

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie
Direktor:
Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. K. K. H. Gundlach MSD, FDSRCS

Funktionsbereich Experimentelle Forschung
ehemaliger Leiter: Prof. Dr. Dr. V. Bienengräber

In-Vivo-Testung ungesinterter, nanokristalliner Knochenaufbaumaterialien auf Hydroxylapatit-Basis bei der Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe

- Eine vergleichende tierexperimentelle Kurzzeitstudie am Miniaturschwein -

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von: Juliane Albrecht
geboren am: 28.08.1981 in Templin
aus: Bremen

Rostock 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Dr. med. dent. V. Bienengräber
2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Th. Mittlmeier
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med dent. H. Pistner

Annahme der Promotion am: 15.12.2008

Promotionsverteidigung am: 04.03.2009

I. <u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. <u>Einleitung und Zielsetzung</u>	6
2. <u>Literaturübersicht</u>	8
2.1 Knochengewebe - anatomische Grundlagen	8
2.2 Knochenregeneration und –umbau	9
2.2.1 natürliche Knochenheilung	9
2.2.2 Knochenumbau (Remodelling)	11
2.2.3 Integration von Biomaterialien	12
2.2.4 Abbau von Knochenersatzmaterialien (Biodegradation)	14
2.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	15
2.4 Einteilung und Eigenschaften von Knochentransplantaten und Knochenersatzmaterialien	17
2.4.1 Knochentransplantate	19
2.4.2 Knochenersatzmaterialien (KEM)	21
3. <u>Materialien und Methode</u>	27
3.1 Getestete Knochenaufbaumaterialien	27
3.1.1 Ostim® (Heraeus-Kulzer)	27
3.1.2 NanoBone® (Artoss)	29
3.1.3 Vergleichende Betrachtung der Eigenschaften beider KAM	33
3.2 Versuchstiere und Versuchsdurchführung	36
3.2.1 Versuchstiere	36
3.2.2 Versuchsdurchführung	36
3.2.3 Operationsverlauf	37
3.2.4 Präparategewinnung	38

3.3 Klinische und röntgenologische Untersuchungen	39
3.3.1 Klinische Untersuchung	39
3.3.2 Röntgenologische Untersuchungen	39
3.4 Histologische Untersuchungen	41
3.4.1. Anfertigung der Präparate	41
3.4.2. Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung	42
3.4.3. Histomorphometrie	43
3.5 Statistische Auswertung	46
4. <u>Ergebnisse</u>	47
4.1. Makroskopische Ergebnisse	47
<u>4.2. Röntgenologische Ergebnisse</u>	49
<u>4.3. Mikroskopische Ergebnisse</u>	54
4.3.1. Qualitative Histologische Ergebnisse	54
4.3.2. Semiquantitative histologische Ergebnisse	58
4.3.2.1 Befunde der Gruppe N (Ostim®)	59
4.3.2.2 Befunde der Gruppe P (NanoBone®)	62
4.3.2.3 Vergleich zwischen den Versuchsgruppen N und P (Ostim® und NanoBone®)	66
4.3.3. Histomorphometrische Ergebnisse	68
4.3.3.1 Biomaterial	71
4.3.3.2 Bindegewebe	73
4.3.3.3 Erweiterter Markraum	74
4.3.3.4 Vakanzen	75
4.3.3.5 Artefakte	76
4.3.3.6 Restdefekte	77
4.3.3.7 Knochenbildung	79

4.3.3.8 Zusammenfassender histomorphometrischer Vergleich beider Versuchsgruppen	83
5. <u>Diskussion</u>	85
5.1 Kritische Wertung der Ergebnisse	85
5.2 Vergleich der getesteten Knochenaufbaumaterialien (KAM) mit einem xenogenen KAM	87
5.3 Schlussfolgerungen und Literaturvergleich	93
6. <u>Zusammenfassung</u>	98
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	101
8. <u>Danksagung</u>	117
9. <u>Eidesstattliche Erklärung</u>	118
10. <u>Lebenslauf</u>	119
11. <u>Thesen zur Dissertationsschrift</u>	120
II. <u>Abbildungsverzeichnis</u>	125
III. <u>Tabellenverzeichnis</u>	131
IV. <u>Abkürzungen</u>	133
V. <u>Anhang</u>	134

1. Einleitung und Zielsetzung

Eine relative Indikation zur Transplantation von Knochen bzw. Implantation von Knochenersatzmaterialien (KEM) stellt sich bei allen Erkrankungen und Verletzungen im Mund- Kiefer und Gesichtsbereich, die mit ossären Defekten $> 1\text{cm}^3$ einhergehen (PARTSCH, 1910). Hier soll eine Beschleunigung der Reossifikation bewirkt werden. Bei der Rekonstruktion großer, nicht spontan ausheilender Knochendefekte (sogenannter Critical-Size-Defekte), deren Größe spezie- und altersspezifisch ist, ist eine absolute Indikation zur plastischen Rekonstruktion mit autologem Knochen oder einem KEM gegeben.

Die Verwendung von autologem Knochen wird zurzeit noch als der Goldstandard angesehen (BUSER und SCHENK, 1995; KOHAL, 1997). Neben zahlreichen Vorteilen birgt diese Methode jedoch u. a. die Nachteile eines Zweiteingriffs mit möglichen Komplikationen und der z. T. mangelnden Verfügbarkeit des Materials in sich. Aus diesen Gründen versucht man seit Jahren Biomaterialien zu entwickeln, deren physikalische, chemische und mechanische Eigenschaften denen des natürlichen Knochens möglichst nahe kommen und welche auf den jeweiligen medizinischen Verwendungszweck zugeschnitten sind.

Bereits im Jahre 1668 wurde von dem holländischen Chirurgen VAN MEKEEREN die erste erfolgreiche Schädeldachplastik durchgeführt, indem er Hundeknochen in einen menschlichen Kalottendefekt implantierte (KÜBLER 1997). Da die Verwendung von xenogenem KEM tierischer Herkunft, wie auch allogener KEM von menschlichen Spendern aufgrund immunologischer und infektiologischer Risiken problematisch ist (HÖNIG et al. 1999), gelangen heute deutlich verbesserte synthetische KEM vermehrt zur klinischen Anwendung, deren Entwicklung bereits vor mehr als einem Jahrhundert begann.

Diese sogenannten alloplastischen Materialien können sowohl vollsynthetisch hergestellt, als auch teilsynthetisch, z.B. durch Extraktion aus tierischem Knochen oder Algen, gewonnen werden. Zu den synthetischen KEM gehören Kalziumphosphate (CP), welche als Hydroxylapatite (HA), Tricalciumphosphate (TCP) sowie Biogläser verfügbar sind. Die herkömmlichen KEM auf CP-Basis werden bei $1100\text{-}1500^\circ\text{C}$ im Sinterverfahren hergestellt (BAUER et al. 1992); man spricht auch von CP-Sinterkeramiken. Sie sind vom Organismus schwer abbaubar, Teile können oft zeitlebens als Restpartikel im Knochen nachgewiesen werden (PIE-SOLD et al. 2004).

An der Universität Rostock beschäftigt sich eine interdisziplinäre Forschungsgruppe von Mitarbeitern des Fachbereiches Physik und der Medizinischen Fakultät mit der Entwicklung optimierter KEM auf HA-Basis. Es handelt sich um eine innovativ im Sol-Gel-Verfahren hergestellte, nanokristalline, hochporöse Kieselgel(SiO_2)-Hydroxylapatit-Matrix (GERBER et al. 2000). Diese besitzt nicht nur eine gute osteokonduktive Wirkung, sondern regt zudem die Knochenneubildung an und wird angepasst im Rahmen des physiologischen Knochenumbaus (Remodelling) biodegradiert, wie vorangegangene Studien belegen (ABDO 2003). Somit ist die zu testende SiO_2 -HA-Matrix kein KEM im herkömmlichen Sinne, sondern sollte aufgrund ihrer, die Knochenregeneration fördernden Wirkung als Knochenaufbaumaterialien (KAM) bezeichnet werden. Das wird durch ergänzende Untersuchungen an Miniaturschweinen bestätigt, bei denen durch dieses KAM im subkutanen Fettgewebe eine extraskelettale Knochenbildung induziert werden konnte (GERBER et al. 2006, BIENENGRÄBER et al. 2006).

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie ist es, dieses neu entwickelte KAM, welches unter dem Handelsnamen NanoBone® (Artoss, Rostock) als granuläres Xerogel verfügbar ist, mit einem anderen auf dem Markt erhältlichen, ebenfalls HA-basierten KAM zu vergleichen. Dabei handelt es sich um das nanopartikuläre hochdisperse HA-Hydrogel Ostim® (Heraeus-Kulzer, Hanau), welches in pastöser Applikationsform vorliegt.

Für die *in vivo* Testung sollen bei Göttinger Miniaturschweinen artifizielle Critical-Size-Defekte an der Mandibula gesetzt werden, in die anschließend alternierend NanoBone® bzw. Ostim® implantiert werden soll. Die Beurteilung der Ossifikation im Defektbereich soll nach 5wöchiger Kontrollzeit im Sinne einer Kurzzeitstudie erfolgen. Kriterien sind die Bestimmung des Ausmaßes und die Lokalisation neu gebildeten Knochens, sowie der prozentuale Anteil des Restdefektes bezogen auf die Ausgangsdefektgröße. Des Weiteren soll die Resorption bzw. Biodegradation der KAM im Defekt beurteilt werden. Die Auswertung der Untersuchungen soll sowohl klinisch als auch röntgenologisch erfolgen. Zudem ist eine umfassende histologische Auswertung unter Einschluss qualitativer, semiquantitativer und histomorphometrischer Methoden vorgesehen.

NanoBone® soll anhand der oben genannten Parameter mit Ostim® verglichen werden, wobei in der Diskussion auch Befunde anderer, von der Arbeitsgruppe getesteter Biomaterialien herangezogen werden sollen. Auf dieser Basis soll die Eignung der getesteten Materialien als KAM für die Rekonstruktion von knöchernen Defekten der Kiefer-Gesichtsregion eingeschätzt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Knochengewebe-anatomische Grundlagen

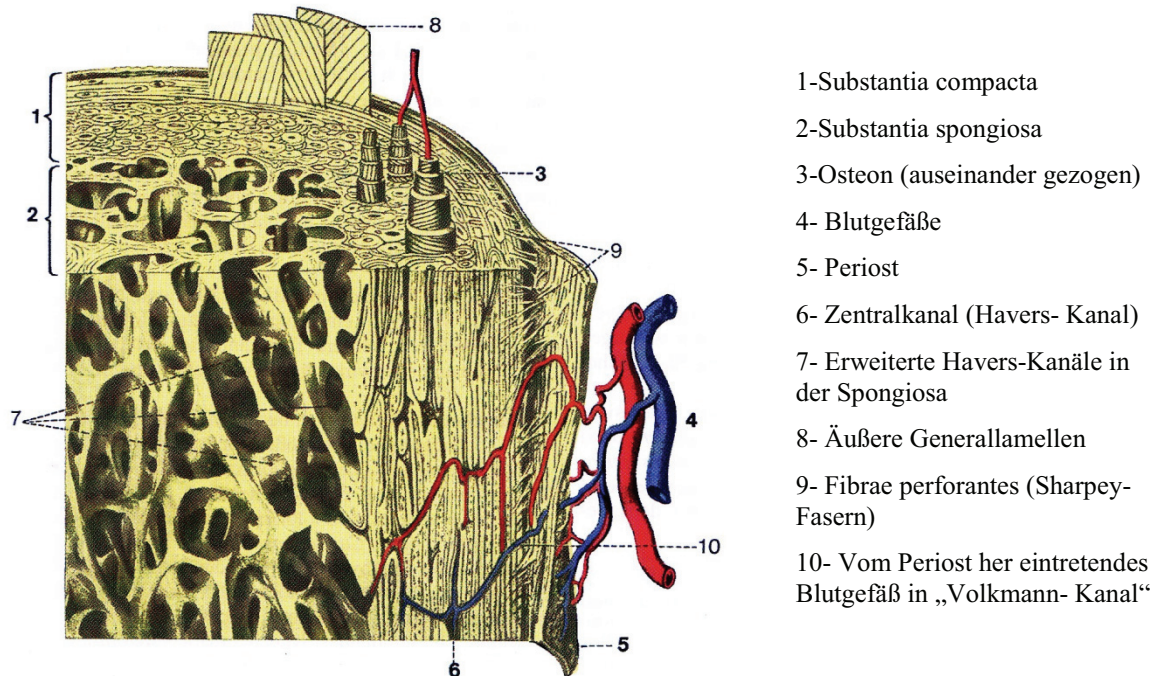


Abb. 1: Schematische Darstellung der Anatomie des Knochens, aus Lippert: Lehrbuch Anatomie (2000).
(nicht auf der Darstellung berücksichtigt ist das Endost, welches die innere Auskleidung des Markraumes von Röhrenknochen bildet)

Eine erfolgreiche Integration von KAM in den Heilungsprozess des Skelettsystems setzt ein grundlegendes Verständnis des anatomischen Knochenaufbaus (Abb. 1) sowie der ossären Reparations- und Umbauprozesse voraus. Der Knochen als am höchsten differenziertes mesenchymales Gewebe besitzt eine Stütz-, Schutz- und Speicherfunktion. Er setzt sich aus kompaktem und spongiösem Gewebe zusammen, ist äußerlich vom Periost bedeckt und innen in unterschiedlicher Ausprägung vom Endost ausgekleidet. Makroskopisch weist kompakter Knochen dichtes Gewebe auf, während im spongiösen Knochen ein Netz aus Knochenbälkchen vorherrscht. Das Periost mit seinen Kollagenfasern, Nerven, Blutgefäßen und zellulären Elementen hat nutritive Funktionen. Periostfibroblasten haben die Fähigkeit der Differenzierung zu knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten. Das Endost weist ähnliche Funktionen auf wie das Periost (SOOST 2000).

Für den histologischen Aufbau der ossären Kompakta ist die Gliederung in Einheiten, sog. Osteone, charakteristisch. Sie setzen sich aus einem Haverskanal mit Osteozyten, Arterien, Kapillaren, Venen und Nervenfasern zusammen, um den die Knochensubstanz in bis

zu 6 Schichten lamellenförmig angeordnet ist (LÖFFLER, PETRIDES, 1998). Es lassen sich 4 verschiedene Knochenzellentypen differenzieren: Aus Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) können sich knochenbildende Osteoblasten und typische Knochenzellen, sog. Osteozyten entwickeln. Zudem können sich mehrkernige Riesenzellen, sog. Osteoklasten differenzieren, die dem Knochenabbau dienen und im Zusammenwirken mit den Osteoblasten den Aufbau („molding“) und den permanenten physiologischen Umbau („remodelling“) des Knochens bewirken.

Die interzelluläre Substanz (Matrix oder Knochengrundsubstanz) setzt sich etwa zu 50% aus Mineralien, 25% aus organischen Verbindungen und 25% aus Hydratationswasser zusammen. Die mineralische Phase besteht hauptsächlich aus Phosphat (ca. 50%) und Kalzium (ca. 35%), der Rest besteht aus Citrat, Karbonat (6-7%), Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe. Unter dem organischen Material überwiegt das Kollagen (90-95%), Restbestandteile sind verschiedene Proteine (JUNQUEIRA, 1996).

2.2 Knochenregeneration und -umbau

Knochen ist ein Gewebe, welches zur kompletten Regeneration befähigt ist und sich im permanenten Umbau (Remodelling) befindet.

2.2.1 natürliche Knochenheilung

Jede Knochenverletzung (Fraktur, Defekt, Implantatinsertion usw.) verursacht initial eine Blutung aus eröffneten Gefäßen des Knochens insbesondere der Markräume und des Periosts sowie der umgebenden Weichteile. Zudem gehen Knochenzellen unter (Zellnekrosen) und Knochengrundsubstanz wird geschädigt, was wiederum eine lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Induktoren hervorruft.

In der frühen Gerinnungsphase werden zahlreiche Thrombozyten an der Wundoberfläche sowie an das Fibrinnetz des Koagulums gebunden. Sie aggregieren und setzen heilungsfördernde Faktoren wie PDGF (Platelet-derived Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor β) und Fibronectin frei (REDDI, 1998). Darüber hinaus werden weitere Blut- und Gewebszellen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten chemotaktisch in das Wundgebiet gelockt, die wiederum regenerationsfördernde Faktoren wie Prostaglandine und Interleukine produzieren (DEUEL et al. 1982, POSTLETHWAITE et al. 1987, WAHL et al. 1987). Diese Faktoren wirken auf eingewanderte mes-

enchymale Zellen, sowie auf Osteoprogenitorzellen des Knochenmarks, wodurch determinierte Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten differenzieren (BRIGHTON, HUNT 1991). Diese Faktoren induzieren bzw. steuern die für eine Knochenheilung essentiellen Prozesse, wie das Einwachsen von Blutgefäßen, Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Matrixsynthese und Immunreaktion (SCHENK 1991; 1994) und beeinflussen so in starkem Umfang Geschwindigkeit und Ausmaß der lokalen Knochenneubildung.

Grundsätzlich werden die primäre und die sekundäre Knochenbruchheilung voneinander unterschieden. Grundvoraussetzung für eine **primäre Knochenheilung** ist die interfragmentäre Ruhe. Zudem darf kein Spalt zwischen den Fragmenten vorhanden sein. Nur so kommt es zur *Kontaktheilung*, charakterisiert durch ein direktes Aussprossen von Blutgefäßen und Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten und -klasten. Es entstehen neue Osteone an den Bruchflächen, was zu einer schnellen knöchernen Überbrückung des Bruchspaltes führt (SCHENK 1963, 1977). Besteht nicht im Bereich der gesamten Bruchfläche Kontakt, kommt es zu einer von Endost und Periost ausgehenden *Spaltheilung*. Der Spalt wird mit aus Bindegewebe entstehendem Geflechtknochen ausgefüllt, welcher sich sekundär im Rahmen des Remodellings in einen belastungsausgerichteten Lamellenknochen umwandelt. Kontakt- und Spaltheilung sind Varianten der primären Knochenheilung, die parallel zueinander ablaufen können (SCHWENZER, EHRENFELD, 2002).

Von **sekundärer Knochenheilung** spricht man bei mangelnder interfragmentärer Ruhe und einer Spaltbreite oder Defektgröße $> 1\text{mm}$. Sie läuft nach SCHWENZER und EHRENFELD (2002) in 4 Phasen ab:

1. *Das Bruchspalthämatom (1.-7. Tag)* entsteht durch Einblutungen aus verletzten Gefäßen. Umliegendes Gefäßbindegewebe und Markräume des Knochens reagieren mit aktiver Hyperämie sowie flüssiger und zellulärer Exsudation.
2. *Der Granulationskallus (7.-14. Tag)* bildet sich durch das Einwandern von subperiostalen pluripotenten Mesenchymzellen in das Frakturhämatom. Diese differenzieren sich zu Osteoklasten, welche die nekrotischen Randzonen abbauen, wodurch der Bruchspalt resp. Defekt primär verbreitert erscheint. Durch eine entzündungsbedingte Azidose werden die ossären Randzonen zusätzlich demineralisiert, wobei herausgelöste Kalzium- und Phosphatsalze später für die Remineralisation genutzt werden.

3. *Der Fixationskallus (14.-21.Tag)* ist ein verdichteter Kallus, wodurch eine interfragmentäre Unruhe verhindert wird. Die Mineralisation in Form einer interfragmentären, enchondralen Ossifikation wird in den äußeren Teilbereichen von einer desmalen Knochenneubildung begleitet (EINHORN 1998).
4. Die Bildung von *Geflechtknochen* ist in der 4. Woche abgeschlossen. Es beginnt die Umwandlung in lamellären Knochen, dessen Trajektorien entsprechend den Druck- und Zugbelastungen transformiert werden.

2.2.2 Knochenumbau (Remodelling)

Bereits in der Endphase der sekundären Frakturheilung kommt es zum Remodelling, d.h. der Knochen wird den aktuellen Belastungsverhältnissen angepasst. Eine einmal gewonnene Bauweise bleibt nur solange erhalten, wie Zug-, Druck- und Scherkräfte gleich bleiben. Ändern sich diese kommt es zum erneuten Umbau des Knochens (JUNQUEIRA 1996). Hierbei führen Zugbelastungen zu Knochenanbau und Druck zu dessen Abbau.

Die aus organischen und anorganischen Komponenten bestehende Knochenmatrix wird durch die Aktivierung von Osteoklasten abgebaut, die u. a. lysosomale Proteinasen und saure Phosphatasen freisetzen. Wenn die Resorptionslakunen (Howship'sche Lakunen) eine Tiefe von 70 µm erreicht haben, kommt es zum programmierten Zelltod (Apoptose) der Osteoklasten. Diese übermitteln zuvor Signale an umgebende Osteoblasten, welche den Defekt durch Ablagerung von Kollagenen und Proteoglykanen mit anschließender Osteogenese wieder auffüllen. Auch Östrogene und TGF-β stimulieren die Osteoblasten. Zur Mineralisation werden Calcium und Phosphate von den Zellen akkumuliert, in Vesikel verpackt und ausgeschleust. An dieser Akkumulation ist Osteocalcin, ein im Knochen auftretendes Protein, beteiligt (LÖFFLER, PETRIDES 1998).

Von essentieller Bedeutung für physiologische und pathologische ossäre „Remodelling“-Vorgänge ist die Kalziumkonzentration im Blutplasma, wobei der Knochen das größte Kalziumreservoir des menschlichen Körpers (99 %) darstellt. Zusammen mit Phosphaten kommt es in der Knochengrundsubstanz zum Auskristallisieren in Form von HA. Aus noch weichem, neu gebildetem Knochen (Osteoid) wird dadurch fester Knochen (SCHWARZ, BECKER 2006).

Bei der Regulierung des Kalzium-Phosphat-Haushaltes spielen auch Hormone eine bedeutende Rolle. Das Parathormon entfaltet seine Wirkung an den Osteoklasten, indem es re-

zeptorvermittelt die Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und den Kalziumtransport der Zellen erhöht und somit den Knochenabbau fördert. Kalzitinin bewirkt, ebenfalls rezeptorvermittelt, die Senkung der cAMP-Produktion und die Verkleinerung der Osteoklasten, was den Knochenabbau bremst. Während der Frakturheilung fördern Prostaglandine die Kallusbildung und erhöhen die Umbaurate durch Stimulation der Kopplung von Osteoklasten und Osteoblasten (GRÜBER et al.1987). Vitamin D ist erforderlich um eine ausreichende Plasma-Kalzium-Konzentration aufrecht zu erhalten und eine suffiziente Mineralisation des Knochens zu gewährleisten. Dies geschieht über die Regulation der renalen Rückresorption sowie einer vermehrte Bildung von HA (SCHWARZ, BECKER 2006).

2.2.3 Integration von Biomaterialien

Als Biomaterialien werden Materialien bezeichnet, die in der Lage sind, mit biologischen Systemen zu agieren. OSBORN und NEWESLY (1980) unterteilen sie entsprechend ihrer biologischen Aktivität in biotolerant, bioinert und bioaktiv.

Biotolerante Implantate, wie z.B. Knochenzement und Chirurgenstahl, werden bindegewebig eingeschieden - man spricht von **Distanzosteogenese**. *Bioinerte* Implantate (Aluminiumoxid, Zirkoniumoxid, Implantate aus Kunststoff und Titan) besitzen auf ihrer Oberfläche eine stabile Oxidschicht. Im orthotopen Lager kommt es zur direkten Verbindung zwischen Implantat und Knochen in Form einer **Kontaktosteogenese**. Es bildet sich üblicherweise keine interponierende Bindegewebsschicht. Die direkte Verzahnung mit dem Knochen ermöglicht eine hohe mechanische Belastung. *Bioaktiv* sind die Mineralstruktur des Knochens nachahmende Kalziumphosphatkeramiken (wie Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Glaskeramiken), die im Organismus spezifische biologische Reaktionen auslösen. Durch Osteokonduktion (Leitschienenfunktion) entsteht eine chemische Bindung zwischen Implantat und Knochen (LE GEROS, 1988). Bioaktive Materialien können infolge positiver Interaktion mit lebenden Geweben u. a. eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu knochenbildenden Zellen bewirken (KOHAL et al. 2001). Dieses wird von OSBORN und NEWESLY (1980) als **Verbundosteogenese** bezeichnet.

Die knöcherne Regeneration unter der Verwendung von KAM stützt sich nach KÜBLER (1997, 1998) auf 3 verschiedenen Komponenten ab (Abb. 2):

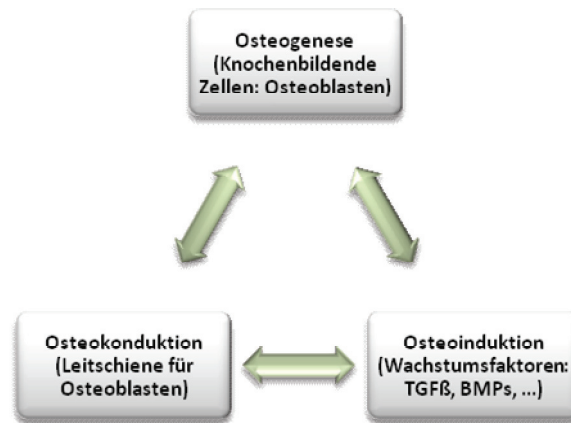


Abb.2: Komponenten der knöchernen Regeneration, aus Bienengraber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgelmatrix, 2007

Osteogenese

Eine *Osteogenese* erfolgt physiologischer Weise durch eine Stimulation der Proliferation ortsständiger knochenbildender Zellen, den Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen. Im Rahmen autogener Knochentransplantationen erfolgt eine Übertragung von Osteoblasten. Wenn dabei genügend Osteoblasten überleben, können diese proliferieren und die Knochenneubildung aktivieren bzw. beschleunigen.

Osteokonduktion

Bei der Osteokonduktion werden vorhandene ortständige Osteoblasten angeregt in ein hochporös strukturiertes KAM nach Art einer Leitschiene begleitet von Kollagenfasern und Gefäßen einzuwachsen (FEIFEL, 1996). Damit wird eine vom Lagergewebe ausgehende Knochenneubildung ohne vorhergehende vollständige Resorption erzielt. Bezüglich der Morphologie stellt dabei die natürliche Spongiosa die Idealstruktur dar (SCHENK, 1994).

Osteoinduktion

Neben den oben genannten Mechanismen der Osteogenese und der Osteokonduktion existiert noch eine weitere Komponente, die eine knöcherne Regeneration beschleunigt- die Osteoinduktion. Insbesondere von einer bestimmten Gruppe von Wachstumsfaktoren, den sogenannten „Bone Morphogenetic Proteins“(BMPs), geht eine solche osteoinduktive

Wirkung aus. Diese sind als nichtkollagene Bestandteile in der Knochenmatrix vorhanden und können in die Umgebung diffundieren (KÜBLER 1997; URIST 1989). Bei der Osteoinduktion stimuliert das Transplantat oder ein mit natürlichen oder synthetischen BMPs angereichertes KAM die Differenzierung von Stammzellen des Lagergewebes zu Osteoblasten. Das KAM dient hier zusätzlich als Leitstruktur und wirkt damit als osteokonduktiver Kofaktor (FRIESEN, 2006).

2.2.4 Abbau von Knochenersatzmaterialien (Biodegradation)

Der Abbau von in den Körper eingebrachten Implantaten unter In-vivo-Bedingungen wird als Biodegradation bezeichnet (DRAENERT et al. 2001).

Hierbei sollte die Geschwindigkeit der Resorption dem Umbau des Knochengewebes angeglichen sein, um einen vorzeitigen Verlust des Leitgerüsts durch zu schnellen Abbau oder seine zu lange Persistenz aufgrund schlechter Resorbierbarkeit und der daraus resultierenden Behinderung der Knochenregeneration zu vermeiden (GÜNTHER et al. 1998).

CP- Keramiken werden grundsätzlich auf 2 Wegen abgebaut:

1. durch chemische Lösung, da Kalzium- und Phosphationen sowie Hydrogen- und Dihydrogenphosphationen abhängig vom pH-Wert in wässrige Lösung gehen.
2. durch den Zerfall der Keramik, wobei diese zunächst in Einzelpartikel zerfällt, die anschließend durch phagozytäre Zellaktivität abtransportiert werden (ABDO 2003)

Das Degradationsverhalten ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

So wird die chemische Löslichkeit der CP-Keramiken unter anderem durch ihren Mineralbestand bestimmt. In Untersuchungen von ADAM, NEBELUNG und VOGT im Jahre 1988 wurde das Lösungsverhalten von verschiedenen Kalziumphosphaten nach 24-stündiger Behandlung mit Wasser (80°C) getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass Kalziumpolyphosphat ($(Ca(PO_3)_2)_n$) sich am besten löste. Beta-Trikalziumphosphat ($\beta-Ca_3(PO_4)_2$) und Alpha-Trikalziumphosphat ($\alpha-Ca_3(PO_4)_2$) zeigten ebenfalls ein gutes, aber protrahiertes Lösungsverhalten. Hydroxylapatit ($Ca_5(PO_4)_3OH$) löst sich nur im stark sauren Milieu, das in vivo normalerweise nicht vorkommt. Am niedrigsten war der prozentuale Anteil an gelöstem CP bei Tetrakalziumphosphat ($Ca_4(PO_4)_2O$).

Nach YAMADA et al. (1997) ist das Ausmaß der Resorption annähernd proportional zur Löslichkeit eines Biomaterials. Ein anzustrebender osteoklastärer Abbau wird insbesonde-

re durch die Zusammensetzung und Porosität der CP-Keramik beeinflusst (HEYMANN et al. 2001). Hierbei ist die Resorptionsrate der Oberfläche direkt proportional und hängt somit in erster Linie von der Mikro- bzw. Nanoporosität ab (DE GROOT 1988; KLAWITTER und HULBERT 1971). Die Makroporen oder intergranulären Hohlräume einschließende Gesamtporosität (siehe auch 2.3) sollte interkonnektierend sein, um das Einwachsen des Knochens in das KEM zu ermöglichen (KLAWITTER, HULBERT 1971; BOBYN et al. 1980).

2.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Knochendefekte, die eine lokalisationsabhängige kritische Größe überschreiten, können nicht spontan ausheilen (AABOE et al., 1995). Um die Kontinuität und die mechanische Belastbarkeit des Knochens aufrechtzuerhalten, müssen diese Defekte aufgefüllt werden. Dieses ist will man auf autologen Knochen verzichten - Hauptanwendungsgebiet von KEM. Da diese eine Platzhalterfunktion für den neu entstehenden Knochen besitzen, müssen sie eine entsprechende Primärstabilität haben. Außerdem sollten sie die Regeneration des Knochens fördern bzw. ihn möglichst vollwertig ersetzen. Daher sollten KEM dem Knochen am Implantationsort hinsichtlich seiner mechanischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften entsprechen.

Nach KATTHAGEN (1986) sind KEM Implantatmaterialien, die die Knochenbildung stimulieren, den körpereigenen Knochen nur vorübergehend ersetzen und sich im Verlauf der Knochenregeneration nach und nach auflösen, das heißt, sie sollten in dem Maß biodegradiert werden wie neuer Knochen entsteht (SAILER, WEBER 2000). KEM dürfen weder toxische, kanzerogene oder teratogene, noch anderweitige systemisch unerwünschte Wirkungen haben. Zudem sollten sie und ihre Degradationsprodukte im Sinne der Langzeitverträglichkeit biokompatibel sein, sowie eine Substratwirkung besitzen, d.h. ihre Abbauprodukte sollten für den knöchernen Wiederaufbau verwendet werden können.

Angestrebt werden sollte der Einsatz bei möglichst vielen Indikationen, bei denen heute noch autologer oder allogener Knochen verwendet wird. Moderne KAM sollten in der Lage sein, sich den individuellen Gegebenheiten des Lagergewebes anzupassen und es so zu konditionieren, dass die gewünschte schnelle Knochenregeneration einsetzt, die auf einem Wechselspiel zwischen dem eingebrachten KAM und dem bestehenden Lager beruht (RÜGER, 1992). Hierfür ist eine hohe Bioaktivität, d.h. ein guter Stoffaustausch zwischen Wirts- und Lagergewebe erforderlich (LINHART et al. 2004).

In der bereits 1911 erstellten Klassifikation von LEXER werden Knochenlager in 3 verschiedene Typen eingeteilt:

1. Das **ersatzunfähige Lager**, das keine eigene osteogene Potenz aufweist z.B. Narbengewebe oder strahlengeschädigter Knochen
2. Das **ersatzschwache Lager**, welches ungünstige Bedingungen aufweist für eine Knochenregeneration z.B. Implantationsorte außerhalb des Knochengewebes, mechanische Instabilität oder beeinträchtigte Vaskularisation des Knochens
3. Das **ersatzstarke Lager**, wobei es sich um Knochengewebe ohne oder mit vollständig kompensierten Vorschädigungen handelt (EITEL et al. 1980).

Hauptbedingungen für den Erfolg einer Transplantation oder Implantation ist die Fähigkeit des Lagers, das eingebrachte Material vaskulär zu erschließen (SCHWEIBERER et al. 1981) sowie die Potenz des KAM die Proliferation vitalen Gewebes auf der Oberfläche und möglichst auch ins Innere seiner Hohlräume zu ermöglichen und die knöcherne Integration zu fördern, d. h. osteokonduktiv zu wirken (KATTHAGEN 1986). Grundvoraussetzung für diese Osteokonduktivität ist das Vorhandensein von interkonnektierenden Poren verschiedener Größenordnungen, durch welche eine vergrößerte spezifische Oberfläche des KAM resultiert. Diese wiederum beeinflusst das In-Vivo-Verhalten, denn die initiale physikalisch-chemische Wechselwirkung mit den umgebenden biologischen Flüssigkeiten und die spätere biologisch-zelluläre Reaktion beginnen an der Materialoberfläche (WEIBRICH et al. 2000). Untersuchungen von RAHN et al. (1986) mit HA- Biokeramiken zeigten das schnellste Einwachsen von vitalem Knochen bei 60-80%iger Porosität und einem Porendurchmesser von 80- 160µm.

Wir unterscheiden Makroporen (>100µm) und Mikroporen (10- 100µm) sowie Poren im Nanometerbereich. Erstere sind notwendig für das Einwachsen von Gefäßen, Mikroporen für die Einwanderung von Zellen und Kollagenfasern und Nanoporen für die Plasma- und Proteinadhäsion (KLAWITTER und HULBERT 1971, DACULSI und PASSUTI 1990, HENKEL et al. 2004). Von an der KAM-Oberfläche adhätierenden Plasma- und Gewebsproteinen kann unter bestimmten Bedingungen eine osteoinduktive Wirkung ausgehen, was BIENENGRÄBER et. al. (2006) bei Minipigs belegen konnten, bei denen im Subkutangewebe eine ektepe, KAM-induzierte Ossifikation erzeugt werden konnte.

Osteoinduktive Stoffe (BMPs), knochenbildende Zellen oder auch Medikamente wie Antibiotika können dafür geeigneten KAM als Trägerstoffe beigefügt oder aufgelagert werden. Eine verbesserte Reossifikation von Defekten kritischer Größe durch Bepflanzung

des KAM auf HA- Basis mit autologen Osteoblasten bei Minipigs konnte von HENKEL et al. (2005) allerdings nicht nachgewiesen werden. Offenbar gewinnen die transplantierten Osteoblasten keinen rechtzeitigen Anschluss an die Gefäßversorgung und sterben ab.

Tabelle 1 fasst die wichtigsten Anforderungen an ein KAM abschließen zusammen:

Tabelle 1: Anforderungen an ein KAM	
•	osteogenetisch
•	osteoinduktiv
•	osteokonduktiv
•	Platzhalterfunktion und Schaffen einer Primärstabilität
•	keinerlei Toxizität, Kanzerogenität, Teratogenität oder anderweitige systemisch unerwünschte Wirkung
•	Biokompatibilität, auch hinsichtlich der Degradationsprodukte
•	der Knochenbildung angepasste Biodegradation
•	Substratwirkung
•	bei möglichst vielen Indikationen einsetzbar
•	Anpassung an individuelle Gegebenheiten des Lagers und dessen Konditionierung
•	Funktion als Trägersubstanz für andere Stoffe

2.4 Einteilung und Eigenschaften von Knochentransplantaten und KEM

Hinsichtlich ihrer Herkunft unterscheidet man Knochentransplantate von Knochenimplantaten bzw. -ersatzmaterialien. Unter ersteren versteht man nach KÜBLER (1997) die Übertragung von Knochengewebe mit vitalen, knochenbildenden Zellen. Die Transplantate lassen sich gemäß Tab. 2 wie folgt einteilen:

Tabelle 2: Transplantate Terminologie (modifiziert aus Reichart, Hausamen, Becker: Curriculum zahnärztliche Chirurgie, 2000)	
Autotransplantat (autogenes, früher homogenes Transplantat)	Spender und Empfänger sind identisch
Isotransplantat (isogenes Transplantat)	Spender und Empfänger sind genetisch identisch
Allogenes Knochentransplantat (homologes Transplantat)	Spender und Empfänger sind genetisch different, gehören aber derselben Spezies an
Xenogenes Knochentransplantat (heterologes Transplantat)	Spender und Empfänger sind genetisch different, sie gehören verschiedenen Spezies an

Zu den KEM und ihrer Weiterentwicklung, den regenerationsfördernden KAM, gehören alle nicht körpereigenen Substanzen, welche zur Auffüllung knöcherner Defekte genutzt werden. LINHART erarbeitete 2003 eine systematische und übersichtliche Klassifikation, dieser Biomaterialien (Tab. 3).

Tabelle 3: Einteilung von KEM (Linhart, 2003)	
Klasse I (anorganische KEM)	a) kalziumhaltige Formkörper oder Granulate b) kalziumhaltige Zemente c) Metalle
Klasse II (Organische KEM)	a) biologischer Ursprung b) synthetischer Ursprung
Klasse III (Komposite)	Kombination von organischen und anorganischen Materialien

2.4.1 Knochentransplantate

Die Verwendung von **autogenem Knochen** als Ersatzmaterial ist unstrittig die idealste Therapievariante zur Behandlung ossärer Defekte, der sogenannte Goldstandard. Bei Operationen im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich wird autogener Knochen entweder lokoregional (z.B. von der Kinnprominenz, von retromolar im Ober- und Unterkiefer sowie von der Apertura piriformis) oder von entfernteren Spenderregionen (z.B. Schädelkalotte, Rippen, Beckenkamm oder Tibiavorderkante) entnommen. Die Größe des Transplantates wird dabei maßgeblich von der Entnahmeregion bestimmt und die Beschaffenheit des Transplantates ist je nach Art der Spenderregion kompakt, spongiös oder kombiniert kortikospongiös (SCHWENZER, EHRENFELD, 2002).

Aufgrund ihrer Struktur und großen Oberfläche weisen Spongiosatransplantate die größte osteogenetische Potenz auf (SOLDNER, HERR 2001). Ihr besonderer Vorteil ist, dass sie sowohl osteokonduktive als auch osteogenetische und osteoinduktive Eigenschaften aufweisen (BAUER und MUSCHLER, 2000). Nach URIST (1989) geht jedoch in Abhängigkeit von Transplantatlager, -größe und struktur der größte Teil der transplantierten Osteoblasten zugrunde. Die Stimulation pluripotenter Mesenchymzellen zur Bildung von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten und deren Migration in den Defekt wird durch bestimmte im Gewebe enthaltenen wachstumsinduzierende Proteine, den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), vermittelt (URIST MR.1965). Wenn das Transplantat an Blutgefäße angeschlossen wird (sog. anastomosierte, gefäßgestielte Transplantate), wird seine Überlebenschance deutlich verbessert, was insbesondere bei Defekten in ersatzschwachem oder unfähigem Lager angewandt wird. Nachteile sind jedoch ein erheblich höherer operativer Aufwand und eine erhöhte Komplikationsrate (EHRENFELD et al. 2004).

Ein weiterer Vorteil autologer Knochentransplantate ist das Fehlen immunologischer Abstoßungsreaktionen aufgrund des gleichen genetischen Ursprungs des Materials sowie der Ausschluss einer möglichen Übertragung von Infektionen, insbesondere viraler Genese.

Es sind aber auch einige Nachteile bei autologen Knochentransplantationen zu beachten, wie z. B. eine limitierte Verfügbarkeit, insbesondere bei großen Defekten. Zum anderen sind mögliche Komplikationen an der Entnahmestelle oder aufgrund des erforderlichen Zweiteingriffs nicht auszuschließen (KURZ, GARFIN, BOOTH, 1989). Aus dem zusätzlichen Eingriff resultieren längere Operationszeiten, eine größere intra- und postoperative Belastung sowie eine höhere postoperative Morbidität für den Patienten (STÜTZLE et al. 1998). Zudem ist zu beachten, dass die initiale mechanische Belastbarkeit von Spongio-

satransplantaten gering ist (GIESEN et al. 1999, IGNATIUS et al. 2000). Nachfolgend wird das freie Autotransplantat jedoch fast vollständig durch neuen Knochen ersetzt, der normal belastbar ist (AXHAUSEN 1952).

Bei **allogenen** Transplantaten sind Spender und Empfänger genetisch nicht identisch. Sie gehören jedoch der gleichen Spezies an. Vorteile dieser Art des Knochenersatzes sind eine ausreichende Verfügbarkeit und gute Osteokonduktivität. Zusätzlich verweist SAILER (2000) auf die Vorteile des Wegfalls eines Zweiteingriffs mit möglichen Komplikationen, verkürzte Operationszeiten und die günstigen Lagerbedingungen bei Zimmertemperatur.

