

Universität Rostock
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie
Direktor
Prof. Dr. med. Dr. med. dent. B. Frerich

Funktionsbereich Experimentelle Forschung
Ehemaliger Leiter: Prof. Dr. Dr. med. V. Bienengräber

**Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe mittels des
bovinen Knochenaufbaumaterials Bio-Oss®**

Eine tierexperimentelle Längsschnittstudie an Miniaturschweinen

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

vorgelegt von: Anja Gruber
geboren am 29.05.1983 in Hagenow
aus: Schwerin

- Rostock 2009 -

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Volker Bienengräber

Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Rosemarie Grabowski

Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Götz

Annahme der Promotion am: 29.06.2009

Promotionsverteidigung am: 02.12.2009

WIDMUNG

Die Autorin widmet diese Arbeit ihren Eltern Roswitha und Bodo Gruber sowie ihrem langjährigen Lebenspartner René Salbach aus Dank für die ständige Unterstützung bei der Verwirklichung der Ziele.

Inhaltsverzeichnis

<i>I Abkürzungsverzeichnis</i>	3
<i>1. Einleitung und Zielstellung</i>	4
<i>2. Literaturübersicht</i>	6
2.1. Anatomische Grundlagen	6
2.2. Charakterisierung und Einteilung der Knochenersatzmaterialien (KEM) resp. Knochenaufbaumaterialien (KAM)	9
2.2.1. Autogener Knochen	10
2.2.2. Allogener Knochen	10
2.2.3. Alloplastische Materialien	11
2.2.4. Xenogene Materialien	12
2.3. Historische Entwicklung der Knochenersatzmaterialien (KEM)	13
2.4. Anforderungen an Knochenersatzmaterialien (KEM)	16
2.4.1. Verfügbarkeit	16
2.4.2. Risiken	16
2.4.3. Biologisches Verhalten und mechanische Eigenschaften	17
2.4.4. Knochenlager	17
2.5. Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEM)	18
2.6. Biokompatibilität	19
2.6.1. Biotoleranz	19
2.6.2. Bioinertheit	19
2.6.3. Bioaktivität	19
2.7. Osteogenese – Osteoinduktion – Osteokonduktion	20
2.8. Wachstumsfaktoren	22
2.8.1. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	22
2.8.2. Insulin- like Growth Factors (IGFs)	22
2.8.3. Fibroblast Growth Factor (FGF)	23
2.8.4. Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	23
2.8.5. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	23
2.9. Knochenregeneration	24
2.9.1. Appositionelle Knochenneubildung	25
2.9.2. Knochenneubildung durch Substitution	25
2.9.3. Die knöcherne Substitution von Knochentransplantaten	25
<i>3. Material und Methode</i>	27
3.1. Charakterisierung und Herstellung der getesteten Biomaterialien	27
3.1.1. Bio-Oss®	27
3.1.2. Zum Vergleich herangezogene Knochenaufbaumaterialien (KAM)	32
3.1.2.1. NanoBone®	32
3.1.2.2. Ostim®	33
3.1.3. Begriffsbestimmung Knochenaufbaumaterialien (KAM)	33
3.1.4. Biodegradation am Beispiel von Bio-Oss®	34
3.2. Versuchstiere	35
3.3. Versuchsdurchführung	37
3.3.1. Operationsmethode	37
3.3.2. Opferung der Tiere	39
3.4. Makroskopische Beurteilung	40
3.5. Röntgenologische Auswertung	40
3.6. Labortechnische Aufarbeitung	42
3.6.1. Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchungen	43
3.6.2. Histomorphometrische Methodik	44
3.6.3. Histochemische Methodik	46
3.6.3.1. Alkalische Phosphatasen	46

3.6.3.2.	BMP-2	47
3.6.3.3.	Tartrat-resistent acid phosphatase (TRAP)	47
3.7.	Statistische Auswertung	47
4.	Ergebnisse	48
4.1.	Klinische Untersuchungsergebnisse	48
4.2.	Röntgenologische Untersuchungsergebnisse	51
4.3.	Histologische Untersuchungsergebnisse	53
4.3.1.	Qualitative Befunde	53
4.3.2.	Semiquantitative histologische Ergebnisse	58
4.3.3.	Histomorphometrische Befunde	64
5.	Diskussion	70
5.1.	Vergleichende Erörterung der klinischen und röntgenologischen Ergebnisse	70
5.2.	Vergleichende Erörterung der histologischen Ergebnisse	75
5.3.	Vergleichende Erörterung ergänzender histochemischer Ergebnisse	78
5.4.	Vergleichende Erörterung der semiquantitativen histologischen und histomorphometrischen Ergebnisse	85
5.5.	Vergleichende Erörterung der Ergebnisse von Humanhistologien bei Einsatz von Bio-Oss® und der Referenzpräparate	91
6.	Zusammenfassung	94
II	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	A
	Eidesstattliche Erklärung	B
III	Abbildungsverzeichnis	C
IV	Tabellenverzeichnis	J
	Anhang	M
Thesen zur Inauguraldissertation		II

I Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BGW	Bindegewebe
BM	Biomaterial
BMP	bone morphogenetic proteins
BMU	bone multicellular unit
DOPC	determinierte Osteoprogenitorzellen
ELISA	enzyme- linked immunosorbent assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Growth Hormon
GHR	Growth Hormon Receptor
GMP	good manufacturing practice
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämalaun- Eosin (Färbemethode)
IGF	Insulin- like Growth Factor
IOPC	induzierbare Osteoprogenitorzellen
ISO	International Standards Organisation
KAM	Knochenaufbaumaterial
KEM	Knochenersatzmaterial
KN	Knochen
MW	Mittelwert
OC	Osteokalzin
PAS	Perjodsäure- Schiff
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGA	Polyglycolidsäure
PLA	Polylaktidsäure
TCP	Trikalziumphosphat
TGF –β	Transforming Growth Factor- β
p. i.	post implantationem
HRP	Horseradish peroxidase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

1. Einleitung und Zielstellung

Im klinischen Alltag müssen häufig knöcherne Defekte behandelt werden, was bis heute besondere Anforderungen an die plastisch rekonstruktive Chirurgie stellt und vielfach den Einsatz von Biomaterialien zum Knochenersatz erforderlich macht. Sie dienen bei großen ossären Defekten dazu, eine vollständige Reossifikation zu ermöglichen, während sie bei mittelgroßen und kleineren Defekten diese beschleunigen.

In der Zahnheilkunde werden Knochentransplantate oder an ihrer Stelle zunehmend Knochenersatzmaterialien (KEM) bei folgenden Indikationen eingesetzt: der Versorgung von angeborenen oder erworbenen Knochendefekten, z. B. Kieferspalt bei Spaltträgern bzw. nach Zystektomien und operativen Zahntfernungen oder zum Aufbau atrophischer Knochenstrukturen nach Zahnverlust in Form präprothetisch bzw. präimplantologisch erforderlicher Augmentationen. Als so genannter Goldstandard gilt bis heute die Transplantation von körpereigenem (autogenem) Knochengewebe, der neben einer originären Knochenstruktur die Knochenbildung anregende (osteoinduktive) Proteine enthält und daher eine überlegene biologische Potenz besitzt (BUSER & SCHENK 1995, KOHAL 1997). Nachteilig ist jedoch, dass zur Gewinnung autogenen Knochens ein Zweiteingriff notwendig ist, der sowohl den Aufwand als auch die Behandlungskosten steigert und mit einer nicht unerheblichen Morbidität verbunden ist (GERNGROSS et al. 1982). Die Alternative ist die Verwendung von Knochen eines anderen humanen Spenders. Dieser so genannte allogene Knochen von Knochenbanken hat einerseits den Nachteil durch seine Konservierung, die osteoinduktive Potenz eingebüßt zu haben, und birgt andererseits die potentielle Gefahr der Übertragung von bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten in sich. Wegen der deshalb erforderlichen Sorgfalt bei der Auswahl, Kontrolle und Lagerung allogener Transplantate ergibt sich ein so erheblicher Aufwand, dass sie heute kaum mehr zur Anwendung kommen. Transplantate von einer anderen Spezies, die man als xenogen bezeichnet, sind leichter als humane zu gewinnen. Bei der Aufarbeitung, die eine Deproteinisierung und Sterilisation beinhalten, gehen allerdings sämtliche osteoinduktive Eigenschaften verloren. Inzwischen gibt es hochgereinigte xenogene Produkte, bei denen das Restrisiko der Übertragung von Krankheitserregern und allergisierenden Proteinen minimiert wurde, so dass sie als Biomaterialien mit hoher Osteokonduktivität vermehrt klinisch als Knochenersatzmaterialien (KEM) eingesetzt werden. Um die Nachteile von KEM biologischer Herkunft zu umgehen, werden für viele Indikationsbereiche synthetisch hergestellte, alloplastische KEM eingesetzt. Sie sind unbegrenzt verfügbar und zeigen aufgrund ihrer hohen Osteokonduktivität vielfach gute

klinische Ergebnisse (AEBI 1991, SCHENK 1991). Dazu bietet sich insbesondere die innovative Generation dieser Substanzen an, die so genannten Knochenaufbaumaterialien (KAM). Sie besitzen eine nanokristalline Hydroxylapatit (HA)-Struktur, aufgrund der sie eine sehr gute Osteokonduktivität und eine der Knochenneubildung angepasstes Biodegradationsverhalten aufweisen.

Das Thema „Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe mittels des bovinen Knochenaufbaumaterials Bio-Oss®“ in Form einer tierexperimentellen Längsschnittstudie wurde gewählt, da sich tendenziell eine Verschiebung der Behandlungsoptionen von autologen Knochentransplantaten zu allseits akzeptierten innovativen KAM, xenogenen und synthetischen Ursprungs, abzeichnet.

Ziel dieser Arbeit ist die Auswertung einer *In-vivo*-Testung des xenogenen KAM Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) an Göttinger Miniaturschweinen. Es handelt sich um ein Präparat bovinen Ursprungs auf HA-Basis. Dazu soll das Biomaterial in „critical size“ Defekte der Mandibula eingebracht werden. Das sind Defekte in einer Größenordnung, bei der eine vollständige knöcherne Regeneration spontan nicht mehr erfolgen kann, sondern größtenteils bindegewebiges Narbengewebe im Defekt verbleibt (BOSCH et al. 1998, HOLLINGER & KLEINSCHMIDT 1992). Als Beobachtungszeiträume wurden 5 Wochen und 8 Monate gewählt, so dass neben der tierexperimentellen Kurzzeittestung eine vergleichende Langzeittestung möglich war. Im Vordergrund dieser Untersuchung stehen die Analyse des Ossifikations- und Biodegradationsverhaltens von Bio-Oss®, da diese Eigenschaften als Schlüsselparameter für die klinische Eignung von KAM gelten. Methodisch zielführend erscheinen klinische, röntgenologische und qualitative bzw. semiquantitative histologische Untersuchungen, ergänzt durch eine histomorphometrische Analyse. Obwohl Bio-Oss® schon einige Jahre im klinischen Einsatz ist, erscheint das notwendig, da derartige Untersuchungen in der Kieferregion bisher nicht vorliegen. Zudem sollen die gewonnenen Ergebnisse als Vergleichsbasis für die Weiterentwicklung von KAM dienen. Da diese Studie Teil eines größeren Forschungsprojektes darstellt, standen als Kontrollgruppe die Ergebnisse früher durchgeführter Untersuchungen an unversorgten „critical size“ Defekten des Unterkiefers an Miniaturschweinen zur Verfügung. Von anderen Untersuchern im Team wurden zwei alloplastische KAM analog *In-vivo* getestet, so dass in der Diskussion ein Vergleich mit eigenen für Bio-Oss® ermittelten Ergebnissen erfolgen kann. Bei diesen Referenzmaterialien handelt es sich um das HA-Xerogel NanoBone® (Artoss) und um das HA-Hydrogel Ostim® (Haereus-Kulzer).

2. Literaturübersicht

2.1. Anatomische Grundlagen

Makroskopisch lässt sich der Knochen formal in lange, kurze und platte Knochen einteilen. Die Oberfläche der Knochen ist von der Knochenhaut (Periost) bedeckt, darunter liegt eine kompakte Schicht, die Substantia compacta, und im Inneren eine lockeres Bälkchenwerk, die Substantia spongiosa. Das blutbildende Knochenmark und das im Alter zunehmende Fettmark befinden sich zentral zwischen den Knochenbälkchen. Histologisch lässt sich das Knochengewebe in Geflechtknochen und lamellären Knochen unterscheiden. Der Geflechtknochen besteht aus wenig organisierter Matrix mit einem geringen Mineralanteil und hohem Zellanteil und ist als primitives Knochengewebe einzustufen, welches im reifen Knochen wenig vorkommt, z. B. an der Ansatzstelle von Sehnen und Bändern. Im Vergleich dazu hat der Lamellenknochen einen hohen Mineralanteil und eine langsame Bildung. Im Zentrum der Kompaktalamellen sind histologisch für die Knochenernährung zuständige Gefäßkanäle nachweisbar. In Längsrichtung verlaufen die so genannten Havers'schen Kanäle, die von konzentrisch angeordneten Knochenlamellen umgeben sind und mit diesen eine Funktionseinheit bilden, die Osteon genannt wird. Der Raum zwischen den Lamellensystemen wird von Schaltlamellen ausgefüllt. Senkrecht zu den in Längsrichtung verlaufenden Havers'schen Kanälen wird die Kompakta von Volkmannkanälen durchzogen, die von der inneren und äußeren Oberfläche in den Knochen eintreten und die Lamellen durchsetzen (JUNQUEIRA & CARNEIRO 1986). Die Spongiosa besteht aus außen glatt begrenzten und innen lamellär geschichteten Knochenbälkchen, welche als regelmäßiges Netzwerk das Knochenmark durchziehen (ADLER 1997).

Osteoid, der organische Anteil des Knochens, macht etwa 23% der Knochenmasse aus. Hauptbestandteil ist Kollagen (89%), daneben sind Proteine (5%) enthalten. Kollagen setzt sich im adulten Knochen u. a. aus Chondroitinschwefelsäure A und im wachsenden Knochen aus Hyaluronaten und Keratosulfaten zusammen. Bei den ossären Proteinen dominieren Glykoproteine, d. h. Verbindungen von Hexosen mit verschiedenen Proteinen. Das Osteoid wird von den Osteoblasten in einer Menge von ca. 1 µm pro Tag sezerniert. Unter optimalen Bedingungen verkalkt es innerhalb von 3-4 Tagen zu 70%, wobei sich feste Knochengrundsubstanz bildet (KATTHAGEN 1986, KNESE 1959).

Der Hauptanteil der Knochenmatrix, 77% der Knochenmasse, sind anorganische Bestandteile, wovon 9/10 Kalziumphosphate und der Rest Kalziumkarbonat sind. Kalzium wird in Form von hexagonalen HA-Nanokristallen im Rahmen der Osteogenese in die

organische Matrix eingelagert und stabilisiert so das Knochengestüt (ROBERTS et al. 1987). Lamellärer Knochen weist beeindruckende mechanische Eigenschaften auf. Sein Elastizitätsmodul liegt bei etwa $1,3 \cdot 10^6 \text{ N/cm}^2$, die Zugfestigkeit bei 10 kg/mm^2 und die Druckfestigkeit bei $14,25 \text{ kg/mm}^2$. Diese Werte sind mit denen von Eichenholz vergleichbar. Zudem weist Knochen eine hohe Biegefestigkeit von $17,80 \text{ kg/mm}^2$ auf (KNESE 1959). Diese physikalischen Eigenschaften des Knochens sind Grundlage für einen Vergleich mit dem zu untersuchenden KAM Bio-Oss®, da die Wertigkeit eines KAM maßgeblich davon abhängt, in wie weit seine physikalischen Parameter denen des Knochens nahe kommen.

Die zellulären Elemente des Knochens bestehen aus osteogenen und hämatopoetischen Gewebekompartimenten. Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs und entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks unter Einfluss von Stimuli, wie z. B. Wachstumsfaktoren, zu Vorläuferzellen. Die weitere Reifung zu Osteoblasten geschieht unter dem Einfluss von mehreren systemischen und lokalen Faktoren – wie z. B. den Bone Morphogenic Proteins (BMPs) (LILIENFELD-TOAL 1992, AUBIN et al. 1995). Aus den Vorläuferzellen entstehen mitotisch aktive Präosteoblasten und schließlich reife Osteoblasten. Osteoblasten synthetisieren die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz - Kollagen Typ I, Osteocalcin, Proteoglykane und Enzyme, wie z. B. Alkalische Phosphatase (MARKS 1997). Ein Osteoblast wird zum Osteozyten, nachdem er sich mit der gebildeten Matrix umgeben hat; man spricht dann von der Knochenzelle (JUNQUEIRA et CARNEIRO 1986). Osteozyten haben unterschiedliche Größe, Form und intrazelluläre Bestandteile, die nach JANDE & BELANGER (1973) Rückschlüsse auf die jeweilige Regenerationsphase des Knochens - formativ, resorptiv oder degenerativ - zulassen. Im jungen Geflechtknochen liegen die Osteozyten sehr eng, unregelmäßig verteilt nebeneinander und sind kaum von den knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, zu unterscheiden. Im reifen Lamellenknochen sind sie dagegen abgeplattet und bilden zahlreiche kleine Fortsätze. Resorptive Osteozyten sind von einer Zone amorphen Materials und Ausläufern von Kollagenfasern umgeben (VAUGHAN 1975). Die Osteozyten besitzen metabolische Aktivität und sind in den Ernährungsprozess des Knochens eingebunden. Zudem haben sie unter dem Einfluss von Parathormon und Calcitonin eine osteolytische Aktivität, z. B. in Form einer Knochenmatrixumwandlung (BELANGER 1971). Außerdem besitzen Osteozyten einen gewissen Pumpeffekt, indem sie das Wasser, das durch Diffusion den perilakunären Raum erreicht hat, entlang des kanalikulären Netzwerks an die Knochenoberfläche heranführen. Ursächlich liegt ein

osmotisches Druckgefälle, erzeugt durch die Ausscheidung wasserbindender Proteine, zugrunde (ARNOLD et al. 1971).

Da der Knochen einem ständigen Umbau unterworfen ist, existiert noch ein dritter Typ von Zellen - die Osteoklasten. Sie sind für die Resorption von Knochengewebe verantwortlich. Osteoklasten befinden sich in den Howship-Lakunen und sind durch ihre Mehrkernigkeit (maximal 10-20 Kerne) charakterisiert. Sie synthetisieren hydrolytische Enzyme und setzen sie frei, wodurch kalzifiziertes Gewebe resorbiert wird (DOTY & SCHOFIELD 1972). Dabei werden zunächst die Mineralsubstanzen aus dem Knochen herausgelöst und danach die Matrixbestandteile abgebaut (HANCOX 1972, RENOLDS 1968).

2.2. Charakterisierung und Einteilung der Knochenersatzmaterialien (KEM) resp. Knochenaufbaumaterialien (KAM)

Biomaterialien sind nicht körpereigene Substanzen, die Gewebselemente bzw. ganze Gewebe ersetzen und deren Funktionen (bzw. Teilfunktionen) im menschlichen Organismus wiederherstellen sollen (REFIOR et al. 1998). Ihre unterschiedliche Herkunft schlägt sich in der Nomenklatur wieder. Materialien biologischer Herkunft zum Ersatz von Knochen bezeichnet man als Transplantate. Bei synthetischer oder teilsynthetischer Herstellung spricht man von Knochenersatzmaterialien (KEM). In Bezug auf die Insertion handelt es sich bei biologischen Materialien um eine Transplantation und bei KEM um eine Implantation bzw. Integration (GERNREICH et al. 2003)

Herkömmliche KEM übernehmen eine mechanische Platzhalterfunktion und fördern die Knochenregeneration in einem gewissen Grade, werden jedoch kaum oder nur partiell biodegradiert, so dass zeitlebens Biomaterialreste im Knochen verbleiben. Sie haben lediglich eine Ersatzfunktion und werden daher als KEM bezeichnet. Innovative, optimal die Knochenregeneration fördernde Produkte werden zeitgleich zur Knochenbildung biodegradiert und sind nach Abschluss der Knochenheilung aus dem Organismus verschwunden. Sie genügen höheren Anforderungen und sollten als Knochenaufbaumaterial (KAM) bezeichnet werden. Die in dieser Arbeit zum Vergleich herangezogenen Biomaterialien sind als KAM einzuordnen.

Einen Überblick bezüglich einer einheitlichen Nomenklatur der Knochentransplantate und KEM zeigt die Tabelle 1.

Tabelle 1 Nomenklatur der Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien (nach EHMKE & FLEMMING 1998, HÜRZELER 1997, KOECK & WAGNER 1996, RATEITSCHAK et al. 1989, SPALLEK & DESCHNER 1995)

Nomenklatur		Materialherkunft	Art des Materials
alt	neu		
autolog	autogen	von gleichen Individuen	humaner Knochen
isolog	syngen	gleiches genetisches Material bei Spender und Empfänger (eineiige Zwillinge)	humaner Knochen
homolog	allogen	gleiche Spezies, keine genetische Übereinstimmung	konservierter humaner Knochen
heterolog	xenogen	verschiedene Spezies	Knochen und Kollagen tierischen Ursprungs
alloplastisch	alloplastisch	synthetisch hergestellt (Sinterkeramiken, Hydro- und Xerogele u. a.)	Kalziumphosphate, Kalziumkarbonate, Biogläser, u. a.

