokultivierten Zellen verwendet wurden, waren hinsichtlich der Proliferation und der Expression der Differenzierungsmarker den Ergebnissen der Kontrollgruppe sehr ähnlich. Insbesondere die Differenzierungsmarker Osteokalzin, -pontin und die alkalische Phosphatase wurden besser exprimiert als in der Kontrolle. Dieses unterstützt die Überlegung einer osteoinduktiven Wirkung von Grafton<sup>®</sup><sup>133</sup>. Das Vorhandensein einer dreidimensionalen Matrix als Träger für die osteoblastären Zellen wäre eine weitere mögliche Erklärung. Sie würde eine Voraussetzung für die osteoblastäre Proliferation und Differenzierung darstellen<sup>105</sup>. Nachteilig bei der Verwendung von Grafton<sup>®</sup> ist der mögliche antigene Effekt des Knochenersatzmaterials. Da *in-vitro* keine immunologischen Effektorzellen kultiviert wurden, konnte sich dieser potentiell antigene Effekt auch nicht auf die untersuchten Parameter auswirken<sup>134</sup>. Hinsichtlich der Verbesserung des Transplantatlagers ist bei diesem Knochenersatzmaterial mit einer guten Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und osteoblastären Zellen aus dem Transplantatbett zu rechnen. Der Patient sollte allerdings über das geringe Restrisiko einer möglichen Krankheitsübertragung aufgeklärt werden und es sollte eine explizite Einwilligung vorliegen.

## 4.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Wegen einer guten Vergleichbarkeit mit dem Menschen wurde das Schaf für den *in-vivo*- Versuchsteil als Versuchstier ausgewählt. Aufgrund seiner Körpergröße, Knochenanatomie und seines Knochenstoffwechsels eignete es sich am besten für die geplanten Versuche. Das durchschnittliche Gewicht der Merino-Wollschafe betrug mit circa 80 kg. ein mit dem Menschen vergleichbares Niveau <sup>91</sup>.

Die Versuche konnten an einer großen Anzahl von vergleichbaren Tieren kontrolliert durchgeführt werden. Die Größe und ausreichende Robustheit des Versuchstieres stellte dabei einen entscheidenden Vorteil dar. Problemlos ließen sich an diesen Tieren mehrfach Blutentnahmen, subkutane Injektionen und die geplanten chirurgischen Interventionen durchführen.

Die quantitativen Schwankungen der Hormonprofile weisen einen dem Menschen ähnlichen Zeitverlauf auf <sup>88</sup>.

Die trabekuläre Struktur des Beckenknochens offenbart zwischen Schaf und Mensch ebenfalls eine große Analogie <sup>89-91</sup>. Der Knochenstoffwechsel der Schafsknochen ist ähnlichen Bedingungen unterworfen wie der des humanen Knochens <sup>88,90</sup>. Die Knochenregenerationsraten sind vergleichbar. Beim Menschen liegt die Regenerationsrate, abhängig vom metabolischen Aktivitätsindex (MAI, beim Menschen 1,0), bei 2,0 - 3,0  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  <sup>92</sup>. Die tägliche Knochenneubildungsrate der Schafe liegt zwischen 1,0 und 2,5  $\mu\text{m}/\text{Tag}$ .

Weiterhin ist die Datenlage zum Schafmodell umfangreich und das Modell ist gut etabliert.

Minischweine haben im Gegensatz zum Schaf beispielsweise eine dichtere Trabekelstruktur und eine höhere Knochenmasse als der Mensch <sup>93,94</sup>. Die Höhe des metabolischen Aktivitätsindex liegt unter dem des Menschen und über dem der Nagetiere. Bezüglich der Tierhaltung und der postinterventionellen Ruhigstellung im Rahmen des knöchernen Heilungsprozesses stellt sich die größere Aggressivität der Minischweine nachteilig dar.

Die tierexperimentelle Verwendung von Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden und Katzen würde eine weitere Alternative darstellen. Diese zeigen allerdings im Vergleich zum Menschen große Unterschiede im Hinblick auf Größe, Gewicht, Knochenanatomie und Knochenstoffwechsel. Für die in unserer Studie formulierte Fragestellung scheinen sie daher wenig geeignet <sup>88</sup>. So zweifeln zum Beispiel MacNeill et al. <sup>95</sup> die Eignung des Kaninchenmodells für Untersuchungen der Knochenheilung an. Bei der Bewertung und Interpretation der tierexperimentellen Ergebnisse ist die getroffene Wahl des Versuchstieres selbstverständlich zu berücksichtigen. Aufgrund der diskutierten Bedingungen zeigte sich das verwandte Merino- Wollschaf als Versuchstier für unsere Fragestellung gut geeignet.

In der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung wurde die Einheilung der gewonnenen Proben klinisch bewertet. Darüber hinaus erfolgte eine Beurteilung mittels quantitativen Computertomographien, Kontakt-Mikroradiographien und polychromer Sequenzmarkierung.

Die klinische Bewertung des Einheilverhaltens der Proben erfolgte immer durch den gleichen Untersucher nach einem standardisierten Vorgehen. Eine größtmögliche Konstanz bei dieser subjektiven Bewertungsmethode war somit gegeben.

Mittels der quantitativen Computertomographie (qCT) wurde die Knochendichte ermittelt. Nach dem erstmaligen Einsatz zur Osteodensitometrie der Wirbelsäule Ende der siebziger Jahre hat sich dieses Messverfahren zur Bestimmung der Knochendichte im axialen Skelett etabliert<sup>108</sup>.

Bezüglich der Interpretation der qCT-Aufnahmen sollte die subjektive Verteilung der *Regions of Interest* erwähnt werden. Durch die manuelle Festlegung der Regionen erfolgte eine beobachterabhängige Beeinflussung der Messergebnisse. Im Zuge der Knochendichtebestimmung wurde das verwendete KEM ebenfalls miterfasst und evaluiert. Im Fall des bovinen Materials, wie zum Beispiel Bio-Oss<sup>®</sup>, kann dies zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen. Eine anfängliche Messwerterhebung der Materialien alleine erscheint für die anschließende Auswertung und Bewertung sinnvoll. Die Resorptionstendenz des KEM und die wirkliche Knochenneubildung ließen sich folglich einfacher und eventuell genauer bestimmen.