Erhebliche Nachteile hingegen sind die vorhandene Antigenität mit möglichen Abstoßungsreaktionen und die Gefahr der Übertragung von Infektionen, beispielsweise Hepatitis oder HIV. Trotz gründlicher Vorbehandlung der Transplantate verbleibt ein geringes Restrisiko. So wurden von SCHRATT et al. (1996) in Deutschland 4 und von SIMONDS et al. (1992) in den USA 3 Fälle publiziert, bei denen eine Infektionsübertragung durch allogenen Knochen erfolgte. Jedoch war entweder zu diesem Zeitpunkt (1984) eine HIV-Testung noch nicht möglich bzw. beim Spender waren zum Entnahmezeitpunkt noch keine HIV-Antikörper nachweisbar. Die Übertragung von Hepatitis-C-Viren wurde von TOMFORD (1995) in 3 Fällen publiziert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Spendern mit frischer Hepatitisinfektion noch keine Antikörper im Serum nachgewiesen werden können.

Verbindliche Richtlinien für Knochenbanken wurden erstmals 1979 von der American Association of Tissue Banks veröffentlicht. Aufgrund der HIV-Problematik wurden diese Richtlinien 1991 überarbeitet (American Association of Tissue Banks 1991). Auch in Deutschland bestehen seit 1990 verbindliche Richtlinien, die 1996 vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer überarbeitet wurden (Richtlinien zum Führen einer Knochenbank 1990, 1996). Allogene Knochenimplantate zählen in Deutschland zu den Arzneimitteln gemäß § 3 Ziffer 3 Arzneimittelgesetz (SOOST 2000).

Um diese gesetzlichen Auflagen zu erfüllen, wird allogener Knochen fast ausnahmslos vorbehandelt angeboten. Durch den Lyophilisierungsprozess, eine Konservierung labiler biologischer Substanzen durch Einfrieren und anschließende Entwässerung unter Hochvakuumbedingungen, gehen die Antigeneigenschaften der Zellmembranen verloren. Es werden jedoch auch andere zelluläre Bestandteile abgetötet, wodurch die osteogenetische Potenz verloren geht (ASCHERL et al. 1987). Erfolgt ein zusätzliches Autoklavieren des Knochens, d.h. eine Entkeimung durch Dampfsterilisation, gehen osteoinduktive Fakto-

ren verloren (REICHART, HAUSAMEN, BECKER, 2000) und die mechanische Belastbarkeit des Transplantates wird deutlich herabgesetzt (KNAEPLER et al. 1992). Hinzu kommen ein immenser Aufwand bezüglich Spenderselektion, Entnahme, Lagerung und Untersuchung des Knochens sowie das Knochenbankmanagement (STÜTZLE et al. 1991).

Der allogener, lyophilisierte Knochen wird osteoklastär abgebaut; anschließend erfolgt über Bindegewebe und Geflechtknochen der Aufbau neuen lamellären Knochens.

Bei **Xenogenen** Materialien gehören Spender und Empfänger nicht der gleichen Spezies an. Sie werden ähnlich wie allogene Materialien vorbehandelt. Vor- und Nachteile sind identisch zu den oben beschriebenen allogenen Materialien. Als minimales Zusatzrisiko kommt insbesondere bei boviner Herkunft - die mögliche Übertragung von Prionen hinzu (GLATZEL et al., 2000, SCHWARZ et al., 2000). Nach entsprechender Vorbehandlung und Reinigung zählt man xenogene Materialien heute zu den Alloplastiken. Sie sind osteokonduktiv und werden in den bestehenden Knochen integriert, jedoch zumeist nur unvollständig biodegradiert

2.4.2 Knochenersatzmaterialien (KEM)

Alloplastische Knochenersatzstoffe sind für das Einbringen in den Organismus bestimmte Materialien, die aus anorganischen Substanzen synthetisiert oder halbsynthetisch aus biologischem Material hergestellt werden. Sie sollen die Funktion von Geweben oder Organen übernehmen, ersetzen oder verbessern (WILLIAMS 1987). Alloplastische KEM gelten als biotolerant, bioinert bzw. bioaktiv (OSBORN und WEISS 1978). Ihr Hauptvorteil stellt die unbegrenzte Verfügbarkeit dar. Sie wirken osteokonduktiv und werden entweder knöchern integriert oder von Osteoklasten bzw. Makrophagen abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt. Alloplastische KEM können mit osteoinduktiven Substanzen (z.B. BMPs) beladen werden, die an ihrer Oberfläche resp. ihren porösen Innenstrukturen adhären (sog Kompositmaterialien).

In der Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie werden häufig kalziumphosphathaltige KEM der Klasse I (siehe Tab. 3) eingesetzt, während Metalle eher ihre Anwendung in der Behandlung von Wirbelsäulendefekten sowie bei der Versorgung von Knochentumoren finden. Materialien biologischen Ursprungs (Klasse IIa) werden aus humanem oder tierischem Knochen bzw. aus Algen und Korallen gewonnen.

Ersatzmaterialien synthetischen Ursprungs (Klasse IIb) sind Kunststoffe, die möglicherweise zukünftig eine größere Bedeutung erlangen werden. Die Komposite (Klasse III) bilden eine inhomogene Klasse von KEM, bei denen durch Kombination organischer und anorganischer Stoffe die jeweiligen Vorteile vereint werden sollen.

Aufgrund der Thematik dieser Arbeit soll insbesondere auf die **synthetischen anorganischen Materialien** zum Knochenersatz eingegangen werden, die RÜGER (1998) wie folgt einteilt:

- monophasische synthetische Verbindungen z.B. Ceros 80/82® (Mathys Co., Bettlach/Schweiz)
- hydrothermal aus Korallen bzw. Algen über einen Umwandlungsprozess produzierte HA-Analoga z.B. Biocoral® (Biocoral, Wilmington/USA), Algipore® (Friadent, Mannheim)
- aus bovinem Knochen durch einen thermischen Sinterungs- z.B. Endobon® (Merck, Darmstadt), Pyrost® (Osteo AG, Lubbock/Schweiz) oder Elutionsprozess gewonnene HA-haltige Substanzen z.B. BioOss® (Geistlich, Baden-Baden), Tutobone® (Tutogen Medical Inc., Florida/USA)
- mehrphasische CP-Keramiken, Biogläser oder mehrphasische Glaskeramiken z.B. Cerasorb® (Curasan, Kleinostheim), Perioglas® (John O. Butler GmbH, Kriftel)
- CP-haltige Knochenzemente z.B. Norian SRS® (Synthes, Solothurn/Schweiz), Biobone® (Merck, Darmstadt)

Anders als LINHART (2003), welcher teilsynthetische HA-Analoga tierischer und pflanzlicher Herkunft der Gruppe IIa (organische KEM biologischen Ursprungs) zuordnet (siehe Tabelle 3), geht RÜGER in seiner Klassifikation davon aus, dass durch entsprechende Vorbehandlungen die organischen Elemente der Ausgangsstoffe weitgehend eliminiert werden und sie somit den synthetischen Materialien angehören.

Als **monophasische synthetische KEM** sind Kalziumphosphate (CP) auf der Basis von HA und β -TCP von Bedeutung. Es werden sowohl synthetische, als auch bovine und phylogene HA-Produkte in Granulat- oder Blockform verwendet (DUMBACH et al., 1988; GHAZAL et al., 1992; HIDDING et al., 1988; KASPERS et al. 1986; SHETTY et al., 1988; WALZ et al., 1994). Ihre herkömmliche Synthese erfolgt durch Sintern von CP-Rohlingen mit verschiedenen Zusätzen bei Temperaturen um 1200 °C. Es entstehen dichte oder poröse Keramiken, so genannte Hochtemperatur-CP (SCHWENZER, EHRENFELD,

2000). Davon unterschieden werden die Niedertemperatur-CP, wobei ausgefälltes HA und dihydriertes Kalziumbiphosphat als Zemente von besonderem biologischem Interesse sind (LINHART et. al, 2004).

Anorganisches Phosphat und Kalzium bilden im natürlichen Knochen Verbindungen, die hexagonale Kristalle formen, wobei das **Hydroxylapatit** ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) mit einem Anteil von 50% überwiegt. Es entsteht durch Osteoblasten, die Matrixvesikel bilden, in denen Kristalle aus CP entstehen, die aus den Zellen geschleust werden. Freigesetztes CP und andere vorhandene Ionen dienen als Kristallisationskeime. Entlang der Kollagenfibrillen schreitet die Kristallisation fort und es kommt zur Umwandlung der Kristalle in HA (JUNQUEIRA, 1996).

HA-Keramikanaloga sind teilsynthetische Präparate pflanzlichen oder tierischen Ursprungs. Erstere werden beispielsweise aus dem interkonnektierend, porösen Calciumkarbonatgerüst von **Korallen** (z.B. Biocoral®, Firma Biocoral, Wilmington/USA) oder **Algen** (z.B. Algipore®, Friadent, Mannheim) durch hydrothermalen Austausch hergestellt. Vorteile dieser Materialien sind die gute Verfügbarkeit sowie das Vorhandensein von interkonnektierenden Poren (KLAWITTER und HULBERT 1971). Tierische Materialien sind zumeist **bovinen** Ursprungs (z.B. BioOss®, Geistlich, Baden-Baden) und werden aus vollständig deproteinisierter Spongiosa hergestellt. Die notwendige Dekontaminierung von Keimen erfolgt entweder durch eine Hitzebehandlung z. T. bis hin zur Sinterung (MITTELMEIER und KATTHAGEN 1984) oder durch chemische Substanzen, wobei ein minimales Restrisiko nicht absolut auszuschließen ist.

HA übt eine stimulierende Wirkung auf die Knochenbildung aus, da Ca^{2+} in Lösung geht (KURASHINA et al. 1982). Ossäres HA ist jedoch bei physiologischem pH-Wert nicht bzw. schwer resorbierbar, was auch für KEM bovinen Ursprungs gilt. Ihre nicht biodegradierten Reste bilden im Gewebe einen osteoimplantären Verbund (RÜGER 1998, MCALLISTER et al. 1999). Eine Osteoneogenese um HA-Partikel herum wird nur vereinzelt und - falls vorhanden - in unmittelbarer Nähe der ossären Defektränder beobachtet. Meist kommt es zu einer bindegewebigen Einkapselung (SCULEAN, JEPSEN, 2004)

Auch synthetische im Sinterverfahren hergestellte HA-Keramiken werden nicht bzw. nur äußerst langsam abgebaut (KATTHAGEN 1986, MERTEN et al. 1994), während β -TCP allmählich abgebaut wird, jedoch weniger druckstabil als HA ist. Die Partikelgröße und die Porosität, die chemische Struktur und die Zusammensetzung der KEM spielen bezüglich des Resorptionsverhaltens eine große Rolle (MISCH, DIESCH, 1993).

In den vergangenen Jahren sind die KAM auf HA-Basis erheblich weiterentwickelt worden, wobei eine wesentliche Verbesserung der Biodegradierbarkeit erreicht werden konnte. So untersuchte DIETRICH (2005) tierexperimentell neuartige Niedertemperatur-Kalziumphosphat-Matrizes auf Xerogelbasis mit unterschiedlichen HA- und β -TCP-Anteilen, wobei das reine HA-Material die günstigsten Eigenschaften bezüglich Knochenbildung und Resorption aufwies (siehe auch Kapitel 3.2). Auch ein von Heraeus-Kulzer (Hanau) entwickeltes HA-Hydrogel (siehe auch 3.1) zeigte in Tierversuchen eine sehr schnelle Resorption (Heraeus-Kulzer, 2003).

Die **Tricalciumphosphate (TCP)** können in α - und β -Kristallstruktur vorliegen, wobei α -TCP durch Erhitzen von β -TCP auf $>1125\text{ }^{\circ}\text{C}$ hergestellt wird. Da β -TCP in seinem Resorptionsverhalten dem α -TCP überlegen ist (LE GEROS 2001), erstreckt sich die experimentelle Erprobung und der klinische Einsatz fast ausnahmslos auf β -TCP-Präparate (RÜGER 1992). Ein bekanntes Beispiel ist Cerasorb® (Curasan AG, Kleinostheim). Biokeramiken auf β -TCP-Basis wirken osteokonduktiv, indem sie dem angrenzenden Knochen als Leitschiene dienen, ein osteoinduktiver Effekt wurde ausgeschlossen (JARCHOW 1981). Als wesentliche Degradationsmechanismen werden die Hydrolyse durch Gewebeflüssigkeit und der Abbau durch mononukleäre Phagozytose beschrieben. Die schnelle Resorbierbarkeit von TCP ist nicht generell positiv zu beurteilen, denn in Abhängigkeit vom Implantationsort findet bei β -TCP eine Biodegradation statt ohne einen vollständigen Ersatz durch Knochen (RUEGER 1998). Neuere In-vivo-Untersuchungen mit einer weiterentwickelten β -TCP-Keramik (Cerasorb M®) weisen jedoch eher auf eine verzögerte Resorption hin (KOEPP et al. 2004).

Mehrphasische CP setzen sich aus unterschiedlichen Anteilen von HA und TCP sowie anderen Komponenten zusammen, wodurch die Eigenschaften des KEMs hinsichtlich Resorbierbarkeit und Stabilität verbessert werden sollen.

Zur gleichen Untergruppe zählt RUEGER (1998) **Biogläser und Glaskeramiken**. Hierunter versteht man amorphe Glasarten, die über die Oberfläche einen direkten Verbund zum Knochen eingehen (HEIMKE und GRISS 1980, LUCZAK und SONNTAG 1990). Biogläser bestehen zum überwiegenden Anteil aus SiO_2 -Verbindungen- einer Glasphase und sind zumeist bioaktiv (HENCH 1991). Durch eine zweite Glasschmelze bei niedriger Temperatur entstehen zweiphasige Glaskeramiken, d.h. eine kristalline Phase (Apatit) ist in einer Glasmatrix eingebettet (RÜGER, 1992). So wird im Vergleich zu den Biogläsern

eine bessere knöchernen Anheftung (Verbundosteogenese) sowie eine größere mechanische Stabilität erreicht. Glaskeramiken werden jedoch weder resorbiert noch osteointegriert.

Biogläser und Glaskeramiken werden zur Oberflächenaktivierung von, aus biologisch nicht reaktionsfähigen Ausgangsmaterialien hergestellten Implantaten eingesetzt, um deren Verankerungsmöglichkeiten im Knochengewebe zu verbessern. Weiterhin werden sie als lokale Wirkstoffträger z. B. in der antiseptischen Chirurgie benutzt (RÜGER J.M. et al. 2004).

Das im Jahre 2004 entwickelte KAM BONIT[®] matrix (DOT, Rostock) vereinigt die positiven Eigenschaften der Biogläser mit denen der Kalziumphosphate. Es besteht zu 87 Gewichtsprozenten aus einer Mischung von HA- und β -TCP-Kristallen (Verhältnis 60 : 40), welche über eine Siliziumdioxidmatrix (13 Gew.-%) miteinander verknüpft sind (HENKEL, DIETRICH, BIENENGRÄBER, 2005). Bei diesem Material handelt es sich um ein Xerogel auf CP-Basis, das im Sol-Gel-Verfahren bei einer Temperatur $<800^{\circ}\text{C}$ hergestellt wird und SiO_2 als Verbundmaterial enthält (GERBER et al. 2001).

Ein Weiterentwicklung ist ein ebenfalls in Rostock entwickeltes KAM, eine SiO_2 Xerogel-Matrix ausschließlich auf HA-Basis, die verbesserte biologische Eigenschaften besitzt. Es ist seit 2005 unter dem Handelsnamen NanoBone[®] (Artoss, Rostock) verfügbar. (Herstellereinformation, 2006). Da NanoBone[®] eines der beiden in der vorliegenden Arbeit getesteten KAM ist, folgt eine genauere Beschreibung bei „Material und Methoden“ (Kapitel 3.2.)

Bereits im Jahre 2002 wurde ein KAM auf **HA-Hydrogel-Basis** von der Firma Heraeus-Kulzer (Hanau) entwickelt und unter dem Namen Ostim[®] auf den Markt gebracht. Hierbei handelt es sich um ein phasenreines ungesintertes HA, welches als 35%ige wässrige Suspension vorliegt und in situ nicht aushärtet (Heraeus-Kulzer, 2003). Da auch dieses KAM nachfolgend getestet wird, erfolgt seine nähere Beschreibung ebenfalls später (Kapitel 3.1.)

Kalziumphosphat-Zemente sind eine weitere Untergruppe der synthetischen KEM anorganischen Ursprungs. Ausgefälltes HA ist das Endprodukt aller kommerziell hergestellten CP-Zemente, welche in reiner Form oder karbonathaltig z.B. Norian SRS® (Synthes, Solothurn/Schweiz) hergestellt werden. CP-Zemente bestehen aus einer festen und einer flüssigen Komponente, welche bei der Abbindereaktion eine Kristallstruktur bilden (BOHNER 2001). HA-Zemente gelten als biokompatibel, injizierbar, osteokonduktiv und biodegradierbar. Aufgrund ihrer geringen mechanischen Festigkeit sind sie jedoch nur für die Wiederherstellung unbelasteter Knochendefekte geeignet (CHOW 2001).

Die CP-Zemente sind nur sehr gering porös. Makroporen fehlen, während sich Mikroporen nur spärlich finden. Sie wirken daher nicht osteokonduktiv. Ihr Abbau erfolgt zellulär, wobei sie letztlich durch autochtonen Knochen ersetzt werden. CP-Zemente sind zudem weder osteoinduktiv noch stimulieren sie die Osteogenese; sie dienen in erster Linie als temporäre Platzhalter im Knochen (WEBER, 2006).

3. Materialien und Methode

3.1 Getestete Knochenaufbaumaterialien

3.1.1 Ostim®

Ostim® (Abb.3) von der Firma Heraeus- Kulzer® (Hanau) ist ein vollsynthetisches KAM auf CP-Basis. Es liegt als phasenreines, ungesintertes, nanokristallines HA-Hydrogel vor, wobei die kristallinen Anteile 35 Vol% der Suspension ausmachen. Die Herstellung erfolgt als kontrollierte Präzipitation von Kalziumphosphatkristallen ohne Sinterung, wobei ein stöchiometrisches Kalzium-Phosphat- Verhältnis von 1,67 vorliegen muss. Wesentliche Eigenschaften sind nach Herstellerangabe eine Kristallgröße von ca. 18 nm, ein pH-Wert von 7,5, eine spezifische Oberfläche von 100m²/g sowie eine Löslichkeit von 2,6mg HA/100g H₂O.



Abb.3: HA-Hydrogel Ostim® (Heraeus-Kulzer, 2003)

Das Material wird mittels eines Konzentrationsprozesses in eine formstabile weiße Paste überführt, mittels γ -Strahlen strahlensterilisiert und kann zur Anwendung mit einer speziellen Spritze implantiert werden (Abb. 4), wodurch ein formschlüssiger Kontakt mit der Begrenzung der Knochenhöhle gewährleistet wird. Es eignet sich für örtlich begrenzte Knochendefekte, die aufgrund der pastösen Konsistenz einfach und formschlüssig aufgefüllt werden können. Das Material härtet in-situ nicht aus, was eine schnelle Vaskularisation ermöglicht (Heraeus-Kulzer, 2003).



Abb. 4: Applikation des pastösen KAM Ostim® mittels spezieller Spritze
 (aus Jelitte G., Laterale Augmentation- bei Einsatz eines nanokristallinen Hydroxylapatits,
 ZMK 20: 54ff, 2004)

Der Wirkungsmechanismus von Ostim® beruht auf einer lokal begrenzten Stimulation der Knochenregeneration. Es ist notwendig, Ostim® stets so zu implantieren, dass es Kontakt zum vitalen Knochenlager hat (Abb. 5 und 6), weil nur dann die schnelle Revaskularisierung mit anschließender Knochenneubildung erfolgen kann. In einem avitalen Lager zeigt Ostim® keine Wirkung, da infolge einer fehlenden Gefäßeinsprossung auch keine knochenbildenden Zellen einwandern können (DINGELDEIN UND ENGART, 2001).

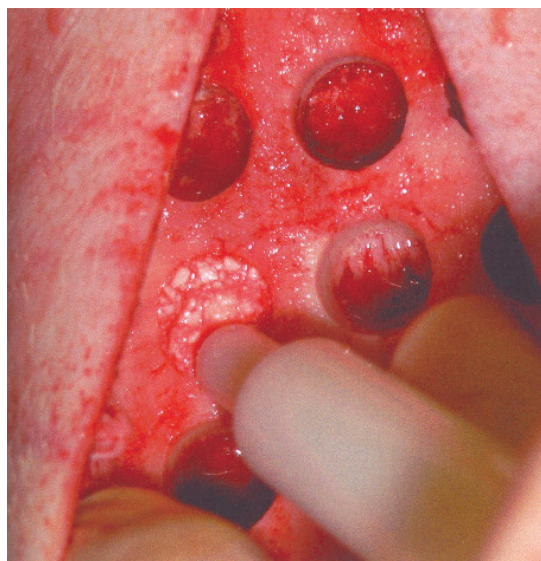


Abb. 5: Ostim® wird mittels Spritze formschlüssig in einen knöchernen Defekt gefüllt (aus Thorwarth et al.:
 knöcherne Regeneration mit nanopartikulärem Hydroxylapatit, Implantologie 12/1, S. 21-32, 2004)

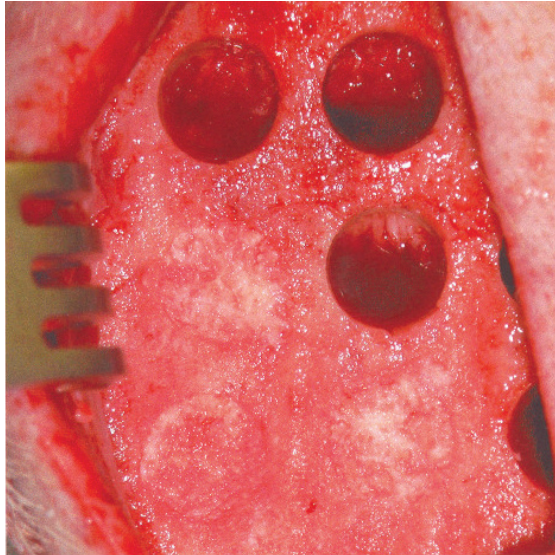


Abb. 6: Situation nach Einbringen des Materials (aus Thorwarth et al.: knöchernen Regeneration mit nanopartikelärem Hydroxylapatit, *Implantologie* 12/1, S. 21-32, 2004)

Die mechanische Stabilität des Materials im Defekt wird als gering eingeschätzt. In schmalen sowie spaltförmigen oder kleinen mehrwandigen Defekten ist die Knochenneubildung als gut zu beurteilen. Bei größeren Knochenkavitäten kommt es jedoch laut WOLF (2003) zur Bildung von zentralen Hohlräumen durch eine zu schnelle der Knochenbildung unangepassten Resorption. Der Hersteller empfiehlt folgende Indikationen für den Einsatz von Ostim®: das Füllen von Zysten und Alveolen, Wurzelspitzenresektionen, Parodontitis, Sinuslift, Augmentationen und Periimplantitis.

3.1.2 NanoBone®

NanoBone® (Abb. 7) von der Firma Artoss (Rostock) ist ein vollsynthetisches ungesintertes, hochporöses, nanostrukturiertes HA, welches in einem neuartigen Sol-Gel-Verfahren (GERBER et al., 2000) hergestellt wird. Unter einem Sol versteht man ein Kolloid mit nicht zusammenhängenden, voneinander unabhängigen Teilchen (Psyrembel, 2002).



Abb.7: HA-Kieselgel-Matrix (NanoBone®)

Während des Herstellungsprozesses wird reines HA in ein SiO_2 -Sol auf der Basis von Alkoxiden gegeben und homogen verteilt. Durch das Entweichen des Lösungsmittels (Ethanol-Wasser-Gemisch) beim Trocknen entsteht ein Gel, das beliebig geformt werden kann (Abb.8). Dieses Verfahren ist vom Anteil der verwendeten Kalziumphosphate unabhängig und erlaubt eine gezielte Gestaltung von Größe und Anordnung der interkonnektierenden Poren, welche das Einwachsen von Blutgefäßen, Kollagenfasern und zellulären Bestandteilen aus dem umgebenden Knochen ermöglichen (HENKEL et al. 2002).

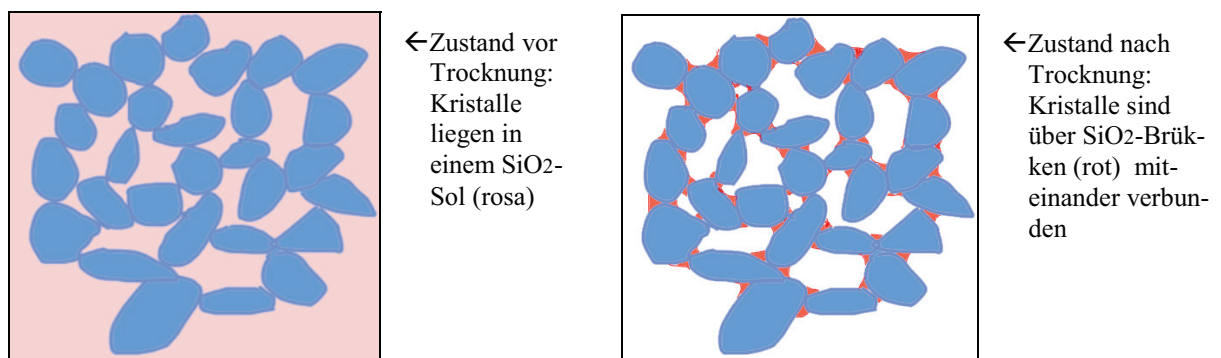


Abb.8: Herstellung eines Xerogels durch Trocknung (aus Bienengräber V., Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgelmatrix, 2007)

Die Porengröße kann durch die Wahl des Verhältnisses von Granulat zu Lösungsmittel und Gelprecursor beeinflusst werden. Die Kristallite (Größe 90nm) werden durch SiO_2 -Brücken (Anteil von 24%) locker verknüpft (GERBER, 2000). Beim Trocknen durch langsames Erhitzen auf eine Temperatur von maximal 800°C erfolgt nur eine geringe Schrumpfung. Es entsteht eine hochporöse Matrix mit einer Feststoffdichte von 0,5-0,7

g/cm³ und einer Porosität von 60-80%. Diese Poren sind interkonnektierend und besitzen einen unterschiedlichen Durchmesser. Siliziumdioxid ist nanostrukturiert, welches aufgrund der extrem vergrößerten äußeren und inneren Oberfläche von 85m²/g die Adhäsion von Plasma- und Gewebsproteinen begünstigt. Beim Gelübergang entstehen neben Nanoporen auch Mikroporen (wenige µm bis 100µm Ø), in die Kollagenfasern und Osteoblasten einwachsen können. Während der Trocknung und Formgebung entstehen Makroporen (>100µm bis mm-Bereich), welche das Einwachsen von Gefäßen ermöglichen.

Das Material wird in Granulatform hergestellt und bei der Anwendung mit Patientenblut gemischt, wodurch eine Paste entsteht, die sich dann formschlüssig in Defekte einfüllen lässt (Abb. 9-13).



Abb.9: Anmischen von NanoBone® mit Patientenblut

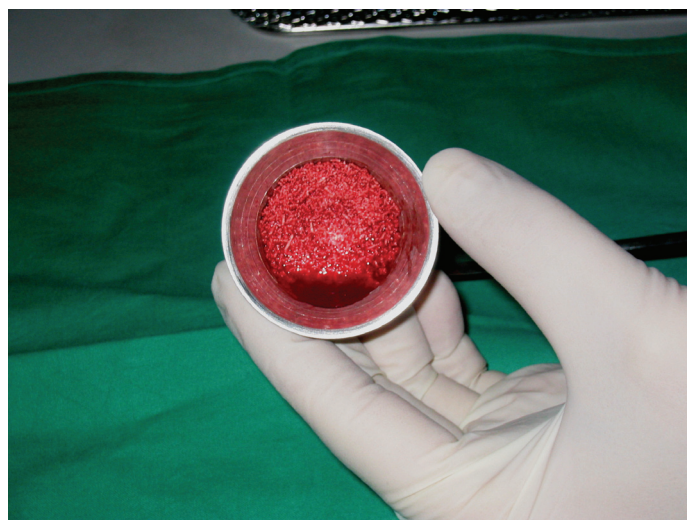


Abb.10: mit Patientenblut gemischtes KAM NanoBone®



Abb.11: Entfernen des überschüssigen Blutes

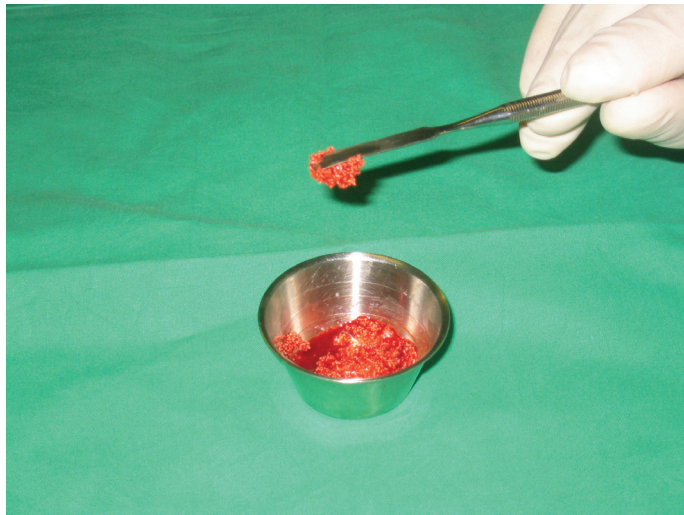


Abb.12: pastöse Konsistenz des mit Blut gemischten KAM vor der Applikation

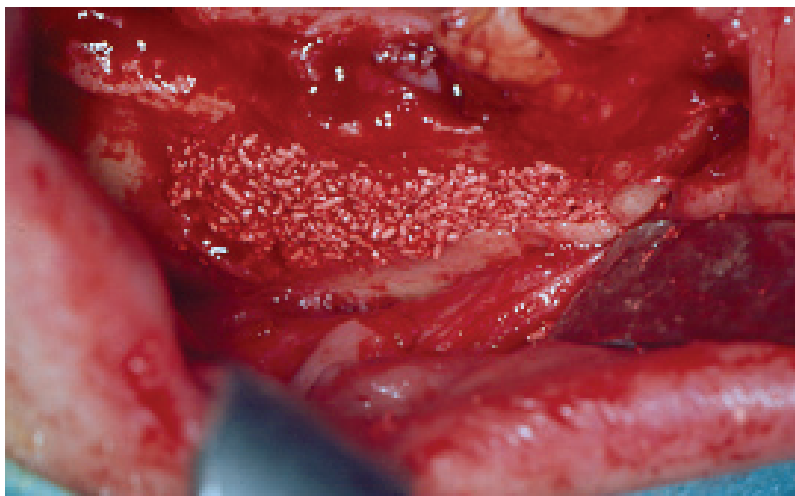


Abb.13: Operationssitus nach Defektfüllung mit NanoBone®

Abb. 11-13 aus Bienengraber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007

3.1.3 Vergleichende Betrachtung der Eigenschaften beider KAM

Sowohl bei Ostim® als auch bei NanoBone® handelt es sich um ungesinterte, nanokristalline KAM, die in unterschiedlichen Formen, sprich als Hydro- oder als Xerogel zur Applikation vorliegen und sich in ihren Eigenschaften unterscheiden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Eigenschaften von Ostim® und NanoBone®		
Ostim®	Eigenschaft	NanoBone®
Paste (Hydrogel)	Applikationsform	Granulat (Xerogel)
35% HA in einer wässrigen Suspension	Bestandteile	ca. 76% HA 24% SiO ₂
Kontrollierte Präzipitation von CP-Kristallen (CP-Verhältnis von 1,67) ohne Sinterung	Herstellungsprozess	Sol-Gel-Verfahren ohne Sinterung
18nm	Kristallgröße	90nm
100m ² /g	Spezifische Oberfläche	84m ² /g
keine Angabe	Dichte	0,5-0,7 g/cm ³
2,6mg HA/100g H ₂ O	Löslichkeit	nur bei pH-Wert < 2
7,5	pH-Wert	Neutral
keine Angabe	Härte	40mpas
keine Angabe	Porosität	Granulatkorn: 61% Schüttung: 75-80%

Das HA- Hydrogel Ostim® wird durch eine kontrollierte Präzipitation von CP-Kristallen (stöchiometrisches Kalzium-Phosphat- Verhältnis von 1,67) und anschließender Suspension in Wasser hergestellt, strahlensterilisiert und in Spritzen abgefüllt, während das, als Xerogel vorliegende NanoBone® durch den bereits in Kapitel 3.2.2 detailliert beschriebenen Sol-Gel-Prozess produziert wird und als Granulat, welches vor der Applikation mit Patientenblut gemischt werden muss, erhältlich ist (Abb. 14-17).

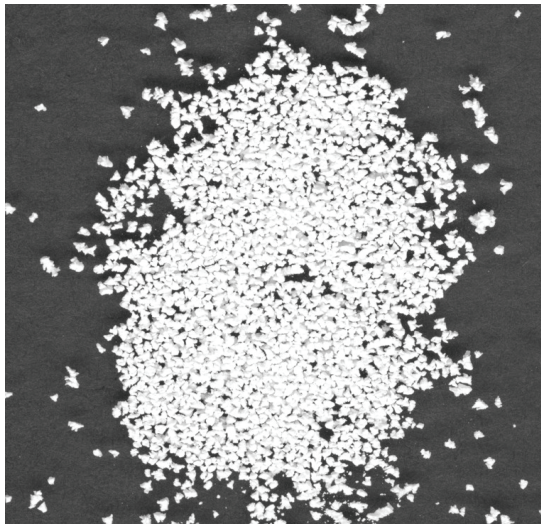


Abb.14: makroskopische Darstellung der Schüttung des Granulats

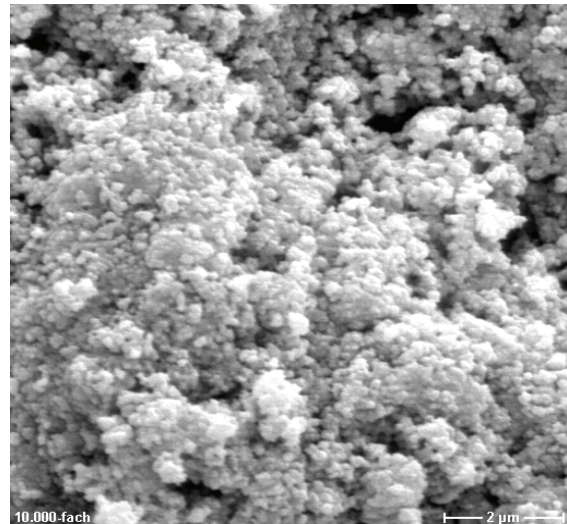


Abb.15: HA-Kieselgel-Matrix (REM)

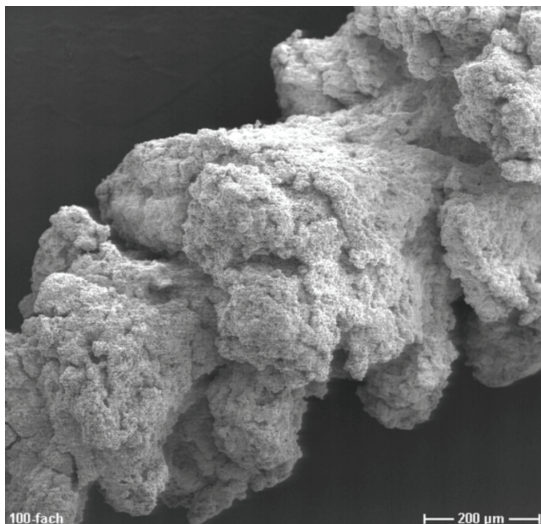


Abb.16: Einzelnes Granulat Korn (REM)

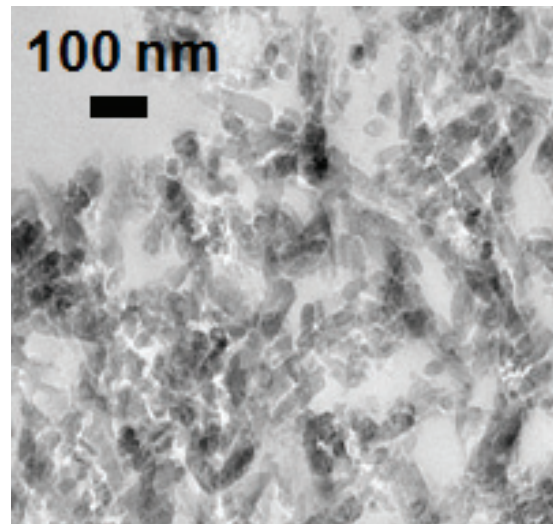


Abb. 17: Kieselgel (TEM)

Abb. 14 - 17 Makro- und Mikrostruktur von NanoBone® aus Bienengräber: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007

Der wichtigste Bestandteil beider KAM ist das nanopartikuläre HA, welches bei Ostim® einen Anteil von 35% in einer wässrigen Suspension hat, während bei NanoBone® der Anteil bei ca. 76% HA liegt und der Rest durch 24% SiO₂ ergänzt wird. Die Kristallgrößen differieren zwischen 18nm bei Ostim® (Abb.18) und 90nm bei NanoBone® (GERBER et al., 2000).

Aus dem festeren Aggregatzustand bei NanoBone® resultiert eine Härte von 40mpas, welche bei Ostim® deutlich niedriger liegen dürfte. Genaue Härteangaben für das Hydrogel lagen hier jedoch nicht vor.



Abb.18: Präzipitierte HA- Kristalle (aus Herstellerinformation Ostim®- Heraeus-Kulzer, 2003)

Die spezifische Oberfläche liegt bei NanoBone® bei 84g/m^2 und bei Ostim® laut Herstellerangaben bei 100g/m^2 . Diese im Vergleich zu herkömmlichen KEM großen Oberflächen entstehen bei NanoBone® durch die interkonnektierende Porosität des Materials (siehe auch Kapitel 3.2.2), welche durch die Herstellung bei niedrigen Temperaturen gewährleistet wird, während die große Oberfläche von Ostim® allein durch die Form der bei der Präzipitation gebildeten HA-Kristalle entstehen kann. Sowohl Ostim® als auch NanoBone® werden bei Temperaturen unter 800°C hergestellt - man spricht von Niedrigtemperatur-HA-Matrizes. Im Gegensatz dazu werden herkömmliche CP-Keramiken bei Temperaturen um die 1200°C gesintert, was zu einer starken Abnahme der Mikro- und Nanopporosität führt (Abb. 19). Diese wiederum sind entscheidend für das Auf- und Einwachsen von vitalem Gewebe auf bzw. in das KAM und somit für die Osteokonduktivität der Biomaterialien. Die Porosität eines Granulatkorns von NanoBone® liegt bei 61%, während die Granulatschüttung eine Porosität von 75-80% aufweist. Bei Ostim® soll eine schnelle Vaskularisierung und Migration von knochenbildenden Zellen etc. durch die Weichheit des Materials gewährleistet werden (Heraeus-Kulzer, 2003 bzw. Artoss 2005).

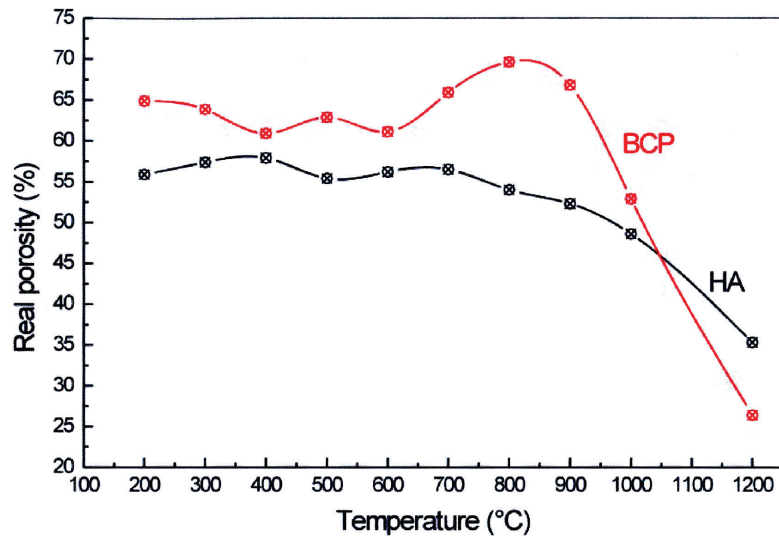


Abb. 19: Temperaturabhängigkeit der Porosität: kennzeichnend ist der starke Abfall der Porosität ab einer Temperatur von 800 °C, oberhalb dieser Temperatur spricht man von Hochtemperatur-HA-Keramiken oder HA-Sinterkeramiken, unterhalb von 800°C von ungesinterten Niedertemperatur-HA-Matrizes (aus Bienengräber: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007) BCP= Biphasisches Calciumphosphat, HA= Hydroxylapatit

3.2 Versuchstiere und Versuchsdurchführung

3.2.1 Versuchstiere

Göttinger Miniaturschweine wurde in dieser Studie als Versuchstiere gewählt, da sie ein nahezu gleiches ossäres Regenerationsverhalten wie der Mensch aufweisen und zum gleichen Kautyp gehören (HÖNIG und MERTEN 1993). Es standen 6 adulte männliche „Göttinger Minischweine“ zur Verfügung, die bei Versuchsbeginn ca. 1 Jahr alt waren und durchschnittlich 21,5kg wogen. Die Tiere wurden nach der Operation eine Woche im Versuchstierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gehalten, anschließend in einem Landwirtschaftsbetrieb unter regelmäßiger Überwachung eines Veterinärmediziners untergebracht.