2.2.1. Autogener Knochen

Frisch transplantiertes Knochen aktiviert die Knochenbildung in der Empfängerregion. Überlebende Osteoblasten sind für den frühen Knochenaufbau verantwortlich, wobei die Grundsubstanz des autogenen Knochens gleichermaßen für eine Proliferation von Osteoblasten und einen gesteigerten Knochenaufbau sorgt (BLOCK & KENT 1998, MARX & GARG 1998, SCHWEIBERER 1971). Autogener Knochen hat wegen seines Gehaltes an transplantierten Osteoblasten, Wachstumsfaktoren und -promotoren osteoinduktive Eigenschaften (BERNHARD 1991, BLOCK & KENT 1998, SCHWEIBERER 1971). Er kann u. a. aus dem maxillofacialen Bereich, dem Beckenkamm und aus Rippenknochen gewonnen werden, was einen Zweiteingriff erfordert. Rund ein Fünftel der Patienten klagen - insbesondere bei Entnahme vom Beckenkamm - postoperativ über Schmerzen am Entnahmeort (GERNGROß et al. 1982). Entnahmestellen im Kieferbereich sind der Tuber maxillae, die retromolare Region und die Symphyse der Mandibula. Das enorale Vorgehen bietet den Vorteil, dass eine Lokalanästhesie genügt, wodurch die Operationszeit kurz ist und sich die Kosten gering halten (HIRSCH & ERICSSON 1991). Kieferknochen ist desmalen Ursprungs und enthält überwiegend kortikale Strukturen mit wenigen zellulären Elementen. Kiefertransplantate weisen daher eine längere initiale Stabilität auf; werden jedoch relativ langsam revaskularisiert und resorbiert. Beckenkammtransplantate bestehen aus Knochen enchondraler Genese mit vorwiegend spongiöser Struktur, woraus eine schnellere Revaskularisierung und Resorption resultieren (LORENZETTI et al. 1998).

2.2.2. Allogener Knochen

Einerseits ist die Vorbehandlung, Lagerung und Konservierung allogenen Knochens in Knochenbanken aufwendig (CZITROM 1989), andererseits schneidet allogener Knochen bei Augmentationen im Kieferbereich deutlich schlechter als autologer Knochen - vielfach sogar auch als KEM - ab (JENSEN et al. 1998a, MOY et al. 1993). Allogener Knochen birgt zudem die Gefahr einer Immunantwort im Sinne einer Antigen-Antikörperreaktion mit nachfolgender Abstoßung des Implantats in sich. Weiterhin ist das Risiko einer Übertragung von Viren auch durch Lyophilisation und Demineralisation nicht völlig auszuschließen (SIMONDS et al. 1992, SAILER 1980). Deshalb sind allogene Transplantate beim Kieferknochenersatz heute kaum mehr von Bedeutung.

2.2.3. Alloplastische Materialien

Zu der Gruppe der alloplastischen Materialien gehören die Keramiken (Hydroxylapatit, β -Trikalziumphosphat), koralline Substanzen (Kalziumkarbonat), Biogläser und die Polymere (REFIOR et al. 1998). Bereits in den 1970er Jahren experimentierte man mit Kalziumphosphatverbindungen und synthetisierte die im humanen Knochen vorkommende kristalline Verbindung Hydroxylapatit (HA) sowie das verwandte β -Trikalziumphosphat (TCP) im Sinterverfahren. Beide Substanzen erwiesen sich als sicher in der Anwendung (GARG 1999). Heute schätzt man die Geschwindigkeit des Abbaus dieser Sinterkeramiken als unangepasst ein, vielfach werden sie zu langsam oder nur teilweise abgebaut (JARCHO 1981). Wünschenswert ist vielmehr eine Resorption bzw. Biodegradation parallel zum „ossären Remodeling“. D. h., die Geschwindigkeit des Abbaus von KEM resp. KAM muss dem des Wiederaufbaus des neu entstehenden Knochens zeitlich entsprechen, wobei die Abbauprodukte Kalzium und Phosphat in den ossären Mineralisierungsprozess eingehen (REFIOR et al. 1998).

KEM korallinen Ursprungs werden halbsynthetisch aus dem Kalziumkarbonatskelett der Koralle gewonnen und weisen eine dem Knochen ähnliche dreidimensionale Struktur auf (GÜNTHER et al. 1998, LANE 1995). Das Material ist porös und somit gut für einen knöchernen Durchbau geeignet (WHITE & SHORES 1986).

Bioglas wird aus Kalziumsalzen, Phosphaten und Natriumsalzen synthetisiert und enthält zusätzlich Silikone, welche die ossäre Mineralisation fördern (LYNCH et al. 1999). Das Material ist weder kristallin, noch porös sondern amorph („gestaltlos“). Häufig wird von bioaktiver Glaskeramik gesprochen, da Bioglas die Osteogenese induziert (FETNER et al. 1994) und als gutes Bonding für Knochen und Weichgewebe fungieren soll (WILSON & LOW 1992).

Weitere KEM, die in der Orthopädie und Kiefer-Gesichtschirurgie z. T. Verwendung finden, sind bioresorbierbare Polymere, wie die Polylaktidsäure (PLA) und Polyglykolidssäure (PGA). Sie weisen eine gute Biokompatibilität auf, da die Säuren im Organismus regulär verstoffwechselt werden. Zudem sollen sie aufgrund einer spongiösen offenen Zellstruktur eine hohe Osteokonduktivität aufweisen (STANCARI et al. 2000).

2.2.4. Xenogene Materialien

Diese Biomaterialien stammen von anderen Tierspezies, z. B. vom Rind oder Schwein. Bei ihrer Gewinnung entzieht man dem Rinderknochen die organischen Bestandteile, wonach ein HA-Gerüst verbleibt, das als KAM dient (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006). Xenogene Materialien weisen eine gute Osteointegration auf und wirken aufgrund ihres interkonnektierenden Porensystems osteokonduktiv. Dadurch ermöglichen sie eine schnelle Knochenneubildung und sind den konventionellen KEM auf HA-Sinterkeramik-Basis überlegen (KOCH 2003). Xenogene KEM haben jedoch den Nachteil, dass bei ihrem Einsatz eine Übertragung von Virus- und Prioneninfektionen nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen ist.

2.3. Historische Entwicklung der Knochenersatzmaterialien (KEM)

Bis in das 17. Jahrhundert geht die rekonstruktive Knochenchirurgie zurück. So soll bereits 1668 der Chirurg JOB VAN MEEKEREN die erste erfolgreiche Schädeldachplastik mit einem xenogenen Transplantat aus einer Hundekalotte durchgeführt haben (zitiert nach NUSSBAUM 1875). Im Jahre 1821 nahm WALTER die erste autogene Knochen transplantation vor, indem er einen Schädeldefekt mit dem bei der Trepanation gewonnenen Knochen versorgte (WALTER 1821). Seit 1859 führte OLLIER tierexperimentelle Studien durch, um zu überprüfen, ob das Einbringen von Knochen transplantaten in schlecht heilende Knochen defekte zu einer Ossifikationsbeschleunigung führt. Er erkannte aufgrund dieser Experimente sowie klinischer Untersuchungen die Bedeutung des mitverpflanzten Periostes. OLLIER (1867) nahm an, dass lebender Knochen bei der Verpflanzung seine Vitalität behält. Er prägte die Begriffe autogene, allogene und xenogene Knochen transplantate und gilt als Begründer der klassischen Osteoblastenlehre. Im Jahre 1900 nahm SYKOFF die erste freie Knochen transplantation am Unterkiefer vor. Ein Jahrzehnt später trug LEXER (1911) mit seinen Arbeiten über das Transplantatlager zum Verständnis der Knochen transplantation bei (zitiert nach LENTRODT 1988). Etwa 1923 benutzte HEGEDUS (vermutlich als einer der Ersten) autogene Knochen späne als Transplantat im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich (HEGEDUS 1923).

Durch den Einsatz der Tiefkühltechnik begünstigt, kamen seit 1950 allogene Knochen transplantationen vermehrt zur Anwendung (BUSH & GARBER 1948, INCLAN 1942). Der Zeitraum von 1908 und 1951 wurde durch AXHAUSEN geprägt, der durch tierexperimentelle Studien eine biologische Zweckmäßigkeitsskala der verschiedenen Materialien für den Transplantationsbedarf erarbeitete. AXHAUSENs Ergebnisse auf dem Gebiet des Kieferersatzes erlangten große Bedeutung und seine daraus abgeleiteten Thesen sind bis heute gültig. Neben LINDEMANN, WASSMUND und ROSENTHAL zählt er zu den Begründern der deutschen Kieferchirurgie.

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts fand BARTH mittels histologischer Untersuchungen heraus, dass jeder verpflanzte Knochen samt Periost abstirbt und durch „schleichenden Ersatz“ vom Lagergewebe her substituiert wird. Da transplantierte Knochen ohnehin abstirbt, empfahl er anstelle autogenen Knochens die Verpflanzung von mazerierten, heteroplastischen Knochen. Diese Fehleinschätzung korrigierte BARTH (1893) später, nachdem er die knochenbildende Aktivität des Periostes erkannt hatte. MARCHAND (1899) kam zu dem Schluss, dass mazerierter Knochen wesentlich langsamer als ein

frisches Transplantat durch neu gebildeten Knochen ersetzt wird. SALTIKOV (1909) konnte schließlich nachweisen, dass Periost und Endost bei der Verpflanzung vital bleiben und von ihnen die Knochenneubildung ausgeht.

Die während des 1. Weltkrieges gehäuft auftretenden Knochenverletzungen der Kiefer-Gesichtsregion wurden vielfach mit autologem Knochen aus dem Beckenkamm versorgt. Diese Methode stellt bis heute den so genannten Goldstandard zur Versorgung größerer ossärer Defekte dar. Die anfänglich sehr hohe Komplikationsrate sank nach Einführung der Antibiotika zur Infektionsprophylaxe und durch Verbesserung der Transplantatfixierung durch moderne Osteosynthesemethoden erheblich (LUHR 1976).

Diese zahlreichen, oft widersprüchlichen Theorien zur Transplantateinheilung fasste AXHAUSEN (1908) zur so genannten Osteoblastentheorie zusammen, die besagt, dass das transplantierte Knochengewebe abstirbt, auch wenn es frisch entnommen ist. Periost und endostale Markanteile des Knochens haben jedoch die Fähigkeit zu überleben. Das abgestorbene Transplantat wird durch neu gebildeten Knochen substituiert, welcher durch das mitverpflanzte Periost und anhaftende Mark beziehungsweise durch ossifikationsfähiges Gewebe der Nachbarschaft gebildet wird. Auch LEXER (1924) war ein Vertreter dieser Osteoblastentheorie. Einen deutlichen Gegensatz stellt die von BASCHKIRZEW & PETROW (1912) begründete Metaplasietheorie dar. Danach stellen bindegewebige Elemente bei Knochentransplantationen ins Weichteillager die Hauptquelle der Knochenregeneration dar. Pluripotentes Bindegewebe soll in den Knochen einwachsen und zu osteoblastischem Gewebe metaplasieren. Durch die Arbeiten von LEVANDER (1934) wurde schließlich die Induktionstheorie begründet. Mit der Hilfe eines alkoholischen Knochenextraktes gelang es ihm, eine heterotrope Knochenbildung in der Muskulatur von Kaninchen zu erzielen. Durch die Entwicklung der Kältetechnik durch INCLAN (1942) gelang erstmals das Haltbarmachen des Knochens. Verpflanzter konservierter Knochen wird vom umgebenden Gewebe abgebaut und durch körpereigenen Knochen ersetzt, wenn er in ein „ersatzstarkes“ Knochenlager transplantiert wird. Die aufwändige Tiefkühlkonservierung von Knochen wurde später durch die Gefriertrocknung und chemische Konservierung der Transplantate abgelöst. Bei der Mazeration des Knochens wird versucht, antigen wirksame Eiweißstoffe zu eliminieren ohne die biologische Wertigkeit des Transplantats, d. h. die osteogene Wirkung auf das Lagergewebe, zu vermindern.

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist davon auszugehen, dass beim lebend verpflanzten Knochen die Osteozyten absterben, so dass autoplastisch und homoplastisch

gewonnener Knochen auf dem Wege der „schleichenden Substitution“ durch neuen Knochen ersetzt wird. Die Knochenneubildung geht somit vom ossären Lager aus und bei Autotransplantaten zusätzlich vom überlebenden osteoblastischen Gewebe. Eine weitere Möglichkeit der Knochenneubildung ist die durch das Transplantat induzierte Metaplasie des Lagerbindegewebes zu Knochengewebe. Aufgrund immunologischer Abwehrreaktionen wird frischer heteroplastischer Knochen nach seinem Absterben abgestoßen bzw. bindegewebig abgekapselt, während konservierter Knochen das ossäre Lagergewebe zur Knochenbildung anregt (WEIß 1966).

Weitere Ausführungen zur Transplantateinheilung - speziell zur Knochenregeneration - finden sich im Kapitel 2.9.

2.4. Anforderungen an Knochenersatzmaterialien (KEM)

Bei der Rekonstruktion großer skelettaler Defekte ist ein indikationsgezogener Einsatz vom KEM in Abhängigkeit von der spezifischen klinischen Situation möglich, wobei diese folgende allgemeine Anforderungen erfüllen sollten (FRIEDMANN 1998a, GÜNTHER et al. 1998, MERZ et al. 1997, MÜLLER 1993):

- Biokompatibilität (keine Toxizität, Antigenität und Kanzerogenität),
- Sterilität (keine Übertragung von Krankheitserregern),
- Biomechanik (Gestaltfestigkeit und mechanische Belastbarkeit),
- Bioaktivität (möglichst einen chemischen Verbund mit neuem Knochen eingehen)
- Resorbierbarkeit bzw. Biodegradierbarkeit (für Substituierbarkeit des KEM)
- Förderung der Knochenregeneration (osteokonduktiv, idealer Weise osteoinduktiv)
- Einfache Handhabung (unter Operationsbedingungen)

2.4.1. Verfügbarkeit

Optimal verfügbar sind KEM, deren Gewinnung nicht von einem Spender abhängig ist. Zudem sollten KEM kommerziell erhältlich, leicht aufzubewahren und nicht kontaminiert sein. Hervorzuheben ist, dass speziell die Gewinnung autologer Knochentransplantate mit einer gewissen Morbiditätsrate in der Spenderregion belastet ist. Dies können Infektionen oder funktionelle Störungen an der Entnahmestelle sein, z. B. über mehrere Wochen anhaltende Schmerzen beim Gehen durch Knochenentnahme am Beckenkamm (GERNGROSS et al. 1982, GROB 1989). Als Faustregel gilt allgemein, dass die Verfügbarkeit um so größer ist, je geringer die biologische Wertigkeit des Ersatzmaterials ist (AEBI 1991).

2.4.2. Risiken

Hierzu zählt die nicht völlig auszuschließende Möglichkeit der Übertragung von Krankheiten - insbesondere von Viren und Prionen - durch alle Knochentransplantationen mit Ausnahme der autologen. Hinzu kommt - ebenfalls bei allen nichtautologen Transplantationen - das geringe Risiko einer Restantigenität, welches eine immunologische Reaktion beim Empfänger auslösen und die Einheilung gefährden kann (MÜLLER 1989). Um das Infektionsrisiko zu bekämpfen, wird vielfach eine Hitzebehandlung bzw. Sterilisation durchgeführt, wobei jedoch alle Eiweiße denaturiert werden. Das betrifft auch die Proteine der Knochenmatrix, die eine wichtige Bedeutung für die Transplantateinheilung und Knochenneubildung haben.

2.4.3. Biologisches Verhalten und mechanische Eigenschaften

Ein biologisch ideales Ersatzmaterial ist autologer Knochen, vorausgesetzt er wird sofort nach seiner Transplantation optimal mit Blut versorgt, was jedoch bei einer freien Knochenverpflanzung nicht der Fall ist. Nur bei der so genannten gefäßgestielten Transplantation ist diese Voraussetzung erfüllt, was ein technisch aufwändiges mikrochirurgisches Vorgehen voraussetzt, bei dem versorgende arterielle und venöse Blutgefäße des Transplantates mit gleichartigen Gefäßen des Transplantatlagers anastomosiert werden müssen. Die sofortige Revaskularisierung des Transplantates verhindert dessen Abstoßung durch eine Immunsuppression. In diesem Falle handelt es sich um ein echtes Knochentransplantat (AEBI & GANZ 1989, AEBI et al. 1989).

Die mechanischen Eigenschaften des eigenen Knochens sind durch KEM nur schwer bzw. partiell erreichbar. Sinterkeramiken auf Kalziumphosphatbasis besitzen eine wesentlich geringere mechanische Festigkeit, so dass sie sich zur Substitution segmentaler, mechanisch stark beanspruchter Knochendefekte nicht eignen. Sie können jedoch gut bei kleineren ossären Defekten verwendet werden, die einer geringeren Beanspruchung ausgesetzt sind (AEBI 1991).

2.4.4. Knochenlager

Das umgebende Knochengewebe der Empfängerregion, das so genannte Wirtslager, ist für die kapilläre Gefäßversorgung des Transplantates resp. Implantates verantwortlich, wobei pluripotente mesenchymale Zellen Ausgangspunkt der Kapillareinsprossungen sind. Man differenziert drei Qualitäten eines Knochenlagers (EITEL et al. 1980):

Ein ersatzstarkes Lager weist keine Vorschädigung auf bzw. hat diese vollständig kompensiert. Es bietet die besten Voraussetzungen für eine Transplantation resp. Implantation.

Als ersatzschwach gilt ein Knochenlager, wenn seine Vaskularisation beeinträchtigt ist (z. B. bei einer Altersatrophie des Knochens) oder bei vorliegender Instabilität. Die Erfolgsquote einer Transplantation bzw. Implantation ist deutlich verringert.

Ein ersatzunfähiges Lager resultiert infolge schwerer Infektion (Osteomyelitiden) oder Strahlenschäden (Radioosteomyelitiden) des Knochens. Hier verbieten sich Transplantationen und Implantationen.

2.5. Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEM)

Der grundlegende Gedanke war, ein adäquates Biomaterial herzustellen, welches eine komplette Restitutio ad integrum eines Knochendefektes bewirkt. Daneben ist bei Frakturen eine Fixierung der Fragmente beispielsweise durch Schrauben oder Platten erforderlich, um eine Instabilität zu vermeiden. Zudem kommt die zusätzliche Anwendung von resorbierbaren bzw. nicht resorbierbaren Membranen in Betracht (BREKKE & TOTH 1998). Der Indikationsbereich für KEM ist weit gefächert und reicht von Defektrekonstruktionen im Bereich der Traumatologie, Tumorchirurgie oder chirurgischen Orthopädie bis hin zur Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Oralchirurgie. In der Zahnheilkunde bestehen zudem besondere Indikationen wie die präprothetische Chirurgie einschließlich präimplantologischer Kieferaugmentationen und Sinusbodenelevationen („Sinuslift“) sowie osteoplastische parodontalchirurgische Verfahren. Weitere Beispiele einer fachbezogenen regenerativen Therapie sind die Versorgung von ossären Defekten nach Zahnextraktionen, Zystektomien sowie operativen Zahnentfernungen, insbesondere Weisheitszähnen (BROWN & CRUESS 1982, DAMIEN & PARSONS 1991, HABAL & REDDI 1992).

Die Biomimetik sowie das Tissue Engineering verbinden medizinische und chirurgische Erkenntnisse mit solchen aus der Molekular- und Zellbiologie und bereiten den Weg für die Entwicklung innovativer KEM, die nicht nur die Grundanforderungen erfüllen (BREKKE & TOTH 1998) sondern auch die Knochenregeneration nachhaltig anregen. Diese stellen eine neue Qualität von Biomaterialien dar und sollten zutreffender als Knochenaufbaumaterialien (KAM) bezeichnet werden.

2.6. Biokompatibilität

Als Biokompatibilität bezeichnet man die Fähigkeit eines KEM, nach seiner Verwendung eine angemessene Reaktion im Wirtsorganismus hervorzurufen (WILLIAMS 1987). Speziell bei Implantaten (also synthetischen Substanzen) im Knochenkontakt lässt sich eine Unterteilung in drei Reaktionstypen differenzieren:

2.6.1. Biotoleranz

Ein Implantat, das vom Organismus weder aufgelöst oder abgebaut werden kann, wird durch eine Bindegewebsschicht abgekapselt. Die Ablagerung körpereigener Serumproteine auf der Implantatoberfläche und deren Konformationsänderung bzw. Änderung des Oxidationszustandes führt zum Auftreten inflammatorischer Reaktionen und letztlich zu einer Distanzosteogenese. Somit verbleibt ein dünner bindegewebiger Spalt zwischen neu gebildetem Knochen und Implantat. Beispiele sind Implantate aus Stahl- oder Kobaltbasislegierungen (HEIMKE 1990).