Die Knochenneubildung wurde mittels Kontakt-Mikroradiographien ermittelt. Dieses Verfahren erlaubt die Darstellung und Beurteilung auch feinsten knöcherner Strukturen und hat sich als wertvolle Methode in der Beurteilung von ossären Strukturen etabliert. Auch Thorwarth et al.<sup>106</sup> attestierten diesem Verfahren, welches sowohl in experimentellen als auch klinischen Studien zur Anwendung kommt, eine hohe Auflösung und damit gute Auswertungsmöglichkeiten.

Eine Identifikation der Knochenersatzmaterialien war eindeutig möglich. Die Unterscheidung zwischen autogenem Transplantat und ortsständigem Knochen war bereits ab der 12. Woche mikroradiographisch nicht mehr eindeutig möglich.

Für die *Point-Count*-Untersuchungen der polychromen Sequenzmarkierung wurden vier verschiedene Fluorochrome verwendet. Fluorochrome sind Substanzen, die an Gewebe angelagert werden können. Sie sind entweder selbst fluoreszierend oder rufen, zusammen mit der Struktur, an die sie sich binden, eine Fluoreszenz hervor. Der Vorgang der Anlagerung wird als Fluorchromierung bezeichnet.

Die von uns benutzten Fluorochrome - Xylenolorange, Calcin (grün), Alizarin complexone (rot), Tetrazyklin (gelb) - besitzen eine Affinität zum mineralisierenden Knochen und Zahnhartgewebe. Diese Affinität gilt sowohl für physiologische, als auch für pathologische Verkalkungsvorgänge. Dies konnte bereits 1976 von Rahn nachgewiesen werden<sup>132</sup>.

Die stoffspezifische Lichtwellenlänge, die so genannte Exzitationswellenlänge, führt zu einer Anregung der Fluorochrome. Dadurch werden einzelne Elektronen auf äußere, energiereichere Bahnen gehoben (Exzitation). Von dort aus kehren sie unter Abstrahlung von langwelligem Licht wieder auf ihre ursprüngliche Bahn zurück (Emission) und sie emittieren so Licht einer von der Exzitationswellenlänge abweichenden Lichtwellenlänge. Diese so genannte Emissionswellenlänge ist stoffspezifisch und unterscheidet sich in Intensität und Farbe von der Umgebung.

Die Natriumsalze der entsprechenden Fluorochrome sind gut wasserlöslich. Diese Wasserlöslichkeit und die Angleichung der meist sauren Salzlösung an einen physiologischen pH-Wert wurden durch die Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  verbessert. Der Ansatz erfolgte als 2 %-ige Lösung. Da die Substanzen hitzelabil sind, wurden die Lösungsansätze bei etwa  $+4^\circ\text{C}$  im Dunkeln aufbewahrt.

Die Gabe der Markierungssubstanzen erfolgte in der vorliegenden Studie parenteral durch intramuskuläre Injektion. Durch die perorale Gabe, zum Beispiel durch Beimischung im Futter der Versuchstiere, wäre die exakte Dosierung erschwert gewesen. Dies ist insbesondere bei Mehrfachmarkierungen zum Erreichen eines ausreichenden Fluoreszenzeffektes von Bedeutung.

Zudem ist bei peroraler Gabe eine zehnfach höhere Menge zum Erreichen eines adäquaten Fluoreszenzeffektes erforderlich. Zusätzlich können sich andere Nahrungsbestandteile negativ auf die Resorption der Fluoreszenzmarker im Verdauungstrakt auswirken.

Fluorochrome werden auf dem Blutweg über die nutritiven Gefäße in den Knochen transportiert. Der Einbauort von Xylenolorange, Calcin, Alizarin complexone und Tetrazyklin im Knochen entspricht dem des  $\text{Ca}^{2+}$ . Sie werden dort angelagert wo Mineralisationsvorgänge stattfinden.

Alle KEM und autogenen Transplantate dieser Studie zeigten eine klinisch reizfreie Einheilung. Die inserierten Xive- Implantate heilten ebenfalls komplikationslos ein. Keines der Implantate war verloren gegangen.

Bio-Oss<sup>®</sup>, ein Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatit vom Rinderknochen, erschien in der Betrachtung der qCT-Bilder sehr kompakt. Zwischen den Materialpartikeln hatte eine deutliche Knochenneubildung stattgefunden. Die in der mikroradiographischen Beurteilung gewonnenen Erkenntnisse wurden durch das qCT bestätigt. Bio-Oss<sup>®</sup> wies nach 12 bzw. 16 Wochen eine deutliche Knochenneubildung auf. Im Gegensatz zu den *in-vitro*-Versuchen zeigte sich das bovine Hydroxylapatit in der röntgenologischen Betrachtung und klinisch experimentell den anderen KEM überlegen.

So zeigte Bio-Oss<sup>®</sup> in den Ergebnissen der Kontaktmikroradiographie nach initial schlechten Werten einen deutlichen Anstieg der Knochenneubildung nach 12 und 16 Wochen dar. Zu diesen Beobachtungszeiträumen wies Bio-Oss<sup>®</sup> im Vergleich zu den anderen KEM den meisten

neugebildeten Knochen auf. Eine eindeutige Knochenneubildung um die Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel hatte stattgefunden. Im Vergleich mit den autogenen Materialien Spongiosa und Kortikospongiosa erreichten die Sinuslifts mit Bio-Oss<sup>®</sup> ein ähnliches Niveau wie die Spongiosagruppe. Die ermittelten Werte bei Verwendung von Kortikospongiosa lagen darüber. Dies lässt sich durch die geringergradige Resorption des kortikalen Knochens erklären. Die vergleichbaren Ergebnisse von autogener Spongiosa und Bio-Oss<sup>®</sup> resultieren einerseits im guten osteokonduktiven *in-vivo*-Verhalten des KEM und andererseits in der hohen Resorptionstendenz der transplantierten Spongiosa. Dies bestätigten die Ergebnisse früherer Untersuchungen. Eine Resorption des KEM konnte nicht beobachtet werden. Diese Erkenntnis deckt sich auch mit den Studienergebnissen von Schlegel et al.<sup>39</sup> und Bereiter et al.<sup>27</sup>. Sie konnten nach Liegezeiten von bis zu 39 Monaten noch Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel nachweisen. Hillman et al.<sup>107</sup> machten in einer klinischen Studie ebenfalls auf die schlechte Resorption und die Scharfkantigkeit des Materials aufmerksam.