3.2.2 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden vom Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern (heute Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei) nach vorheriger Prüfung genehmigt (Genehmigungsnummer: LVL M-V/TSD/7221.3-1.1-042/04). Für den Versuch standen 6 „Göttinger Minischweine“ zur Verfügung. Bei jedem Tier wurden Defekte kritischer Größe („Critical-Size-Defekte“) im

Bereich der anterioren Mandibula beidseits gesetzt. Es resultierten somit 12 artifizielle Knochendefekte, d.h. 6 pro Versuchsgruppe. Bei den 3 Tieren der Gruppe N erfolgte erfolgte die Implantation von Ostim®, während bei den Tieren der Gruppe P die 6 Defekte mit NanoBone® gefüllt wurden.

3.2.3 Operationsverlauf

Zunächst wurden die Tiere mit 4mg/kg Stressnil i.m. prämediziert. Nach 15 Minuten schloss sich die Anästhesie mit 20 mg/kg Ketamin und 0,02mg Dormicum in Form einer Mischspritze an. Zusätzlich wurden lokal 4ml Ultracain beidseits injiziert.

Nach Inzision unterhalb des Unterkieferrandes wurde beiderseits unter Schonung der Muskulatur und des Periostes der Knochen im vorderen Mandibulabereich freigelegt, Abb. 20 und 21 zeigen das operative Vorgehen. Zunächst wurden ein kastenförmiger Defekt mittels Rosenbohrer markiert und dann mittels Fräser und Meißel von vestibulär bis zum lingualen Periost perforierend gestaltet, ohne die Wurzelspitzen zu tangieren. Aufgrund der Defektausdehnung musste der Mandibularkanal mit Inhalt (N. alveolaris inferior, A. und V. mandibularis) reseziert werden.

Die Defektgröße wurde klinisch mit einem Stechzirkel und Lineal ermittelt und überschritt durchweg ein Volumen von 5 cm³ (kritische Größe). Danach erfolgte die Füllung bei Gruppe N mit Ostim® bzw. bei Gruppe P mit NanoBone®. Es wurden 3g Sobelin (Pharmacia, Luxemburg) lokal als Infektionsprophylaxe appliziert. Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluss. Postoperativ wurde zusätzlich eine allgemeine antibiotische Abschirmung mit 4ml Teramycin (Pfizer, New York) intramuskulär vorgenommen.

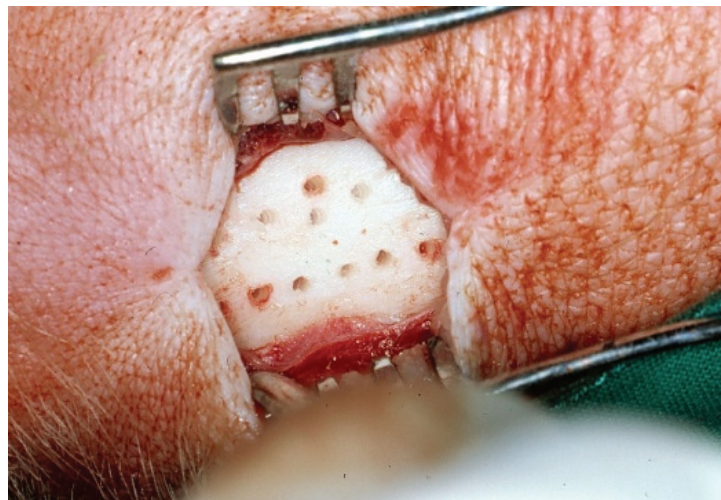


Abb. 20: Operationssitus: Markierung des Defektes mittels Rosenbohrer an der anterioren Mandibula eines Göttinger Miniaturschweines

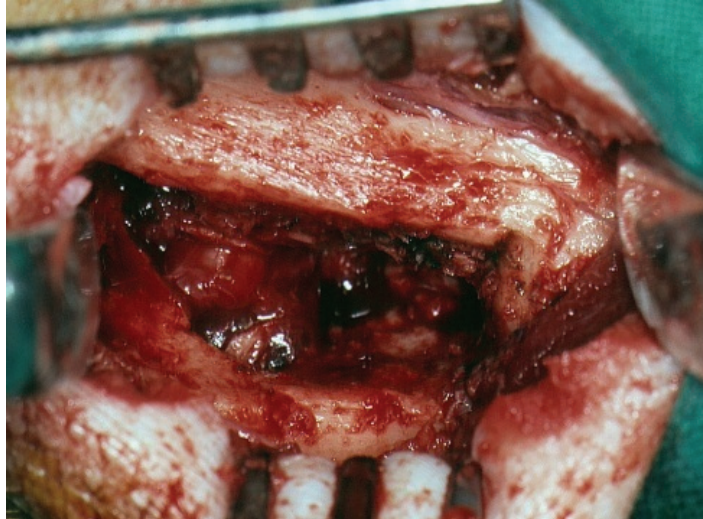


Abb. 21: Operationssitus, Zustand nach Defektsetzung an der anterioren Mandibula eines Göttinger Miniaturschweines

3.2.4 Präparategewinnung

5 Wochen nach Implantation der Biomaterialien erfolgte dann die Tötung der Versuchstiere. Es wurde wiederum mit Stressnil prämediziert und anschließend mit Ketamin und Midazolam anästhesiert. Die Euthanasie wurde mit EUTA 77 (Essex Tierarzney München) intravenös durchgeführt.

Die Entnahme des Unterkiefers erfolgte nach Ablösen aller Weichteile mittels Durchtrennung am aufsteigenden Ast der Mandibula beidseits mit einer oszillierenden Säge. Anschließend wurden restliche Weichteile entfernt und der Kiefer in der Mitte durchtrennt. Alle Kiefer wurden dann klinisch und röntgenologisch untersucht sowie fotodokumentiert. Aus jeder Hälfte wurde ein Knochenanteil mit dem Defekt für die histologische Untersuchung entnommen, der etwa die Größe von $5\text{cm} \times 2\text{cm} \times 2\text{cm}$ aufwies. Dieser wurde in 5%iges neutrales, gepuffertes Formalin zur Fixierung überführt.

3.3 Klinische und röntgenologische Untersuchungen

3.3.1 Klinische Untersuchungen

Intraoperativ und unmittelbar nach der Tötung der Tiere erfolgten die klinischen Untersuchungen. Diese beinhalteten eine makroskopische Beschreibung einschließlich Fotodokumentation der Befunde (Abb. 22) sowie eine metrische Erfassung der Defektgröße mittels Sonde, Stechzirkel und Lineal.

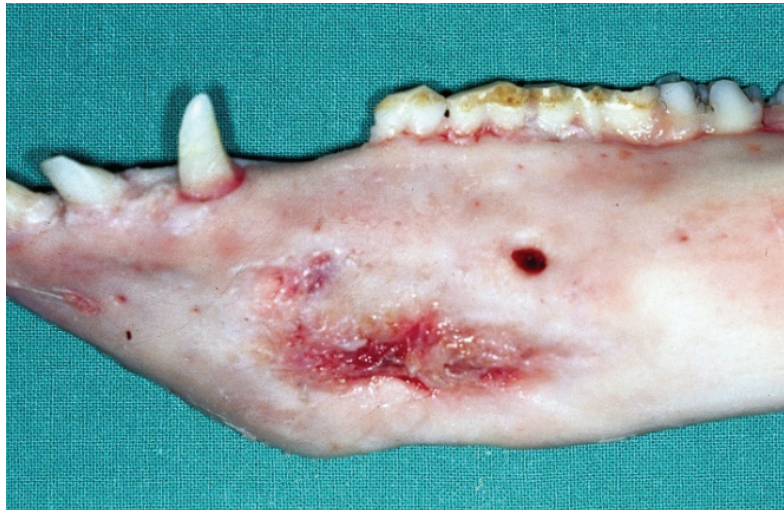


Abb.22: entnommene linke Mandibulahälfte eines Miniatschweinen 5 Wochen nach Implantation eines KAM (Ostim®)

3.3.2 Röntgenologische Untersuchung

Unmittelbar postoperativ wurden die Tiere noch in Narkose beidseits in UK- Lateraltechnik geröntgt. Um Überlagerungen durch die kontralaterale Kieferhälfte zu vermeiden, wurden die Tiere in einem speziellen Styroporgestell gelagert, das eine reproduzierbare Kopfstellung der Miniatschweine gewährleistete (Abb. 23). Es wurde im Rahmen von Voruntersuchungen entwickelt und detailliert beschrieben (BUCUR 2003).

Eine weitere Röntgenkontrolle erfolgte nach der Tötung der Tiere. Nach vorheriger Trennung des Unterkiefers in der Medianebene wurden beide Kieferhälften untereinander auf die Röntgenkassette gelegt und anschließend geröntgt, wodurch eine überlagerungsfreie Darstellung gewährleistet wurde (Abb. 24).

Für die Aufnahmen wurde ein portables Röntgengerät VET X-Ray Gamma 2000 (Physia GmbH, Neuisenburg) für veterinärmedizinische Zwecke benutzt. Für die Unterkiefer-Lateraltaufnahmen wurde ein Fokusobjektstand (FOA) von 45 cm bei 3,2 mAs und einer Leistung von 50kV gewählt, während für die postmortalen Röntgenaufnahmen beider

Kieferhälften im seitlichen Strahlengang ein FOA von 25 cm bei 0,6 mAs und 50 kV gewählt wurden.

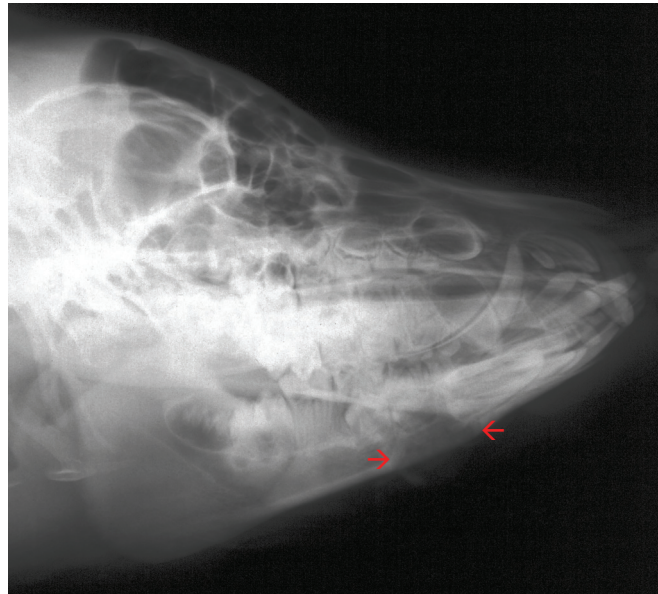


Abb.23: Postoperative Röntgenaufnahme des Unterkiefers in Lateralaufnahmetechnik (Pfeile markieren die Defektregion)

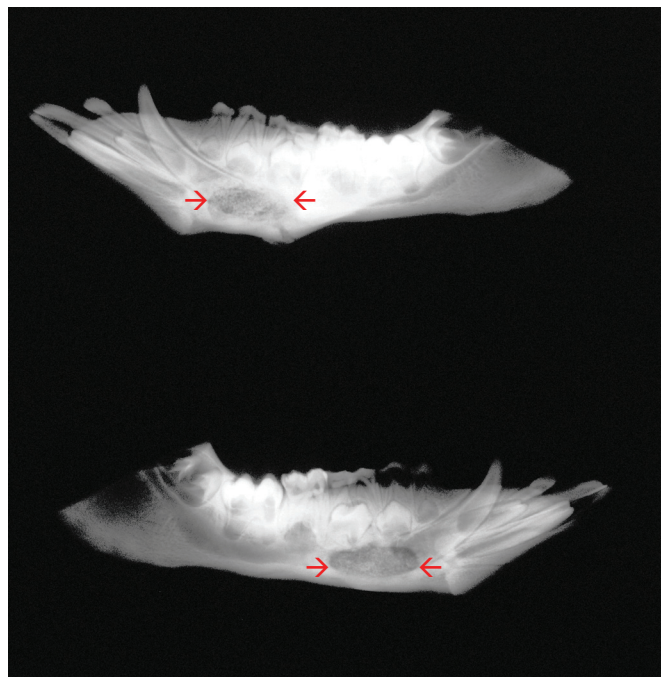


Abb.24: Postmortale Röntgenaufnahme der durchtrennten Unterkieferhälften im seitlichen Strahlengang (Pfeile markieren die sichtbaren Restdefekte)

3.4 Histologische Untersuchungen

3.4.1 Anfertigung der Präparate

Nach 7tägigem Fixieren der Knochenproben in 4%igem neutralen, gepufferten Formalin wurden die Knochenblöcke in Abhängigkeit von ihrer Länge in 8-12 Scheiben zersägt und nummeriert. Die erste Hälfte der Knochenscheiben (4-6 Stück) wurde nach einer Kunststoffeinbettung (Technovit 7200 V2C, Fa. Heraeus Kulzer, Hanau) mittels Trenn-Dünnschliff- Technik (DONATH und BREUNER 1982) bearbeitet. Pro Knochenscheibe wurde ein Schliffpräparat mit Giemsa-Toluidinblau gefärbt (Abb. 25). Die verbleibenden Knochenscheiben (4-6 Stück) wurden in gesättigter EDTA- Lösung entkalkt und nach anschließender Paraffineinbettung mit dem Mikrotom (Jung Supercut 2065, Leica, Heidelberg) geschnitten. Pro Knochenscheibe wurden 5 Präparate mit Hämatoxylin- Eosin (HE) gefärbt (Abb. 26). Für die qualitative Beurteilung wurden zusätzlich ausgewählte Präparate beider Gruppen nach Masson-Goldner gefärbt.

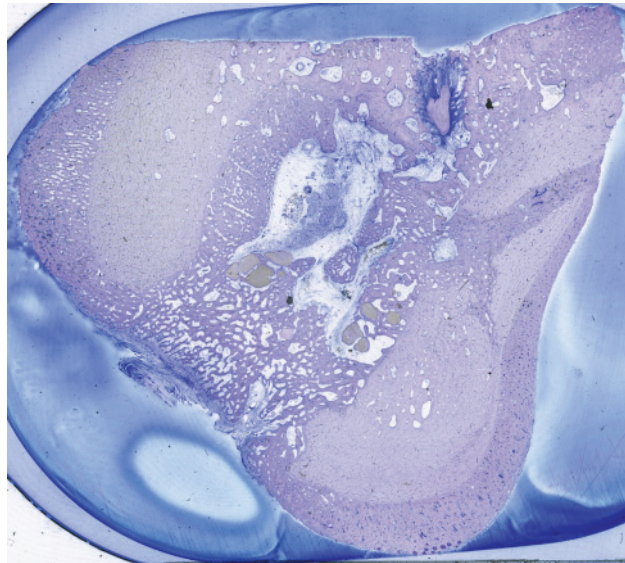


Abb. 25: Eingesanntes Dünnschliffpräparat (1200dpi) der Defektregion 5 Wochen nach Implantation des KAM Ostim®, Giemsa- Toluidinblau-Färbung (Vergr.: 3x)

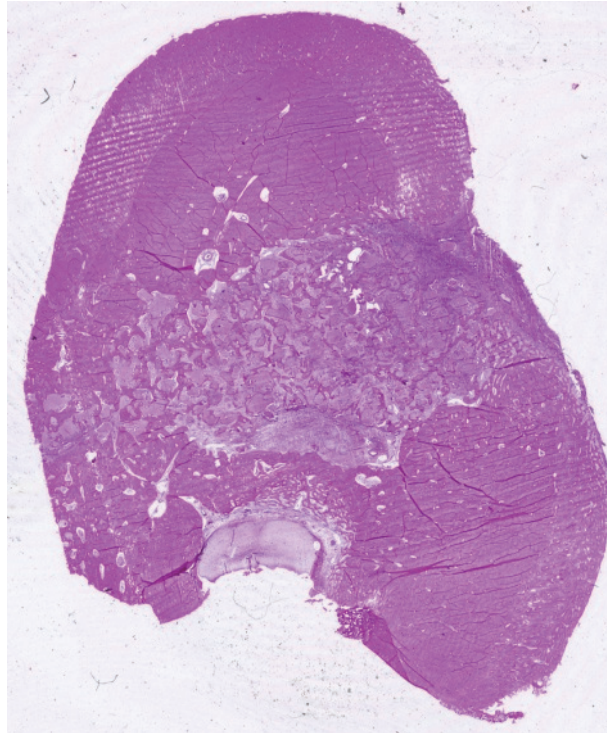


Abb. 26: Eingesanntes entkalktes Präparat (1200dpi) der Defektregion 5 Wochen nach Implantation des KAM, NanoBone®, HE-Färbung (Vergr.: 3x)

3.4.2 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchung

Die semiquantitative Auswertung erfolgte mikroskopisch mit maximal 40facher Vergrößerung, wobei die Präparate zuvor in Hinsicht auf die Qualität selektiert wurden. Nur die eindeutig auswertbaren Schnitte bzw. Schliffe wurden bezüglich der Knochenneubildung im Zentrum und Randbereich der Defekte sowie hinsichtlich des Resorptionsverhaltens der KAM beurteilt. Hierbei wurden auch Entzündungszellen, resorptiv tätige Makrophagen und Osteoklasten registriert. Es erfolgte zudem eine Bewertung von nachweisbaren KAM-assoziierten Knochenneubildungen resp. Verbundosteogenesen im zentralen Defektareal.

Zur semiquantitativen feingeweblichen Analyse wurden folgende Parameter herangezogen:

1. noch vorhandenes Biomaterial
2. Ausmaß der Knochenneubildung
3. Entzündungszeichen
4. KAM-assoziierte Knochenbildung resp. Verbundosteogenese im Zentrum des Defektes

Diese 4 Parameter wurden in folgende 4 Stufen quantitativ graduiert: (0) kein, (1) gering, (2) deutlich, (3) stark. Darüber hinaus wurde die Kategorie (x) als nicht auswertbar definiert.

Zusätzlich wurden Besonderheiten notiert, wie vorhandene Hohlräume (HR) bzw. ein angeschnittener Mandibularkanal (MK) oder in den Defektbereich hineinragende Zähne (Z). Die Auswertung erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Version Office XP bzw. Office 2007, Firma Microsoft®, Redmond, Washington/USA).

3.4.3 Histomorphometrie

Zunächst erfolgte eine Digitalisierung von jeweils 10 repräsentativen Schliff- bzw. Schnittpräparaten eines jeden Defektes (jeweils 5 Präparate mit HE- Färbung bzw. mit Giemsa-Toluidinfärbung) mittels eines Colorscanners im Rechenzentrum der Universität Rostock mit einer Auflösung von 1200dpi (Dots per inch). Somit standen insgesamt 60 Präparate pro Untersuchungsgruppe für die anschließende histomorphometrische Auswertung mit dem Software-Programm ANALYSIS der Firma SIS (Soft Imaging Systems, Münster) zur Verfügung.

Da sich eine automatische Farbdetektion der histologischen Präparate mit diesem Programm als technisch schwierig erwies (geringere Farbunterschiede konnten nicht exakt wahrgenommen werden), wurden die digitalisierten Bilder mittels des Programmes Photoshop® 7.0 (Firma Adobe®, San Jose, Ca/USA) bearbeitet. Dieses ermöglichte eine zusätzliche farbliche Kontrastierung von auszumessenden Flächen, wie in den Abb. 27 und 28 dargestellt ist. Die Flächen der verbliebenen Biomaterialien wurden zuvor gesondert per Hand durch Umfahren mit dem Cursor (HE-Schnitte) bzw. mittels automatischer Farbdetektion (Giemsa-Toluidin-Präparate) ermittelt.

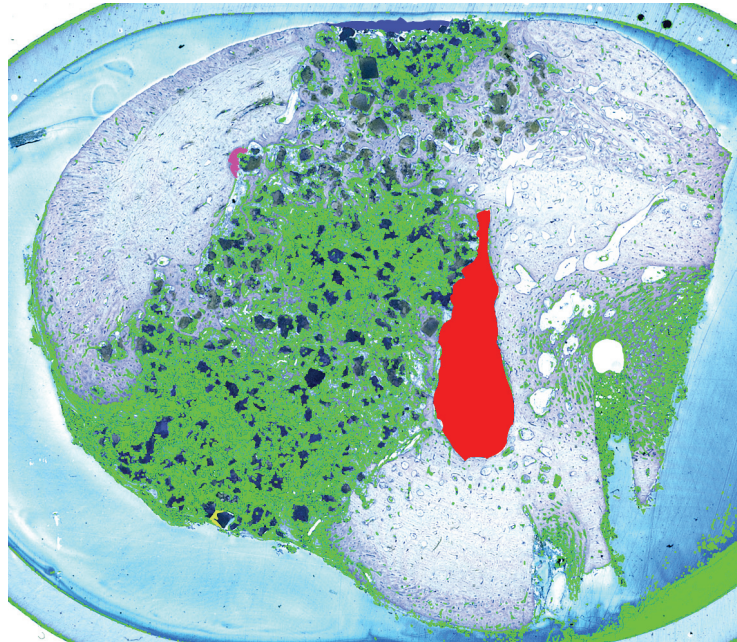


Abb. 27 : Bearbeitetes, eingescanntes Dünnschliffpräparat (Toluidinblau-Färbung) der Defektregion 5 Wochen nach Implantation von NanoBone®, 1200dpi (Vergr.: 3x)



Abb. 28: Bearbeitetes, eingescanntes, entkalktes Präparat der Defektregion (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) 5 Wochen nach Implantation von Ostim® 1200dpi (Vergr.: 3x)

Vor den histomorphometrischen Messungen erfolgte die Kalibrierung der Bilder. Hierzu wurde eine vorbereitete Skala eingescannt. Da die Auflösung des Scanners bekannt war, konnten die entsprechenden Flächen auf den Bildern nun problemlos ausgemessen wer-

den. Das Software-Programm ANALYSIS detektiert die farblich markierten Flächen in mm², die dann in Form von Tabellen angezeigt werden. Für die Versuche wurden die in Tabelle 5 angegebenen Parameter bestimmt.

Tabelle 5: histomorphometrisch bestimmte Parameter, Abkürzungen und Erläuterungen		
Parameter	Abkürzung	Erläuterung
Biomaterial- anteile	BM	noch in der Defektregion vorhandenes Biomaterial
Bindegewebs- anteile	BGW	im Defektbereich vorhandenes Bindegewebe, inklusive Mandibularkanal (falls angeschnitten)
Erweiterte Markräume	EM	ungewöhnliche Erweiterungen der Knochenmarkräume
Vakanzen	V	oberflächliche Defekteinziehungen
Artefakte	AF	Auffälligkeiten ohne physiologisches oder pathologisches Korrelat z.B. Hohlräume durch herausgefallenes Material (BM, KN*, BGW)

*KN: Knochen

Da bereits nach 5 Wochen eine genaue histologische Abgrenzung der ursprünglichen Defektregion nicht mehr möglich war, wurden den histomorphometrischen Berechnungen die klinisch ermittelten Defektgrößen zugrunde gelegt. Hierbei blieben Differenzen durch kleinere Unregelmäßigkeiten innerhalb der Defektregion unberücksichtigt. Zahnanschnitte, die gelegentlich den Defektbereich tangierten, wurden von der Ausgangsdefektgröße subtrahiert. Auf dieser Grundlage erfolgte die Berechnung der Restdefektgröße sowie der daraus resultierende Anteil der Knochenneubildung.

3.5 Statistische Auswertung

Die histomorphometrisch ermittelten Daten wurden im Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock mit dem Softwareprogramm SPSS auf Signifikanzen überprüft. Als Kontrollgruppe (C) wurden die von KRATZKE 2003 ermittelten Werte für die Leerdefekte herangezogen. Als limitierend für die statistischen Untersuchung erwiesen sich die relativ kleine Zahl der Versuchstiere und ihre abweichende Anzahl (n 4) in der Kontrollgruppe (C). Zudem erfolgten die Berechnungen damals auf Grundlage histomorphometrisch gemessener Defektgrößen. Diese mussten für den Vergleich mit den bei Ostim® (N) und NanoBone® (P) ermittelten Werten auf die klinisch bestimmten Defektgrößen hochgerechnet werden. Schwerpunktmäßig wurden die Knochenneubildung und die Defektverkleinerung zwischen diesen drei Gruppen verglichen. Bei den Gruppen N und P erfolgte zudem eine gesonderte statistische Auswertung aller histomorphometrisch gemessenen Werte.

Für alle erhobenen Parameter und Gruppen wurden neben Mittelwerten und Standardabweichungen paarweise Vergleiche mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt und mögliche Signifikanzen ermittelt (KUNDT, KRENTZ, 2003).

4. Ergebnisse

4.1 Makroskopische Ergebnisse

Intraoperativ wurde die Verarbeitbarkeit beider Materialien als gut eingeschätzt.

Ostim® liegt bereits in pastöser Form gebrauchsfertig in einer Spritze zur Applikation vor und lässt sich hiermit gut und formschlüssig in die Defekte applizieren. NanoBone® wird als Granulat hergestellt und muss vor Gebrauch mit Blut angemischt werden. Es lässt sich dann ebenfalls sehr gut formschlüssig in Defekte füllen. Aufgrund der festeren Konsistenz kann es besser modelliert werden und ist ortsständiger.

5 Wochen nach Implantation beider KAM waren die gesetzten Defekte an den Mandibulae noch klinisch erkennbar. Eine vollständige Ossifikation der Knochendefekte war nach diesem kurzen Zeitraum nicht erfolgt, so dass messbare Restdefekte vorhanden waren (Abb. 29 + 30). Im Gegensatz zu Ostim® konnten bei NanoBone® noch partiell biodegradierte Reste des KAM nachgewiesen werden (Abb. 31 + 32). Bei beiden Gruppen fanden sich makroskopisch nur minimale entzündliche Reaktionen.

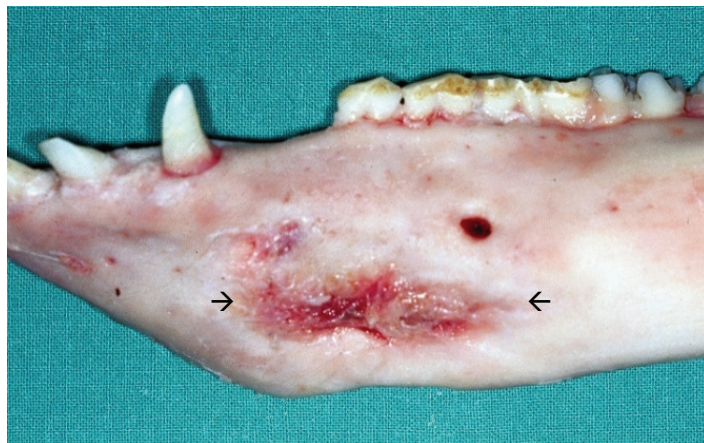


Abb.29: Klinischer Befund nach 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Tier N1li) bukkale Ansicht
Die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt.

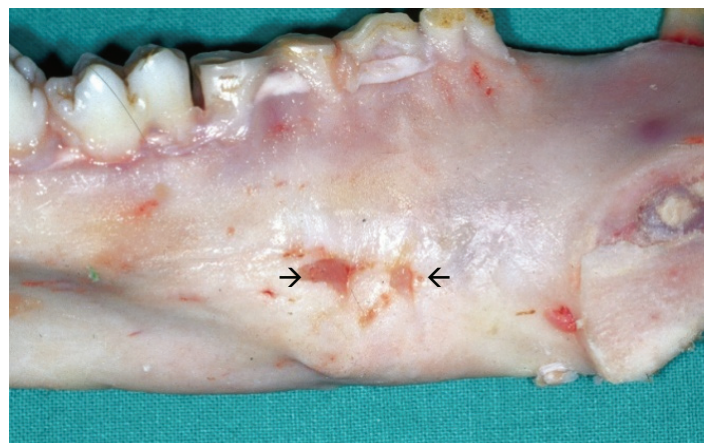


Abb.30: Klinischer Befund nach 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Tier N2re) linguale Ansicht
Die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt.

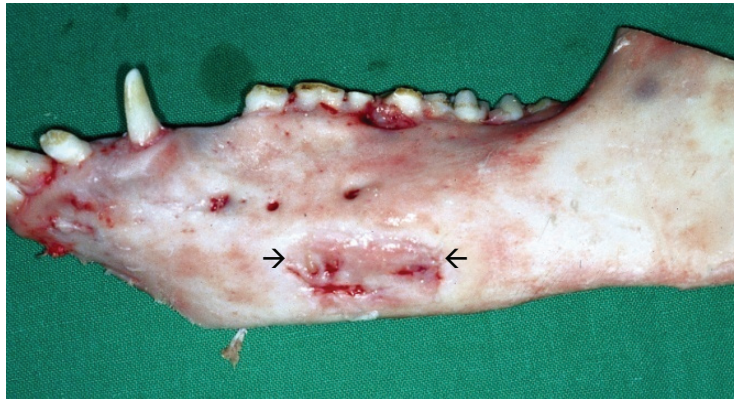


Abb. 31: Klinischer Befund 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P1 li) bukkale Ansicht. Die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt.

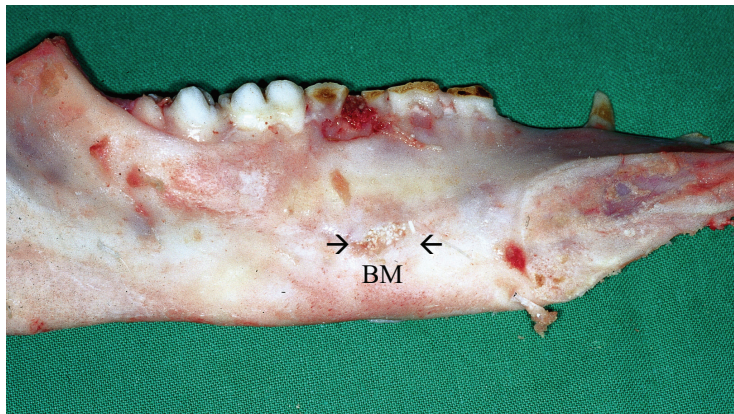


Abb. 32: Klinischer Befund 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P1 re) Ansicht von lingual. Die Pfeile zeigen die Defektregion mit Biomaterialresten (BM)

Die klinisch zu Beginn der Versuche bestimmten Defektgrößen in cm^3 (sog. Ausgangsdefekte) und verbliebene Knochendefekte am Ende der Untersuchungen (sog. Restdefekte) werden in Tabelle 6 wiedergegeben. Bezüglich der Ausgangsdefekte zeigten beide Gruppen kaum Abweichungen, was auf eine korrekte Durchführung der Versuche schließen lässt. Alle Defektgrößen liegen oberhalb der für einen Critical-Size-Defekt geforderten 5cm^3 bei relativ geringen Standardabweichungen. Bei den Restdefekten hingegen ist die Standardabweichung bei NanoBone® wesentlich (nahezu viermal) größer als bei Ostim®. Die durchschnittliche Verkleinerung der klinisch nach 5 Wochen ermittelten Defektgröße lag für Ostim® bei 78,5%, wohingegen bei NanoBone® eine Verkleinerung von 58,7% ermittelt wurde.

Tabelle 6:					
Klinisch ermittelte Ausgangs- und Restdefekte der Versuchsgruppen N und P					
Gruppe N (Ostim®)	Ausgangsdefekt (cm³)	Restdefekt (cm³)	Gruppe P (NanoBone®)	Ausgangsdefekt (cm³)	Restdefekt (cm³)
N1li	5,52	1,54	P1li	5,62	2,81
N1re	5,72	1,08	P1re	5,52	2,38
N2li	5,23	1,08	P2li	5,24	2,50
N2re	5,72	1,04	P2re	5,62	3,08
N3li	5,23	1,06	P3li	5,34	1,32
N3re	5,10	1,19	P3re	5,34	1,40
Mittelwert	5,42	1,17	Mittelwert	5,45	2,25
Standardabweichung	0,61	0,43	Standardabweichung	0,36	1,63

Zusammenfassend zeigen die klinischen Untersuchungen, dass auf der Grundlage der nahezu identischen Ausgangsdefekte ein Vergleich beider KAM gut möglich ist. Ostim® weist bezüglich der Restdefektgrößen und der damit verbundenen Knochenneubildung initial deutlich bessere Werte auf. Bei NanoBone® sind nach 5 Wochen makroskopisch noch Restpartikel des Biomaterials sichtbar, wohingegen bei Ostim® nahezu kein KAM mehr nachweisbar ist.

4.2 Röntgenologische Ergebnisse

Von allen 6 Versuchstieren wurden unmittelbar postoperativ sowie nach der 5 Wochen später erfolgten Tötung Röntgenaufnahmen von beiden Unterkieferseiten angefertigt.

Die folgenden Abbildungen zeigen Röntgenbefunde von Knochendefekten in UK-Lateralaufnahme-Technik unmittelbar nach Implantation von Ostim® (Abb. 33+34) bzw. NanoBone® (Abb. 35 + 36).



Abb. 33:
Unterkiefer-
Lateralaufnahme (Tier N1
links) nach Ostim®-
Implantation (Pfeile mar-
kieren Defektregion)

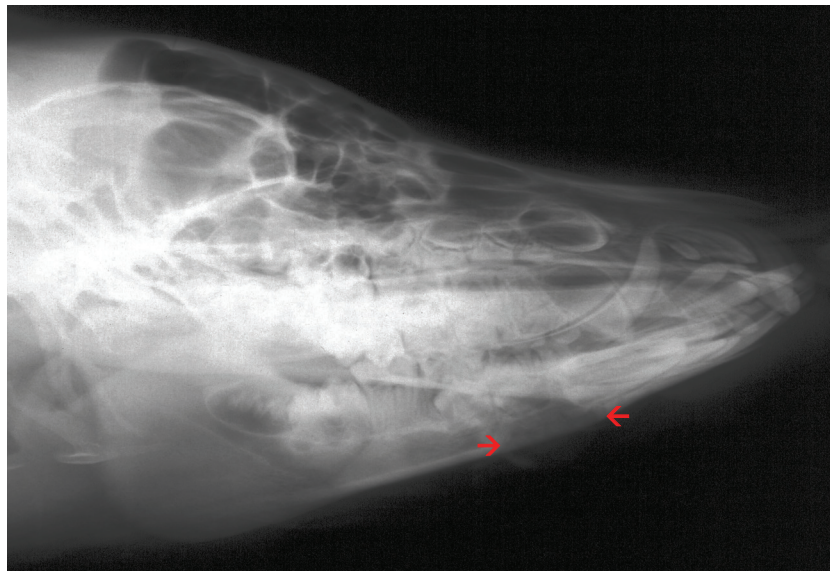


Abb. 34:
Unterkiefer-
Lateralaufnahme (Tier N1
rechts.) nach Ostim®-
Implantation (Pfeile mar-
kieren Defektregion)

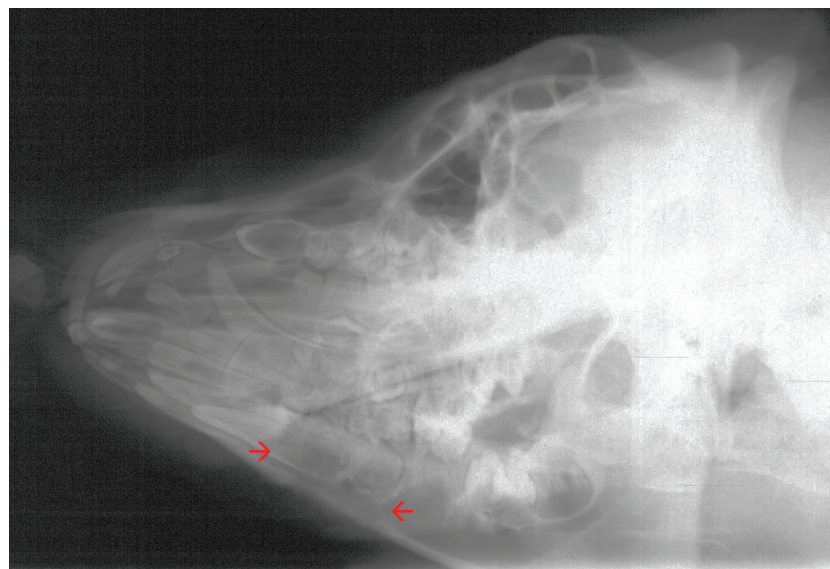


Abb. 35:
Unterkiefer-
Lateralaufnahme (Tier P2
links) nach NanoBone®-
Implantation (Pfeile mar-
kieren Defektregion)

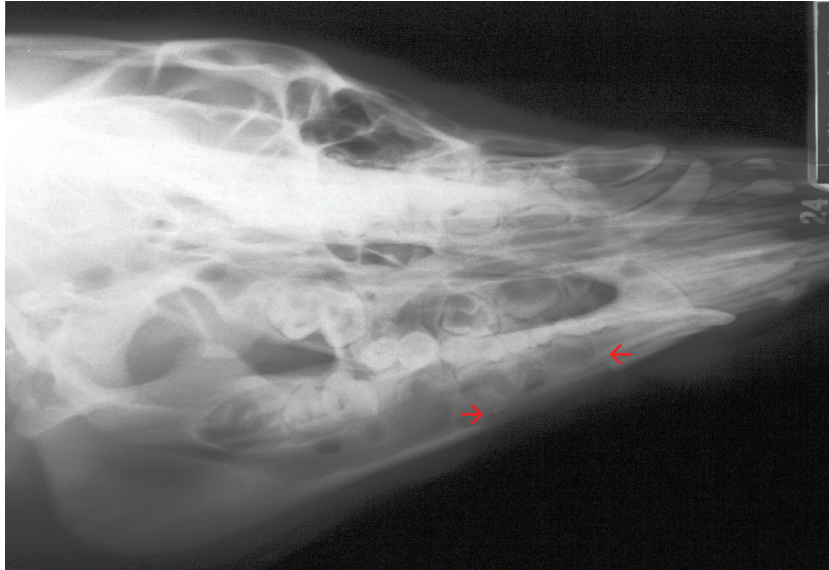


Abb. 36:
 Unterkiefer-
 Lateralaufnahme (Tier P2
 rechts) nach NanoBone®-
 Implantation (Pfeile mar-
 kieren Defektregion)

Am Versuchsende 5 Wochen nach Implantation der KAM - wurden nach Tötung der Tiere und Durchtrennung der Mandibulae in der Mittellinie vergleichende Röntgenaufnahmen beider Kieferhälften im seitlichen Strahlengang angefertigt (Abb. 37 + 38).

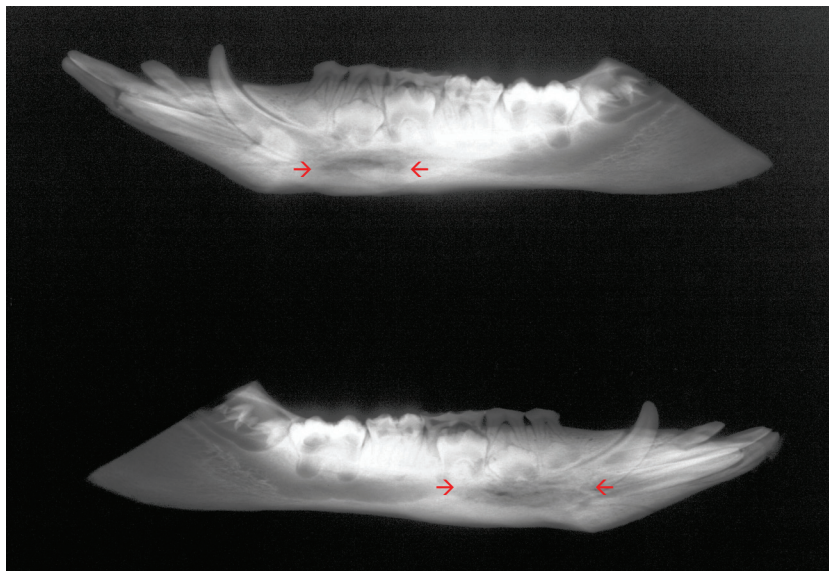


Abb. 37:
 Mandibulahälften im
 seitlichen Strahlengang
 (Tier N1) 5 Wochen nach
 Implantation von Ostim®
 (Pfeile markieren sichtbare
 Restdefekte)

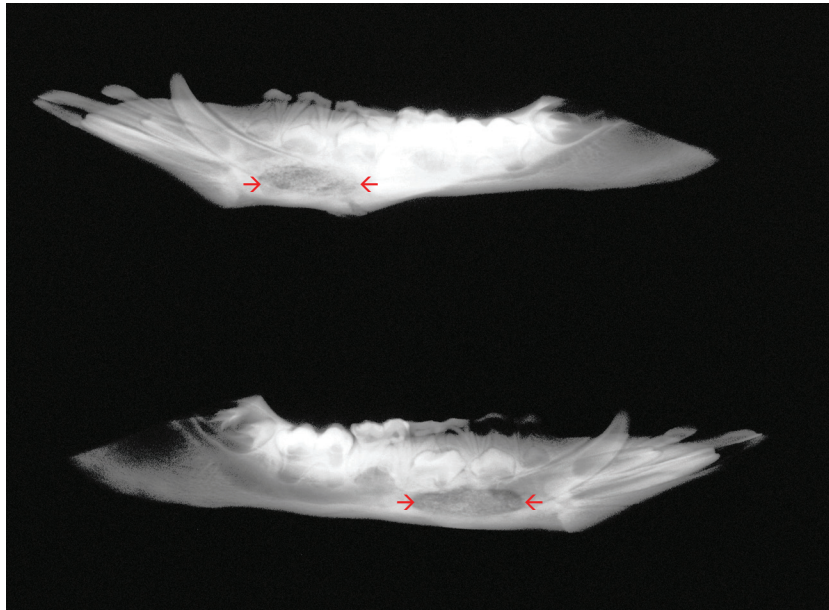


Abb. 38:
Mandibulalhälften im seitlichen Strahlengang (Tier P2) 5 Wochen nach Implantation von NanoBone®,
(Pfeile markieren sichtbare Restdefekte)

Die Qualität der Röntgenaufnahmen variiert trotz Anfertigung unter reproduzierbaren Kautelen. Insbesondere bei den UK-Lateralaufnahmen gelingt nicht immer eine überlappungsfreie Darstellung, was die Auswertung der Bilder erschwert.