2.6.2. Bioinertheit

Bioinerte Implantate lösen keine Reaktionen im umliegenden Gewebe aus, da keine Konformationsänderung der Serumproteine während ihrer Adsorption erfolgt. In diesem Fall wird das Implantat nicht als körperfremd empfunden. Infolge implantatnaher Knochenneubildung kommt es zu punktförmigen ossären Anheftungen an der Implantatoberfläche, man spricht von einer Kontaktosteogenese, wie beispielsweise bei Titan und seinen Legierungen (HEIMKE 1990).

2.6.3. Bioaktivität

Kommt es flächenhaft zu einer direkten chemischen Verbindung zwischen dem umliegenden Knochengewebe und der Implantatoberfläche resultiert eine zugfeste Verbindung zwischen beiden Kompartimenten, die man als Verbundosteogenese bezeichnet. Sie ist das biologisch erreichbare Optimum der ossären Implantatintegration und kann mit KAM auf nanokristalliner HA-Basis erzielt werden (HEIMKE 1990).

2.7. Osteogenese – Osteoinduktion – Osteokonduktion

Eine erfolgreiche Knochentransplantation beruht auf den Prozessen der Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion (FRAME 1987, LANE 1995, MISCH & DIETSCH 1993, PINHOLT et al. 1991). Osteogene Zellen begünstigen die Aktivierung der Knochenentwicklung und beschleunigen das Knochenwachstum (GARG 1999). Um den Prozess der Osteogenese zu verstehen, sollte man sich die zugrunde liegenden knochenphysiologischen Prozesse vor Augen führen. Das Knochengewebe geht aus dem Bindegewebe des embryonalen Mesenchyms hervor. Dabei sind vor allem die Osteoblasten, die sich aus relativ undifferenzierten Mesenchymzellen, den Osteoprogenitorzellen differenzieren, für die Knochenneubildung von Bedeutung (YOUNG 1962). Die Osteoprogenitorzellen wiederum entwickeln sich aus Knochenmarkstammzellen. Nach FRIEDENSTEIN (1973) gibt es zwei Typen osteogener Stammzellen:

- determinierte Osteoprogenitorzellen (DOPC), die stets im Knochen vorhanden sind und
- induzierbare Osteoprogenitorzellen (IOPC), die nur nach Stimulierung, z. B. nach verstärktem Verbrauch von DOPC, neu gebildet werden.

Bei der Osteoinduktion werden bereits vorhandene determinierte Osteoprogenitorzellen stimuliert, die sich dann in Osteoblasten differenzieren und die Osteogenese auslösen. Man kann diesen Vorgang auch bei unkomplizierten Frakturen oder Osteotomien beobachten; man bezeichnet diesen Vorgang als direkte Frakturheilung ohne Kallusbildung. Zudem können sich bei der Osteoinduktion pluripotente Mesenchymzellen unter Einwirkung osteoinduktiver Proteine (z. B. Bone morphogenic proteins [BMPs]) in so genannte induzierbare Osteoprogenitorzellen (IOPC) differenzieren. Diese besitzen die Fähigkeit der Replikation und können sich nicht nur zu Osteoblasten sondern auch zu Chondroblasten differenzieren. Eine optimale osteoinduktive Wirkung geht nur von Transplantaten aus, welches neben vitalen Knochenzellen auch osteoinduktive Proteine enthält (SPALLEK & DESCHNER 1995). Auch von biodegradierbaren Implantaten, die sowohl Knochenzellen als auch BMPs binden können, kann eine osteoinduktive Wirkung ausgehen (BIENENGRÄBER et al. 2006)

Bei der Osteokonduktion bildet das KEM ein Leitgerüst, in das Gefäße einsprossen sowie Osteoprogenitorzellen und fibrilläre Elemente aus dem ortsständigen Transplantatlager proliferieren (BUCHARDT 1983, URIST 1980). Aufgrund meist fehlender osteoinduktiver Stimuli beruht die Hauptwirkung aller KEM auf ihrer osteokonduktiven Komponente.

Autogene Knochentransplantate bieten den Vorteil, sowohl die Osteogenese zu stimulieren als auch osteokonduktiv und osteoinduktiv wirksam zu sein (MISCH & DIETSCH 1993). Ihre osteoinduktive Wirkung beruht auf den mitübertragenen BMPs. Diese sind auch in demineralisierten gefriergetrockneten Knochen vorhanden, der heute jedoch kaum mehr Verwendung findet (WOZNEY 1995). Da BMPs artspezifisch sind, weisen xenogene Präparate wie z. B. Bio-Oss® keine osteoinduktive Wirkung beim Menschen auf (REDDI et al. 1987).

2.8. Wachstumsfaktoren

Als Entdecker osteoinduktiv wirksamer Faktoren gilt URIST (1965). Er fand heraus, dass die Implantation von demineralisierten Knochensegmenten in einem subkutanen Lagergewebe eine Knochenneubildung induziert. An der Induktion der Osteogenese sind folgende, in der Knochenmatrix gespeicherte biologische Wachstumsfaktoren beteiligt:

2.8.1. *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*

Im Jahre 1979 konnte URIST erstmals ein BMP aus dem Knochen von Ratten und Kaninchen isolieren. BMPs werden in Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten gebildet und in der extrazellulären Knochenmatrix gespeichert (BARNES et al. 1999). Es handelt sich um dimere Moleküle, wobei zwei Ketten über Disulfidbrücken zusammengehalten werden. BMPs werden als Vorläufermoleküle (Precursor) synthetisiert (REDDI 1998, WOZNEY & ROSEN 1998). Inzwischen sind 16 verschiedene BMPs bekannt, von denen nur BMP 2 und 7 nachweislich an der Knochenbildung beteiligt sind (REDDI 2001, TRIPPEL et al. 1996). Alle übrigen haben keinen Einfluss auf die Osteoinduktion, werden aber aufgrund ihrer Aminosäuresequenz der BMP-Familie zugeordnet (TRIPPEL et al. 1996). Hauptfunktion aller BMPs ist - besonders während der Embryogenese - eine Anregung mesenchymaler Stammzellen zur Transformation in Osteoblasten und Chondroblasten. Zudem stimulieren sie Knochenwachstum und-umbau sowie die Knochenheilung (ASPENBERG & TUREK 1996, BARNES et al. 1999, KIRKER-HEAD et al. 1995, URIST et al. 1983)

2.8.2. *Insulin-like Growth Factors (IGFs)*

Man unterscheidet zwischen Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1) und IGF2, die den selben Rezeptor besetzen (TRIPPEL et al. 1996). Beide Faktoren haben Einfluss auf das Wachstum des Skelettsystems, wobei IGF-1 eine größere Wirksamkeit besitzt. Im Hypothalamus wird das Wachstum-Releasing-Hormon (GHRH) gebildet, das im Hypophysenvorderlappen die Produktion von Growth Hormon (GH) stimuliert. Zusammen mit spezifischen Bindungsproteinen zirkuliert das GH im Blutkreislauf und steuert die Produktion von IGF-1 in der Leber. IGF-1 gelangt in den Blutkreislauf und stimuliert die Zellteilung und Matrixsynthese im Knochen- und Knorpelgewebe (TRIPPEL et al. 1996).

2.8.3. *Fibroblast Growth Factor (FGF)*

Zu dieser Gruppe gehören der saure Fibroblast Growth Factor (FGF-1) und der basische FGF-2. Ihre Synthese erfolgt in den Makrophagen, mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten (BARNES et al. 1999). Sie werden in hoher Konzentration in der extrazellulären Matrix gespeichert, aus welcher sie beispielsweise bei einer Fraktur in der frühen Heilungsphase freigesetzt werden (BAIRD & WALICKE 1989, BARNES et al. 1999). Die FGFs haben eine mitogene Aktivität auf mesenchymale Zellen, Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten, wodurch deren Proliferation und Differenzierung stimuliert wird. Zudem gehen von dieser Faktorengruppe auch chemotaktische Wirkungen aus (SPOM & ROBERT 1988).

2.8.4. *Platelet Derived Growth Factor (PDGF)*

Dieser Wachstumsfaktor wird von Thrombozyten - z. B. im Frakturhämatom - freigesetzt. Außerdem sind die Monozyten, Makrophagen, hypertrophierenden Chondrozyten und Osteoblasten entscheidende Bildungsorte (BARNES et al. 1999). PDGF stimuliert mesenchymale Zellen und Fibroblasten, wodurch ossäre Heilungsprozesse beschleunigt werden (MOHAN & BAYLINK 1991, NASH et al. 1994). PDGF als mitogene Substanz kann sowohl systemisch als auch lokal die Knochenneubildung stimulieren, da es die DNA und die Proteinsynthese im Knochen anregt (CANALIS et al. 1988).

2.8.5. *Transforming Growth Factor- β (TGF- β)*

TGF- β wird von den Thrombozyten, Entzündungszellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten produziert und in hohen Konzentrationen in der Knochenmatrix gespeichert (BARNES et al. 1999, TRIPPEL et al. 1996). Besonders bei der Frakturheilung ist TGF- β ein präsender Faktor, der wahrscheinlich aus den degranulierenden Thrombozyten im Frakturhämatom seinen Ursprung nimmt (BOSTROM & ASNIS 1998).

Der therapeutische Einsatz von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zur Unterstützung und Beschleunigung der physiologischen ossären Regenerationsprozesse steckt noch in den Kinderschuhen. Indiziert ist ihr Einsatz aufgrund der gegenwärtigen Kenntnisse nur, wenn das vorhandene mesenchymale Lagergewebe für eine komplette Ausheilung der betroffenen Struktur biologisch nicht ausreichend konditioniert ist (ersatzschwaches resp. ersatzunfähiges Lager, siehe. Kapitel 2.4.4.).

2.9. Knochenregeneration

Im Knochen finden ständig Umbauvorgänge statt, welche sich in zwei Kategorien differenzieren lassen: Das „Modeling“ beschreibt die kontinuierliche Resorption und Formation im Bereich der endostalen und periostalen Oberflächen und ist somit verantwortlich für Knochenwachstum und -schwund (Atrophie) (ROBERTS et al. 1989 und 1987). Den inneren Umbau des Knochens, der mit Veränderungen von Osteonen und Trabekeln einhergeht, bezeichnet man als „Remodeling“. Dieses ist bei der Umwandlung von unreifen Geflechtknochen in reifen lamellären Knochen von besonderer Bedeutung. Außerdem spielt das „Remodeling“ bei der Replatzierung von devitalem Knochen eine besondere Rolle. Letzterer kann im Rahmen von Entzündungen des Knochens (Osteomyelitiden) und bei ossären Tumorbildungen entstehen. Wie devitaler Knochen kann beispielsweise in ossäre Defekte eingebrachtes Augmentationsmaterial analoge Remodelingprozesse auslösen. Bevor neuer vitaler Knochen mit sekundären Osteonen entsteht, bilden sich durch Resorption innerhalb des devitalen Knochens Höhlen (ROBERTS et al. 1989 und 1987). Das Ergebnis dieser Umbauvorgänge schließt eine funktionelle Anpassung an die mechanische Belastung des Knochens im Sinne des WOLFF'schen Gesetzes ein. (CARTER 1984, ROBERTS et al. 1987, SCHENK 1991). Apposition (Aufbau) und Resorption (Abbau) von Knochen verlaufen sowohl beim „Modeling“ als auch beim „Remodeling“ parallel zueinander, wobei mit einer täglichen osteoblastischen Knochenapposition von 1 μm und Resorptionsrate von 50 μm zu rechnen ist. Es resultiert ein Volumendefizit, wodurch die Kortikalis anfangs porös ist und nach 2-3 Monaten durch Auffüllen der Resorptionskanäle neu stabilisiert wird (SCHENK 1987). Der bei Defektüberbrückungen primär entstehende unreifere Geflechtknochen kann - von einer festen Unterlage ausgehend - wesentlich schneller proliferieren (30-50 $\mu\text{m}/\text{die}$) (ROBERTS et al. 1987, SCHENK 1991).

Alle am Knochenumbau beteiligten Zellen, wie die Osteoblasten, Osteoklasten und deren Vorstufen, können unter dem Begriff „Bone multicellular unit“ (BMU) zusammengefasst werden (FROST 1998 und 1966). Bei Vorliegen von Knochendefekten kann es zur Aktivierung neuer Umbaueinheiten kommen; ihr prozentualer Anteil kann von 2-3% auf 50-60% am Gesamtbestand der Osteone ansteigen (CARTER 1984, SCHENK & WILLENEGGER 1964, SCHENK 1991). Dies wird nach FROST (1983) als „Regional acceleratory phenomenon“ bezeichnet.

2.9.1. Appositionelle Knochenneubildung

Unter mechanisch stabilen Bedingungen kommt es bei kortikalen Bohrlöchern mit einem Durchmesser von > 1 mm zu einer wandständig beginnenden trabekulären Geflechtknochenbildung (EITEL 1987). Die Hohlräume werden durch konzentrische Knochenneubildung aufgefüllt, wobei nach 5 Wochen ein kompletter Knochendurchbau erreicht wird. Bei Instabilität folgt eine Differenzierung von umgebendem mesenchymalen Gewebe mit einer Kallusbildung an den periostalen und endostalen Oberflächen. Dabei entstehen oberflächenparallele Schichten des Geflechtknochens mit senkrecht dazu verlaufenden Knochenleisten: Letztere schließen sich später zu kleinen Hohlräumen, um die sich konzentrisch geschichtetes Knochengewebe ablagert (EITEL 1987).

2.9.2. Knochenneubildung durch Substitution

Devaskularisierte Knochenfragmente oder ein appositionell gebildeter Kallus müssen zunächst durch Resorption beseitigt werden, um den Ersatz durch neuen Knochen zu ermöglichen. Dabei spielen Osteoklasten eine entscheidende Rolle. Bestehende Gefäßkanäle werden durch Osteoklasten erweitert und konzentrisch lamellär strukturierter Knochen an den Kanalwänden abgelagert. Die Lamellenbildungen sind abgeschlossen, wenn der durchschnittliche Durchmesser der Havers'Känäle $0,02$ mm erreicht hat (EITEL 1987).

2.9.3. Die knöcherne Substitution von Knochentransplantaten

Eine Traumatisierung von Knochengewebe kann durch Defektsetzungen wie Frakturen oder durch das Einbringen von Transplantaten oder Implantaten ausgelöst werden. Diese aktiviert zugleich die lokale Knochenneubildung. Im Gegensatz zu den Umbauvorgängen fehlt in diesem Fall die einleitende osteoklastische Resorptionsphase. Für die Aktivierung der Knochenbildung werden kompetente, so genannte determinierte und undeterminierte Osteoprogenitorzellen durch Mitogene zur Proliferation angeregt. Induktionsstoffe, wie die BMPs und andere bereits erwähnte Wachstumsfaktoren (z. B. TGF- β) führen zur Differenzierung dieser Zellen zu Osteo- bzw. Chondroblasten, wobei Stimulatoren (z. B. IGF-1) die Synthese und Extrusion der organischen Matrix der Stützgewebe zusätzlich fördern (SCHENK 1991). Nach Einbringen eines Transplantates läuft der normale Wundheilungsprozess ab. Der Bildung eines Blutkoagels folgt die Stabilisierung durch bindegewebige Einscheidung und schließlich die Revaskularisation des Transplantates (BASSETT 1972, BUCHARDT 1983, REDDI et al. 1987). Beim Einbau bzw. bei der Inkorporation von KEM sind dagegen Formschluss und Primärstabilität entscheidende Kriterien. Erreicht werden sie durch den „Presssitz“, wodurch sie adäquater Belastung

standhalten und Relativbewegungen im Implantatbett vermieden werden. Restspalten sollten auf eine Breite von weniger als 1mm reduziert werden (SCHENK 1991).

Auch wenn sich der physiologische Umbau von spongiösen und kortikalen Transplantaten wesentlich unterscheidet, gibt es doch Gemeinsamkeiten: So beobachtet man nach einer Knochentransplantation zunächst die so genannte „Replacement-Phase“ mit der Inkorporation des Transplantates in Form eines Transplantat-Geflechtknochen-Komplexes gefolgt von der „Remodeling-Phase“ mit dem Umbau von zwangsläufig nekrotisch gewordenen in vitalen Knochen sowie die Umwandlung von primär entstandenen Geflechtknochen in lamellären Knochen (FROST 1998). In *spöngiöse Knochentransplantate* wachsen aufgrund ihrer Porosität relativ schnell Gefäße ein (HOLDEN 1972). Mesenchymzellen gelangen - durch chemotaktische Stoffe vermittelt - auf dem Blutweg an ihren Wirkort, vermehren sich mitotisch und differenzieren letztlich zu osteogenetischen Zellen, wie z. B. zu Osteoblasten und Osteoklasten (BUCHARDT 1987, REDDI 1981, REDDI et al. 1987). BUCHARDT (1983) prägte den Begriff der „Inkorporation“ für folgenden Vorgang: Nekrotischer Knochen wird primär durch neuengebildeten Knochen umgeben, so dass ein stabiler Transplantat-Geflechtknochen-Komplex entsteht. Die nachfolgende Resorption des nekrotischen Knochens durch Osteoklasten und seinen vollständigen Ersatz durch vitalen Knochen ist mit dem Begriff „Creeping substitution“ belegt. *Kortikale Knochentransplantate* benötigen einen bestimmten Porositätsgrad, damit Gefäße einwachsen können. Das wird durch eine Steigerung der Osteoklastenaktivität und einer Senkung der Osteoblastenaktivität ermöglicht. Ähnlich wie im nekrotischen Knochen, werden durch Osteoklasten Resorptionskanäle im kortikalen Knochen angelegt; die angeschwemmten Osteoblasten bilden solange lamellären Knochen, bis der Durchmesser von Havers'schen Kanälen erreicht wird. Somit kommt es beim kortikalen Transplantat stets zu einer partiellen bis subtotalen Resorption des transplantierten Knochens (BUCHARDT 1983, ENNEKING et al. 1975).

Die Rekrutierung neuer Umbaueinheiten am kortikalen Knochen folgt einem klassischen Profil, das chronologisch folgendermaßen abläuft. Auf die Aktivierung der Osteogenese folgt eine Latenzphase von 3-4 Wochen, bis die osteoklastische Resorptionsphase in Gang gesetzt wird. Im Anschluss daran setzt nach wenigen Tagen die eigentliche Knochenbildung ein, wobei bis zum 2.-3. Monat die resorptiven Prozesse überwiegen können. Nach 6-12 Monaten ist die Rekrutierung der Umbaueinheiten auf das Ausgangsniveau abgeklungen. Ähnliche Umbauvorgänge spielen sich auch in der ossären Spongiosa an den Trabekeloberflächen ab (SCHENK 1978 und 1987).

3. Material und Methode

3.1. Charakterisierung und Herstellung der getesteten Biomaterialien

3.1.1. *Bio-Oss®*

Das im Rahmen dieser Studie *In-vivo* getestete xenogene KAM Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) soll näher vorgestellt werden. Es wurde vor ca. 10 Jahren entwickelt, ist xenogenen Ursprungs und besteht aus ausschließlich anorganischer Knochenmatrix. Inzwischen wurde es intensiv untersucht und in klinischen Studien getestet, die durch den Hersteller gefördert wurden. Es gilt als praktisch bewährt und ist z. Z. Marktführer unter den KAM, die im kraniofazialen Bereich verwendet werden.

Bio-Oss® wird aus bovinem Extremitätenknochen hergestellt, deren Matrix die organischen Bestandteile extrahiert werden. Das Rohmaterial stammt aus behördlichen registrierten und veterinärmedizinisch überwachten Zuchtbetrieben. Sämtliche Proteine wurden unter GMP- (good manufacturing practice) und ISO- (International Standards Organisation) Bedingungen entfernt. Nach Herstellerangaben ist das verbleibende Knochenmaterial frei von organischen Bestandteilen und pathogenen Keimen. Der patentierte Herstellungsprozess dauert etwa 15 h und schließt eine mehrstündige Reinigung mit stark alkalischen Lösungen ein, wodurch eine hochgereinigte Matrix entsteht. Eine Hochtemperaturbehandlung im Sinne der Sinterung wird bewusst vermieden. Bio-Oss® besteht aus biologischem Apatit des Knochens mit deutlich weniger Hydroxylgruppen und mehr Carbonationen als herkömmliche synthetische KEM. Das Verhältnis von Kalzium- und Phosphationen liegt bei 2:1, daraus resultiert ein CaP-Index von 2,03 (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006).

Abbildung 1 zeigt einen Vergleich der spezifischen Oberflächen verschiedener KEM unter denen Bio-Oss® eine Spitzenposition einnimmt. Bio-Oss® ist zudem hochporös. Es bestehen Makroporen in der Größenordnung von 300-1500 µm, Mikroporen mit einem Durchmesser von < 1µm (NEIDTHARDT & SEIBL 2006) sowie interkristallinen Räumen in der Größenordnung von 3-26 nm (PEETZ 1997).