Die schlechte Biodegradierbarkeit des bovinen KEM kann in Kombination mit autogenem Knochen genutzt werden. So vermindert das Beimischen von schlecht resorbierbarem Bio-Oss<sup>®</sup> die Resorption und Atrophie von autogenen Transplantaten. Das KEM kann also in Kombination mit autogenem Knochen oder einem anderen KEM als Resorptionsschutz und Stabilisator eingesetzt werden<sup>107</sup>.

In der durch *Point-Counting* untersuchten Einlagerung der applizierten Fluoreszenzmarker bestätigten sich die für Bio-Oss<sup>®</sup> bis dahin gemachten Beobachtungen aus den Mikroradiographien und der klinischen Beurteilung. Nach anfänglich geringer Einlagerung kam es zum Ende des Beobachtungszeitraumes (16 Wochen) zu einer vermehrten Anfärbung. Im Vergleich mit den übrigen Materialien blieben die Ergebnisse aber auf einem nur geringen Niveau. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt erfolgte eine Einlagerung. Die abweichenden Ergebnisse in den *Point-Count*-Untersuchungen, im Vergleich zu den übrigen Untersuchungen, können an der bereits diskutierten Problematik der Subjektivität dieses Auswerteverfahrens liegen. Eine Verblindung der Auswertung sowie die Durchführung mit fünf unabhängigen Auswertern minimiert zwar die Beeinflussbarkeit deutlich, doch bleibt das *Point-Counting* eine subjektive Methode.

In Gegenwart von Bio-Oss<sup>®</sup> kam es *in-vivo* zu einer Knochenneubildung direkt an der Oberfläche der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel. Diese blieb allerdings hinter den Werten der autogenen Transplantate zurück. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch anderweitig durchgeführte Studien<sup>39, 109</sup>. Ursächlich hierfür können die rein osteokonduktiven Fähigkeiten des Materials sein. Die für Osteostimulation und insbesondere Osteoinduktion benötigten Wachstumsfaktoren sind überwiegend Proteoglykane. Diese Faktoren werden durch Hitze denaturiert, so dass sie während des

Herstellungsprozesses sicher zerstört werden dürften<sup>110, 111</sup>. Eine Resorption des implantierten KEM konnte auch in der Fluoreszenzmikroskopie nicht gezeigt werden. Young et al.<sup>135</sup> fanden für Bio-Oss<sup>®</sup> das gleiche Phänomen in einer Untersuchung an Kaninchen. Auch Schlickewei et al.<sup>112</sup> und Jensen et al.<sup>113</sup> kamen zu dem Ergebnis einer schlechten Biodegradierbarkeit dieses bovinen Materials.

*In-vivo* waren die für Bio-Oss<sup>®</sup> ermittelten Ergebnisse im Vergleich zu den anderen in der Studie verwendeten KEM am vorteilhaftesten. Es wies osteokonduktive Eigenschaften und die Fähigkeit zur Knochenbildung auf. Der Effekt von Bio-Oss<sup>®</sup> *in-vitro* und *in-vivo* differiert sehr deutlich. Die tierexperimentell ermittelten Ergebnisse erschienen erheblich besser als die *in-vitro* postulierten Materialeigenschaften.

Die besseren Eigenschaften von Bio-Oss<sup>®</sup> im Schafmodell lassen sich durch das *in-vivo* vorhandene breitere Zellspektrum im Vergleich zur Zellkultur erklären. Die Gegenwart von Fibroblasten, hämatopoetischen und endothelialen Zellen wirken sich wohl positiv auf die Eigenschaften von Bio-Oss<sup>®</sup> *in-vitro* aus. Zum gleichen Ergebnis kamen auch die Untersuchungen von Lorenzoni et al.<sup>114</sup>, Proussaefs et al.<sup>115</sup> und Maiorana et al.<sup>116</sup>

Eine Resorption des Materials konnte nicht beobachtet werden. Zum gleichen Schluss kamen auch die Studien von Scarano<sup>117</sup> und Degidi<sup>117</sup>. Carmagnola<sup>119</sup> hingegen konnte in einem Versuch an Beaglehunden keine osteointegrativen Eigenschaften von Bio-Oss<sup>®</sup> zeigen.

Neben dem bovinen Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatit Bio-Oss<sup>®</sup> wurde in der vorliegenden Studie auch ein Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit untersucht. Das synthetisch hergestellte Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit (PepGen P-15<sup>®</sup>) soll mittels einer Sequenz von 15 Aminosäuren die Zellbindung und somit die Knochenneubildung erhöhen.

Vergleichend lagen die ermittelten Werte für PepGen P-15<sup>®</sup> unter dem Niveau von Bio-Oss<sup>®</sup>, waren aber mit denen der anderen KEM vergleichbar. Ein deutlicher Vorteil durch die Beschichtung mittels einer Peptidkette konnte nicht gezeigt werden.

In der Auswertung der qCTs wiesen die Messungen von PepGen P-15<sup>®</sup> sehr hohe Dichtewerte auf. Die Ergebnisse für das KEM lagen oberhalb des ebenfalls sehr dichten, ortsständigen Knochens. Auffällig war die Kompaktheit und große Menge des eingebrachten Materials. Ein Abfall der Dichtewerte nach 16 Wochen lässt sich mit einhergehender Resorption des Materials erklären. Eine langsame Resorption des KEM konnte auch in anderen Untersuchungen beobachtet werden<sup>117,118</sup>.

Das Hydroxylapatit PepGen P-15<sup>®</sup> zeigte eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Einlagerung der applizierten Fluoreszenzmarker. Lediglich die nach 16 Wochen bestimmten Werte lagen un-

ter denen des autogenen Knochens. Das verwendete KEM schien gut inkorporiert zu sein. Auffällig war die Knochenregeneration auch innerhalb des Materials. So erfolgte die Einlagerung der applizierte Fluoreszenzmarker nicht nur an der Oberfläche, sondern auch innerhalb der Granula. Ähnliche Beobachtungen machten Degidi<sup>118</sup> und Scarano<sup>117</sup>.

Die in der vorliegenden Untersuchung mikroradiographisch beobachtete Knochenneubildung bei PepGen P-15<sup>®</sup> sowie die in der polychromen Sequenzmarkierung gezeigten Verknöcherungen werden durch diese klinischen Studien bestätigt.

Weiterhin wurden in unserer Untersuchung auch alloplastische Trikalziumphosphate untersucht (Cerasorb<sup>®</sup>).

Bei dem alloplastischen KEM Cerasorb<sup>®</sup> handelt es sich um ein  $\beta$ - Trikalziumphosphat.