Die röntgenologischen Anfangsbefunde beider KAM sind ähnlich. Es zeigt sich eine scharf begrenzte leichte Aufhellung im Bereich der gesetzten Defekte, wobei die Röntgenkontrastgebung von NanoBone® der von natürlichem Knochen ähnelt, wodurch eine exakte Abgrenzung der Defekte erschwert wird. Dennoch lassen sie sich am Beginn röntgenologisch vom restlichen Knochen differenzieren, wobei eine homogene Füllung mit dem KAM erkennbar ist.

5 Wochen nach Implantationszeit beider KAM sind röntgenologisch noch nicht ossär durchbaute Anteile in den ehemaligen Defektregionen nachweisbar (Abb. 37 und 38). Bei den Tieren der Gruppe N (Ostim®) ist im kortikalen Bereich der Defektregion eine recht homogene Ossifikation zu erkennen, die Röntgenkontrastgebung der defektnahen Kortikalis ist jedoch leicht herabgesetzt. Im Zentrum der Defekte sind noch unscharf begrenzte Aufhellungsareale mit leicht wolkiger Struktur sowie Hohlrumbildungen sichtbar. Das KAM Ostim® ist röntgenologisch nicht differenzierbar (Abb. 39 und 40).

Nach 5-wöchiger Implantationszeit zeigen die Röntgenaufnahmen der Versuchstiere der Gruppe P (NanoBone®) ebenfalls eine durchgehende Ossifikation im Bereich der Kortikalis des Unterkiefers. Dieser Bereich erscheint etwas dichter als bei den Tieren der Gruppe N (Abb. 41 und 42). In der Defektregion sind zentral umschriebene, abgegrenzte Aufhellungsareale erkennbar, die mit granulären teilweise knochendichten Strukturen abwechseln. Hierbei könnte es sich um durch Resorptionsprozesse aufgelockertes, granulä-

res Biomaterial handeln bzw. kleinere zentral gelegene Ossifikationen. Die erkennbaren Restdefekte erscheinen im Vergleich zur Gruppe N etwas größer.

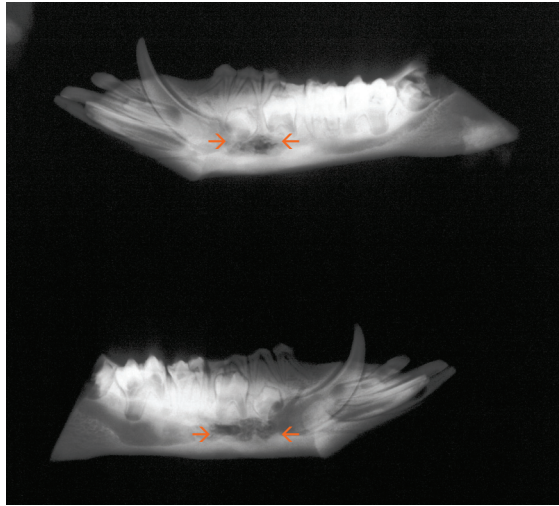


Abb. 39

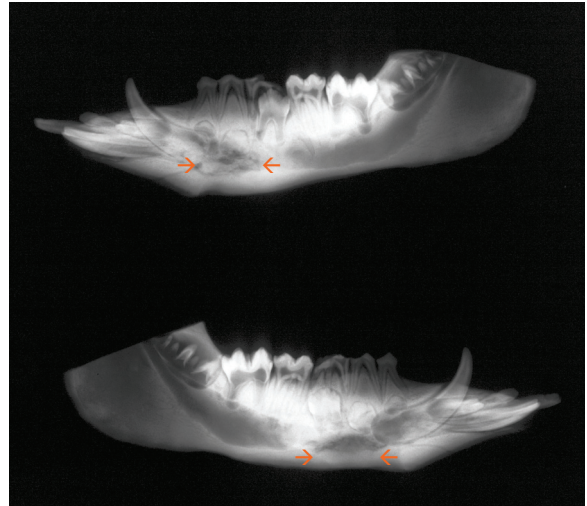


Abb. 40

Röntgenaufnahmen post mortem der Tiere N2 (Abb. 39) und N3 (Abb. 40), jeweils linke und rechte Hälfte der Mandibula, 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Pfeile markieren sichtbare Restdefekte)

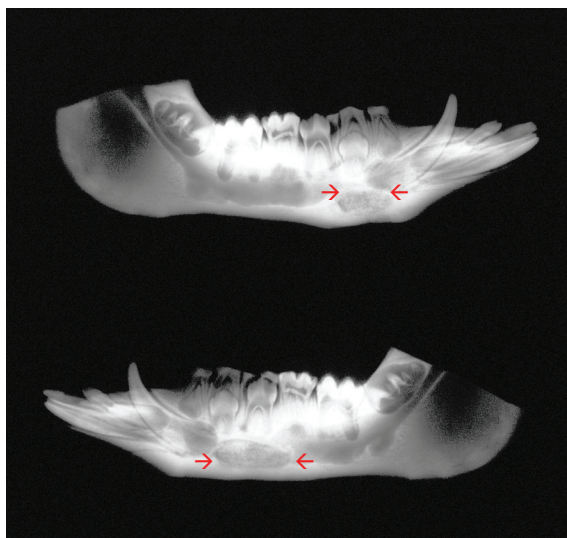


Abb. 41

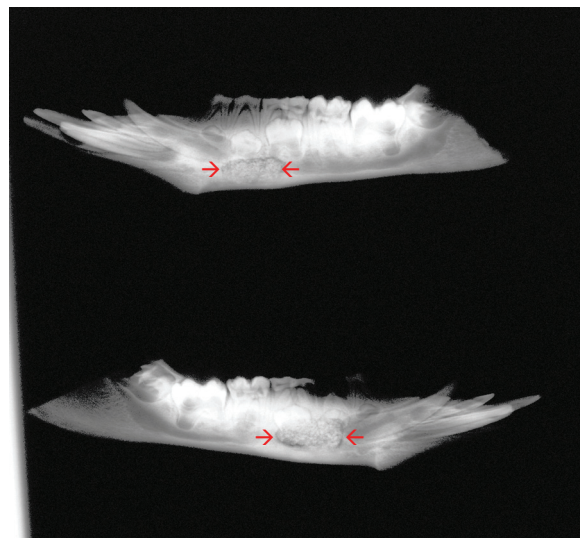


Abb. 42

Röntgenaufnahmen post mortem der Tiere P1 (Abb. 30) und P3 (Abb. 31), jeweils linke und rechte Hälfte der Mandibula, 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Pfeile markieren sichtbare Restdefekte)

4.3 Mikroskopische Ergebnisse

4.3.1 Qualitative Histologische Ergebnisse

Für die qualitative histologische Untersuchung wurden alle vorhandenen Schnitte unter dem Mikroskop mit maximal 40facher Vergrößerung untersucht. Es lagen jeweils 4-6 Giemsa-Toluidin gefärbte Trenn-Dünnschliff-Präparate der anterioren Defekthälfte sowie 20-30 entkalkte und HE gefärbte Schnittpräparate der posterioren Defekthälfte zur Beurteilung vor. Es sollten insbesondere das Ausmaß und die Lokalisation der Knochenneubildung sowie das Degradationsverhalten der KAM histologisch bewertet werden. Zudem sollte geklärt werden, inwieweit die KAM ins ossäre Remodelling einbezogen werden.

Generell ließen sich die mit Giemsa-Toluidinblau gefärbten Knochenschliffe besser beurteilen, als die HE-gefärbten Präparate, da sich bei diesen eine Abgrenzung der Biomaterialien weniger deutlich darstellte (Abb. 43 + 44). Bei der HE- Technik wird der Knochen violett angefärbt, während Bindegewebe sich etwas dunkler bzw. bläulich darstellt. Demgegenüber erscheinen beide KAM heller und homogener. In der Giemsa-Toluidinfärbung (Abb. 45 +46) hingegen färbt sich das Biomaterial bräunlich an, wobei sich Ostim® wesentlich heller darstellt als NanoBone®, Bindegewebe ist ebenfalls blau angefärbt, während der Knochen blaugrau in Erscheinung tritt.

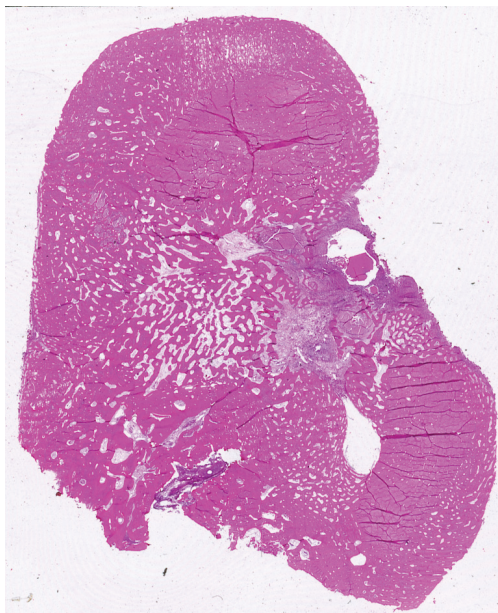


Abb. 43

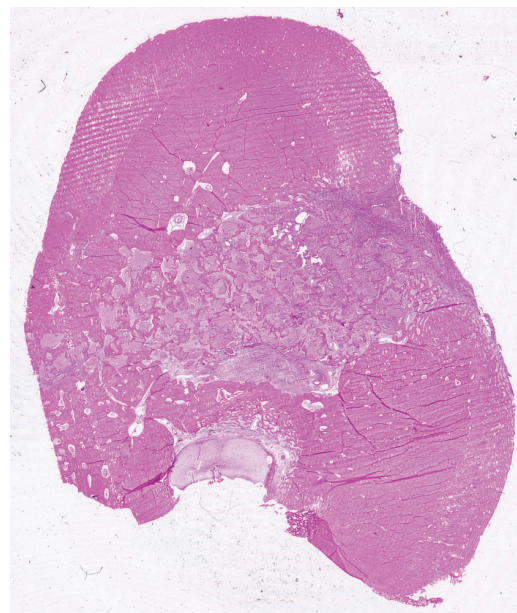


Abb. 44

Defektquerschnitte 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Abb. 32) bzw. NanoBone® (Abb. 33), entkalkte Präparate, HE-Färbung (gescannt mit 1200 dpi, Vergr.: 3x)

5 Wochen nach Implantation waren bei beiden KAM histologisch Restdefekte nachweisbar (Abb. 45 + 46). Sie befanden sich insbesondere im zentralen Bereich der Defektregion. Innerhalb der Restdefekte war neben Bindegewebsanteilen neu gebildeter Knochen nachweisbar. Biomaterialreste fanden sich nahezu nur bei Verwendung von NanoBone®. (Gruppe P). Bei der Anwendung beider KAM sind entzündliche Prozesse nur geringfügig vorhanden und somit als vernachlässigbar einzustufen.

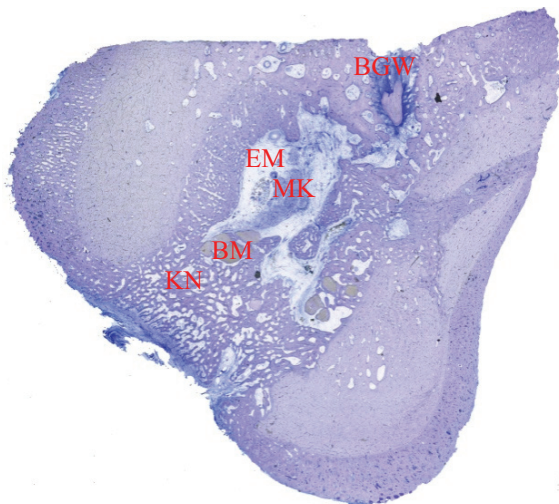


Abb.45: Defektquerschnitt (gescannt mit 1200dpi) eines mit Ostim® gefüllten Defektes (N2li2) nach 5 Wochen (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin-Färbung, Vergr. 3x)
Zentral sehr gute Ossifikation, Biomaterial ist nur noch vereinzelt vorhanden, Hohlraumbildung, geringfügiger Bindegewebsanteil

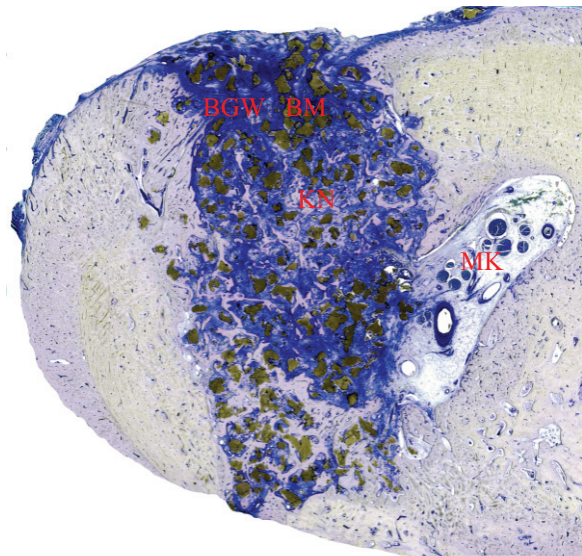


Abb.46: Defektquerschnitt (gescannt mit 1200dpi) eines mit NanoBone® gefüllten Defektes (P1re4) nach 5 Wochen (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin-Färbung, Vergr. 3x)
Zentral noch Biomaterialreste, teilweise in direktem Kontakt mit Knochen, sowie Bindegewebe

BGM = Bindegewebe, EM= Erweiterter Markraum, MK= Mandibularkanal, BM= Biomaterial, KN= Knochen

In den mit Ostim® versorgten Defekten (Gruppe N) hat bereits nach 5 Wochen eine nahezu vollständige Resorption des KAM stattgefunden. Nur bei wenigen Präparaten und höherer Vergrößerung lassen sich kristalline Reste des KAM - in den Schliffpräparaten hellbraun gefärbt- erkennen. Durch die sehr schnelle Resorption, die auch durch andere Studien bestätigt wurde, entstehen bei diesem Material häufig Hohlräume, die nur vereinzelt mit Bindegewebe gefüllt sind. Daneben entstehen z. T. Vakanzen (Einziehungen an der Defektoberfläche).

Dennoch zeigen die mit Ostim® gefüllten Defekte eine vergleichsweise starke defektrandbezogene, z.T. auch zentrale Knochenneubildung (Abb.47), was auf gute osteokonduktive Eigenschaften des KAM hindeutet. Der neu gebildete Knochen hat eine aufgelockerte

Struktur, bindegewebige Bestandteile sind nur wenige vorhanden. Insofern Biomaterialreste noch zu beobachten sind, sind diese häufig von Hohlräumen, seltener direkt von Knochen umschlossen.

Häufig befinden sich in der Umgebung residueller Biomaterialreste neben Bindegewebsanteilen inflammatorische Zellen, was auf eine entzündliche Resorption des Materials schließen lässt (Abb.48). Da das KAM nahezu vollständig resorbiert ist, lassen sich keine Aussagen bezüglich einer Verbundosteogenese machen.

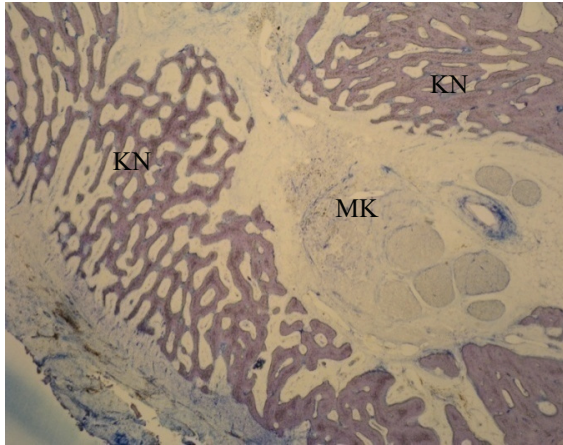


Abb.47: Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 45 Ostim® 5 Wochen in situ, Vergr.: 40 X
KN-Knochen, MK-Mandibularkanal

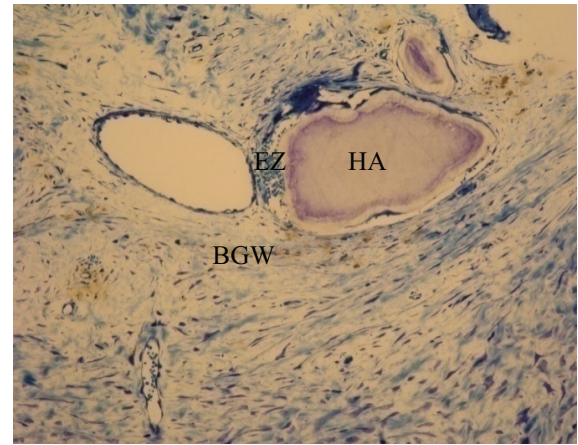


Abb.48: Ausschnittsvergrößerung Ostim® 5 Wochen in situ, Vergr.: 100 X
EZ-Entzündungszellen, HA-Hydroxylapatit, BGW-Bindegewebe

In den Übersichtsaufnahmen 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® in die Knochendefekte dominieren Knochengewebe, Bindegewebe sowie Biomaterialreste im Defektbereich (Abb. 46). Der knöcherne Durchbau der Defekte ist regelmäßig, die randständige Ossifikation erscheint etwas geringer als bei der Gruppe N (Ostim®). Jedoch zeigt sich im Zentrum der Defekte eine stärkere Knochenbildung, was auf osteoprotektive Eigenschaften des KAM NanoBone® hindeutet (Abb. 49). Zudem stellen die verhältnismäßig großen, entzündungsfreien Bindegewebsanteile wahrscheinlich eine Vorstufe des Knochens im Rahmen der desmalen Ossifikation dar. Daneben fällt in Abb. 49 auf, dass die Siliziumdioxid-Matrix bereits vollständig resorbiert ist, so dass ein direkter Kontakt zwischen Biomaterial und Knochen im Sinne einer Verbundosteogenese hergestellt wurde, was besonders im zentralen Defektbereich auffällt.

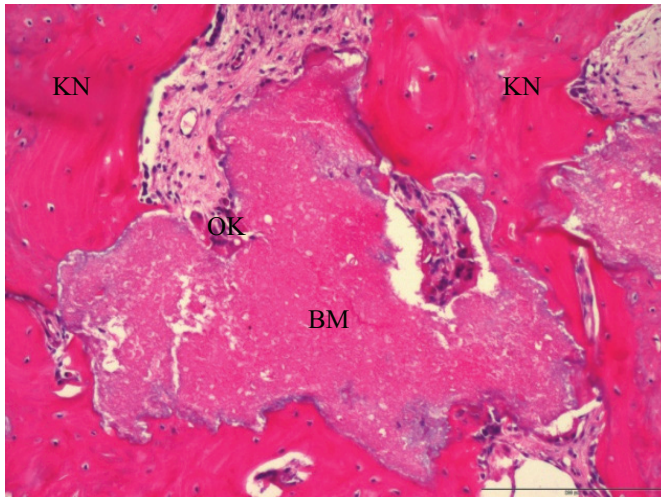


Abb.49:
Verbundosteogenese im Bereich
von NanoBone®-Restpartikeln,
Abbau des KAM durch Osteoklasten, Vergr.: 100 X
KN-Knochen
OK-Osteoklasten
BM-Biomaterial

Direkt an den HA-Partikeln des KAM sind Riesenzellen sichtbar, die einen lakunären Abbau bewirken (Abb. 50 + 51). Durch ergänzende histochemische Untersuchungen, speziell eine positive TRAP-Reaktion (Tartrat resistente saure Phosphatase), konnte im Rahmen anderer Untersuchungen (MEIER, WOLF, 2007) nachgewiesen werden, dass es sich bei diesen Riesenzellen um Osteoklasten handelt.

Somit wird NanoBone® ebenso wie natürlicher Knochen durch Osteoklasten abgebaut und so in den Prozess des ossären Remodellings einbezogen. 5 Wochen nach Implantation des KAM befinden sich noch nicht biodegradierte Restpartikel des Materials in der Defektregion. Ihr Anteil erscheint angepasst an die zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossene Knochenbildung. Im Gegensatz zu den Vergleichspräparaten mit Ostim®, bei denen die Biodegradation schneller erfolgt, werden so zentrale Hohlrumbildungen mit Stabilitätsverlusten in der Defektregion vermieden.

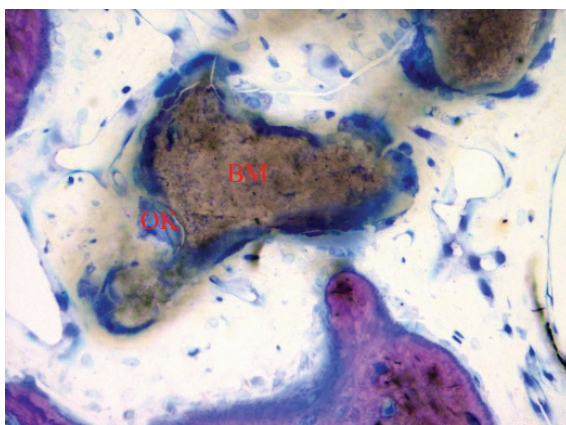


Abb.50 Giemsa- Toluidinblau

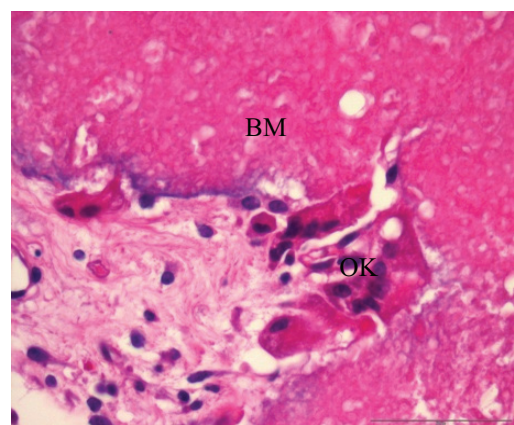


Abb. 51 HE-Färbung

Die Ausschnittsvergrößerungen (100x) aus Abbildung 49 zeigen NanoBone®-Partikel, die durch als Osteoklasten identifizierte Riesenzellen abgebaut werden

OK= Osteoklasten, BM= Biomaterial

4.3.2 Semiquantitative histologische Untersuchung

Die semiquantitative histologische Untersuchung ermöglicht eine orientierende Gegenüberstellung der Knochenneubildung innerhalb der Defekte sowie der Biodegradation der KAM Ostim® bzw. NanoBone®.

Einige wenige histologische Präparate waren für diese quantitative histologische Untersuchung nicht verwertbar, da sie Materialverluste, Faltungen oder Fixierungsfehler aufwiesen bzw. Zahnwurzeln Kontakt zum Defekt hatten. Gelegentlich lagen Schnittstufen außerhalb der Defektregion. Auch diese Präparate blieben unberücksichtigt.

Es wurden folgende bereits in Material und Methode beschriebene Kriterien bei der Auswertung zugrunde gelegt: Grad der Knochenneubildung, vorhandene KAM-Anteile, nachweisbare Entzündungszeichen sowie das Vorhandensein einer zentralen Verbundosteogenese resp. KAM-assoziierte Knochenbildung im Zentrum des Defektes, wobei eine abgestufte Bewertung erfolgte (0-kein, 1-gering, 2-deutlich, 3-stark, x-nicht auswertbar). Für die Einzeldefekte wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und nachfolgend die Gruppenmittelwerte errechnet. Um eine bessere Vergleichsbasis zu haben, wurde zudem der prozentuale Anteil der Mittelwerte bezogen auf den Höchstwert von 3,0 ermittelt. Einschränkend ist anzumerken, dass der absolute Höchstwert von 3 (stark) nicht mit 100% gleichzusetzen ist, da z. B. eine Verknöcherung des Ursprungsdefektes von 90% bereits als starke Knochenneubildung zu bewertet wäre. Die Prozentangaben dienen somit nur einer Orientierung, um eine vergleichende Bewertung der untersuchten KAM zu erleichtern.

Grundsätzlich ist für beide Versuchsgruppen zu bemerken, dass die Knochenneubildung an den Randzonen der Defekte stärker als im Zentrum war, was auf die bessere Vaskularisation, das Vorhandensein von Osteoprogenitorzellen und Wachstumsfaktoren im angrenzenden intakten Knochengewebe zurückzuführen sein dürfte.

4.3.2.1 Befunde der Gruppe N (Ostim®)

In dieser Versuchsgruppe standen 185 Präparate zur Verfügung, von denen nach kritischer Auswahl 117 für die semiquantitativen histologischen Untersuchungen geeignet waren.

Charakteristisch für die Präparate der Gruppe N war, eine schon nach 5 Wochen durchschnittlich zu beobachtende deutliche bis starke Knochenneubildung in den Defektbereichen; d.h. alle Mittelwerte für den Parameter Knochenbildung liegen über 2.

Die mittlere Knochenbildungsrate von 2,51 entspricht einem Prozentsatz von 83,67% des Maximalwertes 3. Der Mittelwert für Entzündungsreaktionen liegt bei 1,19 und ist somit als geringgradig einzustufen (Tab. 7). Wie bereits im Kapitel 4.2.1 beschrieben, sind Biomaterialreste nur noch in sehr geringem Maße vorhanden, so dass eine Beurteilung der Verbundosteogenese in den meisten Präparaten nicht möglich ist. Lediglich bei den Defekten des Tieres N2, in denen noch größere Biomaterialanteile nachweisbar waren, fanden sich zentral auch Hinweise auf eine Verbundosteogenese. Die Standardabweichungen waren mit Werten < 1 in der Gruppe N gering, was eine günstige Voraussetzung für die statistische Bewertung darstellt. Alle weiteren Einzelwerte sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Defekt (n=6)	Knochenbildung	Biomaterial	Entzündung	Zentrale Verbundosteogenese
N1li	2,67	0,51	1,36	0,00
N1re	2,30	0,73	1,73	0,00
N2li	2,14	1,33	1,25	0,54
N2re	2,15	0,46	0,56	0,12
N3li	2,81	0,49	1,07	0,00
N3re	3,00	0,30	1,16	0,00
Gruppenmittelwert	2,51	0,64	1,19	0,11
Standardabweichung	0,82	0,82	0,86	0,48

Bewertungskriterien: 0-kein, 1-gering, 2-deutlich, 3-stark

Stellvertretend sollen für Ostim® die Defekte mit der stärksten (N3re) und der geringsten Knochenneubildung (N2re) in Graphiken dargestellt werden, um die Lokalisation von Knochen, Entzündung, Kontaktosteogenesen und Biomaterial innerhalb der Defekte nachvollziehen zu können (Abb. 52 +55).

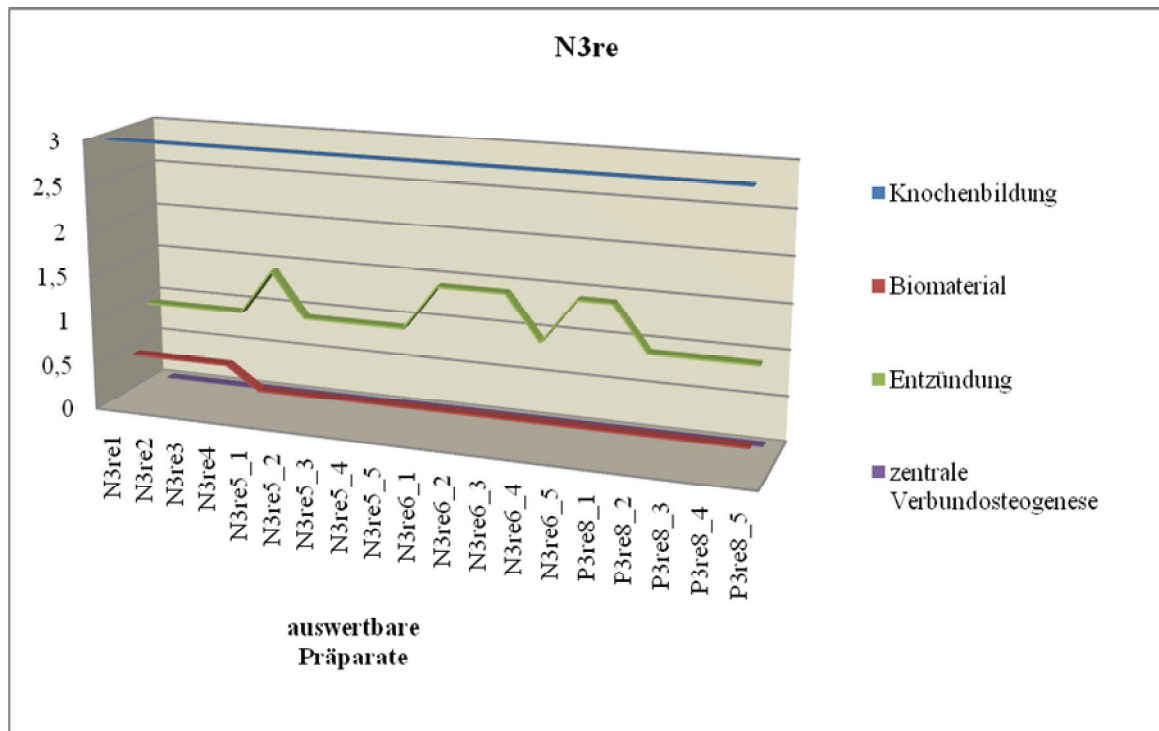


Abb. 52: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier N3 re. (Ostim®)

Innerhalb des Defektes beim Tier N3 re. war eine durchgehend starke Knochenneubildung zu verzeichnen, was in den histologischen Abbildungen 53 und 54 deutlich zur Darstellung kommt. Der ursprüngliche Defektbereich ist kaum noch zu erkennen, da er komplett mit Knochen durchbaut ist. Er zeigt eine aufgelockerte Struktur und z.T. erweiterte Markräume. Lediglich anhand des Übergangs zwischen Geflecht- und Lamellenknochen lässt sich ein ehemaliger Defektbereich erahnen. Es zeigt sich eine nahezu vollständige Resorption des Biomaterials, so dass Verbundosteogenesen im zentralen Defektbereich nicht nachgewiesen werden konnten. Die semiquantitativ ermittelten Werte für die Entzündungsreaktion liegen zwischen 1 und 1,5 und sind als sehr niedrig einzustufen.

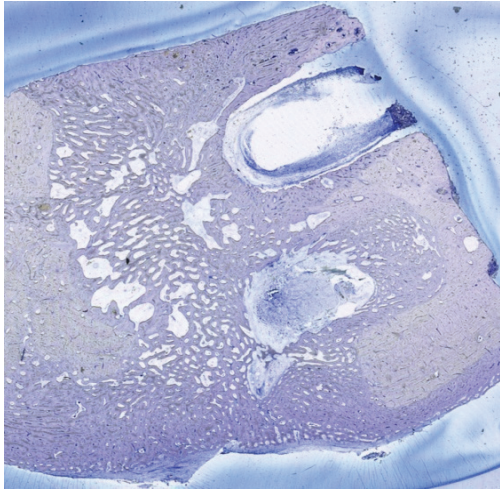


Abb.53: Giemsa –Toluidinblau-Färbung

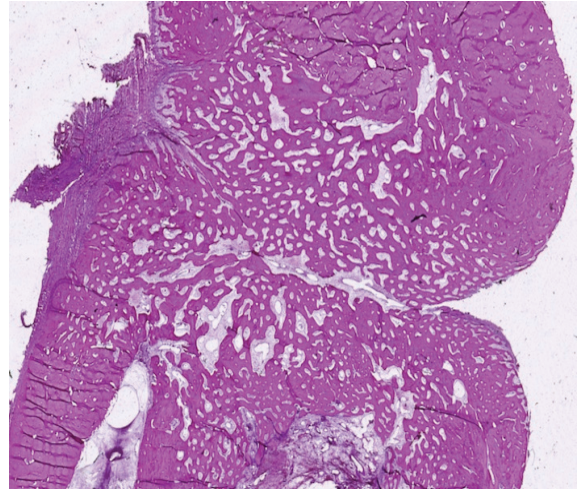


Abb. 54: HE-Färbung

Histofotogramme aus der Defektregion 5 Wochen nach Implantation von Ostim® Tier N3 re.

Beide Übersichtsaufnahmen (Vergr.: 4 X) unterschiedlicher Defektregionen zeigen eine durchgehend starke Knochenneubildung, Biomaterialreste fehlen.

In Abb. 55 ist der Defekt N2li mit der geringsten Knochenneubildungsrate der Ostim®-Gruppe graphisch dargestellt, der bei der semiquantitativen Bewertung noch einen guten Mittelwert von 2,14 erreichte. Es zeigt sich eine gleichmäßige Knochenneubildung, die lediglich an den Defekträndern etwas stärker ist, da hier bessere Bedingungen für die Ossifikation vorlagen, wie z. B. bessere Blutversorgung und das Vorhandensein von Osteoprogenitorzellen.

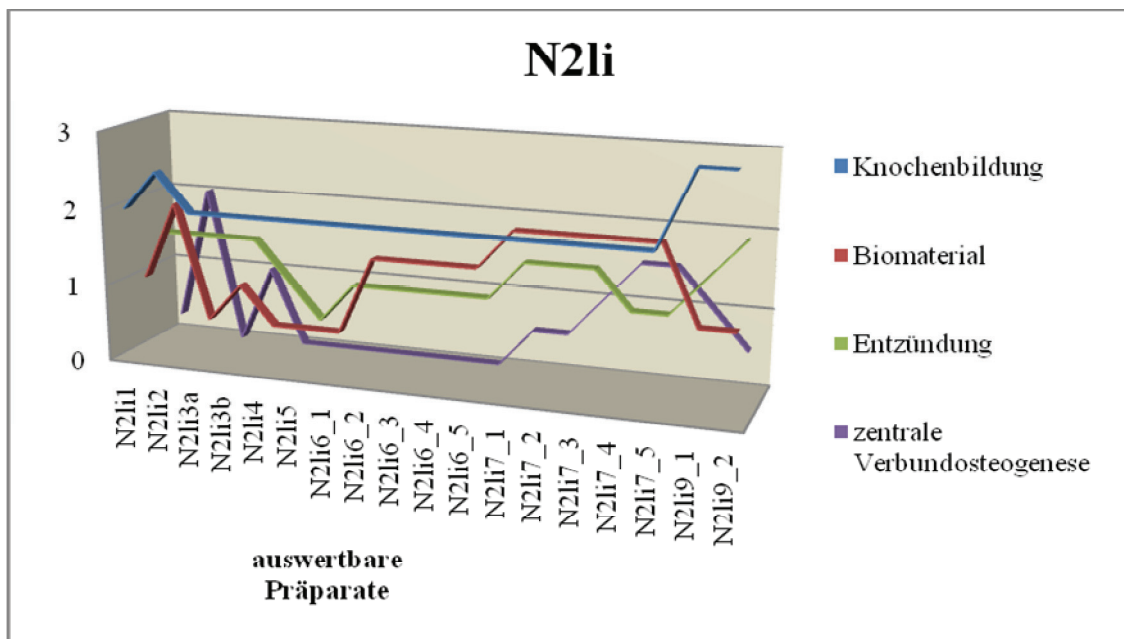


Abb.55: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier N2 li. (Ostim®)

4.3.2.2 Befunde der Gruppe P (NanoBone®)

In der Versuchsgruppe P standen 170 Präparate zur Verfügung, von denen nach kritischer Auswahl 116 für die semiquantitative Untersuchung verwertbar waren.

5 Wochen nach Implantation des KAM NanoBone® in den Unterkiefer von Göttinger Miniatschweinen wurde eine durchschnittliche Knochenbildung von 1,77 erreicht (Tab. 8). Das bedeutet ein Anteil von 59% bezogen auf den Höchstwert 3 (starke Knochenneubildung), was als deutliche Knochenneubildung zu werten ist. Ein ähnlicher Wert von 1,65 (55%) ergibt sich auch für den Anteil der vorhandenen Verbundosteogenesen im Zentrum der Defekte. Auch dieses Kriterium ist somit deutlich nachweisbar. Eine verhältnismäßig hohe Standardabweichung weist darauf hin, dass stärkere individuelle Unterschiede bei der Defektheilung auftraten. Bemerkenswert war, dass das Auftreten zentraler Verbundosteogenesen mit dem Grad der Ossifikation des jeweiligen Defektes korrelierte. Hinsichtlich der nach 5 Wochen noch nachweisbaren KAM-reste zeigen sich konstante Werte zwischen 1,73 und 2 bei einer niedrigen Standardabweichung von 0,24. NanoBone® scheint somit einem gleichmäßigen, kontrollierten Abbau zu unterliegen.

Entzündungserscheinungen in den Defektregionen waren bei diesem KAM mit einem Wert von 1,29 als geringfügig einzustufen. Dies weist auf eine gute Biokompatibilität hin.

Tabelle 8:				
Semiquantitative histologische Untersuchung von Defekten kritischer Größe				
Mittelwerte 5 Wochen nach Implantation von NanoBone®				
Defekt (n=6)	Knochenbildung	Biomaterial	Entzündung	Zentrale Verbundosteogenese
P1li	2	1,94	1,25	1,94
P1re	2,18	2	1	2,45
P2li	1,6	2	1,4	1,5
P2re	1,31	2	1,53	0,75
P3li	1,73	1,73	1,45	1,52
P3re	1,81	1,96	1,11	1,76
Gruppenmittelwert	1,77	1,94	1,29	1,65
Standardabweichung	0,68	0,24	0,46	1,26

Bewertungskriterien: 0-kein, 1-gering, 2-deutlich, 3-stark

Um die Verteilung der einzelnen Parameter innerhalb eines Defektes zu verdeutlichen, wurden die Einzelwerte bei zwei Tieren, dem mit der stärksten (P1 re.) und dem mit der geringsten durchschnittlichen Knochenneubildung (P2 re.), graphisch dargestellt (Abb. 56+ 59).

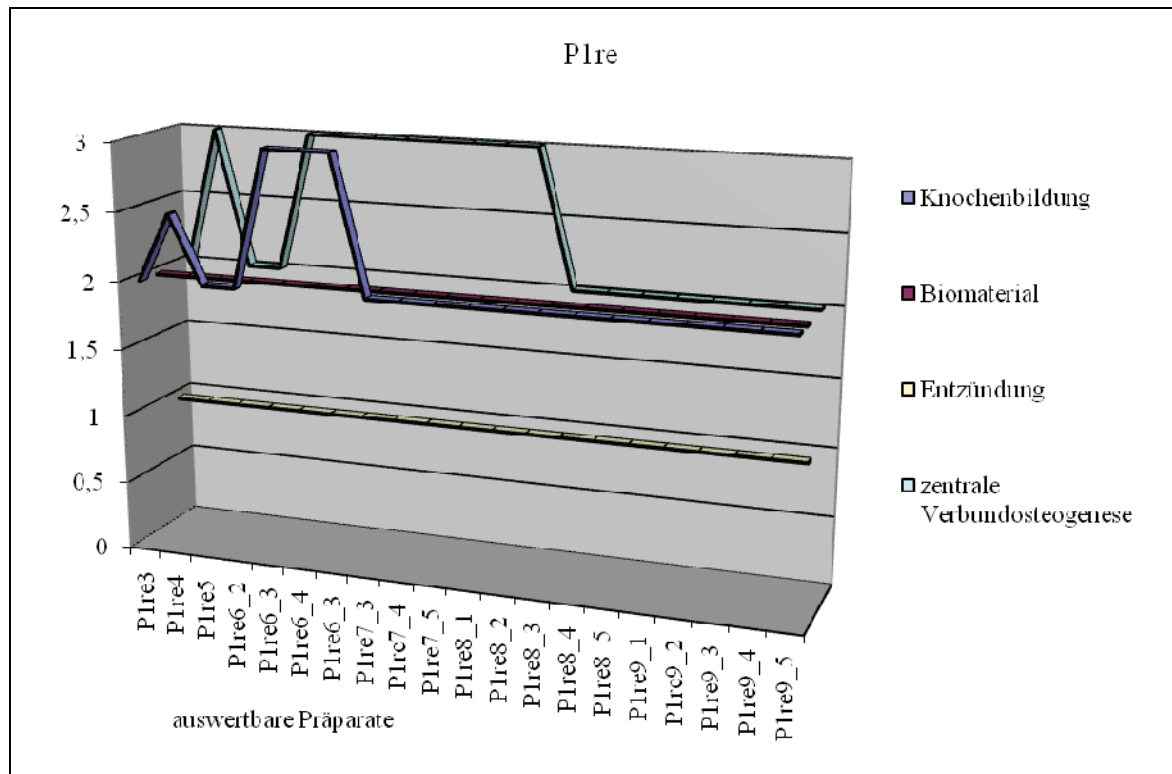


Abb. 56: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes bei Tier P1 re. (NanoBone®)

Die Werte im Defekt P1re zeigen bezüglich der Entzündungsreaktion und der residuellen Biomaterialanteile eine gleichbleibende Verteilung. Die Entzündungsreaktion ist kontinuierlich gering, während KAM-Reste durchgehend deutlich nachweisbar sind. Die Werte für die Knochenbildung und die Verbundosteogenese im Zentrum des Defektes zeigen einen weitgehend analogen Verlauf. Die Schwankungen in der linken Defekthälfte beruhen darauf, dass die dort vorliegenden Trenn-Dünnschliff-Präparate weiter voneinander entfernt liegen, wohingegen die in der rechten Defekthälfte ermittelten Werte homogener sind, da die dort vorliegenden entkalkten Paraffinschnitte enger beieinander liegen.

Histologisch zeigt sich eine deutliche Ossifikation im kortikalen Bereich (Abb.57), sowie eine beginnende Ossifikation im Defektzentrum in Form von Geflechtknochen mit einer deutlich ausgeprägten Verbundosteogenese bei nur geringfügiger Entzündungsreaktion (Abb. 58).