Bio-Oss® steht als so genanntes Spongiosa- und Kortikalisgranulat mit Korngrößen von 250-1000 µm, 500-1000 µm, und 1000-2000 µm zur Verfügung. Es ist zudem in Form von Spongiosablöcken erhältlich. Bio-Oss® weist hinsichtlich seiner physikalischen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit der ossären Spongiosa auf (Abb. 2 und 3). Es hat eine kristalline Feinstruktur von 10-60 nm, die der Spongiosa mit ca. 50 nm nahe kommt. Ähnliches gilt für die innere Oberfläche von Bio-Oss®, die mit ca. 100 m²/g der der

menschlichen Spongiosa mit 50-90 m²/g vergleichbar ist (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006, PEETZ 1997).

Die Tabelle 2 zeigt, dass die physikalischen Eigenschaften von Bio-Oss® herkömmlichen synthetischen KEM bezüglich Druckfestigkeit und Elastizität deutlich überlegen sind (SPECTOR 1994).

Tabelle 2 Eigenschaften von Spongiosa, Bio-Oss® und gesintertes HA im Vergleich (SPECTOR 1994)

	Spongiosa	Bio-Oss®	Gesintertes HA
Bruchfestigkeit (Mpa)	5-60	35	200-900
E-Modul (GPa)	1,4	11	34-100

«Die Porengröße und damit verbunden die Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien beeinflusst deren in-vivo Verhalten.»

(Weibrich, Wagner et al., Mund Kiefer GesichtsChir, 2000)

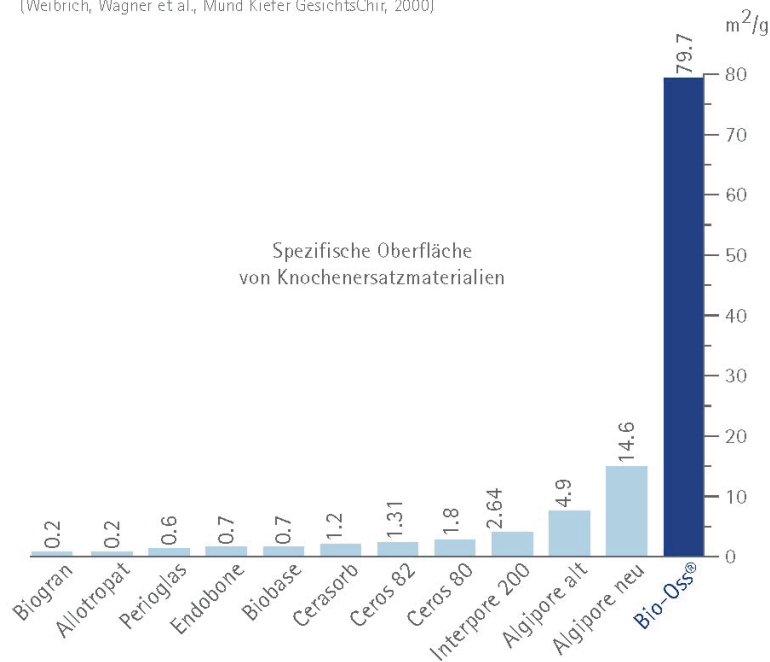


Abbildung 1 Vergleich der spezifischen Oberfläche von ausgewählten KEM (nach WEIBRICH et. al. 2000)

Da durch das Herstellungsverfahren sämtliches organisches Material entfernt wird, ist davon auszugehen, dass Bio-Oss® keine Bakterien, Viren oder Prionen (BSE-Überträger) enthält und eine Krankheitsübertragung auszuschließen ist. COHEN & MULLARKY (1993) und COHEN et al. (1994) konnten nachweisen, dass keinerlei immunologische

oder allergische Reaktionen von Bio-Oss® ausgehen, was die Abwesenheit von Proteinen bestätigt. SCHLICKWEI & PAUL (1991) konnten das mit Hilfe des ELISA-Testes (Enzyme-linked immunosorbent assay) bestätigen.

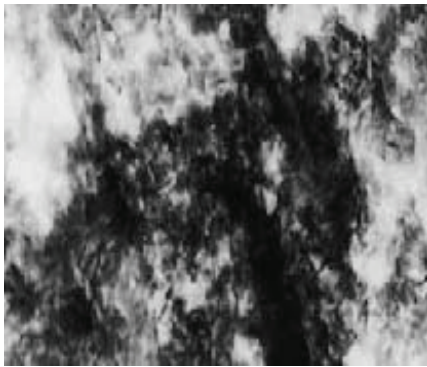


Abbildung 2 *Humaner Knochen mit kleinen und kompakten natürlichen Apatitkristallen (TEM 100'000x)*

(nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)

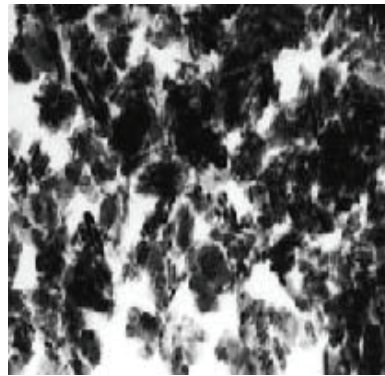


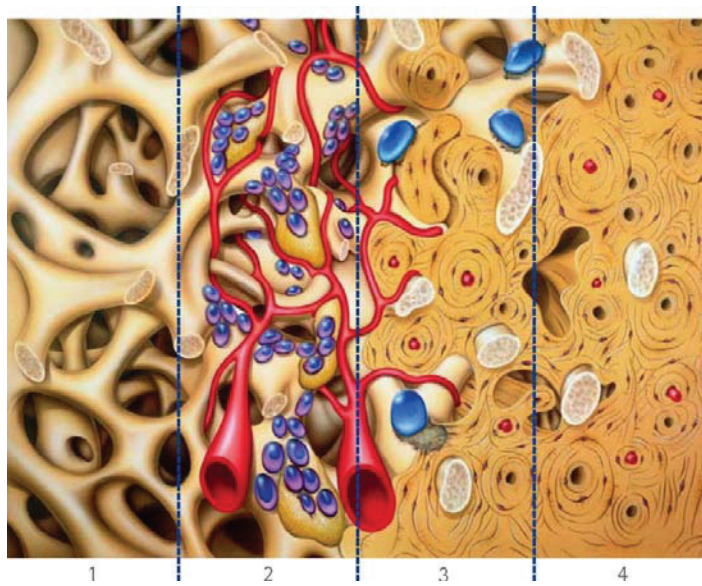
Abbildung 3 *Bio-Oss® mit kleinen und kompakten Nanokristallen ähnlich humanem Knochen (TEM 100'000x)*

(nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)

Bedeutung der inneren Oberfläche

Eine große innere Oberfläche der Partikel mit Makroporen ist Grundvoraussetzung für eine schnelle Vaskularisation des augmentierten Knochens sowie eines implantierten KAM. SCHENK et al. (1994) konnten zahlreiche penetrierende Gefäße in Bio-Oss®-Partikeln nachweisen. Eine zügige Vaskularisation ist Voraussetzung für die ossäre Inkorporation eines KAM, da über die Gefäße die zur Knochenbildung notwendigen Zellen heran transportiert werden (HOLDEN 1972, SCHENK 1991). Durch einwachsende Kapillaren gelangen osteogene Zellen auf die Oberfläche des bovinen KAM und initiieren Knochenwachstumsprozesse. Analog zur autologen Knochen transplantation bildet sich ein Knochengewebsproliferat auf dem Untergrund des xenogenen KAM. Die bereits erwähnte große innere Oberfläche bildet eine große Anlagerungsfläche und begünstigt dadurch die Knochenbildung (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006).

Abb. 4 zeigt schematisch die Abfolge des Osteointegrationsprozesses von Bio-Oss®.



1. Matrixstruktur zur Stabilisierung des Blutkoagulums
2. Revaskularisation
3. Ablagerung des neuen Knochens auf der mineralischen Leitschienenstruktur
4. Remodeling von Knochen und Bio-Oss® durch Osteoklasten und Osteoblasten (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)

Abbildung 4 Schematische Darstellung der knöchernen Integration boviner Partikel (nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)

Interkonnektierendes Porensystem

Bio-Oss® besteht zu 60-80% aus Poren mit einem Durchmesser von 2-50 nm (JENSEN et al. 1998a, PEETZ 1997, WEIBRICH et al. 2000), wodurch das Einsprossen von Blutgefäßen und Begleitzellen ohne vorherige oder begleitende osteoklastische Resorption möglich ist (SCHENK 1991). Damit ein Knochengewebsproliferat in ein KAM oder in transplantierten Knochen einwachsen kann, ist ein Porendurchmesser von mindestens 100 µm und zur Ausbildung Osteonen ähnlicher Strukturen ein solcher von 40-100 µm erforderlich. Für das Einwachsen von Bindegewebsfibrillen genügt dagegen ein Porendurchmesser von 5-15 µm (KLAWITTER & HULBERT 1971). Somit ist die in einem hohen Maße interkonnektierende Porosität eines KAM, die mit einer großen inneren Oberfläche einhergeht, Grundvoraussetzung für einen guten knöchernen Durchbau. Ziel ist eine vollständige Osteointegration der KAM-Bestandteile. Diese Voraussetzungen soll Bio-Oss® prinzipiell erfüllen.

Einbringen des Bio-Oss®-Spongiosa-Granulats in den Defekt:

Das Bio-Oss®-Spongiosa-Granulat sollte nach Herstellerangaben mit moderatem Druck in den Defekt eingebracht werden und möglichst ein direkter Kontakt mit dem Knochen bestehen. Um die hohe Porosität des Materials und große Oberfläche des KAM optimal zu erhalten, sollte ein zu starkes Einpressen in den Defekt vermieden werden. Durch die gute Adhäsion an den Knochenwänden stabilisiert Bio-Oss® den Defekt durch sein langsames Remodeling, wobei eine zusätzliche Fixierung mittels einer Membran, wie z. B. Bio-Gide®, in Abhängigkeit von den anatomischen Gegebenheiten in der Empfängerregion erforderlich sein kann (GEISTLICH BIOMATERIALS 2006).

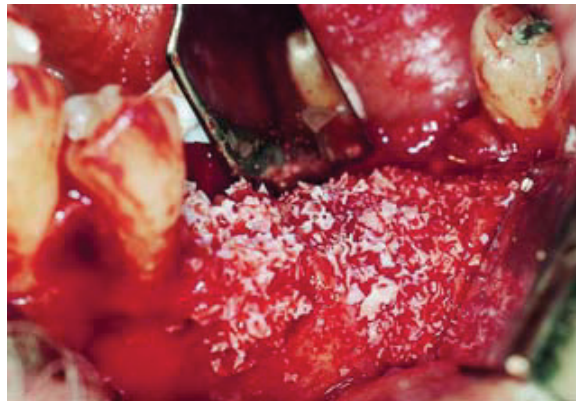


Abbildung 5 Augmentation eines Kieferknochendefektes mit Bio-Oss® (nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)

Sicherheitsanforderungen

Bio-Oss® unterliegt als xenogenes KAM strengen nationalen behördlichen Auflagen gemäß des Medizinproduktegesetzes sowie einem international normierten Qualitätssicherungssystem (ISO 9001:2000/ISO 13485:2000) Letzteres wird behördlicherseits kontrolliert und in der EU durch die CE-Zertifizierung ausgewiesen. Bio-Oss® besitzt zudem die Medizinproduktezulassung der US-Gesundheitsbehörde FDA (GESTLICH BIOMATERIALS 2006).

3.1.2. Zum Vergleich herangezogene Knochenaufbaumaterialien (KAM)

Im Rahmen der vergleichenden Bewertung von Bio-Oss® werden in der Diskussion zwei innovative vollsynthetisch hergestellte KAM auf Hydroxylapatit(HA)-Basis herangezogen, die im Folgenden kurz charakterisiert werden sollen.

3.1.2.1. NanoBone®

NanoBone® (Artoss, Rostock) ist seit Ende 2005 als KAM auf dem Markt und besitzt eine CE-Zertifizierung für den EU-Bereich. Es besteht aus HA mit einem 24% igem Kieselgel-Anteil. Hergestellt wird es innovativ im Dispersionsverfahren, wobei Temperaturen > 800°C, bei denen Sinterungsprozesse eintreten, vermieden werden. Dabei wird nanokristallines HA in ein SiO₂-Sol auf Basis von Alkoxiden gegeben und homogen verteilt. Beim Gelübergang entsteht das nanoporöse Grundgerüst von NanoBone®. Durch Trocknungsvorgänge entstehen zudem Mikroporen in dem Xerogel, das in Granulatform vorliegt. Seine Porosität ist hoch; sie beträgt auf das einzelne Granulat Korn bezogen 60% und die für Schüttung 80%. Das zu 76% aus HA bestehende NanoBone® verfügt über eine sehr große, bioaktive Oberfläche von 84 m²/g. Dazu tragen insbesondere die interkonnektierenden Poren im Nano- und Mikrometerbereich sowie die Makroporen (im Millimeterbereich) bei, die zwischen den einzelnen Granulatkörnern lokalisiert sind. Durch das Anmischen von NanoBone® mit Eigenblut erhält es eine pastöse Konsistenz und haftet dadurch gut in Defekten. Die interkonnektierenden Mikro- und Makroporen gewährleisten eine gute osteokonduktive Wirkung von NanoBone®, da sie das Einwachsen von knochenbildenden Zellen und Bindegewebsfasern sowie von Gefäßen ermöglichen. Das nanoporöse Kristallgerüst hingegen begünstigt das Eindringen von Gewebsflüssigkeit und Plasma in das KAM, wodurch auch wachstumsfördernde Proteine - wie z. B. BMPs - gebunden werden. Dadurch geht von NanoBone® zusätzlich eine osseoprotektive Wirkung aus (HENKEL et al. 2004).

Detaillierte Informationen über das KAM NanoBone® finden sich in der Promotionsschrift von ALBRECHT (2008) und in den Produktinformationen der Herstellerfirma (ARTOSS 2005).

3.1.2.2. Ostim®

Ostim® (Haererus Kulzer, Hanau) - ein erst seit wenigen Jahren verfügbares KAM - basiert ebenfalls auf nanokristallinem HA, das als Hydrogel mit pastöser Konsistenz vorliegt und daher wenig mechanisch belastbar ist. Es wird in einem Niedertemperaturverfahren ($< 800^{\circ}\text{C}$) hergestellt, wodurch eine Sinterung der HA-Kristalle (Durchmesser ca. 18nm) vermieden wird. Die besonders große, bioaktive Oberfläche von $100 \text{ m}^2/\text{g}$ Trockensubstanz ist für die Besiedlung mit Osteoblastenvorläuferzellen gut geeignet. Durch den hohen Wassergehalt des KAM wird zudem die Einwanderung von Blutzellen begünstigt. Die dominierende HA-Komponente in Ostim® - wie im bereits vorgestellten NanoBone® - weist eine große physikochemische Ähnlichkeit mit der Kristallstruktur des natürlichen Knochens auf. Als vorteilhaft erweist sich die einfache Handhabung von Ostim®. Da es in einer sterilen Injektionsspritze geliefert wird, lässt es sich gut in schmale bzw. schlecht zugängliche Defekte applizieren. Ein Anmischen mit Patientenblut, Kochsalzlösung o.a. vor der Applikation entfällt. Da es mechanisch wenig belastbar ist und sehr schnell resorbiert wird, eignet es sich nicht für größere und mechanisch belastete Knochendefekte.

Genauere Ausführungen über Ostim® sind den Produktinformationen der Herstellerfirma zu entnehmen (HERAEUS-KULZER 2003).

3.1.3. *Begriffsbestimmung Knochenaufbaumaterialien (KAM)*

An dieser Stelle soll der Begriff KAM näher erörtert werden. Man versteht darunter solche Biomaterialien, die eine hohe Osteokonduktivität besitzen und eine der Knochenneubildung angepassten Biodegradation aufweisen. Dazu zählen die drei vorgestellten KAM Bio-Oss®, NanoBone® und Ostim®. Obwohl erstes xenogener Herkunft ist und die beiden letzten alloplastischer Natur sind, weisen sie gemeinsam eine nanokristalline HA-Struktur sowie eine unterschiedlich dimensionierte, hohe interkonnektierende Porosität auf, die die eingangs angeführten biologischen Eigenschaften gewährleisten.

Alle Biomaterialien, die diese Kriterien nicht erfüllen, bezeichnet man als *Knochenersatzmaterialien* (KEM). Dazu gehören z. B. die bei hohen Temperaturen ($> 1100^{\circ}\text{C}$) hergestellten, gesinterten Biokeramiken auf HA- und β -TCP-Basis. Durch den Brennvorgang resultiert eine höhere Dichte, was eine geringere Porosität und einen Verlust des interkonnektierenden Charakters des Porensystems dieser KEM zur Folge hat. Die Folge ist eine verminderte Osteokonduktivität und eine erschwerte Biodegradation (HENKEL et al. 2004).

3.1.4. Biodegradation am Beispiel von Bio-Oss®

Der Begriff *Biodegradation* gilt als Ausdruck der Resorbierbarkeit bzw. des biologischen Abbaus von Biomaterialien unter *In-vivo*-Bedingungen. Eine der Knochenneubildung angepasste Biodegradation eines KAM ist somit entscheidend für den knöchernen Durchbau eines Defektes resp. eines Augmentates. Nach SCHENK (1991) gefährdet eine vorzeitige Resorption in der Umbauphase die Integrität des Leitgerüsts, während eine verzögerte Resorption - gleichzusetzen mit Persistenz des KAM - den Aufbau einer kontinuierlichen Knochenstruktur verhindert. Für die Biodegradation von KAM entscheidende beeinflussende Kriterien sind der Porositätsgrad, die Oberflächenstruktur, der Kristallisationsgrad und Kristallgröße sowie verschiedene Wirtsfaktoren (POLLICK et al. 1995).

Die Biodegradation von Bio-Oss® wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Die Einschätzungen reichen von einer vollständig angepassten Resorption bis hin zu einem in Frage stellen der Biodegradierbarkeit des KAM. So konnten KLINGE et al. (1992) an Schädeldefekten von Kaninchen eine vollständige Resorption von Bio-Oss® nachweisen. Anhand histologischer Studien an Kaninchen konnten SPECTOR (1994) und BEREITER et al. (1989) eine große Anzahl an Osteoklasten an der Oberfläche von Bio-Oss® aufzeigen, was für eine aktive Resorption des KAM spricht. SCHLICKWEI & PAUL (1991) vertreten die Ansicht, dass die Resorption von Bio-Oss® beim Menschen im Rahmen des physiologischen Remodelings in einem Zeitintervall von 1-5 Jahren erfolgt.

WALLACE et al. (1996) unterstützt diese Ansicht. Er wies durch Biopsien nach Sinusaugmentation mit Bio-Oss® nach, dass das KAM innerhalb eines Zeitraumes von 12 bis 20 Monaten biodegradiert und in vitalen Knochen umgewandelt wird. In anderen Humanstudien waren Bio-Oss®-Partikel röntgenologisch noch nach sieben Jahren nachzuweisen (SCHLEGEL 1996). So bleibt letztlich der Grad des biologischen Abbaus des bovinen Xenografts umstritten. Als vorteilhaft erweist sich nach CLERGEAU et al. (1996) eine eher langsame Biodegradation, da das KAM den Kollaps des umgebenden Gewebes verhindert und der Oberflächenkontakt des neuen Knochens mit dem KAM seine Inkorporation möglich macht. Andererseits kann sich dort, wo sich noch KAM-Partikel befinden, kein neuer Knochen bilden.

3.2. Versuchstiere

Für die *In-vivo*-Testung des KAM Bio-Oss® wurden 12-14 Monate alte Miniaturschweine - „Göttingen Minipigs“ (Fa. Ellegaard, Dalmose – Dänemark) - mit einem Gewicht von 25 bis 30 kg herangezogen. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei des Landes Mecklenburg-Vorpommern nach vorheriger Prüfung genehmigt (AZ: LVL M-V/TSD/7221.3-1.1-042/04).

Bei 6 Tieren wurden beidseits im anterioren Unterkiefer unterhalb der Zahnreihen Defekte kritischer Größe ($> 5\text{cm}^3$) gesetzt und mit Bio-Oss® versorgt. Es wurden zwei Versuchsgruppen mit jeweils 3 Tieren gebildet, die nach 5 Wochen bzw. 8 Monaten Liegedauer des KAM geopfert und nachuntersucht wurden (Tab. 3).

Tabelle 3 Versuchsaufbau

Versuchsgruppe	Biomaterial	Anzahl der Defekte (Anzahl der Tiere)	Zeitintervall bis zur Opferung
Gruppe O	Bio-Oss®	6 (3 Tiere)	5 Wochen
Gruppe T	Bio-Oss®	6 (3 Tiere)	8 Monate

Während der Versuchsdauer erhielten die Tiere eine Standardnahrung, so genanntes Minipig-Erhaltungsfutter (sniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Haltung der Tiere erfolgte in einem landwirtschaftlichen Betrieb unter regelmäßiger veterinärmedizinischer Kontrolle.