Die *in-vivo* mikroradiographisch ermittelte Knochenneubildung für Cerasorb<sup>®</sup> zeigte über den gesamten Zeitraum gleich bleibende Ergebnisse. Im Vergleich zu denen nach 4 Wochen ermittelten Werten kam es im Folgenden nicht zu einer weiteren Zunahme der Knochenmenge, so dass die nach 16 Wochen bestimmten Werte hinter denen der anderen beobachteten Materialien zurückblieben.

In den Mikroradiographien nach 16 Wochen fiel eine deutliche Resorption des KEM auf. Ein Nachweis der Granula war zwar noch zweifelsfrei möglich, ihre ursprünglich sphärische Form und die gleichmäßige Dichte des Materials waren allerdings aufgehoben.

In der computertomographischen Analyse von Cerasorb<sup>®</sup> konnten insbesondere zentral im eingebrachten KEM Bereiche deutlicher Knochenbildung nachgewiesen werden. In den qCT-Untersuchungen bestätigten sich auch die bereits postulierten Resorptionsprozesse. Zum Ende des 16-wöchigen Beobachtungszeitraumes kam es zu einer Dichteminderung des Materials.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass es sich bei dem synthetisch hergestelltem  $\beta$ -Trikalziumphosphat Cerasorb<sup>®</sup> um ein KEM handelt, welches die Knochenneubildung fördert und gleichzeitig resorbierbar ist. Zu dieser Feststellung kamen unter anderen auch Hossain et al.<sup>124</sup>, Szabo et al.<sup>125</sup> und Merten et al.<sup>123</sup> Letzterer attestierte Trikalziumphosphaten eine gute Resorption und Biodegradierbarkeit. Für das  $\alpha$ - Trikalziumphosphat Bio-Base<sup>®</sup> ermittelten sie einen langsameren Abbau der Granula als für das  $\beta$ - Trikalziumphosphat Cerasorb<sup>®</sup><sup>126</sup>.

Der Abbau der Granula erfolgt mittels chemischer Auflösung und Phagozytose durch mehrkernige Riesenzellen. Die in unseren Versuchen beobachtete Resorption des Trikalziumphosphates Cerasorb<sup>®</sup> verlief komplikationslos und ohne nachweisbare Infektionszeichen. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Transplantatlager kann bei dieser Art des KEM von einer guten Platzhalterfunk-

tion mit osteoinduktiver Wirkung ausgegangen werden. Eine ungehinderte Differenzierung eingewanderter osteogener Zellen ist wahrscheinlich. Bei der Kokultivierung von Knochenmarksstammzellen mit Cerasorb<sup>®</sup> konnten Kotobuki et al.<sup>127</sup> eine die osteogene Differenzierung fördernde Wirkung des  $\beta$ -Trikalziumphosphats nachweisen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Weinand et al.<sup>128</sup> Sie konnten eine Knochenbildung, ausgehend von Knochenmarksstammzellen, die in dreidimensionalen Cerasorb<sup>®</sup>-Trägern kultiviert worden waren, zeigen.

In der *Point-Count*-Untersuchung kam es zu keiner definierten Anfärbung des Materials oder seiner Umgebung. Eine Einlagerung der Marker in das eingebrachte KEM blieb nahezu vollständig aus. Im ortsständigen Knochen der fazialen Kieferhöhlenwand hingegen erfolgte eine regelgerechte Bandenbildung. Die applizierten Fluorochrome wurden demnach resorbiert und entsprechend ihrer Eigenschaften in kalzifizierende Gewebe in der weiteren Umgebung um das KEM eingebaut. Eine mangelnde Resorption und Einlagerung oder Fehlinjektion der Marker kann somit ausgeschlossen werden. In der Antwort blieb das *Point-Counting* für Cerasorb<sup>®</sup> unberücksichtigt. Eine Ursache der ungenügenden Anfärbung scheint nicht klar, zumal das Verfahren als etabliert gilt und erfolgreich in den oben zitierten Studien von Merten und Wildfang in Gegenwart von Cerasorb<sup>®</sup> durchgeführt wurde. Die Argumentation einer fehlenden Kalzifizierung und damit mangelnder Einlagerung der Fluorochrome scheint, in Anbetracht der übrigen Untersuchungsergebnisse, insbesondere auch des guten klinischen Eindrucks des Materials, für Cerasorb<sup>®</sup> fraglich. Ein weiteres untersuchtes alloplastisches Material ist die Glaskeramik Biogran<sup>®</sup>.

Die für das biodegradierbare Glas Biogran<sup>®</sup> *in-vivo* bestimmte Knochenneubildung zeigte zu den Beobachtungszeiträumen 4, 8, und 12 Wochen die schlechtesten Werte. Alle in der Studie betrachteten KEM und insbesondere die autogenen Transplantate wiesen anfänglich eine höhere Neubildung an Knochen auf. Nach 16 Wochen Einheilzeit kam es aber zu einem deutlichen Anstieg der mikroradiographisch ermittelten Knochenneubildung. Im Vergleich zu den anderen Knochenersatzmaterialien lagen die Werte über denen von Cerasorb<sup>®</sup> und PepGen P-15<sup>®</sup>, aber unter dem Niveau von Bio-Oss<sup>®</sup>.

Die in der quantitativen Computertomographie bestimmte Knochendichte lag deutlich unter den Werten des ortsständigen Knochens.

Trotz eines Anstieges zwischen 12 und 16 Wochen wies, im Vergleich zu den übrigen KEM, das bioaktive Glas die geringsten Dichtewerte des mesenchymalen Knochens auf.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der quantitativen Computertomographie sollte jedoch in Betracht gezogen werden, dass bei unseren Messungen das eingebrachte Material grundsätzlich

mit in die ROI und damit in die Messung einbezogen wurde. Die Eigendichte des KEM wurde folglich ebenfalls teilweise evaluiert. Legt man für ein Bioglas materialspezifisch geringe Werte zugrunde, bedeutet dies im Umkehrschluss eine deutliche Zunahme der Knochendichte zwischen 12 und 16 Wochen.

In der *Point-Count*-Untersuchung bestätigte sich dieses Bild. Der isolierte Werteeinbruch für den ersten applizierten Marker (Xylenolorange) in der 8- Wochen- Gruppe ist höchstwahrscheinlich auf eine fehlerhafte Applikation oder Resorption zurückzuführen, da die Einfärbung im ortsständigen Knochen ebenfalls relativ gering ausfiel.