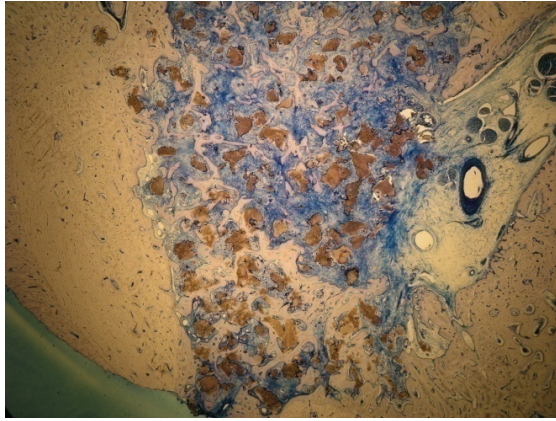


Abb.57

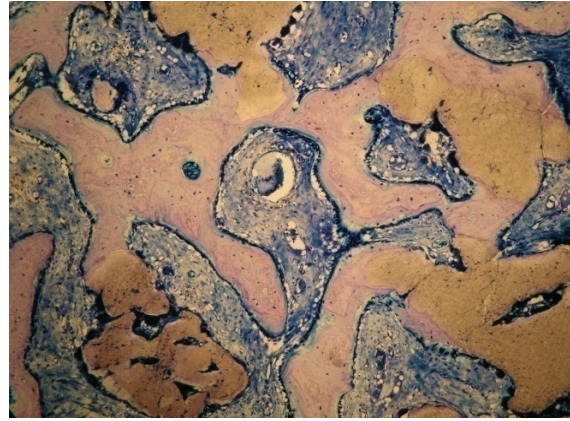


Abb. 58

Trenn-Dünnschliffe aus der Defektregion 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® bei Tier P1 re. (Giemsa-Toluidinblau-Färbung). Abb. 57: Übersichtsaufnahme (Vergr. 10 X) mit Zeichen randständiger und zentraler Ossifikation Abb. 58: Ausschnittsvergrößerung aus dem Defektzentrum mit Nachweis der Verbundosteogenese (Vergr. 40 X)

In dem in Abb. 59 dargestellten Diagramm sind die semiquantitativen Einzelwerte des Defekts mit der geringsten durchschnittlichen Knochenbildung (P2re) dargestellt. Auch in diesem Defekt ist der Anteil an Biomaterial, wie beim Defekt mit der stärksten Knochenneubildung, als durchgehend deutlich einzustufen.

Die Knochenneubildungsrate und der Anteil der Verbundosteogenesen sind jedoch geringer ausgeprägt als beim Tier P1 re., was Rückschlüsse auf einen geringeren ossären Durchbau der Defektregion zulässt. Zudem ist die entzündliche Reaktion in diesem Defekt zumeist als deutlich einzustufen, wobei regionale Unterschiede zu beobachten sind, die neben verschiedenen lokalen Gegebenheiten auch der Subjektivität des Verfahrens zuzuschreiben sein dürften.

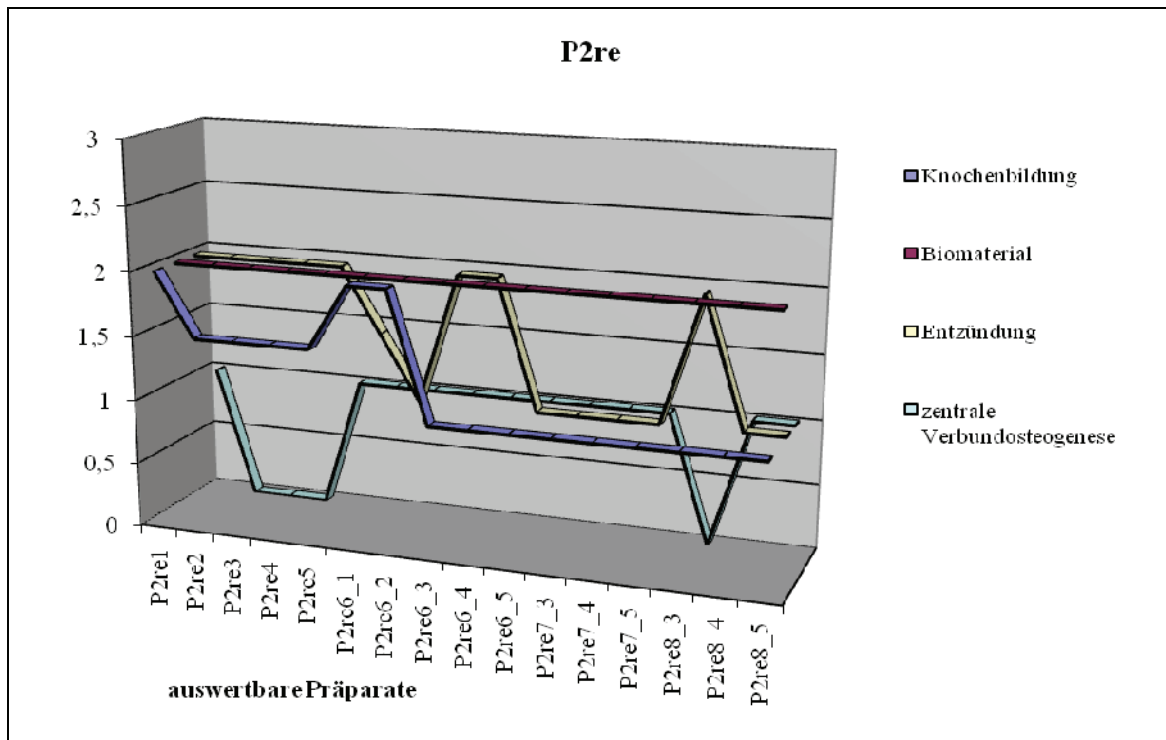


Abb.59: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier P2 re. (NanoBone®) Histologisch stellen sich in der Defektregion mehr kleine Hohlräume dar als bei den Präparaten des Tieres P1 re. Hier scheint Material bei der Herstellung der Trenn-Dünnschliffe verloren gegangen zu sein. Ob es sich dabei um Knochen, Bindegewebe oder KAM-Anteile handelt, ist unklar. Sicher ist jedoch, dass im Defektzentrum nur eine geringe Knochenneubildung nachweisbar war (Abb. 60 + 61).

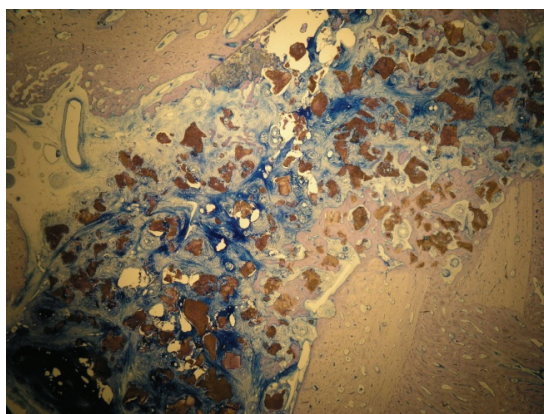


Abb.60

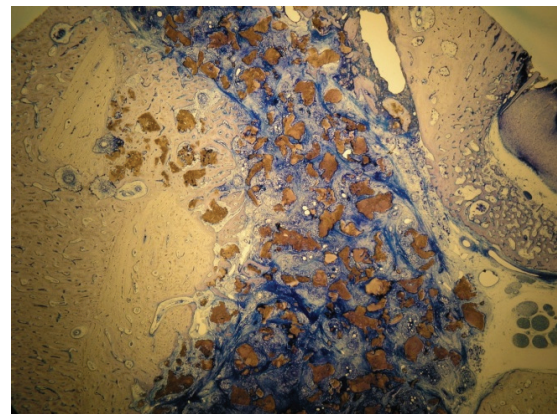


Abb. 61

Trenn-Dünnschliffe aus zwei unterschiedlichen Defektregionen 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® bei Tier P2 re. (Giemsa-Toluidinblau-Färbung, Vergr. 10 X) mit deutlichen Zeichen randständiger, aber nur geringer zentraler Ossifikation

4.3.2.3 Vergleich zwischen den Versuchsgruppen N und P (Ostim® und NanoBone®)

Wenn man die Mittelwerte für die Parameter Knochenneubildung, noch vorhandene Biomaterialanteile, Entzündungsreaktion und nachweisbare Verbundosteogenese im Defektzentrum von beiden Gruppen miteinander vergleicht, werden einige Unterschiede deutlich. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen beider Versuchsgruppen.

Tabelle 9: Vergleich der semiquantitativen histologischen Parameter (Mittelwerte) für die Gruppen N und P				
Parameter	N (Ostim®)		P (NanoBone®)	
	Mittelwerte	Standardabweichungen	Mittelwerte	Standardabweichungen
Knochenneubildung	2,52	0,82	1,77	0,68
Biomaterial	0,64	0,82	1,94	0,24
Entzündung	1,19	0,86	1,29	0,46
Zentrale Verbundosteogenese	0,11	0,48	1,65	1,26

Die Standardabweichungen liegen für alle Werte mit Ausnahme des Wertes für die zentrale Verbundosteogenese bei der Gruppe P unter 1, was bedeutet, dass die individuelle Schwankungsbreite sehr gering ist. In der Gruppe P ist dieser Wert mit 1,26 vergleichsweise deutlich erhöht. Dies hängt damit zusammen, dass für NanoBone® in fast jedem Schnitt Verbundosteogenesen unterschiedlichen Ausmaßes nachgewiesen werden konnten, wohingegen bei Ostim® aufgrund des nicht mehr vorhandenen Biomaterials nur in 2 Defekten eine geringgradig ausgeprägte Verbundosteogenese nachweisbar war. Durch die höhere Anzahl von Einzelwerten ergibt sich hier auch eine größere Standardabweichung. Neben einem gewissen Subjektivitätsgrad, der in die Untersuchungen eingeht, beeinflusst die Abhängigkeit des Parameters von dem Vorhandensein einer zentralen Knochenbildung ebenfalls die Standardabweichung.

Hinsichtlich des residuellen Biomaterialanteiles gibt es bei Ostim® eine verhältnismäßig hohe Standardabweichung, da in dieser Gruppe (N) nur sehr vereinzelt Biomaterial nach-

gewiesen werden konnte, wohingegen bei NanoBone® die Verteilung der Biomaterialreste gleichmäßig in allen Defektarealen erkennbar war.

Auch bezüglich Knochenneubildung und dem Vorhandensein von Entzündungszellen in den Defekten sind die Standardabweichungen bei Ostim® etwas höher, was auf eine stärkere Variabilität der Parameter innerhalb der Defekte hinweist, wohingegen bei NanoBone® eine größere Beständigkeit besteht. Ein graphischer Mittelwertvergleich findet sich in Abbildung 62. Dieser zeigt deutliche Gruppenunterschiede bei den Parametern Knochenneubildung, vorhandene Biomaterialanteile sowie Ausmaß der Verbundosteogenese.

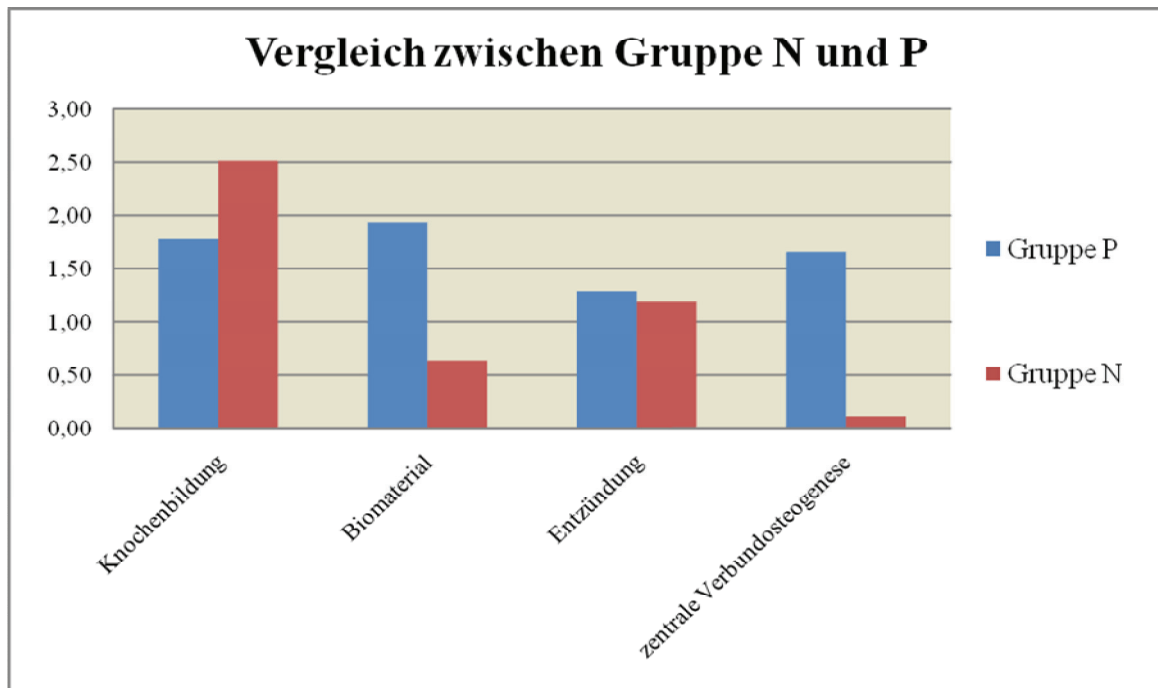


Abb. 62: Graphischer Mittelwertvergleich der erhobenen Parameter für die Gruppen P und N

Bei der Gruppe N (Ostim®) wurde vergleichsweise mehr Knochen gebildet, prozentual errechnet ergab sich ein Unterschied von 24,6% (N: 83,6% - P: 59%) bezogen auf den Höchstwert von 3,0.

Bezüglich des Biomaterials und der damit verbundenen Verbundosteogenese im zentralen Defektbereich sind die Werte der Gruppe P (NanoBone®) deutlich höher als in der Vergleichsgruppe N (Ostim®).

5 Wochen nach Implantation von NanoBone® sind noch deutliche KAM-Reste erkennbar (64,7% vom Höchstwert 3), wohin bei Ostim® eine nahezu vollständige Resorption stattgefunden hat. Es sind nur noch sehr geringe Anteile des KAM vorhanden (21,3% vom Höchstwert 3,0). Aus diesem Grunde ist das Auftreten zentraler Verbundosteogenesen bei Einsatz von NanoBone® deutlich häufiger zu beobachten als beim Vergleichspräparat Os-

tim®. Bei diesem ist fast kein Biomaterial mehr vorhanden, so dass kaum Verbundosteo-genesen stattfinden können.

Das Vorkommen von Entzündungszellen in den Defekten ist bei beiden KAM als gering einzuschätzen. Der minimale Gruppenunterschied von 0,1 ist auch aufgrund unterschiedlicher Standardabweichungen (P: 0,46 und N: 0,86) zu vernachlässigen.

Alle hier dargestellten Trends werden nachfolgend durch die valider erfassbaren Werte auf der Basis histomorphometrischer Untersuchungen überprüft.

4.3.3 *Histomorphometrische Ergebnisse*

Für die histomorphometrischen Untersuchungen wurden aus jedem Defekt 5 Präparate ausgewählt und mittels eines Scanners mit einer Auflösung von 1200dpi digitalisiert. Es lagen somit 30 Präparate pro Versuchsgruppe zur Auswertung vor.

Hauptziel der histomorphometrischen Auswertung war die quantitative Erfassung des Ausmaßes der Knochenneubildung in den Defektenregionen. Parallel dazu war die Größe der Restdefekte zu ermitteln. Diese setzen sich aus den Komponenten residuelles Biomaterial, Bindegewebsanteile, erweiterte Markräume, Vakanzen und Artefakte zusammen.

Da eine retrospektive histomorphometrische Bestimmung der Ausgangsdefektgrößen aufgrund der bereits nach 5 Wochen weit fortgeschrittenen Verknöcherung nicht möglich war, wurden die klinisch bei Defektsetzung ermittelten Größen der Defekte zugrunde gelegt und die resultierenden Querschnittsflächen errechnet. In Einzelfällen, in denen unbeabsichtigt Zahnwurzeln in die Defektregion hineinragten, wurden diese aus den Schnittflächen herausgerechnet. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10:				
Ausgangsdefektgrößen bei den Minipigs beider Versuchsgruppen N und P				
Gruppe	Defekt bzw. Tier	Größe (mm²)	Mittelwert (mm²)	Standardabw. (mm²)
N-Ostim®	N1li	229,55	224,02	27,78
	N1re	260,00		
	N2li	209,00		
	N2re	250,02		
	N3li	209,00		
	N3re	186,53		
P-NanoBone®	P1li	234,00	218,39	18,28
	P1re	240,00		
	P2li	228,00		
	P2re	212,37		
	P3li	198,00		
	P3re	198,00		

Bei beiden Versuchsgruppen (N +P) finden sich ähnliche Mittelwerte für die Defektgröße sowie ähnliche Standardabweichungen, so dass für die Untersuchungen eine vergleichbare Ausgangsbasis vorlag. Geringgradige Abweichungen der Defektgrößen lassen sich jedoch aufgrund der individuellen Gegebenheiten sowie der technischen Unmöglichkeit komplett identische Defekte zu schaffen nicht vermeiden.

Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe aus den Untersuchungen von KRATZKE (2003) aus der eigenen Arbeitsgruppe herangezogen, in denen allerdings nur 4 Defekte pro Gruppe vorlagen. Es wurde für diese Arbeit auf die klinisch ermittelten Defektgrößen und den daraus errechneten Mittelwert zurückgegriffen, der für die Kontrollgruppe mit 195mm² angegeben wurde. Der Mittelwert der Ausgangsdefektgröße dieser Gruppe weicht damit deutlich von denen der Gruppen N + P ab. Zwischen der Gruppe P und der Kontrollgruppe war dieser Unterschied sogar signifikant auf den Niveau $p < 0,05$, was die Validität der Vergleiche mit der Kontrollgruppe belastet.

Das Softwareprogramm SIS-Analysis ist in der Lage gleiche Farbtöne innerhalb kalibrierter histologischer Abbildungen zu detektieren, die zugrunde liegenden Flächenvolumina zu errechnen und die zugehörigen Werte in Form von Tabellen wiederzugeben. Diese automatische Detektion gelang bei der Giemsa-Toluidin-Färbung komplikationslos, da die KAM durch ihre dunkelbraune Anfärbung problemlos abgrenzbar waren. Insbesondere bei den HE- gefärbten aber auch bei Masson-Goldner-gefärbten Präparaten- erwies sich die Detektion als schwierig, da die Farbunterschiede geringer ausgeprägt waren. In diesen Fällen musste teilweise durch Umfahren der Konturen der Kompartimente per Hand detektiert werden, wobei methodisch bedingte Abweichungen der Erfassungsgenauigkeit nicht auszuschließen sind.

Die Flächen der Präparatquerschnitte (in mm²) mussten neben dem residuellen Biomaterial auch für Bindegewebsanteile (BGW), Hohlräume (HR), erweiterte Markräume (EM), Artefakte (AF) sowie Vakanzen (V) bestimmt werden, um eine Berechnung der Restdefektgröße zu ermöglichen. In diesen Fällen erfolgte zuvor eine manuelle Bearbeitung mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop® 7.0 (Firma Adobe®, San Jose, Ca/USA). Bestimmte Funktionen dieses Programmes erlauben das genaue Markieren von Flächen und deren Färbung (Abb. 63 + 64). Die so vorbereiteten Präparate können mittels der automatischen Farbdetektion des SIS-Analysis-Programmes problemlos histomorphometrisch ausgewertet werden. Die nachfolgenden Abbildungen 63 – 66 zeigen Präparate vor und nach der Bildbearbeitung.

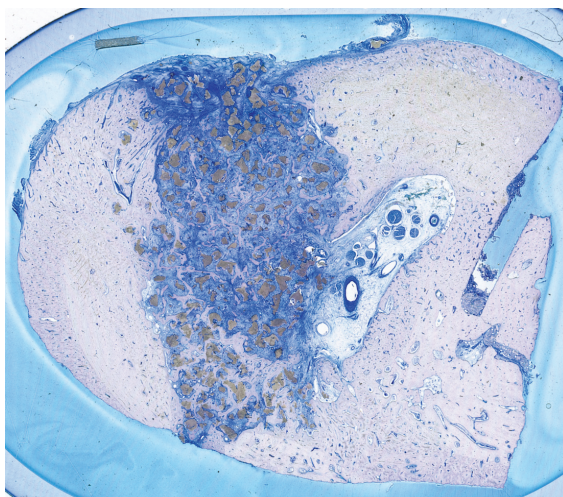


Abb. 63 (unbearbeitet)

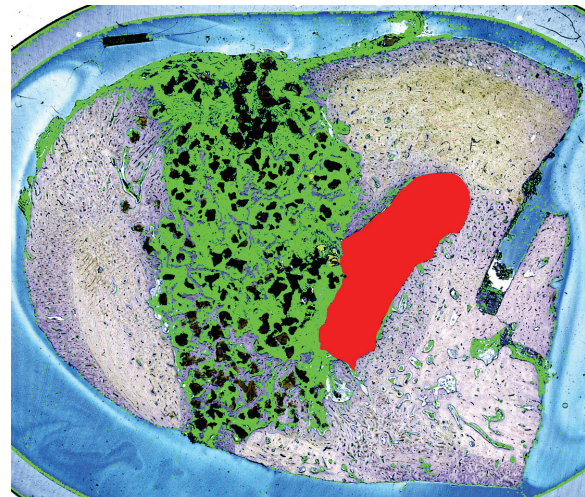


Abb. 64 (bearbeitet mit Photoshop®)*

Histologische Präparate des Tieres P1re4 , Defekt 5 Wochen nach NanoBone®-Implantation (Giemsa-Toluidinblau-Färbung, 1200dpi)

* grün-Bindegewebe, rot-Mandibularkanal

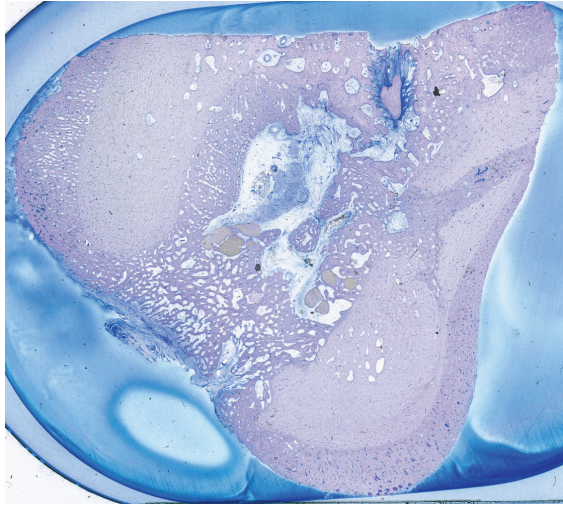


Abb. 65 (unbearbeitet)

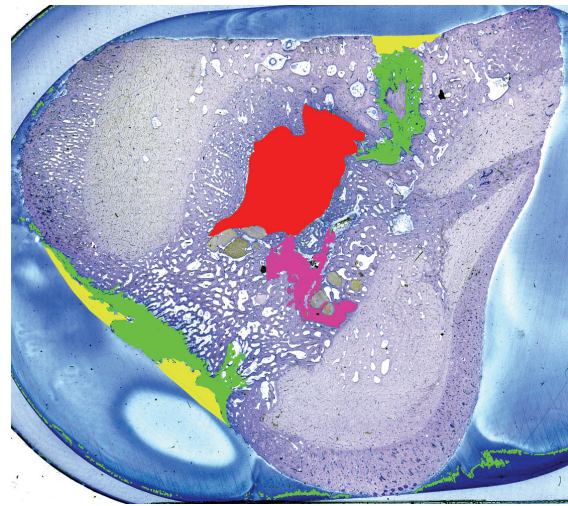


Abb. 66 (bearbeitet mit Photoshop®)*

Histologische Präparate des Tieres N2li2, Defekt 5 Wochen nach Ostim®-Implantation (Giemsa-Toluidin-Färbung, 1200dpi)

*grün-Bindegewebe, rot-Mandibularkanal, gelb-Vakanzen, pink-erweiterte Markräume

Eine tabellarische Zusammenstellung aller histomorphometrisch ermittelten Parameter der Gruppe N (Ostim®) findet sich im Anhang in Tabelle 22 bzw. die der Gruppe P (Nano-Bone®) in Tabelle 23.

Nachfolgend werden die so bestimmten Parameter Biomaterial, Bindegewebe, erweiterte Markräume, Vakanzen, Artefakte und letztlich dann Restdefektgröße und Knochenneubildungsrate im Detail beschrieben werden:

4.3.3.1 Biomaterial

Die bereits in der quantitativen und semiquantitativen histologischen Untersuchung erkennbaren Tendenzen bezüglich des Biomaterialanteils im Defekt sollen durch die histomorphometrischen Untersuchungen präzisiert werden, wobei gezielt die Flächeninhalte der Biomaterialien in den Querschnitten der histologischen Präparate in mm² ermittelt werden. Die für jeden einzelnen Defekt erhobenen Mittelwerte sowie der prozentuale Anteil des Biomaterial bezogen auf die Ausgangsdefektgröße sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch in den Defektregionen nachweisbare Biomaterialanteile					
Präparate Ostim®	BM (mm ²)	BM (%)	Präparate NanoBone®	BM (mm ²)	BM (%)
N1li	0,01	0,01	P1li	13,44	5,74
N1re	0,00	0,00	P1re	19,10	7,96
N2li	2,98	1,43	P2li	15,38	6,74
N2re	0,00	0,00	P2re	15,58	7,30
N3li	0,00	0,00	P3li	16,91	8,54
N2re	0,01	0,01	P3re	14,42	7,28
Gruppenmittelwert	0,50	0,24	Gruppenmittelwert	15,80	7,26
Standardabweichung	0,58	5,62	Standardabweichung	0,97	3,68

Es wird deutlich, dass in der NanoBone® (Gruppe P) 5 Wochen nach Implantation 7,26% des Defektes mit nicht biodegradierten KAM-Resten angefüllt sind, während bei Verwendung von Ostim® (Gruppe N) kaum noch KAM-anteile (0,24%) nachweisbar sind.

Standardabweichungen von 3,68 bzw. 5,62 weisen auf eine geringe Variabilität der Befunde hin. Bei NanoBone® herrscht in allen Defekten eine gleichmäßige Verteilung des Biomaterials vor, wohingegen bei Ostim® nur in 3 von 6 Defekten Biomaterial nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist der vergleichsweise hohe Anteil beim Defekt N2li, in dem recht große Reste vom Biomaterial sichtbar waren. Hierbei scheint es sich um einen Ausreißer zu handeln, denn alle anderen Schnitte zeigen deutlich weniger residuelles Biomaterial.

Somit unterliegt das KAM Ostim® einer sehr schnellen Resorption, die nach 5 Wochen bereits nahezu abgeschlossen ist. NanoBone® scheint in Relation zur Knochenneubildung angepasster biodegradiert zu werden und bietet daher eine bessere Stabilität im Defektbereich während der Heilungsphase. Der im Vergleich zu Ostim höhere Anteil von NanoBone® 5 Wochen nach Implantation ist statistisch im paarweisen Vergleich nach Mann und Whitney signifikant ($p = 0,002$).

4.3.3.2 Bindegewebe

Auch das Vorhandensein von sich differenzierendem Bindegewebe wurde histomorphometrisch untersucht. Hierzu wurde das Bindegewebe mittels des Softwareprogrammes Adobe® Photoshop® farbig markiert und dessen Fläche in mm² bestimmt. Tabelle 12 gibt die erhobenen Werte wieder.

Tabelle 12:					
5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch in den Defektregionen nachweisbarer Bindegewebsanteil					
Präparate			Präparate		
Ostim®	BGW (mm²)	BGW (%)	NanoBone®	BGW (mm²)	BGW (%)
N1li	9,52	4,14	P1li	63,23	26,59
N1re	55,48	21,34	P1re	68,67	28,61
N2li	27,39	13,11	P2li	56,06	24,59
N2re	25,75	10,15	P2re	69,63	32,60
N3li	20,68	9,90	P3li	68,21	34,45
N2re	20,64	11,43	P3re	57,26	28,92
Gruppenmittelwert	26,58	11,68	Gruppenmittelwert	63,68	29,29
Standardabweichung	15,48	5,62	Standardabweichung	6,04	3,68

Der nach 5 Wochen nachweisbare Anteil an differenziertem Bindegewebe war sowohl absolut, als auch prozentual mit 29,3 % bei Einsatz von NanoBone® (Gruppe P) höher als Verwendung von Ostim® (Gruppe N: 11,7%). Die Differenz ist statistisch signifikant ($p < 0,05$), wobei aufgrund geringfügiger Unterschiede der Defektausgangsgrößen nur die prozentualen Werte einen direkten Vergleich zulassen. Die Standardabweichungen liegen mit Werten von 3,68 (P) und 5,62 (N) nah beieinander und sind auf die Variabilität innerhalb der histologischen Schnitte zurückzuführen. Der Befund lässt sich nur in Verbindung mit den Anteilen anderer Komponenten insbesondere Biomaterialresten und Knochenbildung genauer erörtern, was später erfolgen soll.

4.3.3.3 Erweiterter Markraum

In den histologischen Präparaten von Ostim® (Gruppe N) trat mit 3,11% ein größerer Anteil von Hohlrumbildungen innerhalb des neugebildeten Knochens im Vergleich zu NanoBone® (Gruppe P: 0,14%) auf, die nicht ohne weiteres dem neugebildeten Knochen zugeordnet werden konnten (Tabelle 13). Es ist anzunehmen, dass diese Hohlrumbildung innerhalb des neuen Knochens im Zusammenhang mit der sehr schnellen Resorption von Ostim® steht. Dies bedeutet, dass die Knochenneubildung zeitlich nicht mit der Degradation des Biomaterials Schritt halten kann, was die statistische Signifikanzprüfung bestätigt ($p < 0,05$). Weitere histomorphometrische Einzelparameter sind Tabelle 13 zu entnehmen. Anzumerken ist, dass die Auswahl der erweiterten Markräume durch eine subjektive Komponente belastet ist und dieser Parameter daher nur eingeschränkt aussagefähig ist. Insgesamt bestätigen die erhobenen Befunde die vorausgegangenen histologischen Untersuchungen.

Tabelle 13:					
5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare erweiterte Markräume in den Defektregionen					
Präparat	EM	EM	Präparat	EM	EM
Ostim®	(mm²)	(%)	NanoBone®	(mm²)	(%)
N1li	9,97	4,24	P1li	0,34	0,14
N1re	7,88	3,03	P1re	0,05	0,02
N2li	4,8	2,3	P2li	0,54	0,24
N2re	5,83	2,25	P2re	0,00	0,00
N3li	6,83	3,27	P3li	0,00	0,00
N2re	6,48	3,57	P3re	0,93	0,47
Gruppenmittelwert	6,96	3,11	Gruppenmittelwert	0,31	0,14
Standardabweichung	1,79	0,76	Standardabweichung	0,37	0,18

4.3.3.4 Vakanzen

Als Vakanzen wurden sämtliche Einziehungen an der Defektoberfläche zusammengefasst. Auch sie wurden mittels der Software farblich markiert und anschließend digital vermessen. Es ergab sich eine leichte Erhöhung des Vakanzmittelwertes bei Ostim® (Gruppe N: 1,97%) gegenüber NanoBone® (Gruppe P: 0,76%), wobei keine statistische Signifikanz nachweisbar war (Tab. 14). Die nachgewiesene leichte Erhöhung der Vakanzen in der Ostim®-Gruppe ist vermutlich ebenfalls auf die schnelle Resorption dieses KAM und seine weichere Konsistenz gegenüber dem Vergleichsmaterial zurückzuführen. Weitere Einzelwerte sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14:					
5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare Vakanzen in den Defektregionen					
Präparat	V	V	Präparat	V	V
Ostim®	(mm ²)	(%)	NanoBone®	(mm ²)	(%)
N1li	11,07	4,78	P1li	3,33	1,42
N1re	4,65	1,79	P1re	2,82	1,18
N2li	9,63	4,61	P2li	5,15	2,26
N2re	4,92	1,94	P2re	6,66	3,13
N3li	13,21	6,32	P3li	4,34	2,19
N2re	3,28	1,70	P3re	2,53	1,28
Gruppenmittelwert	7,79	3,52	Gruppenmittelwert	4,14	1,91
Standardabweichung	4,05	1,97	Standardabweichung	1,57	0,76

4.3.3.5 Artefakte

Als Artefakte wurden insbesondere Hohlräume in den Defekten gewertet, aus denen bei der Herstellung der Präparate Material herausgefallen war. Diese Hohlräume befanden sich meist im Bereich von Biomaterialrestanteilen und bindegewebigen Strukturen. Hohlraumbildungen im Bereich des neu gebildeten Knochens wurden der bereits abgehandelten Kategorie „erweiterte Markräume“ zugeordnet. Da unklar ist, was sich ursprünglich in diesen Räumen befand, wurden sie weder dem Knochen noch dem Bindegewebe zugeordnet, sondern stellen eine gesondert vermessene Kategorie dar. Auch unbekannte Strukturen, die beispielsweise bei der Präparatherstellung entstanden, wurden als Artefakte gewertet, deren histomorphometrisch ermittelten Einzelwerte in Tabelle 15 wiedergegeben sind.

Tabelle 15:					
5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare Artefakte in den Defektregionen					
Präparat	AF	AF	Präparat	AF	AF
Ostim®	(mm²)	(%)	NanoBone®	(mm²)	(%)
N1li	0,00	0,00	P1li	0,60	0,26
N1re	0,00	0,00	P1re	0,79	0,33
N2li	0,88	0,42	P2li	0,87	0,38
N2re	0,00	0,00	P2re	2,86	1,35
N3li	0,00	0,00	P3li	0,98	0,49
N2re	0,00	0,00	P3re	0,99	0,50
Gruppenmittelwert	0,15	0,07	Gruppenmittelwert	1,18	0,55
Standardabweichung	0,36	0,17	Standardabweichung	0,84	0,40

Die Anzahl der in der Defektregion ermittelten Artefakte ist 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Gruppe P: 0,55%) statistisch signifikant höher als bei Verwendung von Ostim® (Gruppe N: 0,07%, $p < 0,05$), aber insgesamt in beiden Gruppen als sehr gering einzustufen. Da die Gruppe P (NanoBone®) einen signifikant höheren residuellen Biomaterialanteil besitzt und eine festere granuläre Struktur aufweist, wird die Artefaktbildung bei der histologischen Aufbereitung offenbar begünstigt.

4.3.3.6 Restdefekte

Die Ausdehnung der Restdefekte ergibt sich aus der Summation der bereits dargestellten Parameter Biomaterial, Bindegewebe, erweiterter Markraum, Vakanzen und Artefakte. Die errechneten Werte sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

Tabelle 16:					
5 Wochen nach Implantation errechnete Restdefekte					
(bezogen auf die klinischen Ausgangsdefekte)					
Defekt	R		Defekt	R	
Ostim®	(mm²)	R (%)	NanoBone®	(mm²)	R (%)
N1li	30,57	13,17	P1li	79,93	34,16
N1re	68,00	26,16	P1re	91,43	38,10
N2li	45,68	21,86	P2li	77,98	34,20
N2re	36,5	14,34	P2re	94,74	44,37
N3li	40,72	19,48	P3li	90,44	45,68
N2re	30,42	16,70	P3re	76,13	38,45
Gruppenmittelwert	41,98	18,62	Gruppenmittelwert	85,11	39,16
Standardabweichung	14,05	4,89	Standardabweichung	7,99	4,92

Es ist erkennbar, dass 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Gruppe N, 18,62%) deutlich kleinere Restdefekte als in der NanoBone®-Gruppe (P: 39,16%) vorliegen, in der die Mittelwerte fast doppelt so hoch liegen. Diese Differenz ist statistisch signifikant (p 0,02)

Die Abb. 67 und 68 sind ergänzende graphische Darstellungen, in denen die Zusammensetzung der Restdefekte in beiden Versuchsgruppen in Kreisdiagrammen verdeutlicht wird. Zu berücksichtigen ist, dass sich alle enthaltenen prozentualen Werte auf die Restdefektgröße beziehen und nicht auf den Gesamtdefekt.

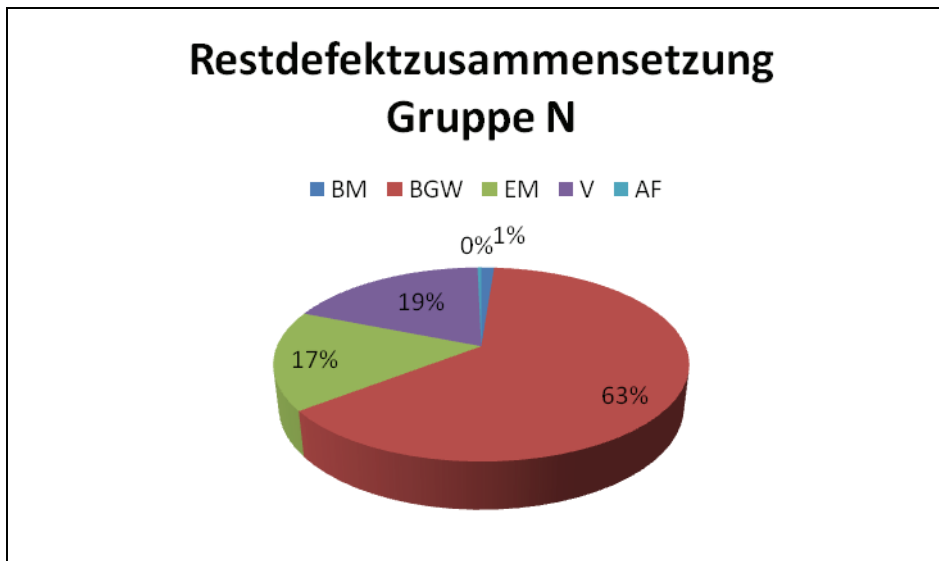


Abb.67: Zusammensetzung der Restdefekte (Mittelwerte) 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Gruppe N)

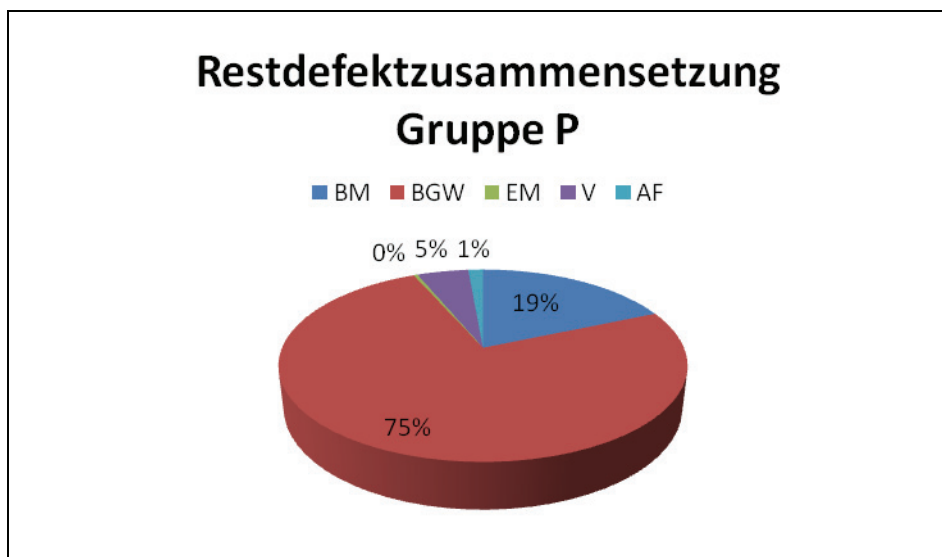


Abb. 68: Zusammensetzung der Restdefekte (Mittelwerte) 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Gruppe P)

Abkürzungen in den Abbildungen:

BM= Biomaterial, BGW= Bindegewebe, EM= Erweiterter Markraum, V= Vakanzen,
AF= Artefakte

Aus den Graphiken geht hervor, dass die Restdefekte bei Verwendung von NanoBone® (Gruppe P) größtenteils (94%) aus differenziertem Bindegewebe (75%) und Biomaterial (19%) bestehen. Der Anteil, der durch den erweiterten Markraum, die Vakanzen und Artefakte gebildet wird, ist mit einem Mittelwert von 6% unbedeutend.

Bei Einsatz von Ostim® (Gruppe N) setzt sich der größte Anteil (99%) aus 3 Komponenten zusammen, dies sind Bindegewebe (63%), erweiterte Markräume (17%) und Vakanzen (19%). Der Anteil von Artefakten und Biomaterialresten macht insgesamt nur 1% aus.

Bei beiden KAM überwiegt im Restdefekt das differenzierte Bindegewebe mit 75% resp. 63%. Daneben zeichnet sich ab, dass die Struktur der Restdefekte bei Anwendung von Ostim® stärker durch Hohlräume in Form von erweiterten Markräumen und Vakanzen geprägt ist, während bei Applikation von NanoBone® eher Biomaterialreste zu erwarten sind.

4.3.3.7 Knochenbildung

Der wichtigste Parameter ist die defektbezogene Knochenneubildungsrate, die durch Subtraktion der Restdefektgröße von der klinisch ermittelten Ausgangsdefektgröße zu errechnen war. Zusätzlich wird die 5 Wochen nach KAM-Implantation eingetretene Defektverkleinerung in Prozent angegeben. Hierzu wurden 6 Einzeldefekte pro Untersuchungsgruppe histomorphometrisch - wie in Kapitel 3.4.3 angegeben - vermessen.