Erwähnenswert ist, dass im Alter von 12-14 Monaten - entgegen allgemeiner veterinärmedizinischer Auffassung - der Zahnwechsel noch nicht bei allen Miniaturschweinen vollständig abgeschlossen war, was das Vorkommen einzelner Zahnkeime im Knochen begründet. Es wurde versucht, diese bei der Defektsetzung nicht zu alterieren, was jedoch in wenigen Einzelfällen nicht gelang. In diesen Ausnahmefällen waren Auswirkungen auf die Knochenregeneration in der Defektregion nicht auszuschließen, welche zu einer Beeinträchtigung der Auswertungsergebnisse geführt haben könnten.

Das adulte Schwein besitzt 44 permanente Zähne, wobei jede Unterkieferhälfte 3 Inzisivi, einen Caninus, 4 Prämolaren und 3 Molaren hat (Abb. 7). Das porkine Milchgebiss umfasst lediglich 28 Zähne (Abb. 6). Daher haben nicht alle permanenten Zähne Milchzahnvorläufer (WIKIPEDIA 2008).

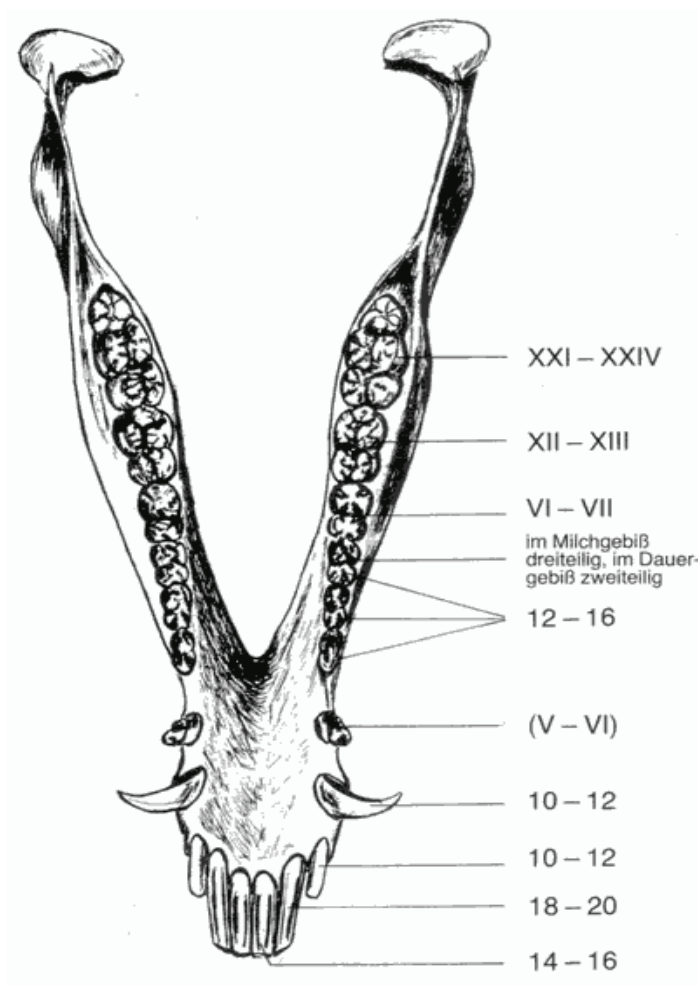
Oberkiefer						
i1	i2	i3	c1	p2	p3	p4
i1	i2	i3	c1	p2	p3	p4
Unterkiefer						

Abbildung 6 Zahnformel Milchgebiss

Oberkiefer										
I1	I2	I3	C1	P1	P2	P3	P4	M1	M2	M3
I1	I2	I3	C1	P1	P2	P3	P4	M1	M2	M3
Unterkiefer										

Abbildung 7 Zahnformel adultes Gebiss

Zusätzliche Hinweise vermittelt die schematische Darstellung der Durchbruchzeiten der permanenten Zähne beim Schwein (Abb. 8). Es handelt sich um Durchschnittswerte, wobei teilweise innerhalb einer Population Unterschiede auftreten können.



Die arabischen Ziffern geben an, in welchen Monaten die Milchzähne durch die Permanenten ersetzt werden. Die Zähne, die primär als Dauerzähne durchbrechen, sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet.

Abbildung 8 Unterkiefer eines Schweins mit Zahndurchbruchzeiten (schematische Darstellung nach BRIEDERMANN 1995)

3.3. Versuchsdurchführung

3.3.1. Operationsmethode

Die Göttinger Miniaturschweine erhielten zur Prämedikation 5 mg/kg Azaperon. Anschließend bekamen die Tiere eine Mischinjektion mit 15 mg/kg Ketamin, 0,2 mg Dormicum und 1 mg Atropinsulfat zur Anästhesie. Zusätzlich wurden 3-4 ml UDS Forte (Ultracain 4%ig) verabreicht, um zeitweilig Blutarmut zu erzielen, welche das operative Vorgehen erleichterte. Der Defekt wurde ins vordere Drittel des Unterkiefers gelegt, da dort die meiste Knochensubstanz verfügbar ist. Zudem treten bei dieser Lokalisation kaum Beschwerden auf, die zu einer Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme führen (Abb. 9).

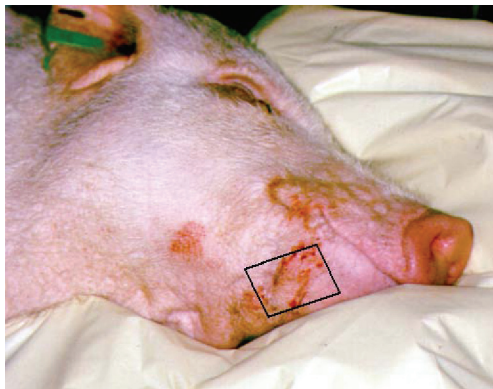


Abbildung 9 *Narkotisiertes Miniaturschwein, Markierung zur Defektsetzung im Bereich der anterioren Mandibula*

Parallel zum rechten Unterkieferrand wurde ein etwa 3,5 cm langer, bogenförmiger Hautschnitt gesetzt und der Knochen unter Erhaltung des abgeschobenen Periostes freigelegt. Um einen Defekt kritischer Größe zu setzen ($> 5\text{cm}^3$) wurden bis zum lingualen Periost Bohrungen mittels eines Rosenbohrers vorgenommen und durch Fräsen und Meißeln schließlich die kastenförmige Ostektomie vollendet (Abb. 10 bis 12). Da Schweine einen sehr breiten Mandibularkanal besitzen, musste das Gefäß- und Nervenbündel (A. u. V. mandibularis, N. alveolaris inferior) entfernt werden, um das erforderliche Defektvolumen zu gewährleisten. Dieses wurde abschließend mittels Messzirkel und Sonde exakt vermessen und im Operationsprotokoll registriert.

Nach Auffüllen des Defektes mit Bio-Oss® wurde der vestibuläre Periostlappen adaptiert und vernäht. Als Infektionsprophylaxe wurde zudem 4 g Sobelingranulat lokal appliziert (Pharmacia S.A., Luxemburg). Muskulatur, Subkutis und Kutis wurden schichtweise mit Vicrylnähten vereinigt. Unmittelbar postoperativ und 48 h später erhielten die Tiere zusätzlich 4 ml des Depotpenicillinpräparates Tadomycel (Bayer, Leverkusen) intramuskulär. Das entspricht einer Dosis von 800.000 I.E. Penicillin-Benzathin und

200.000 I.E. Benzylpenicillin. Auf der linken Unterkieferseite wurde anschließend in gleicher Weise vorgegangen.

Die Futterpellets wurden in den ersten 3 postoperativen Tagen eingeweicht verabreicht, um die Belastung des Unterkiefers beim Kauen zu vermindern. Nach vorheriger klinischer Kontrolle wurde am 4. postoperativen Tag auf Normalkost - wie oben beschrieben - umgestellt.

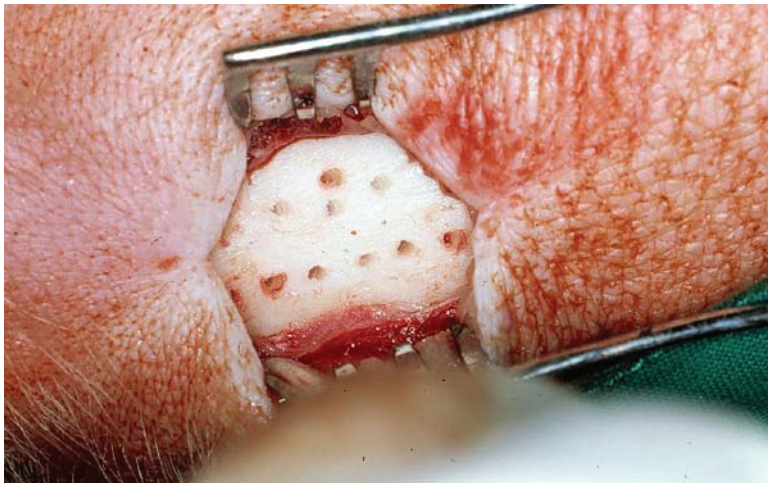


Abbildung 10
*Operationssitus:
Markierung der
Defektgröße durch
Bohrungen mittels
Rosenbohrer*

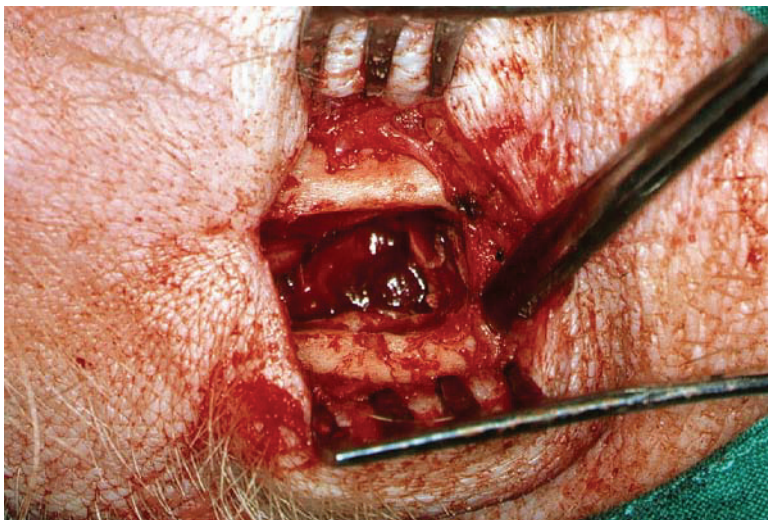


Abbildung 11
*Operationssitus:
„critical size defect“
(>5 cm³) im anterioren
Unterkiefer*

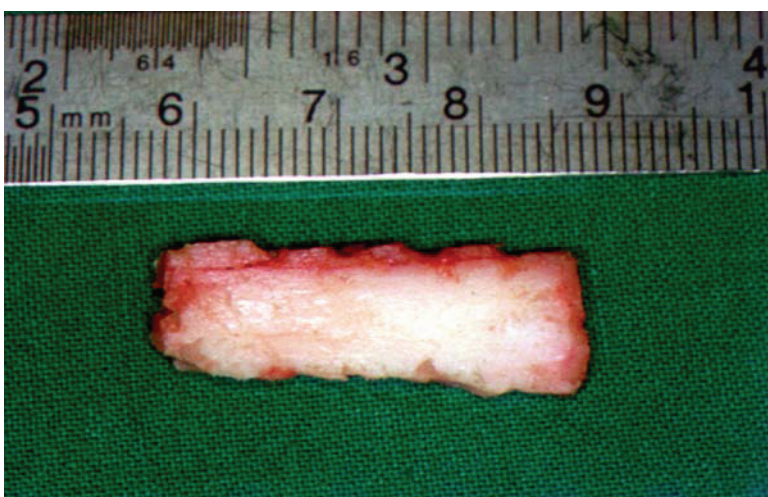


Abbildung 12
*Herausgetrennter
Knochenblock*

3.3.2. *Opferung der Tiere*

Die Tiere mit je 2 Bio-Oss® versorgten Unterkieferdefekten wurden nach 5 Wochen bzw. 8 Monaten geopfert. An eine Prämedikation mit Stresnil schloss sich die Narkose mit 2 ml Dormicum und 8 ml Ketamin i.m. an. Die eigentliche Tötung erfolgte mit 15 ml Euta 77 (40% Pentobarbital) intravenös. Nach vollständiger Ablösung aller Weichteile sowie des Periostes wurde der Unterkiefer im Bereich des Kieferwinkels beiderseits mit einer oszillierenden Säge durchtrennt, in toto entnommen und in der Medianebene nochmals getrennt (Abb. 13). Beide Hälften wurden morphologisch und röntgenologisch untersucht. Da sich der ehemalige Defekt durch narbige Fixation des Periostes erkennen ließ, konnte dieser mit einem Sicherheitsabstand von ca. 5 mm als Block mittels einer gekühlten Knochensäge heraus präpariert werden. Die Fixierung zur histologischen Untersuchung erfolgte umgehend in 5%igem neutralen, gepufferten Formalin.

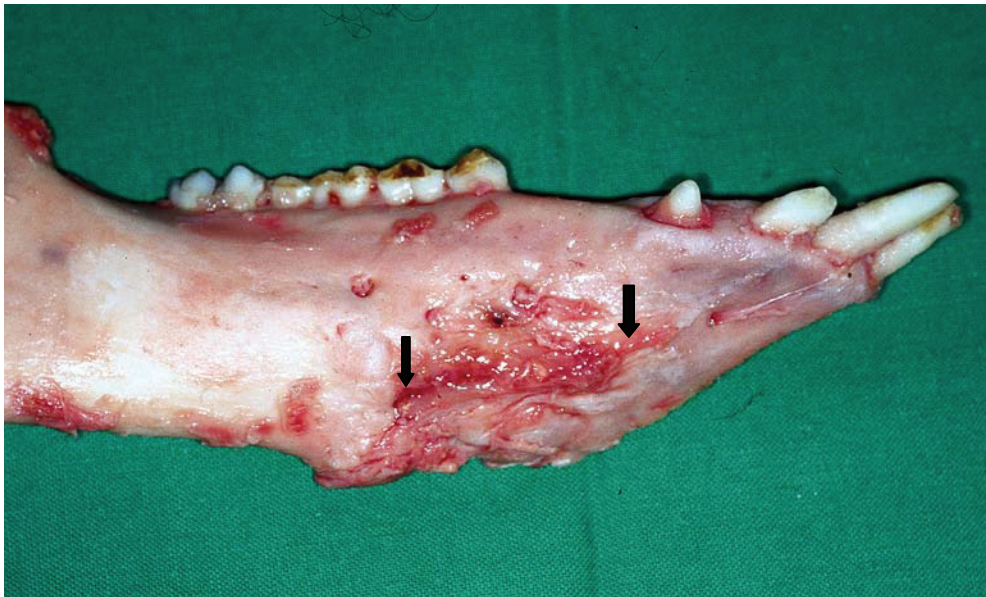


Abbildung 13 Teilansicht des rechten Unterkiefers eines Minipigs 5 Wochen nach Applikation von Bio-Oss® mit deutlich erkennbarer Defektregion (Pfeile) (O3)

3.4. Makroskopische Beurteilung

Bereits intraoperativ wurden vor dem Einbringen des KAM Länge, Breite und Tiefe der artifiziell erzeugten Primärdefekte vermessen (siehe 3.3.1), so dass diese Werte den Operationsprotokollen zu entnehmen waren. Bei den nach 5 Wochen getöteten Tieren wurden an den heraus präparierten Kiefern die Restdefekte in gleicher Weise vermessen und im Tötungsprotokoll dokumentiert, so dass Vergleiche mit den Ausgangsbefunden möglich waren.

Da nach 8 Monaten makroskopisch keine Restdefekte erkennbar waren, konnten in dieser Gruppe klinisch keine abschließenden Messwerte erhoben werden. Es wurden lediglich oberflächliche Veränderungen der Gewebestrukturen registriert, so z. B. leichte bindegewebige Einziehungen und Narbenbildungen. Sie gaben Hinweise auf die ursprüngliche Defektausdehnung.

3.5. Röntgenologische Auswertung

Um röntgenologisch Aussagen über den Grad des knöchernen Durchbaus der Defekte und über die Biodegradation des applizierten KAM gewinnen zu können, wurden alle Tiere postoperativ noch in Narkose mittels der Unterkieferlateraltechnik und unmittelbar postmortal nach medianer Durchtrennung des Unterkiefers im seitlichen Strahlengang geröntgt. Bei ausgewählten Tieren der *In-vivo*-Langzeittestungen über 8 Monate wurden zusätzlich - ebenfalls in Narkose - Unterkieferlateralaufnahmen nach 2 und 4 Monaten post implantationem (p. i.) durchgeführt. Es wurde ein Röntgengerät für veterinärmedizinische Zwecke vom Typ X - Ray Gamma 2000 (PHYSIA GmbH, Neuisenburg) verwendet. Der verwendete Fokus-Objekt-Abstand (FOA) betrug für die Unterkieferlateraltechnik 45 cm bei einer Stromstärke (I) von 3,2 mAs; für die Aufnahmen im seitlichen Strahlengang betrug die Parameter 25 cm (FOA) resp. 0,6 mAs (I). Da alle Röntgenaufnahmen an lebenden Tieren in Narkose erfolgten, war die Anfertigung vergleichbarer überlagerungsfreier Röntgenaufnahmen der Unterkiefer nur durch Einsatz einer speziellen Apparatur zur reproduzierbaren Lagerung der Tiere möglich. (Abb. 14-16). Eine detaillierte Beschreibung dieser Technik ist der Dissertationsschrift von BUCUR (2003) zu entnehmen.



Abbildung 14 Positionierhilfe zur Lagerung der Minipigs beim Röntgen nach BUCUR (2003)

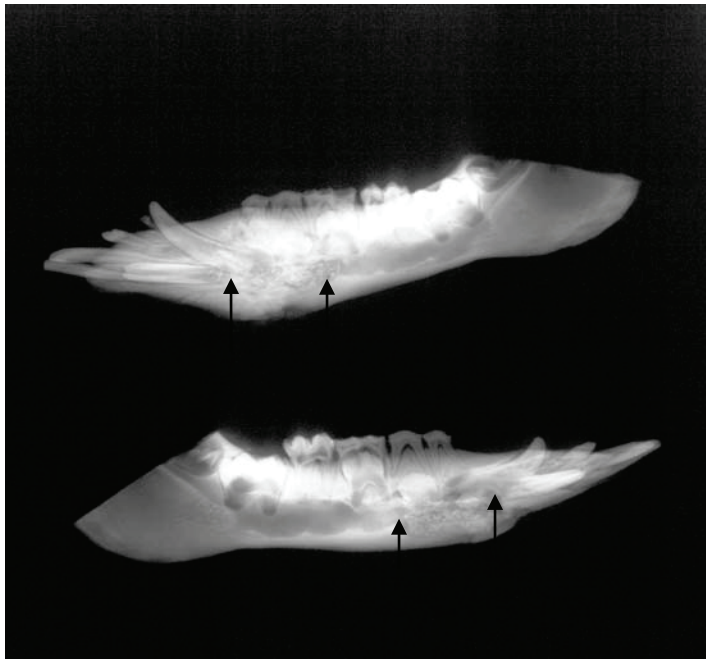


Abbildung 15 Postmortale Röntgenaufnahme beider Unterkieferhälften im seitlichen Strahlengang nach Applikation von Bio-Oss® (Versuchstier O2)



Abbildung 16 Postoperative Röntgenaufnahme mittels Unterkieferlateraltechnik nach Applikation von Bio-Oss® (Versuchstier O3 links)

3.6. Labortechnische Aufarbeitung

Bereits vor der 7-tägigen Fixierung in 4%igem neutralem, gepuffertem Formalin wurden die ehemals ca. 4 cm langen Knochenstücke in 12 Scheiben zerlegt (Abb. 17). Sie wurden wie folgt weiter behandelt:

- 5 Knochengewebsscheiben pro Defekt wurden in Kunststoff eingebettet und mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik (DONATH & BREUNER 1982) weiter aufgearbeitet
- 5 Knochengewebsscheiben wurden mit in gesättigter EDTA-Lösung entkalkt, anschließend in Paraffin eingebettet und konventionelle histologische Schnittpräparate angefertigt
- 1-2 Knochengewebsscheiben blieben zunächst unbearbeitet und standen für z. T. durchgeführte eventuelle notwendige Zusatzuntersuchungen (Rasterelektronenmikroskopie, Histochemie) zu Verfügung



Abbildung 17 Herausgetrennte Knochenstücke, die in kompatible Schnittsegmente (links) gesägt werden

Routinemäßig wurden die entkalkten Präparate mittels der Hämalaun-Eosin (HE)-Technik und die Dünnschliffpräparate nach der Giemsa-Toluidinblau-Methode gefärbt. Als Zweitfärbung wurde bei beiden Präparategruppen die Masson-Goldner-Technik angewandt. Methodisch wurde durchweg nach ROMEIS (1989) vorgegangen.