Die Ergebnisse einer von Al Ruhaimi et al.<sup>132</sup> an Neuseeland- Kaninchen durchgeführten Untersuchung stimmen mit unseren Beobachtungen überein. Sie verwiesen sowohl auf die Knochenneubildung um das KEM *in-vivo* als auch auf die Biodegradierbarkeit des Materials. Dies konnten Al Ruhaimi et al. nach Knochenneubildung durch Verminderung des Anteils an KEM nachweisen.

Die Verwendung von autogenem Knochen als Material der ersten Wahl bestätigte sich auch in der vorliegenden *in vivo*- Untersuchung. Die durchgeführten Versuche wiesen die besten Ergebnisse für das autogene Material bezüglich der Inkorporation und Knochenneubildung auf. Eine Unterscheidung zwischen eingebrachtem autogenem Transplantat der Referenzgruppe und ortsständigem Knochen war, in den nach 12 Wochen erhobenen Dichtemessungen mittels quantitativer Computertomographie, nicht mehr vollständig möglich. In der Auswertung der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie war eine sichere Differenzierung zwischen ortsständigen und transplantierten Knochen ebenfalls nicht mehr vollständig möglich. Diese Feststellung wird durch andere Studien unterstützt<sup>27, 29, 135</sup>. Der eingebrachte autogene Knochen zeigt sich in diesen Studien bestens integriert und funktionell hochwertig.

Problematisch erscheint allerdings die hohe Atrophie bzw. Resorption des autogenen Knochens, insbesondere des Spongiosatransplantates.

So zeigte sich in der quantitativen Computertomographie zwischen 12 und 16 Wochen eine deutliche Volumenabnahme des transplantierten autogenen Knochens am Kieferhöhlenboden. Die verbleibende Knochenmenge der eingebrachten Spongiosa lag unter denen der Kortikospongiosa und zeigte demnach einen höheren Substanzverlust nach längerer Beobachtung. Solche resorptiven Vorgänge des autogenen Knochens sind bekannt<sup>135</sup>. Die hohe Porosität der eingebrachten Spongiosa bedingt eine schnelle Vaskularisation. Die damit einhergehende Einwanderung von osteoklastären Zellen erklärt die zügige Resorption des Materials. Die langsamere Atrophie der eingebrachten Kortikospongiosa konnte bereits in anderen Untersuchungen bewiesen werden<sup>26</sup>.

Dies kann an einer besseren Resistenz der kortikalen Knochenanteile gegenüber Resorptionsvorgängen liegen. Fraglich bleibt, ob die mechanische Belastung im Sinus maxillaris des Schafes ausreicht, um eine Inaktivitätsatrophie des Transplantatkochens mit übermäßiger Abnahme der Knochenmenge zu verhindern. Eine zu geringe Krafteinwirkung auf den Knochen könnte eine nochmals forcierte Resorption erklären.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war der Vergleich von autogenen spongiösen und kortikospongiösen Knochentransplantaten mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien (KEM) *in-vitro* - an osteoblastären Zellen - und *in-vivo* - beim Sinuslift am Schafmodell.

In den Zellkulturversuchen zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Zellen für die verwendeten Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite (Bio-Oss<sup>®</sup>, Aligipore<sup>®</sup>). Die besten Ergebnisse zeigten sich in Gegenwart des bioaktiven Glases Biogran<sup>®</sup>, der demineralisierten allogenen Knochenmatrix (Grafton<sup>®</sup>) und des  $\beta$ -Trikalzium-Phosphates (Cerasorb<sup>®</sup>). Im Vergleich mit den übrigen KEM blieben die Resultate für das  $\alpha$ -Trikalziumphosphat (Biobase<sup>®</sup>) hinter der demineralisierten Knochenmatrix Grafton<sup>®</sup> und den bioaktiven Gläsern und Osteograft<sup>®</sup>/N zurück. Ein Vorteil der zellbindenden Eigenschaften der synthetisch hergestellten Peptidkette des PepGen P-15<sup>®</sup> (Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit) hinsichtlich Zellproliferation und – differenzierung der osteoblastären Zellen war nicht eindeutig erkennbar.

Alle von uns untersuchten autogenen Transplantate und KEM zeigten am Schafmodell eine klinisch gute Inkorporation. Es kam zu keinerlei Infektionen oder Abstoßungen des eingebrachten Materials. Die eingebrachten KEM heilten komplikationslos ein und waren alle in der Lage supportiv auf die Knochenneubildung einzuwirken.

Die Verwendung autogenen Knochens als Goldstandard im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Fachgebiet konnten wir in unserer Untersuchung bestätigen. Der transplantierte spongiöse und kortikospongiöse Knochen zeigte die besten Ergebnisse und konnte nach 12 Wochen nicht mehr eindeutig vom ortsständigen Knochen unterschieden werden. Allerdings war eine Atrophie, vor allem der Spongiosatransplantate nach 16 Wochen zu beobachten. Die eingebrachten autogenen Transplantate erzielten quantitativ und qualitativ die beste Knochenneubildung. Die höheren Knochenneubildungswerte bei gleichzeitig geringerer Atrophie sprechen für eine bessere biomechanische Adaptation des autogenen, kortikospongiösen Transplantates.

Eine Diskrepanz der Ergebnisse zwischen dem *in-vitro*- und *in-vivo*- Versuchsteil konnte für das KEM PepGen P-15<sup>®</sup> (Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit) beobachtet werden, begründet durch die Heterogenität des Zellgemisches. Im Vergleich zu den anderen verwendeten KEM lagen die für dieses Hoch-Temperatur-Hydroxylapatit tierexperimentell ermittelten Werte auf vergleichbarem Niveau. Im Tierversuch konnte Cerasorb<sup>®</sup> ( $\beta$ -Trikalzium-Phosphate) eine deutliche Knochenneubildung bei gleichzeitiger Resorbierbarkeit attestiert werden. Tierexperimentell lagen die für das  $\beta$ -Trikalzium-Phosphat (Cerasorb<sup>®</sup>) ermittelten Werte über denen des bioaktiven Glases

(Biogran<sup>®</sup>), aber hinter denen für Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatite (Bio-Oss<sup>®</sup>), welches die besten Ergebnisse auswies. Unter den verwendeten Knochenersatzmaterialien zeigen sich das Niedrig-Temperatur-Hydroxylapatit Bio-Oss<sup>®</sup> im Tierversuch als das erfolgreichste. Bio-Oss<sup>®</sup> zeigte keine Tendenz zur Biodegradierbarkeit. Die deutliche Diskrepanz zwischen dem *in-vitro* und *in-vivo* Teil der Versuche wurde explizit für dieses KEM beschrieben und ist durch das im Tierversuch breitere Zellspektrum zu erklären. Die Ergebnisse unserer Untersuchung bekräftigen den klinisch verbreiteten und weitestgehend komplikationslosen Einsatz von Bio-Oss<sup>®</sup>.