Das typische Verteilungsmuster des neu gebildeten Knochens innerhalb der einzelnen Defekte verdeutlicht die graphische Darstellung von zwei Defekten (Abb. 69 + 70). Es handelt sich um je ein Tier der Ostim®-Gruppe (N3li) und der NanoBone®-Gruppe (P3re), deren Befunde den Mittelwerten nahe kommen. Die nicht gemessenen Zwischenwerte wurden zusätzlich errechnet. Blau dargestellt wird die Verteilung der Knochenbildung im Defektbereich, die randständig am stärksten ausgeprägt ist. In beiden gruppentypischen Defekten ist die Knochenneubildung im Zentrum am geringsten, da in diesem Bereich die ungünstigsten Durchblutungsverhältnisse vorliegen und die Anzahl penetrierender knochenbildender Zellen am geringsten ist.

Der weiße Bereich, der sich oberhalb der Kurve bis hin zur 100%-Marke erstreckt, entspricht der Restdefektausdehnung (Abb. 69 + 70).

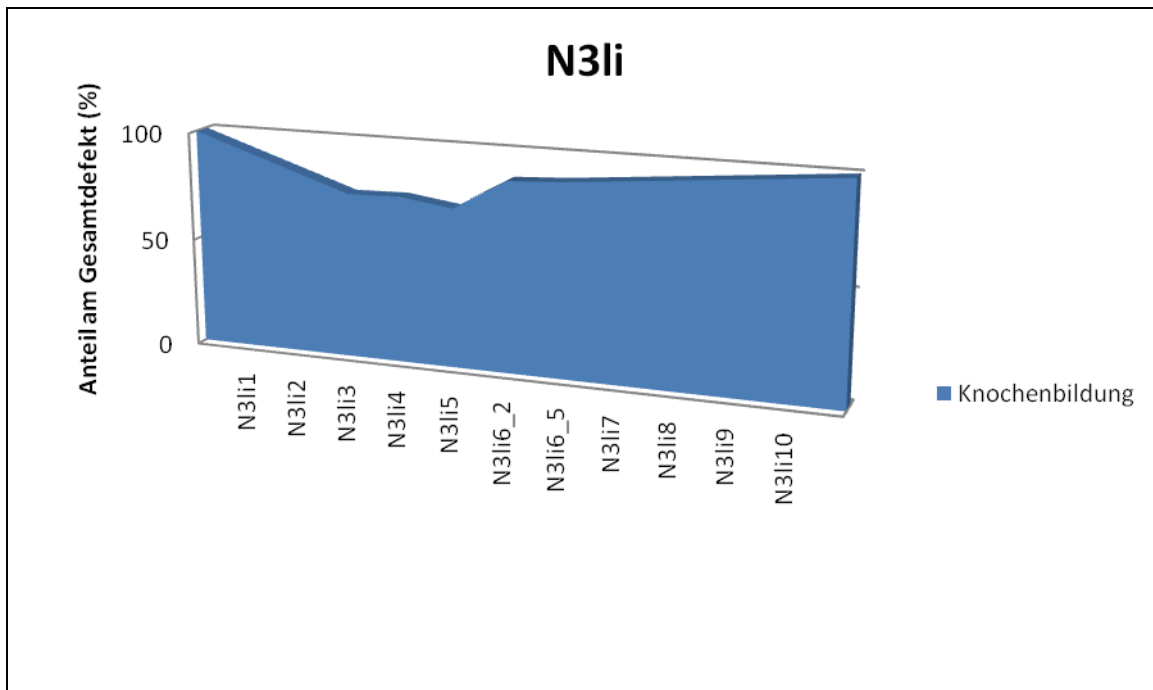


Abb. 69 : Typische Verteilung der Knochenbildung in einem Defekt 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Tier N3li)

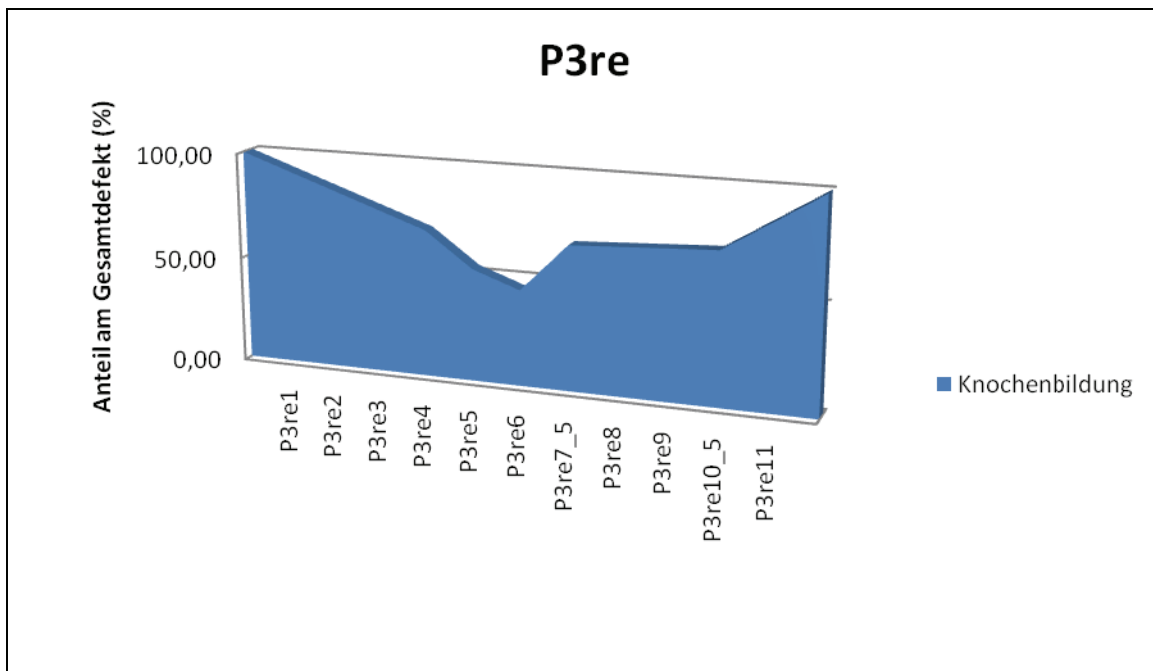


Abb. 70: Typische Verteilung der Knochenbildung in einem Defekt 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P3re)

Eine eigene Kontrollgruppe, bei der die Knochenneubildungsrate 5 Wochen nach Defektsetzung ohne Implantation eines KAM histomorphometrisch ermittelt wurde, existiert nicht. Anstelle dieser wurden die Werte für die Knochenneubildung in unversorgten Defekten gleicher Ausdehnung aus Voruntersuchungen von KRATZKE (2003) entnommen. Diese mussten auf die klinisch gemessenen Defektgrößen umgerechnet werden, wobei die Prämisse zugrunde lag, dass die Differenz zwischen diesen und den histomorphometrisch ermittelten Ausgangsdefektgrößen der Rate neugebildeten Knochens entspricht. Da die Restdefektgrößen bekannt waren, war dies unproblematisch.

Die Tabelle 17 gibt die histomorphometrisch ermittelten Werte für die Knochenneubildungsrate in den Defekten der Ostim®-Gruppe (N), der NanoBone®-Gruppe (P) und der adaptierten Kontrollgruppe C wieder:

Nach Hochrechnung der Knochenneubildungsrate auf die klinischen Defektgrößen in der Kontrollgruppe (C), ergaben sich teilweise sehr hohe Werte. Insbesondere das Tier Nr. 5 zeigt eine enorme Knochenneubildung und dürfte statistisch gesehen als so genannter Ausreißer einzuordnen sein. Die generell recht hohen Werte für die Knochenneubildung in der Kontrollgruppe resultieren aus ihrer direkten Vermessung im Defekt und dem Faktum, dass Einzelparameter wie der erweiterte Markraum und Bindegewebe unberücksichtigt blieben. Zudem ist bei nur vier vermessenen Defekten in der Kontrollgruppe und einer statistisch signifikant abweichenden Ausgangsdefektgröße von Versuchsgruppe P (NanoBone®) ein Vergleich nur eingeschränkt möglich. Demgegenüber lagen die Mittelwerte für die Ausgangsdefektgrößen der Ostim®-Gruppe (N) und der NanoBone®-Gruppe (P) nah beieinander (keine signifikante Differenz). Lediglich die Standardabweichung ist in Gruppe N vergleichsweise etwas höher, was auf intraoperative Variabilitäten bei der Defektsetzung, sowie ein vereinzelt Vorhandensein von Artefakten im Defektbereich zurückzuführen ist.

Tabelle 17:				
Ausgangsdefektgröße sowie Knochenbildungsrate und Defektverkleinerung nach 5 Wochen in den mit KAM behandelten Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe				
	Defekt	Ausgangsdefekt (mm²)	Knochenbildung (mm²)	Defektverkleinerung (%)
C* Kontrolle	5	195,00	156,65	80,33
	6	195,00	125,63	64,42
	7	195,00	116,74	59,87
	8	195,00	136,63	70,07
	Mittelw.	195,00	133,91	68,67
	Stand.	0,00	17,20	8,82
N Ostim®	1li	229,55	197,10	86,05
	1re	260,00	192,00	73,84
	2li	209,00	163,32	78,14
	2re	250,02	213,51	85,66
	3li	209,00	168,28	80,52
	3re	186,53	156,11	83,30
	Mittelw.	224,02	181,72	81,25
	Stand.	27,78	22,49	4,73
	Defekt	Ausgangsdefekt (mm²)	Knochenbildung (mm²)	Defektverkleinerung (%)
P NanoBone®	1li	234,00	154,07	65,84
	1re	240,00	148,57	61,90
	2li	228,00	150,02	65,80
	2re	212,37	117,63	55,39
	3li	198,00	107,56	54,32
	3re	198,00	121,87	61,55
	Mittelw.	218,39	133,29	60,80
	Stand.	18,28	19,91	4,97

C* (Kontrolle) aus KRATZKE 2003

Die absolute Knochenneubildungsrate 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® ist niedriger als die nach zeitgleicher Implantation von Ostim® (Tab: 18). Sie weicht nicht wesentlich von der Kontrollgruppe ab. Da sich bezüglich der Ausgangsdefektgrößen beider Gruppen

jedoch signifikante Unterschiede ergaben, sind die NanoBone®-Gruppe und die Kontrollgruppe statistisch nur eingeschränkt vergleichbar. Es lässt sich jedoch aussagen, dass die absolute Knochenneubildungsrate nach Implantation von Ostim® signifikant höher ist, als in der Kontrollgruppe (p 0,19) und in der NanoBone®-Gruppe (p 0,02). Gleiches gilt für den prozentualen Anteil der Defektverkleinerung.

Tabelle 18:			
Signifikanzprüfungen*: Ausgangsdefektgrößen, Knochenneubildungsraten und relative Defektverkleinerungen 5 Wochen nach Implantation von zwei KAM sowie in einer Kontrollgruppe mit Leerdefekten			
Gruppen	Ausgangsdefekt (mm²)	Knochenbildung (mm²)	Defektverkleinerung (%)
C**/N	nicht signifikant	N>C (p 0,019)	N>C (p 0,038)
C**/P	P>C (p 0,01)	nicht signifikant	nicht signifikant
P/N	nicht signifikant	N>P (p 0,002)	N>P (p 0,002)

* U-Test von Mann und Whitney

C**=Kontrolle (aus KRATZKE 2003), N=Ostim®, P= NanoBone®

4.3.3.8 Zusammenfassender histomorphometrischer Vergleich beider Versuchsgruppen

In Tabelle 19 findet sich eine Gesamtaufstellung der Mittelwerte aller histomorphometrisch gemessener Parameter sowie der daraus berechneten Werte 5 Wochen nach Implantation der

Tabelle 19:								
Gruppenvergleich der histomorphometrischen Parameter (Mittelwerte)								
5 Wochen nach Applikation zweier Knochenaufbaumaterialien								
Gruppe	Klinischer Ausgangsdefekt (mm)	Bio-Material (%)	Binde-gewebe (%)	Erweit. Markraum (%)	Vakanzen (%)	Artefakte (%)	Restdefekt (%)	Neugebild. Knochen (%)
N Ostim®	224,02	0,24	11,68	3,11	3,52	0,07	18,62	81,25
P NanoBone®	218,39	7,26	29,29	0,14	1,91	0,55	39,16	60,84

Werte, die sich im U-Test statistisch signifikant unterscheiden sind rot dargestellt

zwei zu testenden KAM NanoBone® und Ostim®. Sie ermöglicht einen orientierenden Überblick über alle wesentlichen gruppenspezifisch quantifizierbaren Messwerte dieser Studie.

Diese besagen, dass bei annähernd gleicher klinischer Ausgangsdefektgröße bei allen Parametern - mit Ausnahme der Vakanzen - signifikante Gruppenunterschiede bestehen. Das betrifft auch die drei Hauptparameter Biomaterialreste, Restdefektgröße und neugebildeter Knochen. Die Werte für die beiden erstgenannten Parameter sind in der NanoBone®-Gruppe (P) signifikant höher, während neugebildeter Knochen in der Ostim®-Gruppe (N) einen signifikant höheren Wert aufweist.

Nachfolgend werden diese histomorphometrischen Befunde in den Abb. 71 + 72 zusätzlich vergleichend graphisch veranschaulicht.

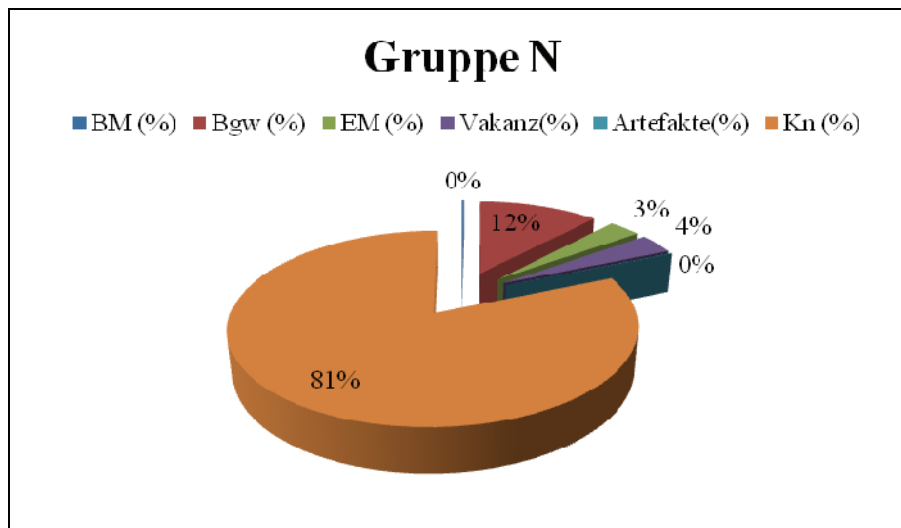


Abb. 71: prozentuale Zusammensetzung der Defektbestandteile 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Gruppe N)

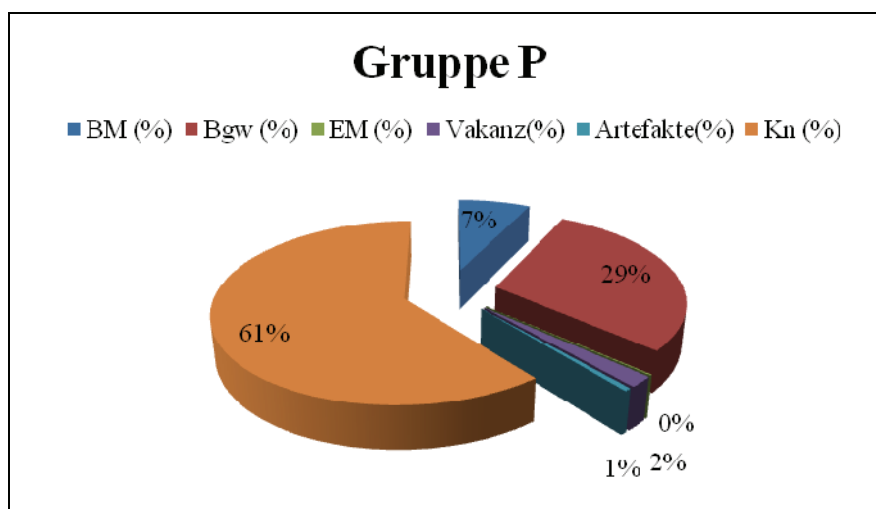


Abb. 72: prozentuale Zusammensetzung der Defektbestandteile 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Gruppe P)

Abkürzungen: BM-Biomaterial, Bgw- Bindegewebe, EM-erweiterter Markraum, Kn-Knochen

5. Diskussion

5.4 Kritische Wertung der Ergebnisse

Um die Tauglichkeit von Ostim® und NanoBone® als Knochenaufbaumaterialien, speziell bei ossären Defekten des Mund-Kiefer- und Gesichtsbereiches, beurteilen zu können, wurde zunächst eine vergleichende tierexperimentelle Kurzzeitstudie an 6 Göttinger Minischweinen durchgeführt. Bei ihnen wurden Defekte kritischer Größe im Bereich der anterioren Mandibula gesetzt und alternativ mit beiden KAM versorgt. Nach 5 Wochen erfolgten vergleichende makroskopische, röntgenologische, qualitative und semiquantitative histologische sowie histomorphometrische Untersuchungen der Defektregionen.

Die makroskopische und röntgenologische Befundung diente einer orientierenden Beurteilung, wobei insbesondere die röntgenologische Abgrenzung von neugebildetem Knochengewebe und nicht biodegradierten Resten beider auf Hydroxylapatit-Basis entwickelter KAM nicht immer zweifelsfrei möglich war.

Während die qualitative histologische Untersuchung der Defektregionen eindeutige Befunde ergab, waren die semiquantitativen histologischen Untersuchungen ausgewählter Präparate nicht frei von subjektiven Einflüssen. Um diese Fehler zu mindern, wurde eine Einteilung in lediglich drei Bewertungsgrade vorgenommen. Aufgrund der subjektiven Komponente wurde auf eine statistische Signifikanzprüfung der semiquantitativen histologischen Befunde verzichtet. Ihre Ergebnisse sollten lediglich als Vororientierung für eine weiterführende histomorphometrische Befunderhebung dienen.

Als histomorphometrischer Parameter für die defektbezogene Knochenneubildung wurde die Differenz der Flächen von Ursprungs- und Restdefekten nach fünf Monaten für einen Gruppenvergleich zugrunde gelegt. Ein Faktor, der die Aussagekraft der Untersuchungen limitierte, war die relativ geringe Zahl (n = 6) der untersuchten Knochendefekte pro Versuchsgruppe. Diese Beschränkung der Versuchstierzahl auf ein der Fragestellung angemessenes Maß war aus ethischen Gründen unumgänglich.

Die zugrundeliegenden Ursprungsdefektflächen wurden durch Multiplikation der intraoperativ vermessenen Höhen und Tiefen der Defekte ermittelt und stellen einen Mittelwert aller zur Auswertung gelangten histologischen Präparate einer Defektregion da, wobei mögliche Abweichungen zwischen einzelnen Schnittebenen unberücksichtigt blieben.

Die histologischen Präparate wurden aus Gründen der Aufwandsminimierung mittels zwei unterschiedlicher Techniken hergestellt. Dazu wurde das Material pro Defekt geteilt, so dass

je die Hälfte mittels Trenn-Dünnschlifftechnik mit der Standardfärbung Giemsa-Toluidinblau bzw. mittels EDTA-Entkalkung mit nachfolgender Paraffineinbettung und HE-Standardfärbung bearbeitet wurde. Einerseits erweiterte dieses Vorgehen die Aussagekraft der histologischen Befunde, andererseits war die Vergleichbarkeit der Präparate z. T. eingeschränkt. So traten vorwiegend bei den entkalkten Präparaten teilweise Schrumpfungen sowie Materialverluste auf. Bei den Trenn-Dünnschliffen war diese Problematik weniger ausgeprägt. Zudem eignete sich die standardmäßig bei den Dünnschliffen angewendete Giemsa-Toluidin-Färbung gut für die automatische Detektion im Rahmen der histomorphometrischen Untersuchungen. Aber auch bei diesen gab es Fehlerquellen, da kleinere Partikel mit ähnlicher Farbgebung in Einzelfällen zusammen mit dem Biomaterial angefärbt werden können und somit bei der Detektion mittels des ANALYSIS-Systems der falschen Kategorie zugeordnet werden. Dies ist auf die Variabilität bei der histologischen Anfärbung zurückzuführen.

Um die histomorphometrische Analyse bei den entkalkten und HE-gefärbten Paraffinschnitten zu ermöglichen, wurden diese histologischen Präparate mittels eines Bildbearbeitungsprogrammes vorbereitet, so dass sie anschließend automatisch vermessen werden konnten. Dieser unterschiedliche Ausmessungsmodus ist ein Kritikpunkt, zumal es insbesondere bei der Detektierung der Biomaterialanteile geringe Fehlerquellen gab.

In Präparaten, bei denen eine automatische Detektierung nicht gelang, mussten die Einzelparameter manuell durch Umfahren der einzelnen Strukturelemente mit dem Cursor per Hand erfolgen. Dieses Vorgehen wurde insbesondere zur Bestimmung der Biomaterialreste in den HE-Präparaten eingesetzt. Dabei ist, wenn man mit höherer Vergrößerung arbeitet, die Fehlerquote so gering, dass man sie vernachlässigen kann.

Beim Ausmessen der erweiterten Markräume ist als Kritikpunkt zu bewerten, dass keine Mindestgröße festgelegt wurde, so dass diesbezüglich eine subjektive Ermessensentscheidung zugrunde liegt. Da alle Befunde durch dieselbe Person nach konstanten Kriterien beurteilt wurden und eine zusätzliche Kontrolle durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin erfolgte, ist ein orientierender Vergleich durchaus möglich.

Als kritisch zu beurteilen ist zudem wie bereits bei Material und Methode (3.5) näher ausgeführt - der Vergleich der beiden Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe aus der Dissertation von KRATZKE (2003). Zum einen weicht die Zahl der untersuchten Knochendefekte ab und zum anderen wurde bei ansonsten identischer Versuchsdurchführung eine abweichende histomorphometrische Methode eingesetzt. Geringe Abweichungen zeigten auch die Ausgangsdefektgrößen; sie waren mit einem Mittelwert von 195mm^2 im Präparatanschnitt etwas

kleiner als die der eigenen Versuchsgruppen. Da uns jedoch keine weiteren Tiere für eine Kontrollgruppe zur Verfügung standen, wurde die Leerdefektgruppe dieser Voruntersuchung zum Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen in die Auswertung einbezogen. Bei den statistischen Untersuchungen wurde die unterschiedliche Zahl der Defekte vier bzw. sechs und auch die Größe der Ausgangsdefekte berücksichtigt. Im Rahmen neuer, bereits geplanter Studien in den kommenden Jahren soll eine neue Kontrollgruppe untersucht werden, welche dann einen einwandfreien Vergleich erlaubt.

5.2 Vergleich der getesteten Knochenaufbaumaterialien (KAM) mit einem xenogenen KAM

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen der Rostocker Forschungsgruppe für Regenerative Medizin wurden weitere KAM in vivo getestet. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die noch unpublizierte Studie von GRUBER (2008) von Interesse. Sie führte Kurz- und Langzeitversuche über 5 Wochen bzw. 8 Monate am gleichen Tiermodell mit BioOss® (Geistlich, Baden-Baden) durch. Zudem testet z. Z. SCHNEIDER (2008) die beiden KAM Ostim® und NanoBone® in Langzeitversuchen über 8 Monate am gleichen Tiermodell.

Das xenogene Vergleichspräparat BioOss® ist bereits mehr als 10 Jahre auf dem Markt und seither vielfach im Kiefer-Gesichtsbereich zur Anwendung gelangt. Inzwischen wurden eine Reihe klinischer Studien durchgeführt. Laut Herstellerangabe existieren bereits mehr als 500 Publikationen zu diesem KAM (Geistlich, 2008) Nach Untersuchungen von PEETZ (1997) soll BioOss® interkonnektierende Poren unterschiedlicher Größenordnung aufweisen: Makroporen mit 300-1500µm Durchmesser, Mikroporen in der Dimension der Havers- und Gefäßkanäle und intrakristalline Räume mit einem Durchmesser von 3-26nm. Die spezifische Oberfläche wird mit 79, 7m²/g angegeben (WEIBRICH et al., 2000).

Beim Vergleich der beiden in der vorliegenden Studie getesteten nanokristallinen KAM auf Hydroxylapatitbasis mit dem xenogenen KAM bovinen Ursprungs sollen lediglich die klinischen, histologischen und histomorphometrischen Befunde bewertet werden, die am aussagekräftigsten sind.

Klinisch fällt 5 Wochen nach Implantation von BioOss® noch reichlich bindegewebiges Granulationsgewebe in den Defektregionen auf (Abb. 73). Analog zu den semiquantitativen histologischen Befunden waren vermehrt entzündliche Prozesse zu beobachten (vergl. Kapitel 4.3.2). Bei Anwendung der beiden anderen KAM ist der Knochendurchbau im kortikalen Be-

reich klinisch weiter fortgeschritten (Abb. 74 + Abb. 75), wobei der Befund bei Einsatz von NanoBone® etwas günstigster erscheint.



Abb. 73 – 75: Mandibulae von Minipigs, klinische Befunde 5 Wochen nach Implantation unterschiedlicher KAM in Knochendefekte kritischer Größe

Abb. 73: BioOss®
(aus Gruber, 2008)



Abb. 74: Ostim®



Abb. 75: NanoBone®

Die Abbildungen 76- 78 zeigen die histologischen Befunde der drei zu vergleichenden KAM jeweils 5 Wochen nach Implantation in mandibuläre Defekte bei Miniaturschweinen.

Bei Verwendung von BioOss® zeigt sich in der Defektregion eine vorwiegend von den Defekträndern ausgehende Knochenneubildung, die an der lingualen Kortikalis am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 76, oben). Zentral ist die Knochenbildung noch recht gering. Im vestibulären Kortikalisbereich dominieren relativ große undegradierete Biomaterial-Partikel (Abb. 76, unten), die von Bindegewebe umgeben sind, das z. T. eine entzündliche Reaktion ausweist.

Bei den mit Ostim® versorgten Defekten ist histologisch durchweg eine auffallend starke Knochenbildung mit zentraler Hohlraumbildung und/oder erweiterten Markräumen nachweisbar (Abb. 77). Daneben kommen Bindegewebsanteile vorwiegend im vestibulären Defektbereich zur Darstellung (Abb. 77, unten). Biomaterialreste sind in der Übersichtsaufnahme nicht nachweisbar, was auf einen frühzeitigen Abbau bereits vor der 5. Wochen hinweist.

Bei Einsatz von NanoBone® ist nach 5 Wochen histologisch ein gleichmäßiger ossärer Durchbau des Defektes zu verzeichnen (Abb. 78), wobei z. T. noch nicht ossifizierte Bindegewebskompartimente vorhanden sind. Letztere erweisen sich als entzündungsfrei und stellen eine Knochenvorstufe im Rahmen der desmalen Ossifikation dar. Partiiell degradierte Biomaterialreste in mäßiger Menge finden sich gleichmäßig über die Defektregion verteilt. Im Zentrum des Defektes ist an mehreren Stellen eine biomaterialinduzierte Verbundosteogenese erkennbar, was bei höherer Vergrößerung deutlicher wird.

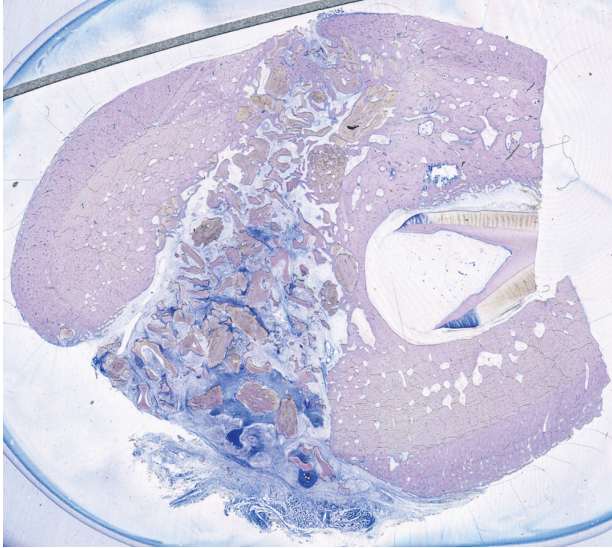


Abb. 76 - 78: Mandibulae von Minipigs, histologische Befunde 5 Wochen nach Implantation unterschiedlicher KAM in Knochendefekte kritischer Größe

Abb. 76: BioOss® (aus Gruber, 2008)

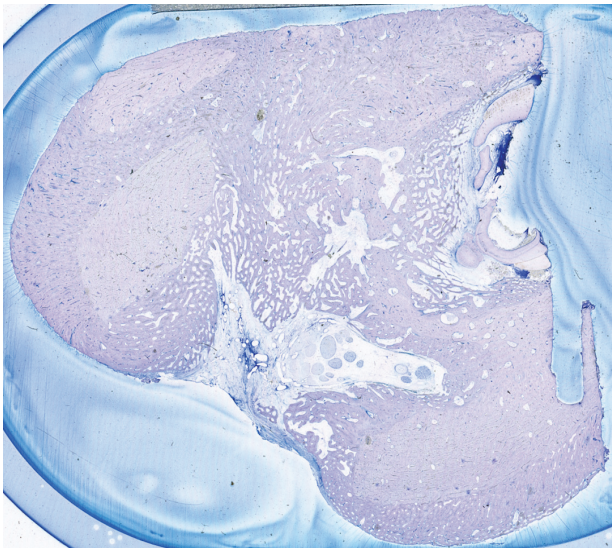


Abb. 77: Ostim®

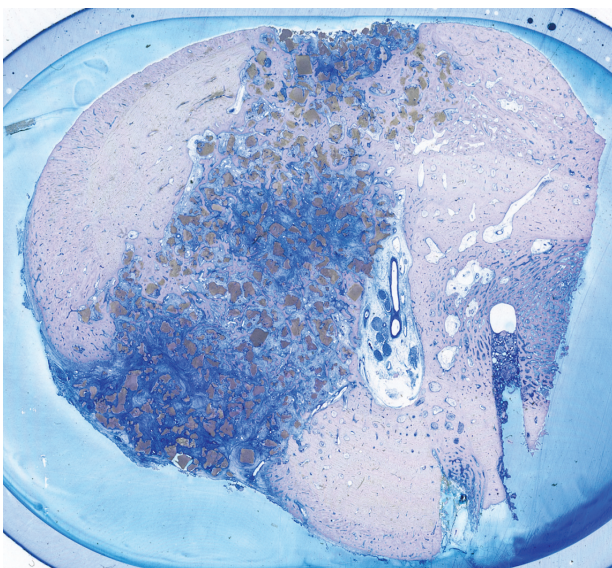


Abb. 78: NanoBone®

Ein Vergleich der histomorphometrisch ermittelten Parameter 5 Wochen nach Implantation von Ostim®, NanoBone® bzw. BioOss® ist in Tabelle 20 dargestellt. Tabelle 21 gibt zusätzlich die Ergebnisse der statistischen Signifikanzprüfung wieder.

Tabelle 20:								
Histomorphometrische Parameter 5 Wochen nach Implantation der getesteten KAM								
Versuchs-Gruppen	Ausgangsdefekt (mm²)	Bio-material (%)	Binde-gewebe (%)	Erweit. Markraum (%)	Vakan-zen (%)	Arte-fakte (%)	Rest-defekt (%)	Neugebild. Knochen (%)
Ostim® (N)	224,02	0,24	11,68	3,11	3,52	0,07	18,62	81,25
NanoBone® (P)	218,39	7,26	29,29	0,14	1,91	0,55	39,16	60,84
BioOss®* (O)	234,62	6,82	20,70	0,00	2,53	1,63	31,68	68,32

*aus Gruber, 2008

Tabelle 21:								
Gruppenvergleiche P/N P/O und O/N 5 Wochen nach Implantation der getesteten KAM Signifikanzprüfung nach Mann und Whitney								
Versuchs-gruppen	Ausgangsdefekt (mm²)	Bio-material (%)	Binde-gewebe (%)	Erweit. Markraum (%)	Vakan-zen (%)	Arte-fakte (%)	Rest-defekt (%)	Neugebild. Knochen (%)
P/N	n.s.	P>N (0,002)	P>N (0,002)	N>P (0,002)	n.s.	P>N (0,015)	P>N (0,002)	N>P (0,002)
P/O*	n.s.	n.s.	P>O (0,004)	n.s.	n.s.	n.s.	P>O (0,026)	O>P (0,026)
O*/N	n.s.	O>N (0,002)	O>N (0,002)	N>O (0,002)	n.s.	O>N (0,004)	O>N (0,002)	N>O (0,002)

P NanoBone®, N= Ostim®, O*=BioOss® (aus Gruber, 2008), n.s.= nicht signifikant

Beim statistischen Gruppenvergleich fällt auf, dass die mit Ostim® - einem auf Hydroxylapatit(HA)-Hydrogelbasis hergestellten synthetischen KAM - versorgten Knochendefekte mit mehr als 80% nach 5 Wochen die höchste Knochenneubildungsrate aufweisen. NanoBone® - ein HA-Xerogel zeigt nach gleicher Liegedauer mit ca. 60 % die geringste Knochenneubildungsrate (Tab. 20). Die für Ostim® ermittelten Werte weichen signifikant von denen für NanoBone® und für das xenogenen KAM BioOss® ermittelten Werten ab (Tab. 21).

Reziprok verhält es sich mit der relativen Größe der Restdefekte bezogen auf die Ausgangsdefektgröße. Sie ist bei Ostim® mit ca. 19% am geringsten, gefolgt von BioOss® (ca. 32%) und NanoBone® (ca. 39 %).

Betrachtet man die nach 5 Wochen nachweisbaren Biomaterialreste, so zeigt sich bei Ostim® mit <1% der geringste Wert. Dieser ist signifikant geringer als bei den beiden anderen KAM, die sich mit ca. 7% Biomaterialanteilen kaum von einander unterscheiden. Die Ursache dürfte in unterschiedlichen Biodegradationsmechanismen der KAM begründet sein. So liegt bei Ostim® das nanokritalline HA in wässriger Lösung vor, was zu einer sehr schnellen Resorption führt. Da die Knochenbildung langsamer voranschreitet, verbleiben bei größeren Defekten zentrale Hohlrumbildungen, was noch unveröffentlichte In-vivo-Langzeitversuche bestätigen können (SCHNEIDER (2008) und TROSSE (2008)). Letztere belegen zudem, dass NanoBone® im Rahmen eines natürlichen ossären Remodellings durch Osteoklasten abgebaut wird, wodurch eine an die Knochenbildung angepasste Biodegradation erzielt wird. Bei BioOss® erfolgt der Abbau des KAM durch resorptive entzündliche Prozesse unter Einbeziehung von Makrophagen. Dieser Degradationsprozess erfolgt initial relativ langsam und führt im weiteren Verlauf nicht selten zur bindegewebigen Einkapselung von Biomaterialresten, wie es die oben angeführten Langzeitversuche von GRUBER (2008) belegen.

Die vergleichenden In-vivo-Untersuchungen der drei getesteten KAM erlauben die abschließende Feststellung, dass nach 5-wöchiger Kontrollzeit insbesondere das Verhalten dieser Biomaterialien in der Frühphase der Knochenregeneration erfassbar ist. Für ihre Dauerbewahrung sind jedoch Langzeitversuche bis zur völligen Konsolidierung der artifiziell gesetzten Defekte erforderlich. Entsprechende Versuche werden in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und nach Abschluss der Befunderhebung gesondert publiziert.

5.3 Schlussfolgerungen und Literaturvergleich

Nach gründlicher In-vitro-Testung sind letztlich tierexperimentelle Untersuchungen die Voraussetzung für die Anwendung von Knochenersatzmaterialien (KAM) am Menschen. Dabei sollte ein Tiermodell, wie z.B. das Göttinger Miniaturschwein, gewählt werden, das insbesondere hinsichtlich der Knochenregeneration eine hohe biologische Humananalogie besitzt. Nur so ist eine Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse in die klinische Praxis mit gewissen Einschränkungen möglich (HÖNIG und MERTEN, 1993; SCHWEIBERER und EITEL, 1981).

Wie bereits im Kapitel 2.3 beschrieben und in Tabelle 1 dargestellt, muss ein ideales KAM eine Vielzahl von Anforderungskriterien erfüllen, von denen einige wesentliche biologische Kriterien hervorgehoben werden sollen. Dies sind

- eine gute Biokompatibilität; auch die Degradationsprodukte betreffend,
- eine gute osteokonduktive Wirkung, ggf. auch osteoinduktive Wirkung im Gewebeverbund
- ein an die Knochenneubildung angepasstes Biodegradationsverhalten
- eine ausreichende Primärstabilität und eine Anpassung ans Lagergewebe

Beiden im Rahmen dieser tierexperimentellen Kurzzeitstudie über 5 Wochen getesteten KAM sowie dem xenogenen Vergleichsmaterial BioOss® einschließlich ihren Abbauprodukten kann eine gute Biokompatibilität bestätigt werden.

Sie weisen zudem alle eine gute osteokonduktive Wirkung auf, so dass Osteoblasten, Kollagenfibrillen und Gefäße ungehindert in die Mikrostrukturen der Biomaterialien einwachsen können. Eine zusätzliche osteoinduktive Wirkung im Gewebeverbund konnte durch ergänzende Untersuchungen von BIENENGRÄBER et al. (2006) speziell für NanoBone® tierexperimentell nachgewiesen werden.

Eine gute Knochenbildung in der Defektregion zeigt sich bei allen KAM, bei Ostim® ist sie nach 5 Wochen am stärksten ausgeprägt, jedoch ausschließlich randständig. Bezüglich des Biodegradationsverhaltens ist zu vermerken, dass Ostim® nach 5 Wochen fast vollständig resorbiert ist, so dass zentrale Hohlräume verbleiben, da die Knochenbildung nicht zeitgleich erfolgt. Dagegen erfolgt bei NanoBone® eine angepasste, osteoklastäre Biodegradation im Rahmen des ossären Remodellings. BioOss® wird z. T. verzögert biodegradiert, so dass in Bindegewebe eingeschlossene Restpartikel über Monate verbleiben können. Residuelle entzündliche Reaktionen sind nach 5 Wochen noch teilweise nachweisbar.

Bezüglich der Primärstabilität sind die granulären Produkte wie BioOss® und NanoBone® dem auf Hydrogel-Basis beruhenden Ostim® überlegen. Gut anpassbar an die Lagergewebe

sind alle drei KAM, wobei Ostim® sich aufgrund seiner pastösen Konsistenz besser für schmale, schwer zugängliche Knochendefekte eignet.

Eine zusammenfassende Wertung der eigenen Befunde ergibt folgendes: Ostim® zeigt die beste Knochenneubildungsrate nach 5 Wochen bei unangepasst schneller Resorption. NanoBone® und BioOss® zeigen etwas geringere, aber gleichmäßigere Ossifikationen der Defekte, wobei bei BioOss® z.T. eine unangepasste langsame Biodegradation zu verzeichnen ist. Damit kommt NanoBone® dem angestrebten Ergebnis einer guten und frühzeitigen Knochenregeneration bei angepasster Biodegradation bezogen auf Defekte kritischer Größe im Kieferbereich am nächsten. Eine definitive Aussage lassen erst In-vivo-Langzeitversuche zu, die nicht Gegenstand dieser Studie waren.

Abschließend sollen die Ergebnisse dieser Studie mit den in der Literatur niedergelegten Daten zu den getesteten KAM Ostim® und NanoBone® verglichen werden. Beides sind neuartige, erst seit 2002 bzw. 2006 zugelassene KAM auf Basis nanokristallinen Hydroxylapatits (HA), über die erst eine begrenzte Anzahl von Publikationen und klinischen Studien vorliegen.

Ostim® liegt als pastöses HA-Hydrogel injizierbar vor und kann somit direkt in Defekte appliziert werden. Da es sich bei diesem KAM um ein weichbleibendes HA-Hydrogel handelt, unterliegt es einer sehr schnellen Resorption, wodurch das Vorhandensein einer ausreichenden Primärstabilität im Defekt nicht gegeben ist. Da dieses KAM in situ nicht aushärtet, sollte es nur bei spaltförmigen bzw. schmalen, dreiwandigen Defekten ohne mechanische Belastung zur Anwendung kommen. Bereits nach 5 Wochen waren keine oder nur sehr wenig Ostim®-Reste in den Defekten nachweisbar. Daher stellt sich die Frage, ob das Material eine ausreichende Ortsständigkeit und eine der Knochenneubildung angepasste Resorption besitzt. Das Vorhandensein von sehr großen zentralen Mark- und Vakaträumen spricht für einen zu schnellen Verlust des KAM durch Resorption oder „Ausschwämmen“ aus dem Defektbereich, was die Primärstabilität negativ beeinflusst. Andererseits ermöglicht die Weichheit des Materials eine gute und schnelle Vaskularisation, was die randständige Knochenregeneration im Defektbereich positiv beeinflusst.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Studie, durchgeführten Versuche zeigten bei Ostim® nach 5 Wochen eine sehr hohe Knochenneubildungsrate; es waren ca. 80% des Defektvolumens mit neu gebildetem Knochen ausgefüllt. Allerdings ist die Indikationsbreite des KAM durch die pastöse Konsistenz eingeschränkt; augmentative Maßnahmen im Rahmen von Auf- oder Anlagerungen im Kieferbereich werden erschwert. In einem Anwenderbericht von

WOLF (2003) wird Ostim® aufgrund seiner Beschaffenheit als nicht ausreichend druckstabil eingeschätzt. Eine Platzhalterfunktion in dreiwandigen Knochendefekten kann es nur unter der Verwendung weiterer Hilfsmittel wie Schrauben oder Meshs ausüben. GRAF (2003) verwendet für die laterale Augmentation mit Ostim® ebenfalls Titanmeshs. In Studien an Critical-Size-Defekten der Schädelkalotte adulter Hausschweine verweisen Thorwarth et al. (2004) auf eine mangelnde Formstabilität von Ostim®. Diese konnte durch Kombination des KAM mit autologem Knochen verbessert werden. Auch in diesen Versuchen war das KAM Ostim® bereits nach 30 Tagen histologisch nicht mehr nachweisbar.