3.6.1 Qualitative und semiquantitative histologische Untersuchungen

Für die *qualitative histologische Auswertung* standen 143 Präparate der *In-vivo*-Testung von Bio-Oss® zur Verfügung: 57 Präparate 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® (Gruppe O) und 86 Präparate nach 8 monatiger Implantationsdauer (Gruppe T). Einige Präparate waren aufgrund von Artefakten nicht exakt auswertbar und blieben in dieser Aufstellung unberücksichtigt.

Die ausgewählten Paraffinschnitte bzw. Dünnschliffpräparate wurden zunächst qualitativ beurteilt, wobei neben der Knochenneubildung in der Defektregion der Abbau des KAM begutachtet wurde. Insbesondere wurde registriert, ob letzterer durch akute oder chronische Entzündungszellen (z. B. Makrophagen) bzw. durch ortständige Zellelemente wie z. B. Osteoklasten erfolgte.

Die zusätzliche *semiquantitative feingewebliche Analyse* erfolgte unter Berücksichtigung folgender Parameter:

1. Noch vorhandene KAM-Anteile
2. Ausmaß der Knochenneubildung
3. Nachweisbare Entzündungszeichen
4. KAM-assoziierte Knochenbildung bzw. Verbundosteogenese im Zentrum des Defektes

Mittels einer Graduierung von **0** (kein) über **1** (gering) und **2** (deutlich) bis hin zu **3** (stark) wurde der Ausprägungsgrad des untersuchten Parameters semiquantitativ erfasst, wobei eine zusätzliche Kategorie **X** (als nicht auswertbar) definiert wurde. Besonderheiten, wie Hohlrumbildungen, in den Defekt hineinragende Zähne, ein großflächig angeschnittener Mandibularkanal oder Artefakte wurden gesondert erfasst.

3.6.2. Histomorphometrische Methodik

Um die einzelnen Schnittpräparate Computer gestützt histomorphometrisch auswerten zu können, wurden fünf repräsentative Präparate pro Defekt ausgewählt und mit Hilfe eines Farbscanners (Agfa Horizon Ultra (R), Agfa, Köln) mit einer Auflösung von 2400 dpi (dots per inch) eingescannt (Abb. 18). So standen in Versuchsgruppe O 30 digitalisierte Präparate zur Verfügung. In der Gruppe T waren es durch den Verlust eines Tieres, das vorzeitig verstorben war, lediglich 20.

Mit dem Softwareprogramm „Analysis“[®] der Firma SIS (SOFT-IMAGING-SYSTEMS) erfolgte die histomorphometrische Auswertung. Durch vorherige Kalibrierung der Bilder konnten exakte Flächen aus den Unterkieferquerschnittspräparaten in Excel-Tabellen ausgegeben werden. Als problematisch erwiesen sich die teilweise zu geringen Farbunterschiede innerhalb der Bilder, so dass sich die einzelnen Phasen „überlappten“ und Pixel fehlinterpretiert wurden. Beispielsweise konnten KAM-Reste und Knochengewebe aufgrund farblicher Gemeinsamkeiten nicht ausreichend differenziert werden. Mit Hilfe des Software-Programmes Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Firma Adobe[®], San Jose, Ca/USA) ließ sich die Tiefenschärfe der Präparate korrigieren, wonach sich KAM und Bindegewebe (bzw. Knochen) mittels automatischer Farbdetektion differenzieren ließen (Abb. 19). Die einzelnen Messungen erfolgten in mehreren Teilschritten mit dem angegebenen Softwareprogramm. Aufgabe war es nun, in den zuvor farbkontrastierten Bildern den Restdefekt zu bestimmen, der sich aus den Komponenten KAM-Reste, Bindegewebe, Vakanzen, Hohlräume und Artefakte zusammensetzt. Die Einzelkomponenten wurden metrisch flächenbezogen erfasst und in Excel-Tabellen überführt. Zahnanschnitte, die in Einzelfällen in die Defekte hineinragten, wurden von den Ausgangsdefektgrößen subtrahiert. Da sich die Primärdefekte am Versuchsende histologisch nicht mehr rekonstruieren ließen, wurden ihre klinisch ermittelten Größen aus den Operationsprotokollen (Zeitpunkt der Defektsetzung) zugrunde gelegt. Der Anteil des in den Defektregionen neu gebildeten Knochens wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Knochenneubildung} = \text{klinischer Primärdefekt} - \text{Defektrest}$$

Aus den resultierenden flächenbezogenen Werten der Kieferquerschnitte ließen sich die Mittelwerte pro Tier und schließlich die Gruppenmittelwerte rechnerisch ermitteln. Ein Beispiel ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Präparat O1re7-5 der Versuchsreihe Bio-Oss® - (5 Wochen post implantationem)

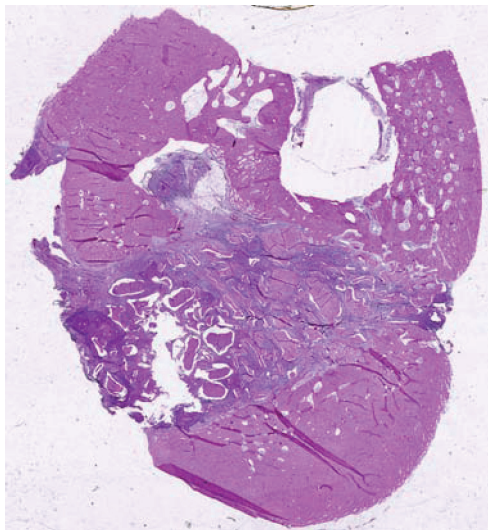


Abbildung 18 *Eingescanntes entkalktes Präparat (1200dpi) 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® (Gr. O), HE-Färbung, Vergr.3x*

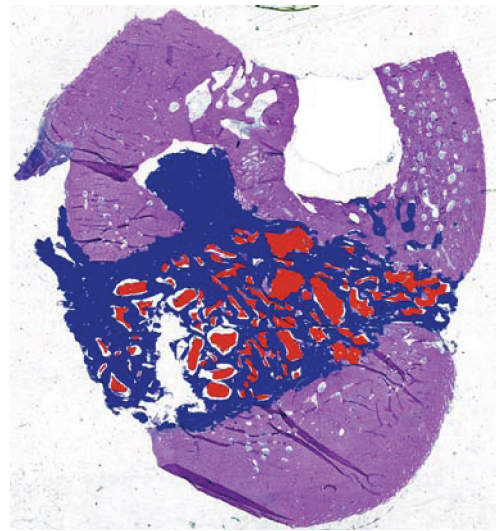


Abbildung 19 *Präparat nach Bearbeitung mit Adobe Photoshop, HE-Färbung, Vergr. 3x*

Tabelle 4 *Vom Softwareprogramm Analysis® erstellte Tabelle der histomorphometrischen Messwerte, ausgegeben für das Präparat der Gruppe O (O1-7_5)*

Defektfläche mm ²	Phase 1 in mm ²	Fläche1 in %	Phase 2 in mm ²	Fläche 2 in %	Phase 3 in mm ²	Fläche 3 in %	Phase 4 in mm ²	Fläche 4 in %	Phase 5 in mm ²	Fläche 5 in %
240	12,4	5,2	52,8	22	7,3	3,0	8,6	3,6	-	-

Defektfläche minus Zahn (wenn angeschnitten)

KAM-Reste (in der Defektregion)

Bindegewebe (in der Defektregion)

Vakanzen (oberflächliche Defekteinziehung)

Artefakte (unphysiologische oder pathologische Auffälligkeiten)

Erweiterter Markraum (unphysiologisch große Knochenmarkräume)

Phase 1 →

Phase 2 →

Phase 3 → **Defektrest**

Phase 4 →

Phase 5 →

3.6.3. Histochemische Methodik

Die Immunhistochemie ist eine Standardmethode, die der zunächst qualitativen Erkennung von Proteinen *in situ* dient. Mit ihr kann man Hinweise erlangen, wie biologisch aktiv die untersuchten Zellen oder Gewebe sind, da die gegebenenfalls nachgewiesenen Enzyme an ihrem Wirkungsort (Gewebe, Zelle, Zellkompartiment) detektiert werden. Entsprechend der jeweiligen Fragestellungen kommen geeignete Techniken zum Einsatz. Ausgewählte histochemische Charakterisierungsmethoden, die Aufschluss über die Knochenstrukturen und deren Umgebungsstrukturen geben, sollen an dieser Stelle näher beschrieben werden.

3.6.3.1. Alkalische Phosphatasen

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein Protein, dessen charakteristische Enzym-Aktivität Phosphorsäuremonoester optimal bei alkalischem pH Wert spaltet. Das Enzym tritt häufig an Stellen der Zellmembran auf, bei denen es zu aktivem Transport kommt. Beispielsweise findet man es in Endothelien von Blutgefäßen, im Bürstensaum der gewundenen Nierentubuli und am inneren Rand von Darmepithelien. Im Gomori-Takamatsu-Verfahren wird der Gewebeschnitt in Gegenwart von Magnesiumionen bei pH 9,4 mit Glycerinphosphat (oder Phosphorsäuremonoester bei hohem pH-Wert und hoher Konzentration an Kalzium-Ionen) versetzt. Das freigesetzte Phosphat wird durch die im Medium in hoher Konzentration vorliegenden Kalzium-Ionen abgefangen und fällt als Kalziumphosphat aus. Bei alkalischem pH ist dieses fast völlig unlöslich und wird dann in das unlösliche Kobaltphosphat überführt. Schließlich wird die Enzymaktivität durch einen schwarzen Niederschlag von Kobaltsulfid sichtbar (DANIELLI 1953, GOMORI 1952).

Der im Rahmen dieser Arbeit dargestellte AP-Nachweis beruht jedoch auf dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. Gleiches gilt für die Detektion von BMP-2 (bone morphogenetic protein-2).

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird zuerst ein spezifischer Antikörper auf die zu untersuchenden Zellen gebracht und schließlich ein weiterer Antikörper, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser so genannte Sekundäntikörper ist mit einem Enzym gekoppelt; im Versuchsprotokoll zum Nachweis von BMP-2 und Alkalische Phosphatase HRP (Horseradish peroxidase) konjugiert, so dass eine Enzym-Substratreaktion ausgelöst wird. Bei Zugabe des Farbstoffes DAB (3,3'-Diaminobenzidin) wird dieser durch die HRP oxidiert und bildet in wässrigen und organischen Lösungsmitteln ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe (WIKIPEDIA 2009).

3.6.3.2. BMP-2

BMP-2 ist ein osteoinduktiv wirkender Wachstumsfaktor der TGF (transforming growth factor)- β -Superfamilie. Dieses Regulatorprotein wird u.a. von Osteoblasten gebildet und ist bei verschiedenen Zelltypen für das Wachstum, die Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose verantwortlich. Weitere Einzelheiten finden sich im Kapitel 2.8.1..

3.6.3.3. Tartrat-resistant acid phosphatase (TRAP)

Der enzymhistochemische Nachweis von TRAP erfolgte nach dem Protokoll von BERKA und ANDERSON (1962). Das Isoenzym der sauren Phosphatase ist vorwiegend im Knochen und in einigen Blutzellen lokalisiert und weist im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel auf die Resorption des Gewebes durch Osteoklasten hin. Zudem werden auch andere Zellen, wie z.B. Makrophagen gefärbt, so dass eine exakte Identifizierung nicht nur aufgrund des positiven Farbergebnisses, sondern auch anhand der Lokalisation – an der Knochenoberfläche – und der Morphologie erfolgen muss.

3.7. Statistische Auswertung

Statistisch überprüft wurden alle exakt quantifizierbaren Daten. Die Auswertung der semiquantitativen histologischen Befunde erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Version Office XP bzw. Office 2007, Firma Microsoft®, Redmond, Washington/USA).

Die histomorphometrischen Untersuchungen wurden deskriptiv durch Ermittlung von Gruppenmittelwerten und Standardabweichungen ermittelt. Die Signifikanzprüfung wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Tests nach Mann-Whitney und Wilcoxon durchgeführt, wobei nach SACHS (1999) vorgegangen wurde. Dieser Test kann angewandt werden, wenn der zu untersuchende Parameter in der Grundgesamtheit nicht normalverteilt ist oder über die Verteilung nichts bekannt ist. Es ist ein Rangsummentest für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bei nichtnormalverteilten Grundgesamtheiten (KUNDT & KRENTZ 2003). Unter Anleitung der Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock konnten die statistischen Berechnungen mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 10.0) durchgeführt werden.

Schwerpunktmäßig wurden Knochenneubildung und Biodegradation von Bio-Oss® nach 5-wöchiger und 8-monatiger Implantation verglichen. Zudem konnten die von anderen Untersuchern der Arbeitsgruppe zeitgleich ermittelten histomorphometrischen Werte für NanoBone® und Ostim® zum statistischen Vergleich herangezogen werden.

4. Ergebnisse

Nachfolgend werden eigene klinische, röntgenologische und histologische Untersuchungsergebnisse sowie histomorphometrische Auswertungen der *In-vivo*-Testung von Bio-Oss® nach 5 Wochen und 8 Monaten dargestellt. Diese Untersuchungen waren Teil eines größeren Forschungsvorhabens, in dem weitere innovative KAM - wie Ostim® und NanoBone® - getestet wurden. Diese Testungen wurden von zwei weiteren Doktorandinnen vorgenommen (ALBRECHT 2008, SCHNEIDER 2009).

4.1. **Klinische Untersuchungsergebnisse**

In den Tabellen 5-7 sind die klinisch evaluierten Defektgrößen aufgeführt, die zu Versuchsbeginn und jeweils nach 5 Wochen bzw. 8 Monaten nach Bio-Oss®-Implantation ermittelt wurden. Eine Ausgangsdefektgröße von mindestens 5 cm³ im Sinne eines „critical size“ Defektes lag bei allen Tieren vor, was entscheidender Faktor für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse darstellt. Klinisch waren alle Knochendefekte 5 Wochen post implantationem (p. i.) fast vollständig mit fibrösem Gewebe ausgefüllt. Daneben konnte eine marginale Knochenbildung festgestellt werden, die bereits zu einer Verkleinerung der Defekte geführt hat. Jedoch sollten diese Werte kritisch bewertet werden, da eine genaue Abgrenzung des Defektbereiches von Umgebungsstrukturen nicht immer zweifelsfrei möglich war und die mittels Sonde und Lineal ermittelten Werte Ungenauigkeiten aufweisen können. Nach 8 Monaten waren die Defekte in allen Versuchsgruppen vollständig mit Knochen ausgefüllt. Es wurden lediglich vereinzelt narbige Einziehungen an der Knochenoberfläche in der ehemaligen Defektregion registriert.

Die klinische Auswertung nach 8 Monaten erbrachte bezüglich der Reossifikation der 4 Knochendefekte keine nennenswerten Unterschiede. Klinisch waren bei keinem Tier im Bereich der Mandibula KAM-Partikel nachweisbar, was für ein vollständige Biodegradation bzw. einen Einbau in den Knochen spricht. Bio-Oss®-Anteile in den perimandibulären Weichteilen, die auf einen teilweisen Verlust des KAM hindeuten würden, ließen sich nicht nachweisen. Bei beiden Versuchsgruppen fanden sich gelegentlich klinisch entzündliche Reaktionen. In den Tabellen 5 und 6 sind die klinisch evaluierten Defektgrößen der Versuchsgruppen gemäß dem Versuchsprotokoll dargestellt.

Tabelle 5 Klinisch ermittelte Defektgröße der Gruppe O - 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss®*

Gruppe O Defektgröße	n	O1 (li/re) (cm ³)	O2 (li/re) (cm ³)	O3 (li/re) (cm ³)
Anfangswert	6	6,6 / 5,5	5,7 / 6,6	6,2 / 6,2
Nach 5 Wochen	6	5,0 / 4,2	6,5 / 2,2	5,2 / 2,9

Tabelle 6 Klinisch ermittelte Defektgröße der Gruppe T - 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss®*

Gruppe T Defektgröße	n	T1 (li/re) (cm ³)	T2 (li/re) (cm ³)	T3 (li/re) (cm ³)
Anfangswert	4	Fehlversuch*	6,2 / 6,1	6,5 / 6,3
Nach 8 Monaten	4	Fehlversuch*	0,0 / 0,3	0,0 / 0,0

*Einzelheiten siehe Methodik , Kapitel 3.6.2.

Resümierend ist festzustellen, dass sich alle artifiziell gesetzten Knochendefekte kritischer Größe 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® deutlich verkleinert haben. Lediglich das Tier O2 wies linksseitig einen abweichenden Befund auf, wobei es sich um einen Messfehler handeln dürfte, der aufgrund nachfolgend beschriebener histomorphometrischer Befunde entkräftet werden kann. Bis zum 8. Monat sind alle ossären Defekte nahezu vollständig verknöchert. Vereinzelt zu beobachtende narbige Einziehungen an der Knochenoberfläche sind vermutlich durch die körperliche Unruhe einzelner Tiere bedingt. In den folgenden Abbildungen sind klinische Befunde auszugsweise nach unterschiedlicher Liegedauer dargestellt (Abb. 20 und 21). Weitere klinische Befunde sind dem Anhang zu entnehmen.

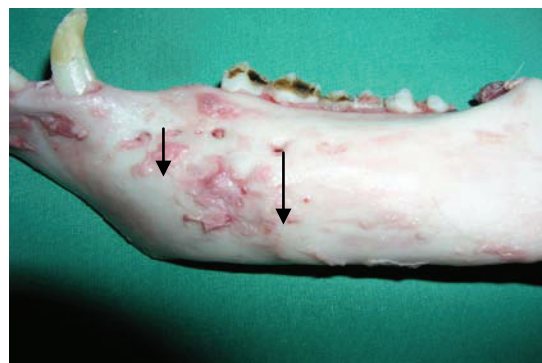
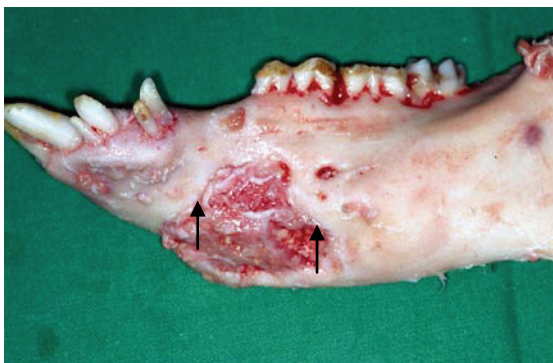


Abbildung 20 Befund 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® (O2). Pfeile markieren den makroskopisch erkennbaren Restdefekt. (linker Unterkiefer, bukkale Ansicht)

Abbildung 21 Befund 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® (T2); makroskopisch guter Knochendurchbau in der Defektregion. Pfeile markieren den Restdefekt. (linker Unterkiefer, bukkale Ansicht)

Da sich diese Versuchsreihe auf eine zweidimensionale Erfassung ausgewählter Parameter an Unterkieferquerschnitten stützt, sind die ermittelten Flächenanteile bezüglich der Defektgrößen in die histomorphometrische und statistische Auswertung eingegangen. Die Größen der ermittelten Ausgangsdefekte, d. h. zum Zeitpunkt der Applikation, weisen eine relativ hohe Schwankungsbreite auf, woraus hohe Standardabweichungen resultieren. In Tabelle 7 sind die klinisch ermittelten Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Ausgangsdefekte dargestellt. Angeschnittene Zahnkeime und eine anatomisch übergroße Ausdehnung des Mandibularkanals wurde von den protokollarisch ermittelten Defektgrößen subtrahiert. Schließlich führt die knöcherne Substitution der Defekte im Zuge des Remodelings zu einer Neuformation des Mandibularkanals und in der Tiefe liegende Zahnkeime nutzten die aufgelockerte Struktur des KAM, um an die Knochenoberfläche zu gelangen. Die Gruppenmittelwerte der Defektgrößen wiesen eine Schwankungsbreite von 182,4 mm² bis 234,6 mm² auf. Da die klinisch ermittelten Ausgangsdefektgrößen der Gruppen O und T (p=0,136) sich nicht signifikant unterscheiden (p=0,136), eignen sie sich gut für einen statistischen Gruppenvergleich.

Tabelle 7 Darstellung der klinisch ermittelten Defektgrößen

n	Versuchsgruppe	Minimum mm²	Maximum mm²	Mittelwert mm²	Standardabweichung
6	O	200,8	289,8	234,6	31,5
4	T	129,3	229,1	182,4	49,1
Asymptotische Signifikanz 0,136					

4.2. Röntgenologische Untersuchungsergebnisse

Röntgenaufnahmen lagen von allen Defektregionen des Unterkiefers postoperativ und unmittelbar nach der Tötung der Tiere vor. Abbildung 22 stellt eine postoperative Röntgenaufnahme eines Defektes im linken Unterkiefer bei einem Minaturschwein dar, in den Bio-Oss® implantiert wurde. In der Unterkieferlateralaufnahme sind die mesiale und distale Begrenzung des iatrogenen Defektes im Bereich des anterolateralen Unterkiefers abgrenzbar und durch Pfeile markiert. Innerhalb der Defektregion ist Bio-Oss® kaum röntgenkontrastgebend.