## 6 Literatur

1. Nkenke E, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Winkler G, Neukam FW. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* Oct 2002;13(5):514-521.
2. Jakse N, Seibert FJ, Lorenzoni M, Eskici A, Pertl C. A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting. *Clin Oral Implants Res.* Oct 2001;12(5):488-494.
3. Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* Oct 2001;12(5):495-502.
4. Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, et al. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Mar 2004;33(2):157-163.
5. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-195.
6. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br.* Aug 1989;71(4):677-680.
7. Reddi AH. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* Oct 1994;4(5):737-744.
8. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am.* Apr 1987;18(2):207-212.
9. Schenk RK, Willenegger HR. [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. *Unfallheilkunde.* May 1977;80(5):155-160.
10. Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am.* Aug 1988;70(7):1067-1081.
11. Johner R. [Dependence of bone healing on defect size]. *Helv Chir Acta.* May 1972;39(1):409-411.
12. Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, et al. The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation. *Connect Tissue Res.* 1989;20(1-4):3-13.
13. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* Jun 1990;143(3):420-430.
14. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology.* Mar 1991;128(3):1496-1504.
15. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res.* Nov 1999;14(11):1926-1933.
16. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev.* Aug 1996;17(4):333-368.
17. Golub EE. Enzymes in mineralizing systems: state of the art. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):183-188.
18. Gheron Robey P. The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Dec 1989;18(4):858-902.
19. Hulmes DJ. The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem.* 1992;27:49-67.
20. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int.* Jun 1994;18(6):617-628.
21. McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A. High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec.* Dec 1992;234(4):479-492.
22. Votta BJ, White JR, Dodds RA, et al. CKbeta-8 [CCL23], a novel CC chemokine, is chemotactic for human osteoclast precursors and is expressed in bone tissues. *J Cell Physiol.* May 2000;183(2):196-207.

23. McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci.* Apr 21 1995;760:177-189.
24. Zohar R, Cheifetz S, McCulloch CA, Sodek J. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur J Oral Sci.* Jan 1998;106 Suppl 1:401-407.
25. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:375-413.
26. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res.* Dec 1987(225):7-16.
27. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* Feb 2000(371):10-27.
28. Rueger JM. [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade.* Feb 1998;27(2):72-79.
29. Sailer HF, Weber FE. [Bone substitutes]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* May 2000;4 Suppl 1:S384-391.
30. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* Sep 1976;58(6):854-858.
31. Kubler NR. [Osteoinduction and -reparation]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* Feb 1997;1(1):2-25.
32. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* Nov 12 1965;150(698):893-899.
33. Nogami H, Urist MR. Transmembrane bone matrix gelatin-induced differentiation of bone. *Calcif Tissue Res.* Dec 18 1975;19(2):153-163.
34. Damien CJ, Parsons JR, Prewett AB, Rietveld DC, Zimmerman MC. Investigation of an organic delivery system for demineralized bone matrix in a delayed-healing cranial defect model. *J Biomed Mater Res.* May 1994;28(5):553-561.
35. Quintero G, Mellonig JT, Gambill VM, Pelleu GB, Jr. A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *J Periodontol.* Dec 1982;53(12):726-730.
36. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1973;70(12):3511-3515.
37. Urist MR. Chemosterilized antigen-extracted surface-demineralized autolysed allogeneic (AAA) bone for arthrodesis. In: Friedlaender GE, Mankin H, Sell KW, eds. Osteochondral allografts. Boston: Little, Brown & Co.; 1983:193-201.
38. Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Gotz H, Duschner H, Wagner W. [Determining the size of the specific surface of bone substitutes with gas adsorption]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* May 2000;4(3):148-152.
39. Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jan-Feb 2003;18(1):53-58.
40. van Meekeren J. *Heel-en geneeskonstige aanmerkingen. Posthumous publication.* Amsterdam; 1668.
41. Senn N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Amer J Med Sci.* 1889;98:219-243.
42. Bauermeister A, Maatz R. A method of bone maceration; results in animal experiments. *J Bone Joint Surg Am.* Jan 1957;39-A(1):153-166.
43. McMurray GN. The evaluation of Kiel bone in spinal fusions. *J Bone Joint Surg Br.* 1982;64(1):101-104.
44. goldSalama R. Xenogeneic bone grafting in humans. *Clin Orthop Relat Res.* Apr 1983(174):113-121.
45. Salama R, Gazit E. The antigenicity of Kiel bone in the human host. *J Bone Joint Surg Br.* May 1978;60-B(2):262-265.
46. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am.* Nov 1995;77(11):1742-1754.
47. Rüksamen-Waigmann H. Virussicherheit von Blutspendern und Knochen transplantaten. In: Schnettler R, Markgraf E, eds. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Stuttgart New York: Thieme, G.; 1997:1-7.
48. Gürtler L. Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochen transplantate. In: Schnettler R, Markgraf E, eds. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Stuttgart New York: Thieme, G.; 1997:8-11.