Mit Ostim® wurden an der Russian State Medical University in Moskau fünf verschiedene klinische Studien in den Fachbereichen Traumatologie und Orthopädie, Kieferchirurgie, sowie Parodontologie an insgesamt 442 Patienten durchgeführt (ZUYEV UND MITARBEITER, 1993). In der Kieferchirurgie wurde Ostim® bei 27 Patienten mit radikulären Zysten, Frakturen und posttraumatischer Osteomyelitis am Unterkiefer angewandt. Die Applikation von Ostim® beschleunigte den Knochenheilungsprozess, was durch die Ermittlung der Mineralisationsrate im Frakturbereich bzw. im Knochendefekt belegt wurde. BEZRUKOV UND MITARBEITER (1998) verwendeten Ostim® bei weiteren 49 Patienten mit Kieferzysten und stellten sie einer unbehandelten Kontrollgruppe von 43 Patienten gegenüber. Nach einer Beobachtungszeit von 3 Monaten konnten sie röntgenologisch in der Ostim®-Gruppe eine stärkere Knochenneubildung als bei der Kontrollgruppe nachweisen. PANKRATOV et al. (1995) setzten das KAM bei 65 Patienten mit Frakturen des Unterkiefers ein. Als Vergleich dienten 60 konventionell behandelte Frakturpatienten. In der Ostim®-Gruppe war die Komplikationsrate geringer und es kam in keinem Fall zu einer verzögerten Knochenheilung.

In der Parodontologie wurde Ostim® bei insgesamt 200 Patienten von ZUYEV UND MITARBEITERN (1996) angewendet und mit 195 Patienten verglichen, die anstelle von Ostim® mit demineralisierten Knochen versorgt wurden. Beurteilt wurden die Taschentiefen vor und nach der Behandlung, der Hygieneindex und der Blutungsindex. Bei Einsatz von Ostim® zeigte sich im Vergleich zur demineralisierten Knochenmatrix eine Tendenz zur effizienteren Knochenregeneration mit einer 1,5% geringeren Komplikationsrate als bei der Kontrollgruppe (3,5%). Bei abszedierenden Parodontitiden empfehlen die Autoren eine Kombination von Ostim® mit wirksamen Antibiotika. Ebenso ist eine Anreicherung mit Wachstumsfaktoren möglich, wobei aufgrund der sehr schnellen Resorption von Ostim® nur eine relativ kurzzeitige Freisetzung erfolgt.

Im Gegensatz dazu liegt das nanokristalline HA-Xerogel NanoBone® als Granulat vor und weist eine höhere Festigkeit und somit eine bessere Primärstabilität auf. Es ist zunächst gründlich mit Eigenblut zu vermischen, bevor es in einen Defekt eingebracht werden kann. Es erreicht so eine pastöse Konsistenz und leichte Applizierbarkeit. Zudem führt das Benetzen des KAM mit Blut oder Blutplasma zur Bindung wichtiger Wachstumsfaktoren (TGF- β , BMPs u. a.), die bei späterer Freisetzung zu einer Stimulation der Wundheilung und Knochenbildung beitragen (BIENENGRÄBER et al., 2006).

5 Wochen nach Implantation des KAM zeigten die partiell biodegradierten NanoBone®-Partikel eine sehr gute Osteointegration, was durch das Vorhandensein von Verbundosteogenesen insbesondere im Zentrum der Defekte - zum Ausdruck kam. Durch den Abbau des KAM durch Osteoklasten im Rahmen physiologischer Knochenumbauprozesse wird so eine an die Knochenneubildung angepasste Biodegradation von NanoBone® erreicht, woraus zugleich eine hohe Stabilität im Defektbereich resultiert. Auf Grund der erst 2,5 Jahre zurückliegenden Markteinführung liegen für NanoBone® noch keine abgeschlossenen klinischen Studien mit längeren Nachkontrollzeiten vor. Allerdings existieren Zwischenergebnisse einer Bizerstudie mit 96 Patienten an den Kliniken für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Rostock und des Bundeswehrkrankenhauses in Hamburg vor (HENKEL et al. 2007). Hierbei handelte es sich um mit NanoBone® versorgte Knochendefekte des Viszerokraniums mit einem Volumen von 1cm³-5cm³, die klinisch und bildgebend (Röntgen, CT) bis zu einem Jahr postoperativ nachkontrolliert wurden. Es zeigte sich eine röntgenologisch nachweisbare gute Knochenregeneration sowie eine komplikationslose klinische Einheilung in 92,7% der Fälle. Eine totale bzw. subtotale Abstoßung des KAM trat bei 7,3% der Patienten auf. Trotz temporärem Freiliegen von NanoBone®-Anteilen in 9,4% der Fälle wurde zu meist (7 von 9 Fällen) eine gute Knochenregeneration erzielt. In einer ergänzenden klinischen Studie wurden bei 17 Patienten während Implantatinsertionen Bohrzylinder vier Monate nach Augmentation mit NanoBone® gewonnen und histologisch untersucht, wobei eine gute osteoregenerative Wirkung des KAM histologisch bestätigt wurde (MEIER et al. 2008). In beiden Studien wurde NanoBone® bei folgenden Indikationen erfolgreich angewandt: Auffüllung von Kieferknochendefekten bis zu 5 cm³ Größe infolge odontogener Zysten, operativer Zahnentfernungen, periapikaler Ostitiden und benignen Tumoren sowie als Augmentationsmaterial bei Kieferatrophien, Sinuslift, parodontalen und periimplantären Defekten.

Da die HA-Partikel in NanoBone® nicht zerfallen, sondern ins Knochengewebe integriert und dort osteoklastär abgebaut werden, gelangen keine HA-Partikel ins Lymphsystem, was durch

ergänzende In-vitro-Untersuchungen bestätigt werden konnte. Die beim Abbau entstehenden Kalzium- und Phosphationen werden im Rahmen des physiologischen Remodellingprozesses in den neu gebildeten Knochen eingebaut.

Der Kieselgel-Anteil des NanoBone® in Höhe von ca. 24% wird innerhalb sehr kurzer Zeit (ca. 2 Wochen) abgebaut. Nach 5 Wochen ist in vivo eine neu gebildete organische Matrix nachweisbar, die aus nichtkollagenen Matrixproteinen des Knochens besteht. In diese Matrix sind aus HA bestehende Granulatteilchen des KAM ohne ihre Form zu verlieren eingelagert. Damit wandeln sich die Granulatteilchen praktisch in körpereigenes Material um. Im Rahmen des physiologischen Remodellings folgt ein Umbau des primär entstandenen Geflechtknochens in Lamellenknochen, wobei die noch vorhandenen Granulatteilchen über Osteoklasten abgebaut werden (BIENENGRÄBER et al. 2006).

NanoBone® kann ebenso wie Ostim® als Trägersubstanz für Medikamente wie z. B. Antibiotika oder Wachstumsfaktoren wie z. B. BMPs genutzt werden. Ein klinischer Vorteil ist, dass NanoBone® im Gewebeverbund eine osteoinduktive Wirkung entfalten kann. Deshalb ist die zusätzliche Verwendung von osteoinduktiven Substanzen bei Verwendung dieses KAM routinemäßig nicht erforderlich, sondern nur bei vorgeschädigtem Lagergewebe in Betracht zu ziehen. Zudem besitzt NanoBone® aufgrund der besseren Primärstabilität gegenüber Ostim® eine größere Indikationsbreite. In Vorbereitung sind andere Applikationsformen des HA-SiO₂-Xerogels NanoBone®, wie die Herstellung von Formkörpern für Defekte mit größerer mechanischer Belastung - auch im Extremitätenbereich, - sowie eines injizierbaren pastösen Produktes für schlecht zugängliche und schmale Defekte.

Resümierend ist festzustellen, dass beide KAM - NanoBone® und Ostim® - aufgrund der vorliegen der In-vivo-Testung sowie ergänzender Langzeitstudien- unter Berücksichtigung der spezifischen Indikationsstellung eine gute klinische Alternative zu autologem Knochenersatz im Kiefer- Gesichtsbereich darstellen. Die Verwendung xenogener KAM mit den bekannten Risiken erscheint somit in Zukunft als entbehrlich.

6. Zusammenfassung

Für die Rekonstruktion knöcherner Defekte stellte autologer Knochen bisher den Goldstandard dar. Wegen seiner beschränkten Verfügbarkeit und der Notwendigkeit eines belastenden Zweiteingriffes mit möglichen Risiken wurden neuartige synthetische Knochenaufbaumaterialien (KAM) entwickelt, die körpereigenen Knochen möglichst gleichwertig ersetzen. Diese sollten die körpereigene Knochenbildung anregen und parallel dazu angepasst biodegradiert werden. An der Universität Rostock beschäftigte sich im Rahmen des Landesforschungsschwerpunktes „Regenerative Medizin“ eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe mit der Entwicklung eines neuartigen, im Sol-Gel-Verfahren hergestellten, nanokristallinen Knochenaufbaumaterials (KAM) auf Hydroxylapatit (HA)-SiO₂-Basis, das unter dem Namen NanoBone® (Artoss GmbH, Rostock) 2006 auf dem Markt erschienen ist.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, dieses KAM tierexperimentell an einem etablierten Tiermodell mit Göttinger Miniaturschweinen zu testen. Speziell sollte die Eignung von NanoBone® für die Rekonstruktion knöcherner Defekte der Kiefer-Gesichtsregion eingeschätzt werden. Bei 6 Tieren wurden artifizielle Mandibuladefekte kritischer Größe ($> 5 \text{ cm}^3$) beidseits gesetzt. Als Vergleich diente Ostim® (Heraus-Kulzer, Hanau), ein KAM auf HA-Hydrogel-Basis. Von den 12 zur Verfügung stehenden Critical-Size-Defekten, wurden je 6 mit Ostim® bzw. NanoBone® versorgt. Nach 5-wöchiger Kontrollzeit (Kurzzeitstudie) erfolgte anhand klinischer, röntgenologischer und histologischer (qualitativ, semiquantitativ, histomorphometrisch) Untersuchungen die Beurteilung der Ossifikation im Defektbereich. Kriterien waren das Ausmaß an neu gebildetem Knochen, dessen Lokalisation sowie der verbliebene Restdefektanteil bezogen auf die Ausgangsdefektgröße. Zusätzliche Untersuchungsparameter waren die begleitenden Entzündungsreaktionen und der Abbaumechanismus der KAM. Werte eines analogen Tiermodells von einer unbehandelten Kontrollgruppe (KRATZKE, 2003) sowie aus einer mit dem xenogenen KAM BioOss® behandelten Versuchsgruppe (GRUBER 2008) standen zum Vergleich zur Verfügung.

Klinisch weist Ostim® bezüglich der Knochenneubildungsrate sowie Restdefektgröße nach 5 Wochen die deutlich besseren Werte auf. Bei NanoBone® sind zeitgleich makroskopisch Restpartikel des Biomaterials sichtbar, wohingegen Ostim®-Partikel nicht mehr nachweisbar waren.

Röntgenologisch stellten sich nach 5-wöchiger Implantationszeit in beiden Versuchsgruppen Restdefekte dar, die in der Ostim®-Gruppe etwas kleiner waren. Zudem ließ sich in dieser Versuchsgruppe kein Biomaterial nachweisen. Dagegen zeigte sich in der NanoBone®-

Gruppe eine gleichmäßige, leichte opake Kontrastgebung, die Biomaterialresten entsprechen dürfte. Die kortikalen Defektbereiche waren röntgenologisch bei beiden Gruppen gut ossär durchbaut. Zentral zeigten sich insbesondere bei den Ostim®-gefüllten Defekten Aufhellungsareale.

5 Wochen nach Implantation der KAM waren bei beiden Versuchsgruppen histologisch noch deutliche Restdefekte in der Mandibula erkennbar. Während sich bei Implantation von Ostim® kaum mehr Restanteile des KAMs nachweisen ließen, waren bei Verwendung von NanoBone® noch Biomaterialreste in mäßiger Menge vorhanden. Bei Einsatz beider KAM traten kaum entzündlichen Reaktionen auf. Die mittlere Defektverkleinerung nach 5 Wochen betrug bei Implantation von Ostim® 78,5%, während sie bei Einsatz von NanoBone® zum gleichen Zeitpunkt mit 58,7% deutlich geringer war.

Semiquantitativ histologisch wurde die Knochenneubildungsrate in der Ostim®-Gruppe nach 5 Wochen mit deutlich bis stark (Mittelwert MW: 2,51) eingestuft, wohingegen sie in der NanoBone®-Gruppe als deutlich (MW: 1,77) deklariert wurde. KAM-Anteile waren bei den mit NanoBone® versorgten Defekten deutlich (MW: 1,94) nachweisbar, während sich bei Anwendung von Ostim® in den Defekten nur noch geringe KAM- Restanteile befanden (MW: 0,64). Aufgrund der schnellen Resorption von Ostim® konnten Verbundosteogenesen nur in sehr geringem Ausmaß (MW: 0,11) beobachtet werden. Bei Verwendung von NanoBone® hingegen konnten in nahezu allen histologischen Präparaten Verbundosteogenesen unterschiedlichen Ausprägungsgrades beobachtet werden (MW 1,65), was für einen hohen osseprotektiven Effekt des Materials spricht. Bemerkenswert ist zudem das regelmäßige Auftreten von Osteoklasten im engen Kontakt zu NanoBone®-Partikeln, was auf einen Abbau im Rahmen des natürlichen ossären Remodellierungsprozesses hinweist.

Zusätzliche histomorphometrische Untersuchungen dienten der quantitativen Erfassung folgender Parameter 5 Wochen nach Implantation von Ostim® resp. NanoBone®:

- Die Restdefektgrößen, welche sich aus Biomaterialresten, differenziertem Bindegewebe, Vakaträumen und Artefakten zusammensetzt sowie
- die Menge an neugebildetem Knochen in den Defektbereichen, die sich aus der Differenz von klinischer Ausgangsdefektgröße und Restdefektgröße ergibt.

Nach Digitalisierung der Histofotogramme und teilweiser Bildbearbeitung zur besseren Kontrastgebung erfolgte die automatische Detektion der Werte mit Hilfe des Software-

Programmes Analysis (Firma SIS, Münster). Zum statistischen Gruppenvergleich wurde der U-Test nach Mann und Whitney eingesetzt.

Bezogen auf die Ausgangsdefektgrößen, die sich nicht signifikant unterschieden, zeigten sich 5 Wochen nach Implantation von Ostim® signifikant kleinere Restdefekte (18,62%) als bei Verwendung von NanoBone® (39,16%). Hauptbestandteil dieser Restdefekte war differenziertes Bindegewebe, dessen Anteil in der NanoBone®-Gruppe (29,29%) signifikant größer war als in der Ostim®-Gruppe (11,68%). Der nach 5 Wochen nicht biodegradierte Anteil von NanoBone® (7,26%) war signifikant größer als bei Ostim® (0,24%), welches bereits nahezu vollständig resorbiert wurde. Bei den Tieren der Ostim®-Gruppe waren signifikant mehr erweiterte Markräume resp. zentrale Hohlräumbildungen zu beobachten, was auf eine vorzeitige Resorption hinweist und die Stabilität der Defektregion in Frage stellt. NanoBone® wird langsamer, aber offenbar der Knochenneubildung angepasst biodegradiert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte in der Ostim®-Gruppe eine signifikant höhere Knochenneubildungsrate und daraus resultierend eine stärkere prozentuale Defektverkleinerung nachgewiesen werden. Ein exakter statistischer Vergleich zwischen Kontroll- und NanoBone®-Gruppe war aufgrund signifikant unterschiedlicher Ausgangsdefektgrößen nicht möglich.

Der histomorphometrische Vergleich beider in dieser Studie in vivo getesteter alloplastischer KAM mit dem xenogenen Biomaterial BioOss® nach 5 Wochen ergab bezüglich der Knochenneubildungsrate signifikante Gruppenunterschiede. Bei Verwendung von NanoBone® war die Knochenneubildung am geringsten gefolgt von BioOss® und Ostim®, das am günstigsten abschnitt. Dabei war der Anteil an differenziertem Bindegewebe bei NanoBone® signifikant höher als bei BioOss® und Ostim®. Die desmale Ossifikation bei NanoBone® verläuft offenbar bis zur 5. Woche post implantationem langsamer. Erst Langzeitversuche bis zu 8 Monaten können die endgültige Einschätzung bringen, inwieweit die Biodegradation der untersuchten KAM an die Knochenneubildung angepasst verläuft. Sie sind Gegenstand ergänzender Untersuchungen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass beide getesteten KAM (NanoBone® + Ostim®) im In-vivo-Kurzzeittest eine sehr gute osteokonduktive und osteoprotektive Wirkung besitzen.

Sie stellen für viele Indikationen eine sehr gute Alternative zu autolog transplantiertem Knochen dar, was auch ergänzende klinische Studien belegen. Da beide Materialien synthetischen Ursprungs sind, sollte ihnen aufgrund gleicher klinischer Eignung der Vorzug gegenüber xenogenen Präparaten mit ihren bekannten Risiken eingeräumt werden.

7. Literaturverzeichnis

Aaboe M., Pinholdt E.M., Hjorting- Hansen E.

Healing of experimentally created defects: A review
Oral and Maxillofacial Surgery 33: 312- 318, 1995

Abdo, M.A.A.

In- vivo-Testung eines innovativen Knochenersatzmaterials auf Kalziumphosphatbasis
Med. Dissertation Universität Rostock 2003

Adam P., Nebelung A.O., Vogt M.

Löslichkeit und Umwandlung biokeramischer Schichten
Zahnärztliche Implantologie 4: 15- 21, 1988

Artoss

Produktinformationen zu NanoBone®
www.artoss.com, Informationsbroschüre 2005

Ascherl R., Lechner F., Blümel G.

Zur Wertigkeit allogener kältekonservierter Spongiosa bei Wiederherstellungseingriffen in der Traumatologie und Endoprothetik
H. Unfallheilk. 189: 1042-1044, 1987

Axhausen W.

Die Knochenregeneration, ein zweiphasiges Geschehen
Zentralblatt für Chirurgie 77: 435-442, 1952

Bauer G., Vizethum F.

Process for producing a bone replacement material
U.S. Patent 5, 133/756, 1992

Bauer T.W., Muschler G.F.

Bone graft materials
Clin. Orthop. 371: 10- 27, 2000

Bezrukov V. M., Grigoryants L. A., Zuyev V. P., Pankratov A.S.

Surgical treatment of cysts of the jaws making use of ultrahighly dispersed Hydroxyapatite
Stomatologija 77 (1) 31- 5, 1998

Bienengräber V., Gerber T., Wolf E., Henkel K.-O.

Biologische Grundlagen eines synthetischen Knochenaufbaumaterials - NanoBone®
Implantologie Journal 4: 48-51, 2006

Bienengräber V., Lenz S., Rumpel E., Gerber Th., Henkel, K.-O.

A New Osteoinductive Bone Replacement Material
International Proceedings, XVIII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo facial Surgery, Barcelona (Spain): 19-22, 12.-15. September 2006

Bienengräber V.

Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgelmatrix. Vortrag, 75. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 29.05. bis 02. 06. 2007 in Rostock-Warnemünde
Persönliche Mitteilung 2007

Bobyn J.D., Pilliar R.M., Cameron H.U., Weatherly G.C.

The optimum pore size for the fixation of porous surfaced metal implants by the ingrowth of bone
Clin Orthop. 150: 263- 270, 1980

Bohner, M.

Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery
European Spine Journal 10: 114-121, 2001

Brighton C.T., Hunt R.M.

Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus
J Bone Joint Surg Am 73: 832- 847, 1991

Bucur C.

Die Reossifikation von Unterkieferdefekten bei fehlendem Periost mit und ohne Titanfolienabdeckung
Med. Dissertation Universität Rostock 2004

Buser D., Schenk R.

Standortbestimmung der membrangestützten Knochenregeneration in der oralen Implantologie. Teil 1:
Wissenschaftliche Grundlagen
Implantol. 3: 209-226, 1995

Chow, L.C.

Calcium-Phosphat-Zemente: Eigenschaften und Verwendungen
Biomaterialien 2, 11-18, 2001

Daculsi G., Passuti N.

Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics
Biomaterials 11: 86-87, 1990

De Groot K.

Bioceramics consisting of calcium phosphate salts
Biomaterials 1: 47, 1988

Deuel T.F., Senior R.M., Huag J.S., Griffin G.L.

Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet- derived groth factor
J Clin Invest 69: 1046- 1049, 1982

Dietrich W.H.

In- vivo-Testung einer Sol-Gel-Kalziumphosphatmatrix zum Knochenersatz bei Knochendefekten kritischer Größe
Med. Dissertation Universität Rostock 2005

Dingeldein E., Engart B.

Ostim®-Paste Produktinformation
Osartis GmbH & Co. KG, Obernburg, 2001

Donath K., Breuner G.

A method of study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff Technique
Journal of Oral Pathology 11: 318-326, 1982

Draenert K., Wiese F.G., Garde U., Draenert Y., Helbert U., Börner M.

Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP- Basis
Trauma Berufskrankh. 3: 293-300, 2001

Dumbach J., Spitzer W.

Knochenersatz mit pyrolysiertem xenogenen Knochen
Dtsch. Zahnärztl. Z. 43: 45-48, 1988

Ehrenfeld M., Mast G., Hagenmaier C., Schuler K., Draenert F.

Differentialindikation mikrovaskulär reanastomosierter Knochentransplantate bei Kontinuitätsdefekten im Unterkieferbereich
54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Aachen, 02.-05.06.2004

Einhorn T.A.

The cell and molecular biology of fracture healing

Clin Orthop 355: 7-21, 1998

Eitel F., Schweiberer L., Saur K. L. T., Klapp F.

Theoretische Grundlagen der Knochentransplantation: Osteogenese und Revaskularisierung als Leistung des Wirtslagers

In : Hierholzer, G., Zilch, H. (Hrsg.) Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren. Springer, Heidelberg: 1-12, 1980

Feifel H.

Osteoinduktion und Osteokonduktion – Therapie des Knochendefektes mit Proteinen und xenogenem Knochen

Dtsch Zahnärztl Z 51: 144-155, 1996

Friesen K.

Proliferations-, Differenzierungs- und Adhäsionsverhalten osteogener Zelllinien auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien

Med. Dissertation Universität Düsseldorf, 2006

Geistlich Pharma AG

Herstellerinformationen zu BioOss®

<http://www.geistlich.ch>, 2008

Gerber T., Holzhüter G., Knoblich B., Dörfling P., Bienengräber V., Henkel K.-O.

Development of Bioaktive Sol-Gel Material Template for in Vitro and in Vivo Synthesis of Bone Material

Journal of Sol-Gel Science and Technology 19, 441-445, 2000

Gerber T., Knoblich T., Traykova G., Holzhüter P., Dörfling K.-O., Henkel V., Bienengräber, V.

Entwicklung, in vitro und in vivo Tests eines hochporösen Knochenersatzmaterials

Osteologie 10: 175-183, 2001

Gerber T., Holzhüter G., Götz W., Bienengräber V., Henkel K.-O., Rumpel E.

Nanostructuring of Biomaterials – A Pathway to Bone Grafting Substitute

Eur J Trauma 32:132-40, 2006

Ghazal G., Prein J.

Knochendefektfüllung in den Kieferknochen mit Tricalciumphosphat
Swiss Dent 13, 15- 18, 1992

Giesen E.B., Lamerigts N.M., Verdonschot N., Buma P., Schreuers B.W., Huiskes R.

Mechanical characteristics of impacted morselised bone grafts used in revision of total hip arthroplasty
J Bone Joint Surg Br. 81(6): 1052-1057, 1999

Glatzl M., Abela E., Maissen M., Aguzzi A.

Binding of disease- associated prion Protein to plasminogen
Nature 408 (6811): 479- 83, 2000

Graf H.-L.

Nanokristalliner Charakter bringt entscheidende Vorteile
DZW Spezial Ausgabe 5, 2003

Gruber A.

Ergebnisse der noch unpublizierten Promotionsschrift. Persönliche Mitteilung
2008

Grüber J.

Die Regelung des Knochenstoffwechsels durch Vitamine, Hormone und Kalzitinin.

In: Wolter D., Jungbluth K.-H. (Hrsg.) Hefte zur Unfallheilkunde 185 – Wissenschaftl. und klin. Aspekte der Knochen transplantation, Springer- Verlag S. 30-41, 1987

Günther K.P., Scharf H.P., Pesch H.-J., Puhl W.

Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen- tierexperimentelle Untersuchungen
Orthopäde 27: 105- 117, 1998

Heimke, G., Griss P.

Ceramic implant materials
Medical & biological engineering & computing 18: 503-510, 1980

Hensch, L.L.

Bioceramics: From concepts to clinic.
J. Am. Ceram. Soc. 74 1487–1510, 1991

Henkel K.-O., Gerber T., Dörfling P., Härtel J., Jonas L., Gundlach K.K.H., Bienengräber V.

Stimulation der Regeneration von Knochendefekten durch Einsatz einer Biokeramik und autologer Osteoblastentransplantation

Mund Kiefer Gesichts Chir 6: 59-65, 2002

Henkel K.-O., Gerber T., Dietrich W.H., Kundt G., Bienengräber V.

Im Sol-Gel-Verfahren hergestellte Kalziumphosphatkeramiken – Ein Durchbruch in der Therapie von Knochendefekten? Eine tierexperimentelle Studie

Osteologie 13: 57-64, 2004

Henkel K.-O., Dietrich W., Bienengräber V.

Ein neuartiges Knochenersatzmaterial auf Kalziumphosphatbasis - Therapeutische Anwendungen bei Defekten im Ober- und Unterkiefer

dens (Mitteilungsblatt der Zahnärztekammer und der Kassenärztlichen Vereinigung Mecklenburg-Vorpommern)1: 20-22, 2005

Henkel K.-O., Lenz J.-H., Gerber T., Bienengräber V.

Neuartiges Knochenaufbaumaterial auf Basis eines Niedertemperatur-Hydroxylapatits

Implantologie Journal 5: 40-42, 2005

Henkel K.-O., Kirchhoff M., Gerber T., Bienengräber V.

Poster: Klinische Anwendung eines innovativen nanokristallinen Knochenersatzmaterials - eine Bizenstudie

57. Jahrestagung der AGKI in Wiesbaden, Mai 2007

Heraeus-Kulzer®

Produktinformationen zu OSTIM®

www.ostim-dental.de, Patienten- und Anwenderinformationsbroschüren (seit 2003)

Heymann D., Guicheur J., Rouselle A.V.

Ultrastructural evidence in vitro of osteoclastic- induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms

Histol. Histopathol. 16: 37- 44, 2001

Hidding J., Hemprich A.

Klinische Ergebnisse bei der Verwendung eines neuen porösen Hydroxylapatites (Ceros 80®) in Block- und Granulaform. Erste Resultate bei der individuellen Herstellung von Blöcken aus Hydroxylapatit und Fibrin

Dtsch. Zahnärztl. Z. 43: 101-104, 1988

Hönig J.F., Merten H.A.

Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der humanmedizinischen osteologischen Grundlagenforschung

Zahnärztliche Implantologie 2: 237-243, 1993

Hönig J., Merten H.-A., Heinemann D.E.

Risk of Transmission of Agens assoziated with Creutzfeld-Jakob-Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy

Plastic and Reconstructive Surgery 103/4: 1324-1325, 1999

Ignatius A., Betz O., Augat P., Claes L.

Biomechanical and histological analysis of autogenous cancellous bone Grafts in a loaded transplantation model. Transactions

European Orthopaedic Research Society 10: 98, 2000

Jarchow, M.

Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics

Clinical orthopaedics and related research 157: 259-278, 1981

Jelitte G.

Laterale Augmentation- bei Einsatz eines nanokristallinen Hydroxylapatits

ZMK 20: 54ff., 2004

Junqueira, Carneiro

Histologie

Springerverlag: 211, 1996

Kaspers C., Ewers R.

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Einheilungstendenz synthetischer, koralliner und aus Algen gewonnener (phykogener) Hydroxylapatitmaterialien

Z. Zahnärztl. Implantol 2, 242-248, 1986

Katthagen B.D.

Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien- eine tierexperimentelle Studie

Hefte Unfallheilkunde 178: 5-55, 1986

Klawitter J.J., Hulbert S.F.

Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopedic applications

J Biomed Mater Res Symp 2: 161, 1971

Knaepler H., v.Garrel Th., Seipp H.-M., Gotzen L.

Autoklavieren von allogenen Knochentransplantaten als Alternative zur konventionellen Knochenbank

Orthopädische Praxis 28: 18-22, 1992

Koepf, HE: Schorlemmer, S, Kessler, S, Brenner, RE, Claes L, Günther, KP, Ignatius AA

Biocompatibility and Osseointegration of β -TCP: Histological and Biochemical Studies in a Weight-Bearing Sheep Model

J Biomed Mat Res 70 B: 209-217, 2006

Kohal R.J.

Knochenersatzmaterialien in der Parodontologie und zahnärztlichen Implantologie

Zahnärztl. Mitt. 8: 56-61, 1997

Kohal R.-J., Cassellas J., Dennison D.K., Caffesse R.G.

Zahnärztl Implantol 17/3: 103ff, 2001

Kratzke J.

Stimulieren autolog transplantierte Osteoblasten die Reossifikation von Unterkieferdefekten ?
Eine tierexperimentelle Studie an Miniaturschweinen

Med. Dissertation Universität Rostock, 2003

Kübler N.R.

Osteoinduktion und -reparation

Dtsch. Z. Mund Kiefer Gesichtschir. 21: 2-25, 1997

Kübler N.R.

Knochenregeneration durch Osteoinduktion

Dtsch Zahnärztl Z 53: 834-843, 1998

Kundt G., Krentz H.

Medizinische Biometrie - Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung. Mit Prüfungsfragen und Prüfungsaufgaben

Shaker Verlag Aachen: 153-157, 2003

Kurashina K., Kotani A., Tanaka H., Toda Y., Ono M.

Studies on the clinical use of ceramic materials. 1: Bone reaction to dense calcium hydroxyapatite ceramics

Shinshu Med. J. 30 161-173, 1982

Kurz L., Garfin S., Booth R.

Harvesting autogenous iliac bone grafts: a review of complications and techniques

Spine 14: 1324- 1331: 1989

LeGeros R.Z.

Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review

Adv Dent Res 2: 164-180, 1988

LeGeros R.Z.

Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification.

Z Kardiol.90 Suppl 3:116-24, 2001

Lexer, E.

Über freie Transplantationen

Langenbecks Archiv der klinischen Chirurgie 95: 827-851, 1911

Linhart W.

Knochenersatzmaterialien: Biokompatibilität und Funktionalität in vivo und in vitro

Habilitationschrift, Universität Hamburg, 2003

Linhart W., Briem D., Peters A., Lehmann W., Windolf J., Rieger J.-M.

Resorbierbare Kalziumphosphatzemente

Trauma Berufskrankh 6: 277-284, 2004

Löffler, Petrides

Biochemie und Pathobiochemie

Springer Verlag: 750-751, 1998

Lippert

Lehrbuch Anatomie (5. Auflage)

Urban u. Fischer Verlag: 29, 2000

Luczak S., Sonntag F.

Untersuchungen zur Regenerationsgeschwindigkeit des Knochens nach Defektfüllung mit Tricalciumphosphat und Kollagen im Vergleich zu gängigen Substitutionsmaterialien

Dissertation, Medizinische Fakultät Universität Leipzig, 1990

McAllister B.S., Margolin M.D., Cogan A.C., Buck D., Hollinger J.O., Lynch S.E.

Eighteen-Month Radiographic and Histologic Evaluation of Sinus Grafting with Anorganic Bovine Bone in the Chimpanzee

The international journal of oral & maxillofacial implants 14 361-368, 1999

Meier J., Wolf E.

Poster: Umbau des nanokristallinen Knochenersatzmaterials NanoBone® im histologischen und immunhistochemischen Bild

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Implantologie München, Mai 2007

Meier J., Wolf E., Bienengräber V.

Einsatz synthetischer des nanostrukturierten Knochenaufbaumaterials NanoBone bei Sinusbodenelevation. (im Druck)

2008

Merten H.A., Hönig J.F., Wiese K.G.

Histomorphologische Charakteristika bei der Reaugmentaion mit granulärer Hydroxylapatitkeramik

Z. Zahnärztliche Implantologie 10: 99-105, 1994

Misch C.E., Dietsch F.

Bone-grafting materials in implant dentistry

Impl Dent; 2:158-167, 1993

Mittelmeier H., Katthagen B.D.

Neue Wege des Knochenersatzes

Orthop. Prax. 5: 389-395, 1984

Osborn J.F.; Newesely H.

The material science of calcium phosphate ceramic

Biomaterials 1: 108-111, 1980

Osborn, J.F.; Weiss, T.H.

Hydroxylapatitkeramik – ein knochenähnlicher Biowerkstoff;
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 88: 1166-119, 1978

Pankatov A.S., Zuyev V.P., Alekseva A.N.

The use of ultrahighly dispersed hydroxyapatite in the complex treatment of patients with mandibular fractures
Stomatologiia (Mosk), Vol. 74, No.4, pp 22-5, 1995

Partsch C.

Zur Behandlung der Kieferzysten
Dtsch. Mschr. Zahnheilkd. 28, S. 252-275, 1910

Peetz M.

Characterisation of xenogenic bone material
In: Boyne, P.J., ed. Osseous reconstruction of the maxilla and mandible: surgical techniques using titanium mesh and bone mineral, 87-100. Chicago: Quintessence, 1997

Piesold J.-U., Merwald M., Braxein K., Pistner H.

Schnell abbindender Kalziumphosphatzement für die kranio-maxillofaziale Chirurgie- Erfahrungen über 6 Jahre
Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie 8: 5-11, 2004

Postlethwaite A.E., Keski-Oja J., Moses H.L., Kang A.H.

Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β
J Exp Med 165: 251- 256, 1987

Psyrembel W.

Klinisches Wörterbuch Aufl. 259
De Gryter Verl. 2002

Rahn, B.A., Neff, J., Leutenegger, A., Mathys, R., Perren S.M.

Integration of synthetic apatite of various pore size and density in bone
In : Christel, P. ; Meunier, A. ; Lee, A.J.C. (Hrsg.) Biological and biomechanical performance of biomaterials. Elsevier, Amsterdam : 21-26, 1986

Reddi A.H.

Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins
Clin. Orthop 355: 66-72, 1998

Reichart P., Hausamen J.-E., Becker J.

Transplantationsterminologie (Kap.: 16.9.1.4)

Curriculum zahnärztliche Chirurgie , Quintessenz-Verlag- GmbH: 437ff, Sept.2000

Rüger J.M.

Knochenersatzmittel

Hefte zur Unfallheilkunde 213: 40-258, 1992

Rüger J. M.

Knochenersatzmittel – Heutiger Stand und Ausblick

Der Orthopäde 27: 72-79, 1998-1

Rüger J.M. et al.

Allogener Knochen und Knochenersatzmittel

Unfallchirurgie, Hsg. Rüter A., Trentz O., Wagner M., Urban und Fischer, München; Jena: 166-182, 2004

Sailer H.F., Weber F.E.

Knochenersatzmaterialien

MKG (Suppl 1) 4: 384- 391, 2000

Schenk R., Willenegger H.

Zum histologischen Bild der sog. Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund

Experienta 19: 593- 595, 1963

Schenk R., Willenegger H.

Zur Histologie der primären Knochenheilung

Unfallheilkunde 80: 155-160, 1977

Schenk R. K.

Zur Problematik der Knochenersatzstoffe. Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen.

Hefte zur Unfallheilkunde 216: 23-35, 1991

Schenk, R.K.

Bone Regeneration: Biological Basis. In: Buser, D.; Dahlin, C.; Schenk, R.K.: Guided bone regeneration in implant dentistry.

Quintessence, Chicago, Berlin, London: 49-56, 1994

Schneider S.

Ergebnisse der noch unpublizierten Promotionsschrift. Persönliche Mitteilung
2008

Schratt H.-E., Regel G., Kiesewetter B., Tscherne H.

HIV-Infektion durch kältekonservierte Knochentransplantate
Der Unfallchirurg 99: 679-684, 1996

Schwarz F., Becker J.

Periimplantäre Entzündung- Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und aktuelle Therapiekonzepte
Quintessenz Verlag: 1. Auflage: 11-14 , 2006

**Schwarz Z., Weesnert, van Dijk S., Cochran D.L., Mellonig J.T., Lohmann C.H., Cames D.L.,
Goldstein M., Dean D.D. and Boyan B.D.**

Ability of Deproteinized Cancellous Bovine Bone to Induce New Bone Formation
J.Periodontal, Vol. 71 (8): 1258-1269, 2000

Schweiberer L., Eitel F.

Bone transplantation in animals and man (1981)

In: Altman H, Büchner F., Cottier H., Grundmann E., Hollo G., Letterer E (Hrsg.): Handbuch der allgemeinen Pathologie. 4. Aufl. Springer Berlin: 617-654, 1977

Schwenzer, Ehrenfeld

Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Band 2: Spezielle Chirurgie
Thieme Verlag: 386-387, 2002

Schwenzer, Ehrenfeld

Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Band 3: Zahnärztliche Chirurgie
Thieme Verlag: 122-123, 2000

Sculean, Jepsen

Regenerative Materialien in der Parodontologie, Teil 1: Knochentransplantate und – ersatzmaterialien
Parodontologie, Heft 3: 207- 217, 2004

Shetty V., Niederdellmann H., Katthagen B.-D.

Erste klinische Erfahrungen mit einem pyrolisierten Knochenersatzmaterial
Dtsch. Zahnärztl. Z 43: 129-131, 1988

Simonds R.J., Holmberg S.D., Hurwitz R.L.

Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor
New England Journal of Medicine 326: 726-732, 1992

Soldner E., Herr G.

Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien
Trauma Berufskrankh. 3: 256-269, 2001

Soost, Frank

Habilitationsschrift: Validierung des Knochenumbaus von Knochenersatzmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2000
<http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/soost-frank-2001-03-06/HTML/front.html>

Stützle H., Kessler S., Mandelkow H., Schweiberer L.

Knochenbankorganisation
Unfallchirurg 94: 619- 623, 1991

Stützle H., Hallfeldt K., Mandelkow H., Kessler S., Schweiberer L.

Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien
Springer Verlag, Orthopäde 27: 118-125 1998

Süinkler M.

Simulation der Reossifikation von Unterkieferdefekten mittels einer innovativen Biokeramik mit und ohne Osteoblastentransplantation
Med. Dissertation Universität Rostock, 2003

Thorwart et al.

Untersuchung zur knöchernen Regeneration ossärer Defekte unter Anwendung eines nanopartikulären Hydroxylapatits (Ostim®)
Implantologie 12/1: 21-32, 2004

Tomford W.W.

Transmission of disease trough transplantation of musculoskeletal allografts – current concepts review
The journal of bone and joint surgery 77: 1742-1753, 1995

Trosse S.

Ergebnisse der noch unpublizierten Promotionsschrift. Persönliche Mitteilung
2008

Urist M.R.

Bone formation by autoinduction

Science 150: 893-899, 1965

Urist, M.R.

Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone- bone marrow consortium

In: Aebi M., Ragazzoni P. (Hrsg.) Bone Transplantation Springer , Berlin Heidelberg New York:

185-197, 1989

Wahl S.M, Hunt D., Wakefield L., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B., Sporn M.B.

Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production

Proc Natl Acad Sci USA 84: 5788- 5792, 1987

Walz C., Gerlach K.L., Dingeldein E.

Möglichkeiten der Osteoplastik mit boviner Spongiosa Experimentelle und klinische Untersuchungen

Dtsch Zahnärztl. Z. 49, 168- 169, 1994

Weber P.

Extrakorporale hydrostatische Hochdruckbehandlung als neues Verfahren zur Desinfektion infizierter Knochenpräparate

Dissertationsarbeit TU München, 2006

Weibrich G., Trettin R., Gnoth S.H., Götz H., Duschner H., Wagner W.

Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von KEM mittels Gasadsorption

MKG-Chir. 4: 148- 152, 2000

Williams D.F.

Definitions in biomaterials

In: Williams, D.F. (Hrsg.) Progress in biomedical engineering. Elsevier, Amsterdam (1987)

Wolf J.

Beschleunigung der Resorption von Knochenersatzmaterialien durch den Einsatz der Nano-Technologie

Dent Implantol 7, 24-28, 2003

Yamada S., Heymann D., Bouler J.M., Daculsi G.

Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro

J. Biomed Mat Res 37: 346- 352, 1997

Zuyev V. P., Dimitrieva L. A., Pankratov A. S., Filatova N. A.

The comparative characteristics of stimulators of reparative osteogenesis in the treatment of periodontal disease

Stomatologiya 75 (5), 31-4, 1996

Zuyev V. P., Minkin L. N., Pivovarov Yu. P.

Report on additional clinical trials of hydroxyapatite Preparations (“Ostim-Apatite”) Russian State Medical University, Dep. of maxillofacial surgery and stomatology, 1993

In: Reinle T., Untersuchungen zur Biokompatibilität eines Antibiotikums aus Kalziumsulfat und nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin nach Implantation in Kaninchenfemura, Dissertation Universität Gießen 2005

8. Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bienengräber für die freundliche Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung während der Durchführung, sowie seine hilfreichen Korrekturen und Hinweise bei der Überarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke den Operateuren Herrn Prof. Dr. Dr. K.-O. Henkel und Herrn Dr. W. Fröhlich für die freundliche Unterstützung und den Mitarbeiterinnen des Versuchstierhauses der Medizinischen Fakultät für die Nachsorge und Haltung der Tiere. Zudem gilt mein Dank Herrn Dr. H. Rohrman als betreuendem Tierarzt für die Narkotisierung und Überwachung der Tiere.