Beide Unterkieferhälften eines Tieres 5 Wochen post implantationem (p. i.) von Bio-Oss® sind in Abbildung 23 röntgenographisch dargestellt. Es handelt sich um Aufnahmen im seitlichen Strahlengang nach medianer Durchtrennung des Unterkiefers. Restaufhellungen im Sinne einer noch unvollständigen ossären Konsolidierung sind deutlich erkennbar, wobei das KAM Bio-Oss® nicht eindeutig differenzierbar ist. Der iatrogen gesetzte Knochendefekt ist nach 5 Wochen röntgenologisch noch abgrenzbar und homogen strukturiert.

Abbildung 24 ist ein gleichariges Röntgenogramm eines Miniaturschweines 8 Monate p. i. von Bio-Oss®. Die ehemaligen Defektregionen zeigen nur eine geringgradig erhöhte Radioluzenz, was für einen nahezu vollständigen ossären Durchbau spricht. Neu gebildete Knochenstrukturen zeichnen sich röntgenkontrastgebend ab. Die ehemalige Defektregion des Unterkiefers scheint vollständig ossär durchgebaut zu sein, woraus zu schlussfolgern ist, dass das Knochenremodeling mit Ausbildung des Mandibularkanal noch nicht abgeschlossen ist. Zudem zeigt sich 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® eine Knochenapposition an der basalen Unterkieferkortikalis. Zu diesem Zeitpunkt sind die Reste des KAM besser röntgenkontrastgebend und von neu gebildeten Knochen zumeist abgrenzbar.

Allerdings wird die Aussagekraft der röntgenologischen Befunde - insbesondere bei der Unterkieferlateralaufnahmetechnik - durch Überlagerungen durch andere Knochenstrukturen des Gesichtsschädels sowie durch in Einzelfällen in der Defektumgebung vorhandene Zahnkeime beeinträchtigt. Bezüglich der defektbezogenen Knochenneubildungsrate und des Biodegradationsverhaltens des KAM kann deshalb röntgenologisch nur eine orientierende Aussage gemacht werden. Eine quantitative Bewertung ist nicht möglich. Ergänzende röntgenologische Befunde sind im Anhang aufgeführt.

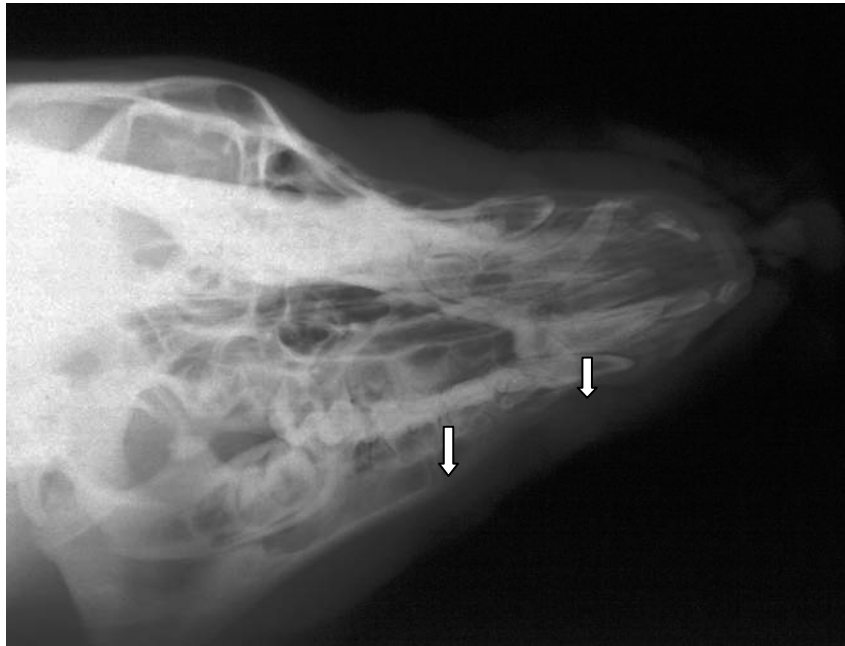


Abbildung 22 Postoperative Röntgenaufnahme (Lateraltechnik, linker Unterkiefer dargestellt) nach Bio-Oss®-Implantation (O2), Defektlänge mit Pfeilen markiert

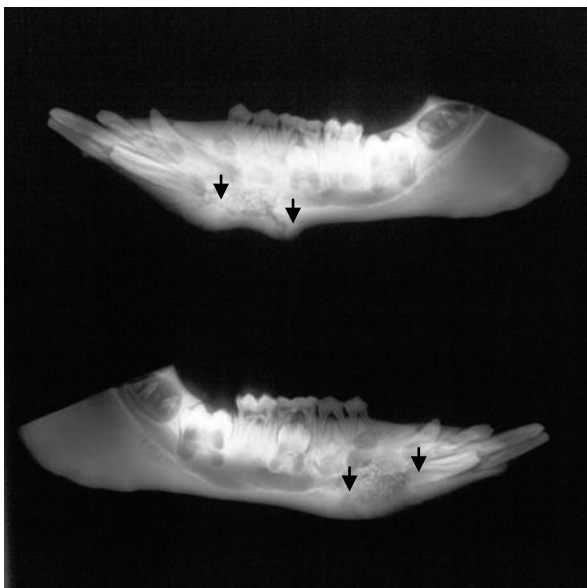


Abbildung 23 Röntgenaufnahme 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (O 3; UK geteilt, seitlicher Strahlengang)

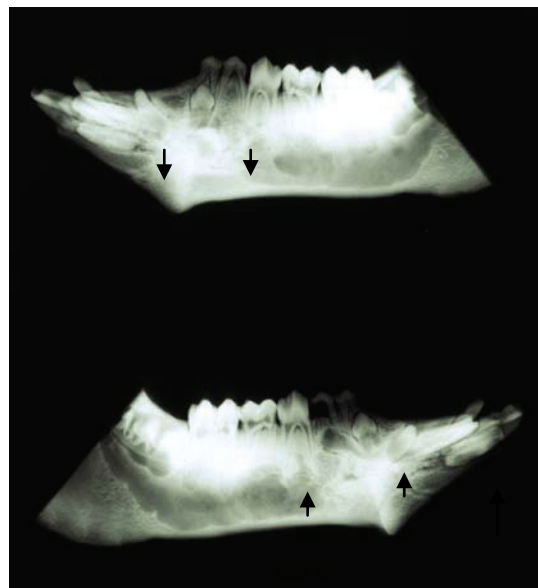


Abbildung 24 Röntgenaufnahme 8 Monaten nach Bio-Oss®-Implantation (T 1) UK geteilt, seitlicher Strahlengang)

4.3. Histologische Untersuchungsergebnisse

4.3.1. Qualitative Befunde

Zur qualitativen histologischen Untersuchung lagen jeweils 4-6 Giemsa-Toluidin gefärbte Trenn-Dünnschliff-Präparate sowie 15-20 entkalkte, HE gefärbte Präparate aus der Defektregion zur Auswertung vor. Histologische Bewertungskriterien waren Art und Ausmaß der Knochenneubildung, das Degradationsverhalten von Bio-Oss® sowie sein möglicher Ein- und Umbau im Rahmen des ossären Remodelings. Die Knochendefekte wurden unmittelbar nach der Defektsetzung mit anschließender Bio-Oss®-Implantation sowie 5 Wochen und 8 Monate p. i. detailliert beurteilt und die sich verändernden Gewebsstrukturen erfasst.

Generell waren die Giemsa-Toluidin-gefärbten Knochenschliffe etwas besser beurteilbar. In diesen Präparaten erscheinen die Partikel des KAM bovinen Ursprungs zentral hell bis lila, umgeben von einer dunkleren Randzone. In der Regel war 5 Wochen p. i. histologisch eine deutliche Restdefektbegrenzung möglich. Zu diesem Zeitpunkt waren die Bio-Oss®-Partikel in den Knochendefekten von kleinen Herden neu gebildeten Geflechtknochens umgeben. Dieser erscheint organoid und zeigt partiell eine beginnende Umwandlung in längliche lamelläre Knochenstrukturen, wobei die lamelläre Schichtung z. T. aufgehoben ist und die Osteozytenlakunen leer erscheinen, da sie kernlos sind. Dies weist auf Devitalität der Partikel hin, was offenbar eine Folge der Vorbehandlung des bovinen Knochens ist.

Einige Präparate zeigen sporadisch über die gesamte Defektregion verteilt Areale von Geflechtknochen, teils an der Oberfläche der KAM-Restpartikel, teils losgelöst von ihr in der Defektregion (Abb. 25). Ihr größter Teil weist keine Knochenneubildung auf. Im Abbau begriffene, residuelle Bio-Oss®-Partikel sind deutlich zu erkennen. Das histologische Bild in der Defektregion ist 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation in dieser Abbildung noch durch zellreiches Granulationsgewebe geprägt, das in eine bindegewebige Narbe übergeht. Einige kleine Knochenbälkchen weisen an ihrer Oberfläche noch Osteoblasten auf und signalisieren ein weiteres appositionelles Knochenwachstum; daneben finden sich aber auch Knochenbälkchen ohne Osteoblasten mit offensichtlich abgeschlossener Knochenregeneration.

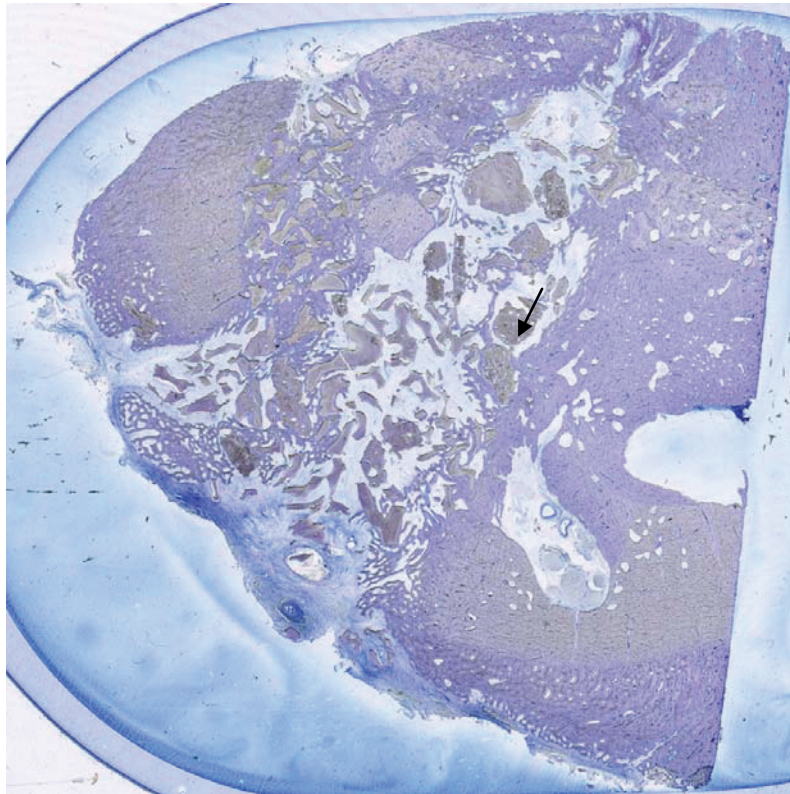


Abbildung 25 Übersicht: Querschnitt durch die Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O) mit neu gebildetem spongiösem Knochen und relativ breiter Kortikaliszone. Zahlreiche integrierte Bio-Oss®-Partikel (Pfeil) erkennbar; Ausgangsdefektgröße noch abgrenzbar, (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.:3x)

An der Oberfläche der KAM-Partikel lagern sich neu gebildete, partiell mineralisierte Knochenbälkchen teils mit und teils ohne trennende Grenzschicht ab. Letzte besteht aus einer unterschiedlich breiten Bindegewebsschicht. An vielen Stellen sieht man Phagozyten, ansonsten fallen in den Räumen zwischen den Bio-Oss®-Partikeln zahlreiche neu gebildete Gefäße sowie fibröses Gewebe auf. 5 Wochen p. i. findet sich in den Defektregionen wenig Knochengewebe; es handelt sich um die bereits erwähnten diskreten Knochenappositionen an der Oberfläche einzelner KAM-Partikel. Bindegewebige Strukturen durchsetzt mit herdförmigen entzündlichen Infiltraten überwiegen. (Abb. 26 und 27).

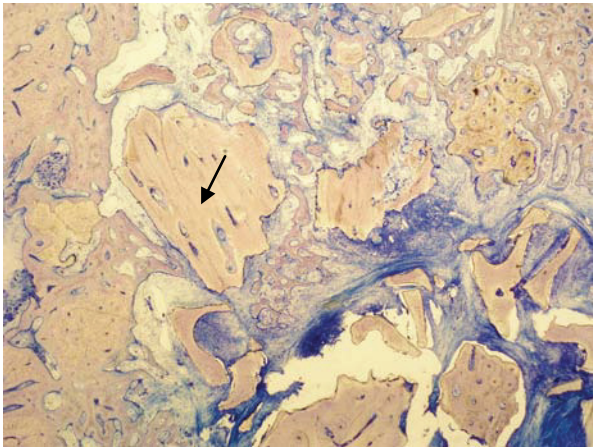


Abbildung 26 Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O). Knochenbälkchen formieren sich an der Oberfläche einzelner KAM-Partikel (Pfeil). (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.: 100 x)

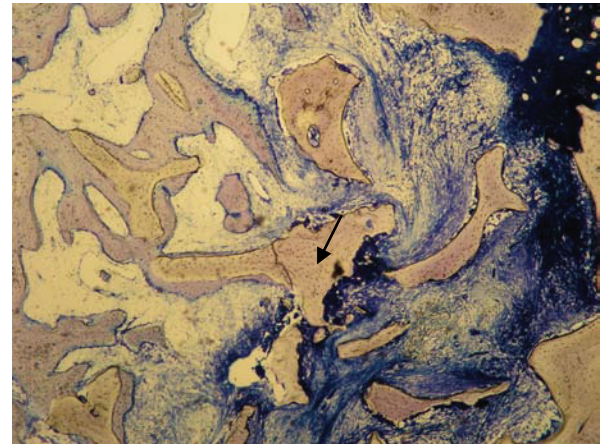


Abbildung 27 Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O) Biomaterial (Pfeil) eingebettet in entzündlich infiltriertes Bindegewebe. Der neu gebildete Knochen hat sich direkt meist ohne trennenden Bindegewebsaum an die KAM-Partikel angelagert. (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.: 160 x)

Mit zunehmender Verweildauer des KAM im Knochendefekt ist die Oberfläche der Bio-Oss®-Partikel mehr und mehr mit neu gebildetem Knochen umgeben. Später werden sie knöchern integriert, wie die Versuche nach 8-monatiger Liegedauer der Bio-Oss®-Implantate belegen (Abb. 28). Daneben finden sich bindegewebig eingeschlossene Biomaterialreste mit inflammatorischen Zellen, was - zumindest partiell - auf eine entzündliche Resorption des KAM schließen lässt. Der Mandibularkanal, der durch die Defektsetzung teilweise in Mitleidenschaft gezogen wurde, hat sich zu diesem Zeitpunkt im Rahmen des Knochenremodelings neu formiert.

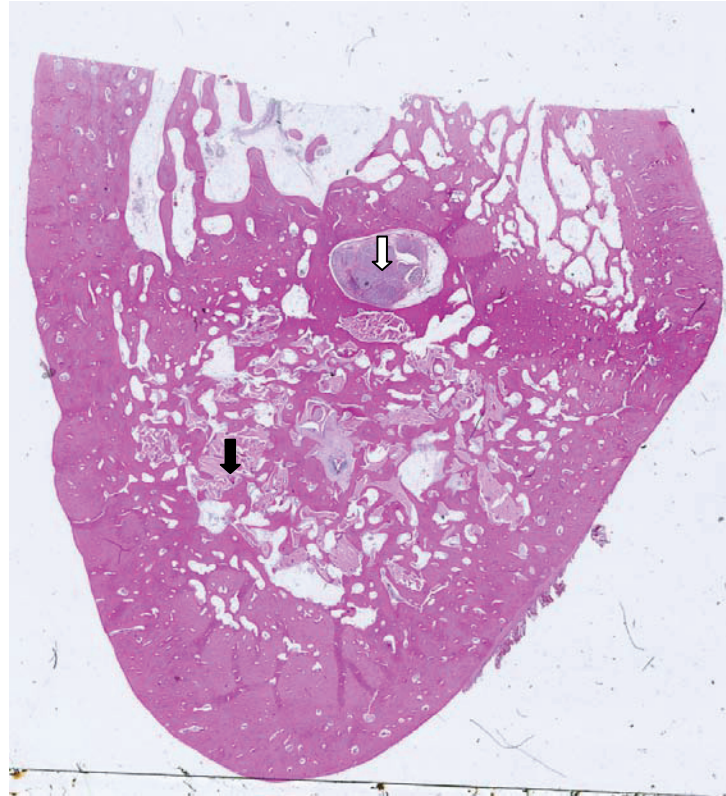


Abbildung 28 Übersicht: Querschnitt der Defektregion 8 Monate nach der Bio-Oss®-Implantation (Gruppe T): knöchern integrierte KAM-Partikel (Pfeil schwarz) und Neuformation des Mandibularkanals (Pfeil weiß) (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 3x)

Die Reossifikation der artifiziell gesetzten Knochendefekte erscheint 8 Monate p. i. gut und spiegelt die osteoprotektiven Eigenschaften des KAM wieder. Der enge Kontakt zwischen KAM-Partikeln und neu gebildeten Knochenbälkchen - z. T. im Sinne einer Verbundosteogenese - ist in der Abbildung 29 ersichtlich. Osteoklasten sind an der Oberfläche der Knochenbälkchen sichtbar. Osteoklastäre Resorptionshöhlen an den Bio-Oss®-Partikeln sind nur gelegentlich zu beobachten, so dass der Anteil des osteoklastären Abbaus des KAM im Rahmen des ossären Remodelings nicht eindeutig einzuschätzen ist. Teile des KAM verbleiben offenbar bindegewebig oder ossär eingeschlossen längere Zeit im Knochen, wie in Abbildung 30 dargestellt ist. Ihr weiterer Abbau durch Makrophagen ist möglich. Ihre sichere Differenzierung von Osteoblasten ist allerdings ausschließlich mittels histochemischer Verfahren möglich.