49. De Boer H. Early research on bone transplantation. In: Aebiund M, Regazzoni P, eds. Bone Transplantation. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 1998:7-19.
50. Ollier L. *Traite experimental et clinique de la regeneration des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Paris: V.M.e.Fils; 1867.
51. Axhausen C. Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Tierversuchen. *Langenbecks Arch Klin Chir*. 1908;88:23-145.
52. Schultz RC. Reconstruction of facial deformities using silicones and acrylics. In: Rubin LR, ed. Biomaterials in reconstructive surgery; 1983:437-473.
53. Amler MH, LeGeros RZ. Hard tissue replacement (HTR) polymer as an implant material. *J Biomed Mater Res*. Aug 1990;24(8):1079-1089.
54. Reck R. Bioactive glass-ceramics in ear surgery: animal studies and clinical results. *Laryngoscope*. Feb 1984;94(2 Pt 2 Suppl 33):1-54.
55. Heughebaert M, LeGeros RZ, Gineste M, Guilhem A, Bonel G. Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J Biomed Mater Res*. Dec 1988;22(3 Suppl):257-268.
56. Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol*. Sep 1992;63(9):729-735.
57. LeGeros RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res*. Aug 1988;2(1):164-180.
58. Cook SD, Kay JF, Thomas KA, Jarcho M. Interface mechanics and histology of titanium and hydroxylapatite-coated titanium for dental implant applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. Winter 1987;2(1):15-22.
59. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-integrated Prostheses, Osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence; 1985.
60. Wolfe MW, Cook SD. Use of osteoinductive implants in the treatment of bone defects. *Med Prog Technol*. 1994;20(3-4):155-168.
61. Urist MR. Bone transplants and implants. In: Urist MR, ed. Fundamental and clinical physiology of bone Philadelphia: JB LippincottCo; 1980:331-368.
62. Nentwig GH. [Preoperative planning of delayed care for individual tooth gaps using implants]. *Dtsch Zahnarztl Z*. Jul 1983;38(7):689-691.
63. Chanavaz M. Maxillary sinus: anatomy, physiology, surgery, and bone grafting related to implantology--eleven years of surgical experience (1979-1990). *J Oral Implantol*. 1990;16(3):199-209.
64. Kraut RA, Kessler HP, Holmes RE. Quantification of bone in dental implant sites after composite grafting of the mandible: report of a case. *Int J Oral Maxillofac Implants*. Summer 1989;4(2):153-158.
65. Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, et al. Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am*. Jan 1992;36(1):151-186; discussion 187-158.
66. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res*. Dec 1996;7(4):329-336.
67. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. Dec 1981;10(6):387-416.
68. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. Winter 1990;5(4):347-359.
69. van den Bergh JP, ten Bruggenkate CM, Krekeler G, Tuinzing DB. Sinusfloor elevation and grafting with autogenous iliac crest bone. *Clin Oral Implants Res*. Dec 1998;9(6):429-435.
70. Geiger SA, Pesch HJ. [Animal experimental studies on the healing around ceramic implantation in bone lesions in the maxillary sinus region]. *Dtsch Zahnarztl Z*. May 1977;32(5):396-399.
71. Tatum H, Jr. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am*. Apr 1986;30(2):207-229.
72. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg*. Aug 1980;38(8):613-616.

73. Smiler DG, Holmes RE. Sinus lift procedure using porous hydroxyapatite: a preliminary clinical report. *J Oral Implantol.* 1987;13(2):239-253.
74. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* Sep-Oct 1998;11(5):391-401.
75. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am.* Apr 1987;18(2):187-196.
76. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* Apr 1983(174):28-42.
77. Arzt T, Maschotowski J, Wimmer F, Schmidh K. Sinuselevation durch Osteogenese mittels eines osteoinduktiven Proteinkomplexes. *Z Zahnärztl Implantol.* 1996;12(3).
78. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Jun 1998;85(6):638-646.
79. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 1984;81(2):371-375.
80. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* Dec 16 1988;242(4885):1528-1534.
81. Capelli M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Jun 2003;23(3):277-285.
82. Davies JE. In-vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec.* Jun 1996;245(2):426-445.
83. Boeck-Neto RJ, Gabrielli M, Lia R, Marcantonio E, Shibli JA, Marcantonio E, Jr. Histomorphometrical analysis of bone formed after maxillary sinus floor augmentation by grafting with a combination of autogenous bone and demineralized freeze-dried bone allograft or hydroxyapatite. *J Periodontol.* Mar 2002;73(3):266-270.
84. Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowen M. Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem.* Jun 1994;42(6):733-744.
85. Mundlos S. Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog Histochem Cytochem.* 1994;28(3):1-47.
86. Schmidt R, Kulbe KD. Long-term cultivation of human osteoblasts. *Bone Miner.* Mar 1993;20(3):211-221.
87. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* Jan 1988(226):267-291.
88. Gerlach UV. *Induktion von Osteoporose beim Schaf - Tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Frakturbehandlung beim osteoporotischen Knochen* [Dissertation]. Giessen: Klink und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universität Giessen; 2002.
89. Pastoureau P, Meunier PJ, Delmas PD. Serum osteocalcin (bone Gla-protein), an index of bone growth in lambs. Comparison with age-related histomorphometric changes. *Bone.* 1991;12(3):143-149.
90. Turner AS, Villanueva AR. Histomorphometry of the iliac crest: 9-11 year old ewes. *Proc Vet Surg.* 1993;22:413.
91. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, et al. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther.* Sep 2006;13(17):1290-1299.
92. Jaworski ZFG. Haversian systems and Haversian bone. In: Hall BK, ed. *Bone.* Vol 4. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992:21-45.
93. Inui A, Itamoto K, Takuma T, et al. Age-related changes of bone mineral density and microarchitecture in miniature pigs. *J Vet Med Sci.* Jun 2004;66(6):599-609.
94. Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Oct 2001;30(5):373-379.
95. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In-vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol.* Apr 1999;26(4):239-245.
96. Oreffo RO, Driessens FC, Planell JA, Triffitt JT. Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells. *Tissue Eng.* Fall 1998;4(3):293-303.
97. Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol.* Aug 2000;71(8):1258-1269.