Für die Hilfestellung bei der bildlichen Dokumentation möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Fotolabors der Klinik Frau R. Stamm und Frau K. Kindermann bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern des Institutes für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, speziell Herrn Oberarzt Dr. V. Hingst für die Unterstützung beim Erstellen und Beurteilen der Röntgenbilder.

Frau S. Niemierski und Frau D. Gütschow möchte ich für die histologische Bearbeitung des umfangreichen Probenmaterials danken.

Beim Digitalisieren der Präparate erhielt ich Unterstützung von Frau K. Baier im Rechenzentrum der Universität Rostock.

Für die Hilfestellung beim Umgang mit dem Softwareprogramm ANALYSIS, insbesondere das Programmieren des Makros möchte ich Herrn Dipl.-Ing. G. Fulda vom Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock danken.

Frau Dr. S. Lenz danke ich für die Unterstützung bei der histomorphometrischen Auswertung.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. G. Kundt vom Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock für die Hilfe und Beratung bei der statistischen Analyse der Untersuchungsergebnisse.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meiner gesamten Familie und meinem Freund für die großartige moralische Unterstützung, die Geduld und den unerschütterlichen Glauben an die Fertigstellung der vorgelegten Arbeit bedanken.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. med. V. Bienengräber selbständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der angegebenen Mittel verfasst habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt. Der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock übertrage ich das Recht, diese Dissertation zu vervielfältigen und zu vertreiben.

Bremen, den 05.06.08

Juliane Albrecht

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliane Albrecht
Geburtsdatum: 28.08.1981
Geburtsort: Templin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dipl.Stom. Sabine Albrecht
geb. am 18.11.1961
Dipl.Stom. Sven Albrecht
geb. am 26.03.1962

Schulausbildung: 09/88-06/94 Lindenschule Templin
09/94-06/01 Gymnasium Templin
06/01 Abschluss der 13. Klasse mit der allgemeinen Hochschulreife (Ø 1,4)

Studium: 10/01 Aufnahme des Zahnmedizinstudiums an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
10/02 Ablegen der Naturwissenschaftlichen Vorprüfung (Gesamturteil: gut)
03/04 Abschluss des vorklinischen Studiums durch die Zahnärztliche Vorprüfung (Gesamturteil: sehr gut)
10/04 Hochschulwechsel an die Universität Rostock
10/06 Zahnärztliche Prüfung (Gesamturteil: sehr gut) und anschließende Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang: 06/07 Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dipl. Stom. Sven und Sabine Albrecht in Templin
10/07-11/07 Assistenz Zahnärztin in der überörtlichen Praxisgemeinschaft Dr. Stahlberg, Dr. Reiter und Partner in Bremen
Seit 12/07 Assistenz Zahnärztin in der Praxis von Herrn Dr. Günter Scheuble in Bremen

Bremen, den 05.06.08

11. Thesen zur Dissertationsschrift

In-Vivo-Testung ungesinterter, nanokristalliner Knochenaufbaumaterialien auf Hydroxylapatit-Basis bei der Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe

- Eine vergleichende tierexperimentelle Kurzzeitstudie am Miniaturschwein -

vorgelegt von Juliane Albrecht

1. Bei der Rekonstruktion knöcherner Defekte kritischer Größe im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich stellt die Transplantation autologen Knochens bisher den Goldstandard dar. Nachteilig sind jedoch der erforderliche Zweiteingriff mit möglichen Komplikationen und in Einzelfällen die mangelnde Verfügbarkeit. Deshalb wurden in letzter Zeit verstärkt alternative Knochenaufbaumaterialien (KAM) entwickelt, wobei neben xenogenen Produkten mit den bekannten Risiken alloplastische KAM auf Kalziumphosphat(CP)-Basis zunehmend an Bedeutung gewinnen.
2. Das Problem herkömmlicher im Sinterverfahren bei Temperaturen von ca. 1300 °C hergestellter CP-Keramiken ist ihre begrenzte Osteokonduktivität sowie ihr unangepasstes Biodegradationsverhalten, d.h. ihr zu langsamer zumeist unvollständiger Abbau. Die Knochenregeneration erfolgt dadurch nicht optimal, da eine Beeinträchtigung der Biomechanik des Knochens resultiert. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde an der Universität Rostock eine Technologie zur Herstellung von CP-Xerogelen auf Sol-Gel- Basis mit einem Siliziumdioxid(SiO₂)-anteil entwickelt (GERBER et al. 2000). Diese neuartigen nanokristallinen KAM besitzen durch ihre große Oberfläche und interkonnektierenden Poren unterschiedlicher Größenordnungen eine sehr gute Osteokonduktivität sowie ein an die Knochenneubildung angepasstes Biodegradationsverhalten, wie Voruntersuchungen aus der interdisziplinären Forschungsgruppe ergaben (ABDO 2003).

3. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer In-vivo-Kurzzeitstudie das in Rostock entwickelte KAM NanoBone® der Firma Artoss zu prüfen, bei dem es sich um ein Hydroxylapatit(HA)-Xerogel mit 24%igem SiO₂-Anteil handelt. Als Vergleichsmaterial diente das KAM Ostim® (Heraeus-Kulzer, Hanau), ein HA-Hydrogel. Als Versuchstiere wurden wegen des humananlogenen ossären Reparationsverhaltens Göttinger Miniaturschweine gewählt. Bei 6 Tieren wurden beidseits Critical-Size-Defekte (>5cm³) des Unterkiefers gesetzt, in welche alternierend die zu testenden KAM eingebracht wurden. Nach 5-wöchiger Implantationszeit erfolgte die Opferung der Tiere mit nachfolgender klinischer und röntgenologischer Untersuchung. Der aus der Defektregion entnommene Knochen wurde zudem histologisch aufbereitet und unter Einbeziehung morphometrischer Methoden untersucht. Als Kontrollgruppe stand eine Versuchsgruppe (n 4) mit Critical-Size-Defekten des Unterkiefers zur Verfügung, die ohne Versorgung durch ein KAM blieben (KRATZKE, 2003).
4. Die klinische Untersuchung der Defektregionen ermöglichte eine orientierende Bewertung der Ossifikationsprozesse. Nach 5-wöchiger Implantationszeit waren bei beiden KAM mandibuläre Restdefekte nachweisbar. Die mittlere Verkleinerung bezogen auf die Ausgangsdefektgröße betrug nach Implantation von Ostim® 78,5%, wohingegen der Vergleichswert für NanoBone® lediglich 58,7% erreichte. Während sich in der NanoBone®-Gruppe makroskopisch Biomaterialreste in mäßigem Ausprägungsgrad zeigten, fanden sich solche bei Verwendung von Ostim® nicht.
5. Röntgenologisch zeigten sich nach 5-wöchiger Implantationszeit bei beiden Gruppen zentrale Aufhellungsareale in der ehemaligen Defektregion. Bei den Tieren der NanoBone®-Gruppe waren diese Aufhellungszonen im Gegensatz zu der Ostim®-Gruppe von granulären knochendichten Strukturen durchsetzt, welche auf persistierende Biomaterialanteile bzw. kleinere Ossifikationszentren hindeuten. Durch die mögliche Lagerungskongruenz, Überlagerungseffekte und unterschiedliche Aufnahmetechniken postoperativ und postmortal ist die Aussagekraft der röntgenologischen Untersuchungen eingeschränkt.

6. In den qualitativen und semiquantitativen histologischen Untersuchungen dominierten 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® in der Defektregion neben neugebildetem Geflechtknochen, differenziertes Bindegewebe sowie Biomaterialpartikel. Auffällig waren zudem das Vorhandensein von zentralen Verbundosteogenesen, welche auf osteoprotektive Eigenschaften des KAM hindeuten sowie das Vorhandensein von Riesenzellen mit Biomaterialkontakt als Zeichen osteoklastären Abbaus. Fünf Wochen nach Implantation von Ostim® zeigte sich eine etwas stärkere, vorwiegend randständige Knochenneubildung als in der Vergleichsgruppe, wobei der neu gebildete Knochen von verhältnismäßig großen Markräumen resp. zentralen Hohlräumen durchsetzt wurde. Das Biomaterial war zu diesem Zeitpunkt fast vollständig resorbiert und nur noch ganz vereinzelt nachweisbar. Verbundosteogenesen waren daher nicht nachweisbar. Entzündliche Prozesse in den Defektregionen fanden sich bei Verwendung beider KAM nur geringgradig.

7. Die zusätzlich durchgeführte histomorphometrische Analyse 5 Wochen nach Implantation von Ostim® zeigte auf die Ausgangsdefektgröße bezogen eine signifikant kleinere mittlere Restdefektgröße (18,62%) gegenüber der NanoBone®-Gruppe P (39,16%). Der Hauptanteil der Restdefekte bestand aus differenziertem Bindegewebe, welches in der NanoBone®-Gruppe (29,29%) einen signifikant höheren Mittelwert als in der Ostim®-Gruppe (11,68%) aufwies. Der residuelle Biomaterialanteil bei NanoBone® war aufgrund eines langsameren Abbaus signifikant höher (7,26%), aber offenbar an die Knochenneubildung angepasst. Ostim® hingegen war nach 5 Wochen bereits fast vollständig resorbiert (0,24%). Zudem waren bei den Tieren der Ostim®-Gruppe signifikant mehr erweiterte Markräume resp. zentrale Hohlräume zu beobachten, was für eine zu schnelle Biodegradation spricht. Die aus den histomorphometrischen Daten errechneten prozentualen Anteile an neugebildetem Knochen lagen - bezogen auf die Ausgangsdefektgröße - bei Ostim® mit 81,25% deutlich höher als bei NanoBone® mit 60,8%.

8. Ein histomorphometrischer Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (KRATZKE 2003) war aufgrund abweichender Parameter nur eingeschränkt möglich. Es ließen sich nach 5-wöchiger Kontrollzeit eine signifikant erhöhte Knochenneubildungsrate sowie eine stärkere prozentuale Defektverkleinerung bei den mit Ostim®-versorgten Defekten gegenüber denen der Kontrollgruppe nachweisen. Dagegen waren die Kontrollgruppe und die NanoBone®-Gruppe wegen signifikant abweichender Ausgangsdefektgrößen statistisch nicht vergleichbar.

9. Der histomorphometrische Vergleich der beiden getesteten alloplastischen KAM mit dem xenogen Produkt BioOss® (Geistlich, Baden-Baden), welches ebenfalls in der Rostocker Arbeitsgruppe getestet wurde (GRUBER, 2008), zeigte folgendes:
5 Wochen nach Implantation von Ostim® war die Knochenneubildungsrate signifikant höher als bei Verwendung von BioOss®, was wiederum eine signifikant stärkere Knochenbildung als NanoBone® auslöste. Der Anteil an differenziertem Bindegewebe war bei NanoBone® signifikant höher als bei BioOss® und Ostim®, bei welchem signifikant mehr erweiterte Markräume resp. Hohlräume und weniger Biomaterial in der Defektregion nachweisbar waren als in den anderen Gruppen.

10. Die Wahl eines Versuchsmodells mit bestmöglicher biologischer Humananalogie hinsichtlich der Knochenreparation erlaubt eine Übertragung tierexperimenteller Ergebnisse in die klinische Praxis mit gebotener Zurückhaltung. Zudem ist ein gewisser Grad an Subjektivität bei der Auswertung der röntgenologischen und histologischen Befunde einzuräumen. Die aus ethischen Gründen klein gehaltene Versuchstieranzahl beeinträchtigt z. T. die Aussagekraft der metrisch erfassbaren Werte, insbesondere der Histomorphometrie. Letztlich reichen In-vivo-Untersuchungen über einen Zeitraum von 5 Wochen nicht aus, um das biologische Verhalten von KAM endgültig einzuschätzen. Aus diesem Grunde wurden in der Arbeitsgruppe zusätzlich Langzeit-Tierversuche bis zu 8 Monaten durchgeführt. Diese waren nicht Gegenstand dieser Arbeit; ihre Ergebnisse gehen jedoch in die Formulierung der Thesen 11 und 12 mit ein.

11. Die in vivo getesteten alloplastischen KAM auf der Basis von HA-Hydrogelen resp. HA-Xerogelen stellen eine deutliche Verbesserung gegenüber herkömmlichen bei Temperaturen von ca. 1300°C gesinterten CP-Keramiken dar. Beide zeichnen sich durch eine gute Osteokonduktivität mit hoher Knochenneubildungsrate aus. Letztere ist bei Ostim® etwas stärker ausgeprägt, wobei der neugebildete Knochen vorwiegend randständig lokalisiert ist. Seine Resorption erfolgt sehr schnell, was zu zentralen Hohlrumbildungen im Defekt führt. Dagegen wird NanoBone® durch den Abbau von Osteoklasten im Rahmen des physiologischen ossären Remodellings angepasst an die Knochenneubildung biodegradiert. Es besitzt eine ausreichende mechanische Belastbarkeit, die bei Ostim® wegen der weichen Konsistenz des Hydrogels nicht gegeben ist.

12. Aufgrund der in These 11 angegebenen Eigenschaften können beide Biomaterialien bei Vorhandensein normalen Lagergewebes anstelle von autologem Knochen dem bisherigen Goldstandard als KAM eingesetzt werden. Dabei eignet sich Ostim® besser für die Versorgung schmaler, spaltförmiger Defekte z.B. im Parodontalbereich oder in schwer zugänglichen Regionen. Der Einsatz von NanoBone® bietet sich bei mittelgroßen Kieferknochendefekten unterschiedlicher Genese sowie beim Sinuslift an.

II. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Schematische Darstellung der Anatomie des Knochens, aus Lippert: Lehrbuch Anatomie (2000). (nicht auf der Darstellung berücksichtigt ist das Endost, welches die innere Auskleidung des Markraumes von Röhrenknochen bildet) 1- Substantia compacta, 2-Substantia spongiosa, 3-Osteon (auseinander gezogen), 4- Blutgefäße, 5- Periost, 6- Zentralkanal (Havers- Kanal), 7- Erweiterte Havers-Kanäle in der Spongiosa, 8- Äußere Generallamellen, 9- Fibrae perforantes (Sharpey- Fasern), 10- Vom Periost her eintretendes Blutgefäß in „Volkman- Kanal“
- Abb.2: Komponenten der knöchernen Regeneration, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgelmatrix, 2007
- Abb.3: HA-Hydrogel Ostim® (Heraeus-Kulzer, 2003)
- Abb.4: Applikation des pastösen KAM Ostim® mittels spezieller Spritze (aus Jelitte G., Laterale Augmentation- bei Einsatz eines nanokristallinen Hydroxylapatits, ZMK 20: 54ff., 2004)
- Abb.5: Ostim® wird mittels Spritze formschlüssig in einen knöchernen Defekt gefüllt (aus Thorwarth et al.: knöcherne Regeneration mit nanopartikulärem Hydroxylapatit, Implantologie 12/1, S. 21-32, 2004)
- Abb.6: Situation nach Einbringen des Materials (aus Thorwarth et al.: knöcherne Regeneration mit nanopartikulärem Hydroxylapatit, Implantologie 12/1, S. 21-32, 2004)
- Abb.7: HA-Kieselgel-Matrix (NanoBone®)
- Abb.8: Herstellung eines Xerogels durch Trocknung, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.9: Anmischen von NanoBone® mit Patientenblut, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.10: mit Patientenblut gemischtes KAM NanoBone®, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.11: Entfernen des überschüssigen Blutes, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007

- Abb.12: pastöse Konsistenz des mit Blut gemischten KAM vor der Applikation, aus Vortrag Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.13: Operationssitus nach Defektfüllung mit NanoBone®, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.14: NanoBone®- makroskopische Darstellung der Schüttung des Granulats, aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.15: HA-Kieselgel-Matrix (REM), aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.16: einzelnes Granulatkorn (REM), aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.17: Kieselgel (TEM), aus Bienengräber, V.: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007
- Abb.18: Präzipitierte HA- Kristalle (aus Herstellerinformation Ostim®, Heraeus-Kulzer®, 2003)
- Abb.19: Temperaturabhängigkeit der Porosität: kennzeichnend ist der starke Abfall der Porosität ab einer Temperatur von 800 °C, oberhalb dieser Temperatur spricht man von Hochtemperatur-HA-Keramiken oder HA-Sinterkeramiken, unterhalb von 800°C von ungesinterten Niedertemperatur-HA-Matrizes (aus Bienengräber: Eine neuartige nanokristalline HA-Kieselgel-Matrix, 2007)
BCP Biphasisches Calciumphosphat, HA Hydroxylapatit
- Abb.20 : Operationssitus: Markierung des Defektes mittels Rosenbohrer an der anterioren Mandibula eines Göttinger Miniaturschweines
- Abb.21 : Operationssitus, Zustand nach Defektsetzung an der anterioren Mandibula eines Göttinger Miniaturschweines
- Abb.22: entnommene linke Mandibulahälfte eines Miniaturschweines 5 Wochen nach Implantation eines KAM (Ostim®)
- Abb.23: Postoperative Röntgenaufnahme des Unterkiefers in Lateraltaufnahmetechnik (Pfeile markieren die Defektregion)
- Abb.24: Postmortale Röntgenaufnahme der durchtrennten Unterkieferhälften im seitlichen Strahlengang (Pfeile markieren die sichtbaren Restdefekte)

- Abb.25: Eingesanntes Dünnschliffpräparat (1200dpi) der Defektregion 5 Wochen nach Implantation eines KAM, Ostim®, Giemsa-Toluidinblau-Färbung (Vergr.: 3x)
- Abb.26: Eingesanntes entkalktes Präparat (1200dpi) der Defektregion 5 Wochen nach Implantation eines KAM, NanoBone®, HE-Färbung (Vergr.: 3x)
- Abb.27 : Bearbeitetes, eingesanntes Dünnschliffpräparat (Toluidinblau-Färbung) der Defektregion 5 Wochen nach Biomaterialimplantation (NanoBone®), 1200dpi (Vergr.: 3x)
- Abb.28: Bearbeitetes, eingesanntes, entkalktes Präparat der Defektregion (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) 5 Wochen nach Biomaterialimplantation (Ostim®), 1200dpi (Vergr.: 3x)
- Abb.29: Klinischer Befund 5 Wochen nach Implantation von Ostim® bukkale Ansicht (Tier N1 li), die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt
- Abb.30: Klinischer Befund nach 5 Wochen nach Implantation von Ostim® linguale Ansicht (Tier N2 re), die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt
- Abb.31: Klinischer Befund 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P1 li) bukkale Ansicht, die Pfeile markieren den sichtbaren Restdefekt
- Abb.32: Klinischer Befund 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P1 re) Ansicht von lingual. Die Pfeile zeigen die Defektregionen mit Biomaterialresten (BM)
- Abb.33: Unterkiefer-Lateralaufnahme (Tier N1 links) nach Ostim®-Implantation (Pfeile markieren Defektregion)
- Abb.34: Unterkiefer-Lateralaufnahme (Tier N1 rechts) nach Ostim®-Implantation (Pfeile markieren Defektregion)
- Abb.35: Unterkiefer-Lateralaufnahme (Tier P2 links) nach NanoBone®-Implantation (Pfeile markieren Defektregion)
- Abb.36: Unterkiefer-Lateralaufnahme (Tier P2 rechts) nach NanoBone®-Implantation (Pfeile markieren Defektregion)
- Abb.37: Mandibulahälften im seitlichen Strahlengang (Tier N1) 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Pfeile markieren sichtbare Restdefekte)

- Abb.38: Mandibulahälften im seitlichen Strahlengang (Tier P2) 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Pfeile markieren sichtbare Restdefekte)
- Abb.39+40: Röntgenaufnahmen post mortem der Tiere N2 (Abb. 39) und N3 (Abb. 40), jeweils linke und rechte Hälfte der Mandibula, 5 Wochen nach Implantation von Ostim®
- Abb.41+42: Röntgenaufnahmen post mortem der Tiere P1 (Abb. 41) und P3 (Abb. 42), jeweils linke und rechte Hälfte der Mandibula, 5 Wochen nach Implantation von NanoBone®
- Abb.43+44: Defektquerschnitte 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Abb. 32) bzw. NanoBone® (Abb. 33), entkalkte Präparate, HE-Färbung (gescannt mit 1200 dpi, Vergr.: 3x)
- Abb.45: Defektquerschnitt (gescannt mit 1200dpi) eines mit Ostim® gefüllten Defektes (N2li2) nach 5 Wochen (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin-Färbung, Vergr. 3x) Zentral sehr gute Ossifikation, Biomaterial ist nur noch vereinzelt vorhanden, Hohlrumbildung, geringfügiger Bindegewebsanteil
BGM Bindegewebe, EM Erweiterter Markraum, MK Mandibularkanal, BM Biomaterial, KN Knochen
- Abb.46: Defektquerschnitt (gescannt mit 1200dpi) eines mit NanoBone® gefüllten Defektes (P1re4) nach 5 Wochen (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin-Färbung, Vergr. 3x) Zentral noch Biomaterialreste, teilweise in direktem Kontakt mit Knochen, sowie Bindegewebe
BGM Bindegewebe, MK Mandibularkanal, BM Biomaterial, KN Knochen
- Abb.47: Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 45, Ostim® 5 Wochen in situ, Vergr.: 40 X
KN-Knochen, MK-Mandibularkanal
- Abb.48: Ausschnittsvergrößerung, Ostim® 5 Wochen in situ, Vergr.: 100 X
EZ-Entzündungszellen, HA-Hydroxylapatit, BGW-Bindegewebe
- Abb.49: Verbundosteogenese im Bereich von NanoBone®-Restpartikeln, Abbau des KAM durch Osteoklasten, Vergr.: 100 X
KN-Knochen, OK-Osteoklasten, BM-Biomaterial

- Abb.50+51: Ausschnittsvergrößerungen (100x) aus Abbildung 49 zeigen NanoBone®-Partikel, die durch als Osteoklasten identifizierte Riesenzellen abgebaut werden
OK Osteoklasten, BM Biomaterial, Abb.50: Giemsa-Toluidinblau-Färbung, Abb.51: HE-Färbung
- Abb.52: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier N3 re. (Ostim®)
- Abb.53+54: Histofotogramme aus der Defektregion 5 Wochen nach Implantation von Ostim® Tier N3 re. (Abb.54: Giemsa- Toluidinblau, Abb.55: HE-Färbung)
Beide Übersichtsaufnahmen (Vergr.: 4 X) unterschiedlicher Defektregionen zeigen eine durchgehend starke Knochenneubildung, Biomaterialreste fehlen
- Abb.55: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier N2 li. (Ostim®)
- Abb.56: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes bei Tier P1 re. (NanoBone®)
- Abb.57+58: Trenn-Dünnschliffe aus der Defektregion 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® bei Tier P1 re. (Giemsa-Toluidinblau-Färbung). Abb. 57: Übersichtsaufnahme (Vergr. 10 X) mit Zeichen randständiger und zentraler Ossifikation Abb. 58: Ausschnittsvergrößerung aus dem Defektzentrum mit Nachweis der Verbundosteogenese (Vergr. 40 X)
- Abb.59: Graphische Darstellung der Einzelparameter des Knochendefektes beim Tier P2 re. (NanoBone®)
- Abb.60+61: Trenn-Dünnschliffe aus zwei unterschiedlichen Defektregionen 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® bei Tier P2 re. (Giemsa-Toluidinblau-Färbung, Vergr. 10 X) mit deutlichen Zeichen randständiger, aber nur geringer zentraler Ossifikation
- Abb.62: Graphischer Mittelwertvergleich der erhobenen Parameter für die Gruppen P und N
- Abb.63+64: Histologische Präparate des Tieres P1re4 (Abb.63 unbearbeitet, Abb.64 bearbeitet mit Photoshop®)*, Defekt 5 Wochen nach NanoBone®- Implantation (Giemsa-Toluidinblau-Färbung, 1200dpi)
* grün-Bindegewebe, rot-Mandibularkanal

- Abb.65+66: Histologische Präparate des Tieres N2li2 (Abb.65 unbearbeitet, Abb.66 bearbeitet mit Photoshop)*, Defekt 5 Wochen nach Ostim®-Implantation (Giemsa-Toluidin-Färbung, 1200dpi)
*grün-Bindegewebe, rot-Mandibularkanal, gelb-Vakanzen, pink-erweiterte Markräume
- Abb.67: Zusammensetzung der Restdefekte (Mittelwerte) 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Gruppe N)
BM Biomaterial, BGW Bindegewebe, EM Erweiterter Markraum, V Vakanzen, AF Artefakte
- Abb.68: Zusammensetzung der Restdefekte (Mittelwerte) 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Gruppe P)
BM Biomaterial, BGW Bindegewebe, EM Erweiterter Markraum, V Vakanzen, AF Artefakte
- Abb.69: Typische Verteilung der Knochenbildung in einem Defekt 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Tier N3li)
- Abb.70 : Typische Verteilung der Knochenbildung in einem Defekt 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Tier P3re)
- Abb.71: prozentuale Zusammensetzung der Defektbestandteile 5 Wochen nach Implantation von Ostim® (Grupp N), BM Biomaterial, Bgw Bindegewebe, EM erweiterter Markraum, Kn Knochen
- Abb.72: prozentuale Zusammensetzung der Defektbestandteile 5 Wochen nach Implantation von NanoBone® (Gruppe P), BM Biomaterial, Bgw Bindegewebe, EM erweiterter Markraum, Kn Knochen
- Abb.73-75: Mandibulae von Minipigs, klinische Befunde 5 Wochen nach Implantation unterschiedlicher KAM in Knochendefekte kritischer Größe
Abb.73: BioOss® (aus Gruber, 2008), Abb.74: Ostim®, Abb.75: NanoBone®
- Abb.76-78: Mandibulae von Minipigs, histologische Befunde 5 Wochen nach Implantation unterschiedlicher KAM in Knochendefekte kritischer Größe
Abb.76: BioOss® (aus Gruber, 2008), Abb.77: Ostim®, Abb.78: NanoBone®

III. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Anforderungen an ein KAM
- Tabelle 2: Transplantate Terminologie (modifiziert aus Reichart, Hausamen, Becker: Curriculum zahnärztliche Chirurgie, 2000)
- Tabelle 3: Einteilung von KEM (Linhart 2003)
- Tabelle 4: Eigenschaften von Ostim® und NanoBone®
- Tabelle 5: histomorphometrisch bestimmte Parameter, Abkürzungen und Erläuterungen
- Tabelle 6: klinisch ermittelte Ausgangs- und Restdefekte der Versuchsgruppen N und P
- Tabelle 7: Semiquantitative histologische Untersuchung von Defekten kritischer Größe
Mittelwerte 5 Wochen nach Implantation von Ostim®
Bewertungskriterien: 0-kein, 1-gering, 2-deutlich, 3-stark
- Tabelle 8: Semiquantitative histologische Untersuchung von Defekten kritischer Größe
Mittelwerte 5 Wochen nach Implantation von NanoBone®
Bewertungskriterien: 0-kein, 1-gering, 2-deutlich, 3-stark
- Tabelle 9: Vergleich der semiquantitativen histologischen Parameter (Mittelwerte) für die Gruppen N und P
- Tabelle 10: Ausgangsdefektgrößen bei den Minipigs beider Versuchsgruppen N und P
- Tabelle 11: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch in den Defektregionen nachweisbare Biomaterialanteile
- Tabelle 12: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch in den Defektregionen nachweisbarer Bindegewebsanteil
- Tabelle 13: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare erweiterte Markräume in den Defektregionen
- Tabelle 14: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare Vakanzen in den Defektregionen
- Tabelle 15: 5 Wochen nach Implantation histomorphometrisch nachweisbare Artefakte in den Defektregionen

- Tabelle 16: 5 Wochen nach Implantation errechnete Restdefekte (bezogen auf die klinischen Ausgangsdefekte)
- Tabelle 17: Ausgangsdefektgröße sowie Knochenbildungsrate und Defektverkleinerung nach 5 Wochen in den mit KAM behandelten Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe
- Tabelle 18: Signifikanzprüfungen*: Ausgangsdefektgrößen, Knochenneubildungsraten und relative Defektverkleinerungen 5 Wochen nach Implantation von zwei KAM sowie in einer Kontrollgruppe, C** Kontrolle (aus KRATZKE 2003), P NanoBone®, N Ostim® * U-Test von Mann und Whitney
- Tabelle 19: Gruppenvergleich der histomorphometrischen Parameter (Mittelwerte) 5 Wochen nach Applikation zweier Knochenaufbaumaterialien
- Tabelle 20: Histomorphometrische Parameter 5 Wochen nach Implantation der getesteten KAM
- Tabelle 21: Gruppenvergleiche P/N, P/O* und O*/N 5 Wochen nach Implantation der getesteten KAM Signifikanzprüfung nach Mann und Whitney
P NanoBone®, N= Ostim®, O*=BioOss® (aus GRUBER 2008), n.s.= nicht signifikant
- Tabelle 22: histomorphometrische Messwerte der Gruppe P (NanoBone®)
- Tabelle 23: histomorphometrische Messwerte der Gruppe (Ostim®)

IV. Abkürzungen

BCP	Biphasisches Calciumphosphat
BGW	Bindegewebe
BM	Biomaterial
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CP	Kalziumphosphat
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin (Färbemethode)
KAM	Knochenaufbaumaterial
KEM	Knochenersatzmaterial
KN	Knochen
MW	Mittelwert
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
SiO ₂	Siliciumdioxid
TCP	Tricalciumphosphat
TGF-β	Transforming Growth Factor β

V. Anhang

Zusätzliche Tabellen der Histomorphometrischen Befunde

Tabelle 22: histomorphometrische Messwerte Gruppe N (Ostim®)																
Präparat	klin. Defekt	Klin. Def.-Zahn (mm ²)	BM (mm ²)	BM (%)	Bgw (mm ²)	Bgw (%)	EM (mm ²)	EM (%)	Vakanz (mm ²)	Vakanz (%)	Hohlräume (mm ²)	Hohlräume (%)	Residdefekt (mm ²)	Residdefekt (%)	Kn (mm ²)	Kn (%)
N1li2	240,00		0,00	0,00	3,09	1,29	14,97	6,24	8,87	3,70	0,00	0,00	26,93	11,22	203,65	84,85
N1li4	240,00		0,00	0,00	14,73	6,14	15,09	6,29	14,77	6,15	0,00	0,00	44,59	18,58	195,41	81,42
N1li5	240,00		0,06	0,03	13,28	5,53	11,55	4,81	14,47	6,03	0,00	0,00	39,36	16,40	200,64	83,60
N1li7 2	240,00	215,82	0,00	0,00	4,42	2,05	4,92	2,28	10,42	4,83	0,00	0,00	19,76	9,16	196,06	90,84
N1li8 4	240,00	211,94	0,00	0,00	12,07	5,70	3,31	1,56	6,81	3,21	0,00	0,00	22,19	10,47	189,75	89,53
Mittelwert:	229,55		0,01	0,01	9,52	4,14	9,97	4,24	11,07	4,78	0,00	0,00	30,57	13,17	197,10	86,05
N1re5	260,00		0,00	0,00	91,84	35,32	6,97	2,68	11,28	4,34	0,00	0,00	110,09	42,34	149,91	57,66
N1re6	260,00		0,00	0,00	67,67	26,03	14,78	5,68	3,88	1,49	0,00	0,00	86,33	33,20	173,67	66,80
N1re6 Nf	260,00		0,00	0,00	82,02	31,55	5,61	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	87,63	33,70	172,37	66,30
N1re8 4	260,00		0,00	0,00	19,15	7,37	4,95	1,90	3,11	1,20	0,00	0,00	27,21	10,47	232,79	89,53
N1re9 4	260,00		0,00	0,00	16,71	6,43	7,08	2,72	4,97	1,91	0,00	0,00	28,76	11,06	231,24	88,94
Mittelwert:	260,00		0,00	0,00	55,48	21,34	7,88	3,03	4,65	1,79	0,00	0,00	68,00	26,16	192,00	73,84
N2li2	209,00		2,34	1,12	33,00	15,79	5,25	2,51	5,49	2,63	0,00	0,00	46,08	22,05	162,92	77,95
N2li3b	209,00		0,00	0,00	38,51	18,43	4,62	2,21	3,36	1,61	0,00	0,00	46,49	22,24	162,51	77,76
N2li5	209,00		0,00	0,00	31,63	15,13	11,61	5,56	16,02	7,67	0,00	0,00	59,26	28,35	149,74	71,65
N2li6 4	209,00		1,56	0,75	15,22	7,28	1,24	0,59	11,00	5,26	3,07	1,47	32,09	15,35	176,91	84,65
N2li7 4	209,00		11,00	5,26	18,60	8,90	1,30	0,62	12,26	5,87	1,31	0,63	44,47	21,28	164,53	78,72
Mittelwert:	209,00		2,98	1,43	27,39	13,11	4,80	2,30	9,63	4,61	0,88	0,42	45,68	21,86	163,32	78,14
N2re3	260,00	210,08	0,00	0,00	13,56	6,45	0,58	0,28	2,43	1,16	0,00	0,00	16,57	7,89	193,51	92,11
N2re4	260,00		0,00	0,00	44,05	16,94	12,23	4,70	6,47	2,49	0,00	0,00	62,75	24,13	197,25	75,87
N2re5	260,00		0,00	0,00	18,26	7,02	10,50	4,04	4,66	1,79	0,00	0,00	33,42	12,85	226,58	87,15
N2re7 5	260,00		0,00	0,00	31,95	12,29	2,60	1,00	8,61	3,31	0,00	0,00	43,16	16,60	216,84	83,40
N2re9 5	260,00		0,00	0,00	20,94	8,05	3,23	1,24	2,45	0,94	0,00	0,00	26,62	10,24	233,38	89,76
Mittelwert:	250,02		0,00	0,00	25,75	10,15	5,83	2,25	4,92	1,94	0,00	0,00	36,50	14,34	213,51	85,66
N3li3	209,00		0,00	0,00	22,82	10,92	10,06	4,81	17,13	8,20	0,00	0,00	50,01	23,93	158,99	76,07
N3li4	209,00		0,00	0,00	26,33	12,60	6,38	3,05	16,07	7,69	0,00	0,00	48,78	23,34	160,22	76,66
N3li5	209,00		0,00	0,00	26,76	12,80	16,35	7,82	12,61	6,03	0,00	0,00	55,72	26,66	153,28	73,34
N3li6 2	209,00		0,00	0,00	14,15	6,77	1,36	0,65	10,42	4,99	0,00	0,00	25,93	12,41	183,07	87,59
N3li6 5	209,00		0,00	0,00	13,35	6,39	0,00	0,00	9,82	4,70	0,00	0,00	23,17	11,09	185,83	88,91
Mittelwert:	209,00		0,00	0,00	20,68	9,90	6,83	3,27	13,21	6,32	0,00	0,00	40,72	19,48	168,28	80,52
N3re2	204,00	184,55	0,06	0,03	23,58	12,78	5,27	2,86	3,26	1,77	0,00	0,00	32,17	17,43	152,38	82,57
N3re3	204,00	166,57	0,00	0,00	24,02	14,42	10,03	6,02	0,00	0,00	0,00	0,00	34,05	20,44	132,52	79,56
N3re4	204,00	173,53	0,00	0,00	31,26	18,01	6,72	3,87	3,24	1,87	0,00	0,00	41,22	23,75	132,31	76,25
N3re5 2	204,00		0,00	0,00	9,01	4,42	5,04	2,47	5,24	2,57	0,00	0,00	19,29	9,46	184,71	90,54
N3re6 3	204,00		0,00	0,00	15,35	7,52	5,34	2,62	4,67	2,29	0,00	0,00	25,36	12,43	178,64	87,57
Mittelwert:	186,53		0,01	0,01	20,64	11,43	6,48	3,57	3,28	1,70	0,00	0,00	30,42	16,70	156,11	83,30
Mittelwert:	224,02		0,50	0,24	26,58	11,68	6,96	3,11	7,79	3,52	0,15	0,07	41,98	18,62	181,72	81,25

Tabelle 23: histomorphometrische Messwerte der Gruppe P (NanoBone®)

Präparat	klin. Defekt	Klin. Def-Zahn (mm ²)	BM (mm ²)	BM (%)	Bgw (mm ²)	Bgw (%)	EM (mm ²)	EM (%)	Vakanz (mm ²)	Vakanz (%)	Hohlräume (mm ²)	Hohlräume (%)	Restdefekt (mm ²)	Restdefekt (%)	Kn (mm ²)	Kn (%)
P1li3	234,00		14,39	6,15	91,79	39,23	1,68	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	107,86	46,09	126,14	53,91
P1li4	234,00		16,73	7,15	57,30	24,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	74,03	31,64	159,97	68,36
P1li5	234,00		14,59	6,24	76,38	32,64	0,00	0,00	0,00	0,00	1,55	0,66	92,52	39,54	141,48	60,46
P1li7 5	234,00		11,40	4,87	32,26	13,79	0,00	0,00	11,37	4,86	1,30	0,56	56,33	24,07	177,67	75,93
P1li8 5	234,00		10,07	4,30	53,40	22,82	0,00	0,00	5,26	2,25	0,16	0,07	68,89	29,44	165,11	70,56
Mittelwert:	234,00		13,44	5,74	62,23	26,59	0,34	0,14	3,33	1,42	0,60	0,26	79,93	34,16	154,07	65,84
P1re3	240,00		13,60	5,67	91,60	38,17	0,00	0,00	6,52	2,72	0,73	0,30	112,45	46,85	127,55	53,15
P1re4	240,00		20,66	8,61	89,99	37,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,04	110,75	46,15	129,25	53,85
P1re5	240,00		36,39	15,16	101,82	42,43	0,24	0,10	0,96	0,40	0,06	0,03	139,47	58,11	100,53	41,89
P1re7 4	240,00		12,49	5,20	31,71	13,21	0,00	0,00	1,33	0,55	2,15	0,90	47,68	19,87	192,32	80,13
P1re8 4	240,00		12,38	5,16	28,22	11,76	0,00	0,00	5,30	2,21	0,91	0,38	46,81	19,50	193,19	80,50
Mittelwert:	240,00		19,10	7,96	68,67	28,61	0,05	0,02	2,82	1,18	0,79	0,33	91,43	38,10	148,57	61,90
P2li2	228,00		11,84	5,19	61,18	26,83	0,00	0,00	8,12	3,56	0,93	0,41	82,07	36,00	145,93	64,00
P2li3	228,00		18,58	8,15	64,43	28,26	0,00	0,00	5,13	2,25	0,72	0,32	88,86	38,97	139,14	61,03
P2li4	228,00		25,61	11,23	73,20	32,11	2,68	1,18	0,00	0,00	1,15	0,50	102,64	45,02	125,36	54,98
P2li5 5	228,00		9,19	4,03	36,31	15,93	0,00	0,00	5,09	2,23	1,55	0,68	52,14	22,87	175,86	77,13
P2li6 3	228,00		11,66	5,11	45,16	19,81	0,00	0,00	7,39	3,24	0,00	0,00	64,21	28,16	163,79	71,84
Mittelwert:	228,00		15,38	6,74	56,06	24,59	0,54	0,24	5,15	2,26	0,87	0,38	77,98	34,20	150,02	65,80
P2re2	216,00		13,60	6,30	76,10	35,23	0,00	0,00	8,05	3,73	0,16	0,07	97,91	45,33	118,09	54,67
P2re4	216,00		22,09	10,23	86,68	40,13	0,00	0,00	5,74	2,66	1,40	0,65	115,91	53,66	100,09	46,34
P2re5	216,00		22,08	10,22	94,93	43,95	0,00	0,00	7,62	3,53	6,91	3,20	131,54	60,90	84,46	39,10
P2re6 3	216,00	205,91	9,37	4,55	36,32	17,64	0,00	0,00	5,27	2,56	3,13	1,52	54,09	26,27	151,82	73,73
P2re7 5	216,00	207,93	10,78	5,18	54,14	26,04	0,00	0,00	6,61	3,18	2,72	1,31	74,25	35,71	133,68	64,29
Mittelwert:	212,37		15,58	7,30	69,63	32,60	0,00	0,00	6,66	3,13	2,86	1,35	94,74	44,37	117,63	55,63
P3li2	198,00		12,96	6,55	56,19	28,38	0,00	0,00	7,19	3,63	0,46	0,23	76,80	38,79	121,20	61,21
P3li4	198,00		27,00	13,64	56,77	28,67	0,00	0,00	6,64	3,35	4,15	2,10	94,56	47,76	103,44	52,24
P3li5	198,00		28,03	14,16	85,38	43,12	0,00	0,00	7,88	3,98	0,00	0,00	121,29	61,26	76,71	38,74
P3li6 4	198,00		10,55	5,33	60,44	30,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,06	71,11	35,91	126,89	64,09
P3li7 5	198,00		6,00	3,03	82,29	41,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,09	88,46	44,68	109,54	55,32
Mittelwert:	198,00		16,91	8,54	68,21	34,45	0,00	0,00	4,34	2,19	0,98	0,49	90,44	45,68	107,56	54,32
P3re4	198,00		6,42	3,24	53,89	27,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,09	60,48	30,55	137,52	69,45
P3re5	198,00		15,09	7,62	73,93	37,34	3,27	1,65	0,00	0,00	0,37	0,19	92,66	46,80	105,34	53,20
P3re6	198,00		20,59	10,40	82,43	41,63	1,37	0,69	1,98	1,00	2,01	1,02	108,38	54,74	89,62	45,26
P3re7 5	198,00		11,81	5,96	49,44	24,97	0,00	0,00	0,00	0,00	1,77	0,89	63,02	31,83	134,98	68,17
P3re10 5	198,00		18,18	9,18	26,61	13,44	0,00	0,00	10,67	5,39	0,64	0,32	56,10	28,33	141,90	71,67
Mittelwert:	198,00		14,42	7,28	57,26	28,92	0,93	0,47	2,53	1,28	0,99	0,50	76,13	38,45	121,87	61,55
Mittelwert:	218,39		15,80	7,26	63,68	29,29	0,31	0,14	4,14	1,91	1,18	0,55	85,11	39,16	133,29	60,84