98. Huffman EWDJ, Keil RL. Determination of trace organic carbon and nitrogen in the presence of carbonates in anorganic bovine bone graft materials. *Microchemical J.* 2003;74:249-256.
99. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* Jun 2001;22(12):1599-1606.
100. Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol.* Sep 1999;70(9):1053-1063.
101. Heymann D, Delecrin J, Deschamps C, Gouin F, Padrines M, Passuti N. [In-vitro assessment of combining osteogenic cells with macroporous calcium-phosphate ceramics]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* Feb 1 2001;87(1):8-17.
102. Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, et al. Invitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Jul 2005;34(5):543-550.
103. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hubner U, Schmelzeisen R. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *J Mater Sci Mater Med.* Jan 2005;16(1):57-66.
104. Lumbikanonda N, Sammons R. Bone cell attachment to dental implants of different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Sep-Oct 2001;16(5):627-636.
105. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* Apr 2000;21(7):667-681.
106. Thorwarth M, Wehrhan F, Srouf S, et al. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *Br J Oral Maxillofac Surg.* Jan 2007;45(1):41-47.
107. Hallman M, Sennerby L, Lundgren S. 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. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Sep-Oct 2002;17(5):635-643.
108. Prevrhal S, Genant HK. [Quantitative computer tomography]. *Radiologe.* Mar 1999;39(3):194-202.
109. Stutzle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L. [Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]. *Orthopade.* Feb 1998;27(2):118-125.
110. Mohan S, Linkhart T, Farley J, Baylink D. Bone-derived factors active on bone cells. *Calcif Tissue Int.* 1984;36 Suppl 1:S139-145.
111. Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res.* Jul-Aug 1967;53:243-283.
112. Schlickewei W, Riede UN, Yu J, Ziechmann W, Kuner EH, Seubert B. Influence of humate on calcium hydroxyapatite implants. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1993;112(6):275-279.
113. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jan-Feb 1996;11(1):55-66.
114. Lorenzoni M, Pertl C, Keil C, Wegscheider WA. Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Sep-Oct 1998;13(5):639-646.
115. Proussaefs P, Lozada J, Rohrer MD. A clinical and histologic evaluation of a block onlay graft in conjunction with autogenous particulate and inorganic bovine mineral (Bio-Oss): a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Dec 2002;22(6):567-573.
116. Maiorana C, Beretta M, Salina S, Santoro F. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Feb 2005;25(1):19-25.
117. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, et al. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent.* Jun 2006;15(2):197-207.
118. Degidi M, Piattelli M, Scarano A, Iezzi G, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with a synthetic cell-binding peptide: histological and histomorphometrical results in humans. *J Oral Implantol.* 2004;30(6):376-383.
119. Carmagnola D, Berglundh T, Araujo M, Albrektsson T, Lindhe J. Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* Nov 2000;27(11):799-805.
120. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res.* Aug 1996;31(4):545-554.

121. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng.* Feb 1999;5(1):53-65.
122. Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* Feb 2003;23(1):69-77.
123. Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF. Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *J Craniofac Surg.* Jan 2001;12(1):59-68.
124. Hossain MZ, Kyomen S, Tanne K. Biologic responses of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate ceramics transplanted into bone defects to orthodontic forces. *Cleft Palate Craniofac J.* Jul 1996;33(4):277-283.
125. Szabo G, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Nemeth Z. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Sep-Oct 2001;16(5):681-692.
126. Merten HA, Wiltfang J, Honig JF, Funke M, Luhr HG. [Intra-individual comparison of alpha- and beta-TCP ceramics in an animal experiment]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* Sep 2000;4 Suppl 2:S509-515.
127. Kotobuki N, Kawagoe D, Nomura D, et al. Observation and quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured in-vitro on newly formed transparent beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* Jan 2006;17(1):33-41.
128. Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, et al. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone.* Apr 2006;38(4):555-563.
129. Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent.* Fall 1993;2(3):151-156.
130. Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil.* Sep 1991;18(5):439-452.
131. Valimaki VV, Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg.* 2006;95(2):95-102.
132. Al Ruhaimi KA. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jan-Feb 2001;16(1):105-114.
133. Gebhart M, Lane J. A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. *Acta Orthop Belg.* 1991;57(2):130-143.
134. Bostrom MP, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarlo E, Lane JM. An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine.* Jul 1 2001;26(13):1425-1428.
135. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Jan-Feb 1999;14(1):72-76.
136. Jager M, Fischer J, Schultheis A, Lensing-Hohn S, Krauspe R. Extensive H(+) release by bone substitutes affects biocompatibility in-vitro testing. *J Biomed Mater Res A.* Feb 2006;76(2):310-322.

## **Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Kübler, Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und Priv.- Doz. Dr. Dr. Reuther, Leitender Oberarzt der Klinik, für die Überlassung dieses Themas, für die jederzeit hervorragende fachliche und menschliche Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Fischer, Leiter des Institutes für experimentelle Medizin der Universität zu Köln, danke ich für die stets gute und freudige Zusammenarbeit im Rahmen der tierexperimentellen Untersuchungen. Prof. Dr. Bloch, Leiter des Institutes für Sportphysiologie der deutschen Sporthochschule Köln, gebührt mein Dank für viele Anregungen bezüglich der Auswertung und die Nutzung technischer Ausstattungen seines Institutes. Herrn Prof. Prof. (hc) Dr. Koepke, Leiter des anatomischen Institutes der Universität zu Köln, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die fachliche, wie technische Unterstützung. Zu weiterem Dank bin ich Frau Salmon, MTA der Zahnklinik der Universität zu Köln, verpflichtet. Besonders möchte ich mich bei Frau Knivka, MTA des anatomischen Institutes der Universität zu Köln, für eine kompetente, engagierte und stets nette Zusammenarbeit bedanken. Weiterer Dank gebührt meinen Mitdoktoranden Annika Stolke und Hannah Reiter für eine schöne und konstruktive Zeit und Zusammenarbeit.

Meinem Onkel Dr. phil. Ralph Glodeck, seiner Frau Alexandra und meinem Patenkind Julia danke ich für konstruktive Unterstützung in der Entstehung dieser Arbeit.

Meinen Freunden Dipl.-Math. Florian Wittke und Lars Floßdorf danke ich für die Beratung bezüglich der statistischen Auswertung und für die unendliche große Unterstützung, die sie mir in auch noch so schwierigen Situationen gegeben haben. Dipl.-Ing. (FH) Roland Oerder habe ich die beste Korrektur aller Zeiten zu verdanken. Andrea, Sunny und Klaus Linz danke ich, dass sie so sind wie sie sind.

Zu meiner Person

Christian Linz

geboren am 29. August 1979, in Solingen

1990 – 1999

**Abitur**, Landrat- Lucas- Gymnasium, Leverkusen

August 1999 – Juli 2000

**Zivildienst**, Rettungs- und Notarzdienst der Stadt Leverkusen

- Qualifikation bis zum Rettungssanitäter

2000 – 2002

**Berufsausbildung zum Rettungsassistenten** (Staatsexamen)

- Parallel zu Zivildienst bzw. Studium.

April 2001 – Juni 2007

**Studium der Humanmedizin**, Universität zu Köln

- Approbation als Arzt August 2008

Seit dem WS 07 /08

**Studium der Zahnmedizin**, Julius- Maximilians- Universität Würzburg

Seit August 2008

**Wissenschaftlicher Mitarbeiter** der ZMK-Klinik, MKG-Chirurgie,  
Direktor Prof. Dr. Dr. Kübler

---