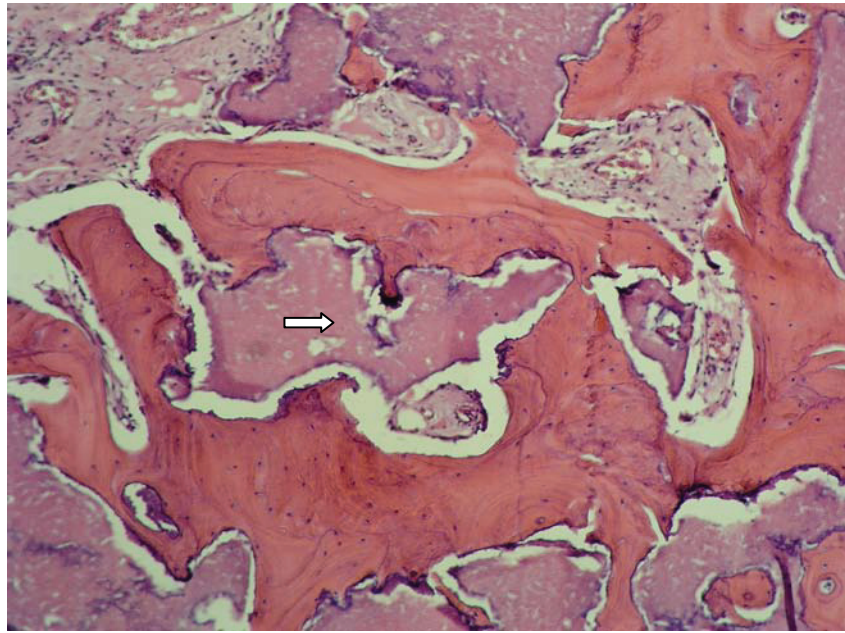


Abbildung 29 Gut osteointegrierte Bio-Oss®-Partikel(Pfeil) in spongiösen Knochen 8 Monate p. i., (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 80x)

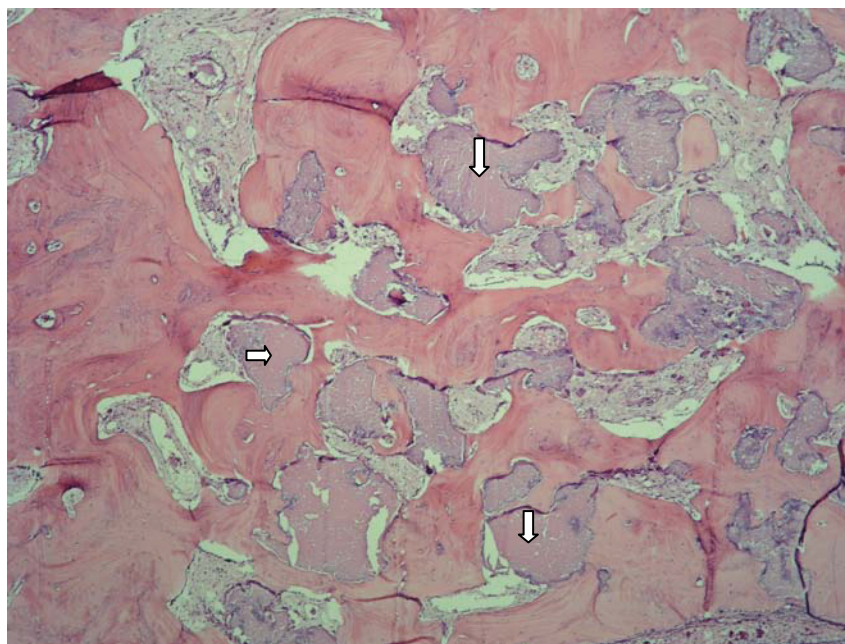


Abbildung 30 Ausschnitt mit gutem Reossifikationsgrad 8 Monate p. i.; Pfeile markieren Restpartikel (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 320x)

4.3.2. Semiquantitative histologische Ergebnisse

Die semiquantitative histologische Evaluierung dient der orientierenden quantitativen Einschätzung des Reossifikationsgrades der artifiziellen Knochendefekte sowie des Biodegradationsverhaltens von Bio-Oss®. Präparate mit Materialverlusten und Artefakten sowie Schnittstufen außerhalb der Defektregion wurden ausgesondert, so dass nur aussagekräftige Präparate zur Beurteilung gelangten. Die Kriterien Grad der Knochenneubildung, vorhandene Biomaterialanteile, Entzündungszeichen sowie Hinweise auf zentrale Verbundosteogenese wurden abgestuft graduiert, wobei **0** als kein Hinweis, **1** mit gering, **2** mit deutlich, **3** mit stark und **x** mit nicht auswertbar bewertet wurden (Einzelheiten s. Kap. 3.6.1). Für die Einzeldefekte wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen errechnet, darüber hinaus wurden die Gruppenmittelwerte ermittelt. Um einen Vergleich mit der noch vorzustellenden Histomorphometrie zu ermöglichen (s. Kap. 4.3.3.), wurde der prozentuale Anteil der Mittelwerte bezogen auf den Höchstwert 3,0 angegeben.

5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® betrug der Mittelwert der defektbezogenen Knochenneubildungsrate 1,6 (von 3,0), was etwa einem Prozentwert von 50,0% entspricht (Tab. 8). Der Mittelwert für Entzündungsreaktionen ergab einen Wert von 2,3 (76,7%) und der Anteil verbliebener Biomaterialanteile lag bei 2,3 (75%). Die Bio-Oss®-Partikel sind von neu gebildetem Knochen, Osteoid und Weichgewebe in unterschiedlicher Menge umgeben. Die histologische Auswertung macht deutlich, dass die Bio-Oss®-Partikel als Leitstruktur für die neu gebildete Knochenformation dienen. Verbundosteogenese bedeutet, dass sich Knochenbälkchen primär auf der Oberfläche der Bio-Oss®-Partikel bilden und beide sich miteinander verbinden, d. h. eine Osteointegration des KAM erfolgt. Dieser Befund wurde in der zentralen Defektregion mit dem Gruppenmittelwert von 1,0 (34%) bewertet. Die weiteren Einzelwerte 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation sind in Tabelle 8 detailliert zusammengestellt. Die Standardabweichungen aller Werte der Gruppenwerte waren < 1 , so dass eine ausreichende Relevanz der Befunde besteht.

Tabelle 8 *Semiquantitative histologische Untersuchung von Unterkieferdefekten kritischer Größe bei Miniaturschweinen- 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O)**

Mittelwerte 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss®				
Defekt (n=6)	Knochenbildung	Biomaterial	Entzündung	Zentrale Verbundosteogenese
O1 re	1,3	2,1	2,9	0,8
O1 li	1,2	2,8	2,6	0,8
O2 re	1,8	2,2	2,7	1,2
O2 li	1,3	2,0	2,5	0,3
O3 re	2,3	2,3	1,1	1,9
O3 li	1,5	2,1	2,0	1,1
Gruppenmittelwert	1,6	2,3	2,3	1,0
Standardabweichung	0,4	0,3	0,7	0,5

*Flächenbezogene Auswertung 0 = kein, 1 = gering, 2 = deutlich, 3 = stark, x = nicht auswertbar

8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® betrug der Gruppenmittelwert für die defektbezogene Knochenbildung 2,4, was einem defektbezogenen Anteil von 81% entspricht und mit „deutlich“ einzustufen ist (Tab. 9). Die Verbundosteogenese erreichte in dieser Gruppe (T) einen Mittelwert von 1,3 (43,3%). Der Anteil der Entzündungsreaktionen ist mit einem Wert von 0,9 (28,3%) als geringfügig einzuschätzen. KAM-Anteile erreichten einen Gruppenmittelwert von 1,0 (31,7%).

Die Standardabweichungen sind mit Ausnahme des Wertes für die Verbundosteogenese 8 Monate p. i. von Bio-Oss® < 1, d. h. die individuelle Schwankungsbreite ist sehr gering. Der etwas höhere Wert von 1,0 in einem Falle (T2li) kommt dadurch zustande, dass kein Biomaterial auffindbar war. Zudem war in dieser Gruppe durch Ausfälle von Versuchstieren die auswertbare Fallzahl auf 4 reduziert, so dass ein abweichender Einzelbefund die Standardabweichung stärker beeinflussen konnte.

Tabelle 9 *Semiquantitative histologische Untersuchung von Unterkieferdefekten kritischer Größe bei Miniaturschweinen- 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppe T)**

Mittelwerte 8 Monaten nach Implantation von Bio-Oss®				
Defekt (n=4)	Knochenbildung	Biomaterial	Entzündung	Zentrale Verbundosteogenese
T2 re	1,5	1,0	1,5	1,0
T2 li	2,6	0,0	1,5	0,0
T3 re	2,6	1,4	0,2	1,8
T3 li	3,0	1,4	0,2	2,4
Gruppenmittelwert	2,4	1,0	0,9	1,3
Standardabweichung	0,6	0,7	0,8	1,0

*Flächenbezogene Auswertung 0 = kein, 1 = gering, 2 = deutlich, 3 = stark, x = nicht auswertbar

Der semiquantitative histologische Gruppenvergleich ergibt, dass die Bio-Oss®-Partikel 8 Monate p. i. in einen Knochendefekt zu einem größeren Anteil in neu gebildeten Knochen eingeschlossen sind als nach 5 Wochen. Dieser Eindruck soll durch eine histomorphometrische Analyse an späterer Stelle genauer abgeklärt werden. Im Zeitraum von 5. Woche bis zum 8. Monat hat sich etwa 30% neuer Knochen zusätzlich gebildet (Tab. 10). Dieser neu gebildete Knochen besteht größtenteils aus bindegewebig präformiertem Geflechtknochen, welcher in der Lage ist, Defekte schnell zu überbrücken. Von der 5. Woche bis zum 8. Monat p. i. fällt der Anteil der Bio-Oss®-Partikel in den Defektregionen von 75% auf 31,7% (Mittelwerte) ab. Das stützt die These, dass Bio-Oss® einem kontinuierlichen, relativ langsam verlaufenden Biodegradationsprozess - so genanntes „creeping substitution“- unterliegt, was in der Fachliteratur jedoch widersprüchlich bewertet wird. Das Vorkommen von Entzündungszellen hielt sich in einem solchen Rahmen, dass keine nennenswerte Beeinflussung der Knochenneubildungsrate resultieren dürfte. Abbildung 31 veranschaulicht das zusätzlich graphisch.

Tabelle 10 *Semiquantitative histologische Befunde: Vergleich der Gruppenmittelwerte 5 Wochen (O) und 8 Monate (T) p. i. von Bio-Oss® in Knochendefekte kritischer Größe bei Miniaturschweinen **

Vergleich der semiquantitativen histologischen Parameter (Mittelwerte) für die Gruppen O und T				
Parameter	O		T	
	Mittelwerte	Standardabweichung	Mittelwerte	Standardabweichung
Knochenneubildung	1,6	0,4	2,4	0,6
Biomaterial	2,3	0,3	1,0	0,7
Entzündung	2,3	0,7	0,9	0,8
Zentrale Verbundosteogenese	1,0	0,5	1,3	1,0

*Flächenbezogene Auswertung 0 = kein, 1 = gering, 2 = deutlich, 3 = stark, x = nicht auswertbar

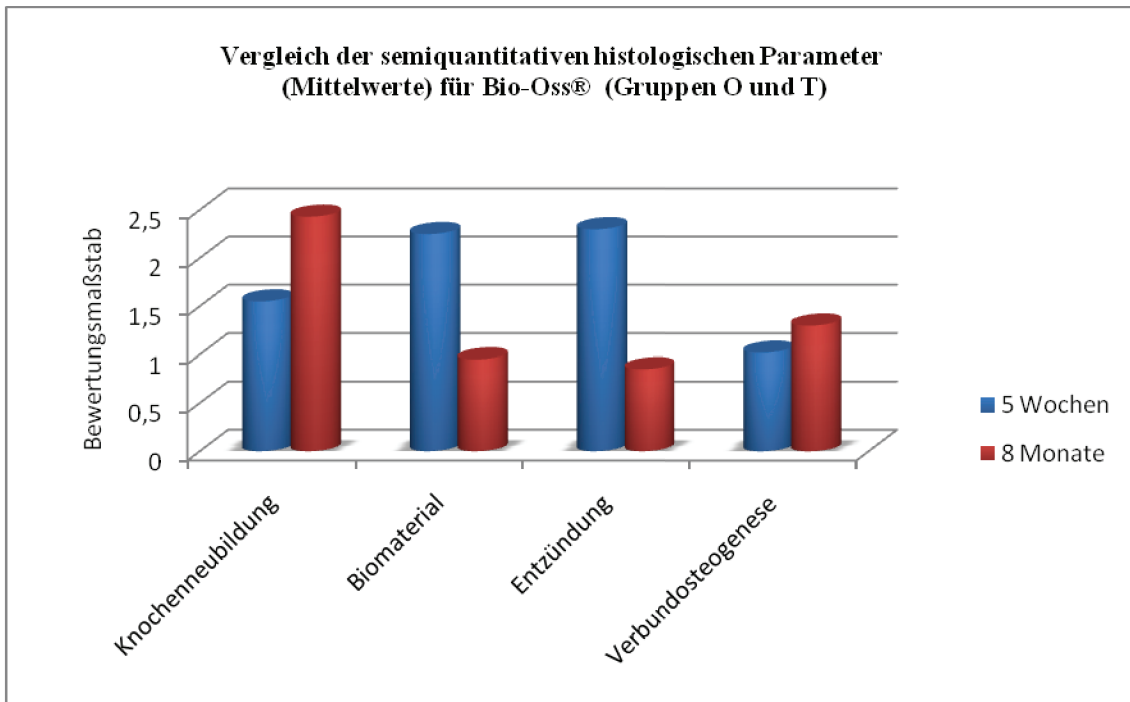


Abbildung 31 Graphische Darstellung: Gruppenvergleich der semiquantitativ histologisch ermittelten Einzelparameter aus Tabelle 10 (O: 5 Wochen; T: 8 Monate p. i. von Bio-Oss®)

Vergleicht man die semiquantitativ für Knochenneubildung, Biomaterialreste, Entzündung und zentraler Verbundosteogenese ermittelten Werte der Einzeltiere (Abb. 31 und 32) innerhalb der Defektgruppen miteinander, so sind deutlich Schwankungen von Tier zu Tier zu erkennen, was möglicherweise auf individuelle Unterschiede bezüglich Immunabwehr und Regenerationsverhalten der Tiere zurückgeht. Diese Variabilität zeigt sich insbesondere bei dem Parameter Entzündung; hier ist keine Regelmäßigkeit der Werte zu erkennen. Aus Abb. 33 ist ersichtlich, dass die Verweildauer der Bio-Oss®-Partikel in den Knochendefekten einen positiven Einfluss sowohl auf die defektbezogene Knochenneubildungsrate als auch auf die partikelbezogene Verbundosteogenese hat. 8 Monate p. i. des KAM werden Spitzenwerte der Ossifikation erreicht, die sich dem Maximalwert von 3 nähern. Mit diesen hohen Ossifikationsraten ist eine starke Verbundosteogenese in den Zentren der Knochendefekte korreliert. Der Anteil noch vorhandener Bio-Oss®-Partikel sinkt bezogen auf den Mittelwert von 2,3 nach 5 Wochen auf 1,0 nach 8 Monaten und deutet auf eine zeitlich fortschreitende Abnahme der KAM-Anteile durch Biodegradation hin. Die Gruppenmittelwerte für den Parameter Entzündung zeigen nach 8 Monaten eine große Streubreite auf (Abb. 33) was in der nachfolgenden histomorphometrischen Auswertung zu überprüfen gilt

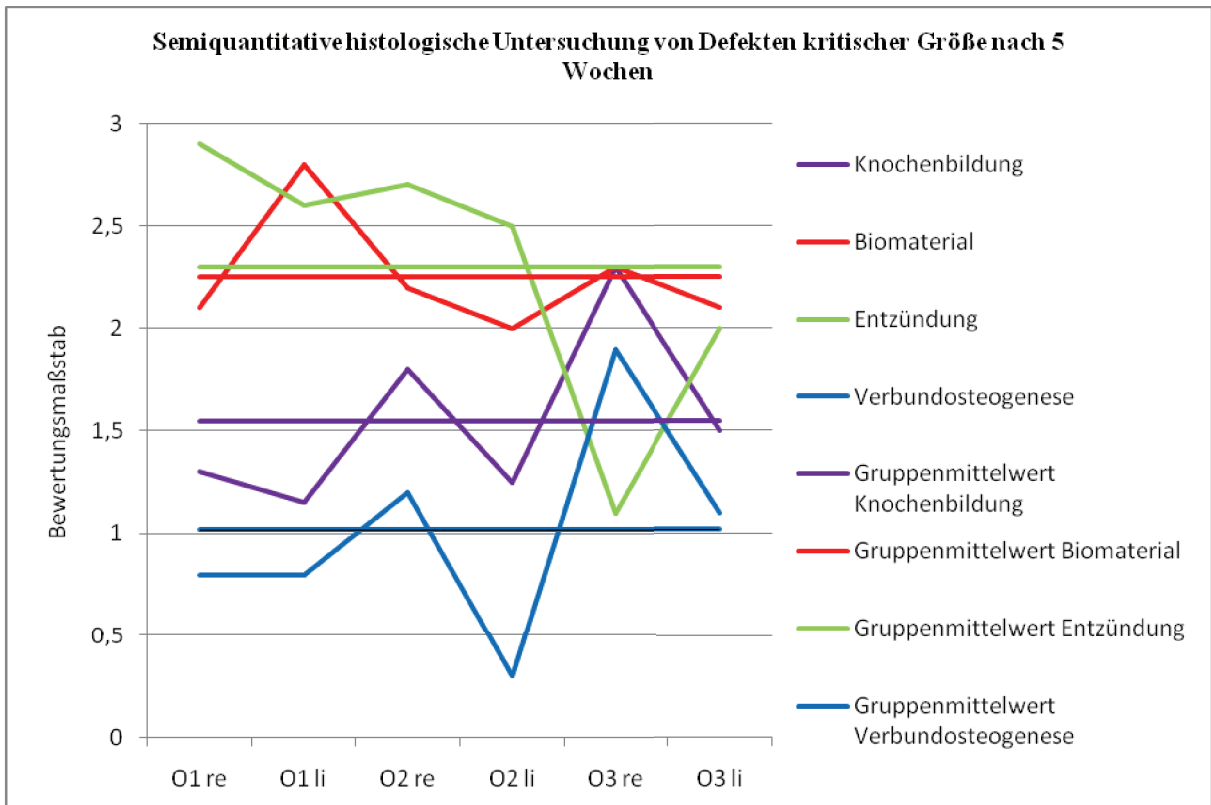


Abbildung 32 Graphische Darstellung: Einzelparameter aller Knochendefekte (Mittelwerte) 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O)

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der vergleichenden Evaluierung aller Parameter sowohl nach 5 Wochen als auch nach 8 Monaten Verweildauer des KAM in den Knochendefekten kritischer Größe, Werte verschiedener Tiere miteinander verglichen werden. Somit sind die Differenzen der ermittelten Mittelwerte nicht allein vom Zeitpunkt der Implantation des KAM abhängig, sondern auch von den individuellen Heilungsbedingungen und Abwehrmechanismen.

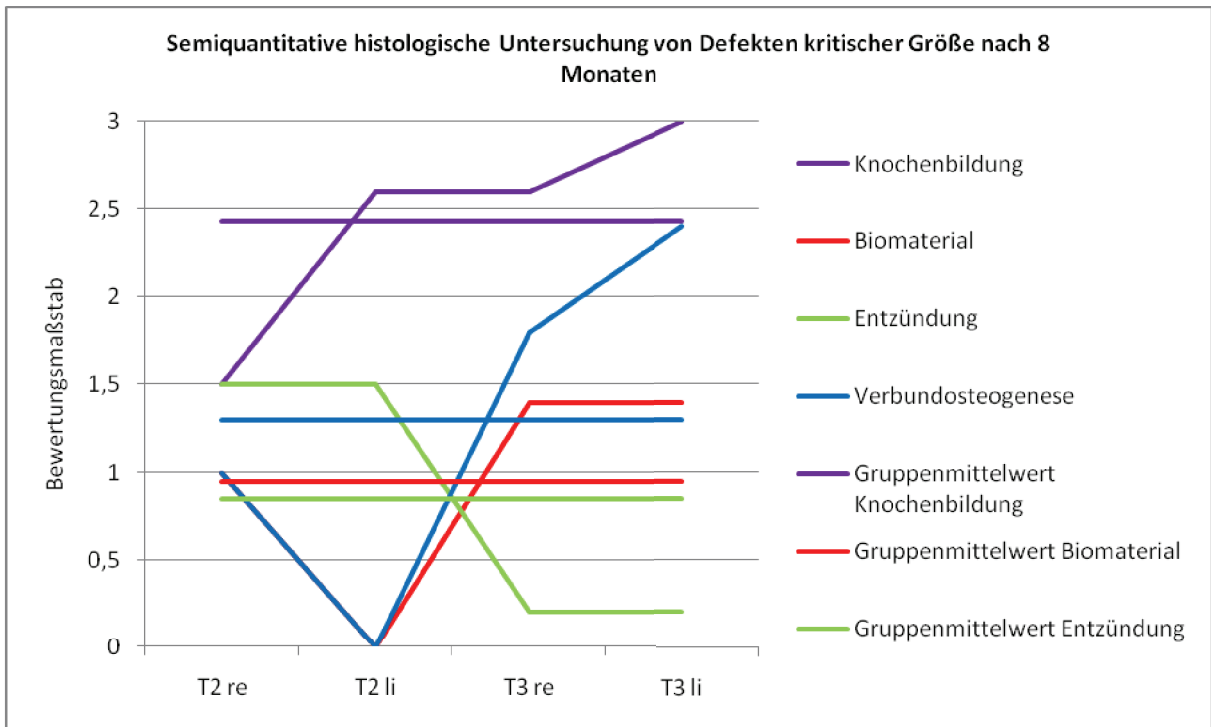


Abbildung 33 Graphische Darstellung: Einzelparameter für jeden Knochendefekt (Mittelwerte) 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® (Gruppe T)

Da die semiquantitative histologische Auswertung mit einer groben Orientierung in 3 Intensitätsgrade nicht frei von subjektiven Einflüssen ist, kann sie nur quantitative Trends aufzeigen. Eine exakte Quantifizierung erlaubt ausschließlich die histomorphometrische Analyse.

4.3.3. Histomorphometrische Befunde

Histomorphometrisch ausgewertet wurden 5 ausgewählte feingewebliche Schnitte pro Knochendefekt. Somit stand das Material von 6 Defekten (drei Tieren) mit insgesamt 30 ausgewählten histologischen Präparaten 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) zur Verfügung. 8 Monate p. i. (Gruppe T) waren es wegen des Verlustes eines Tieres lediglich 20 Präparate von 4 Defekten (zwei Tieren). Histomorphometrisch wurden die Flächen der Unterkieferquerschnitte ermittelt, wobei initial Mittelwerte pro Tier und letztlich Mittelwerte pro Versuchsgruppe ermittelt wurden, die vom Datenverarbeitungsprogramm tabellarisch und graphisch ausgegeben werden konnten.

In Tabelle 11 sind die klinisch ermittelten Querschnittsflächen der Ausgangsdefekte dargestellt. Diese Werte mussten zugrunde gelegt werden, da eine retrospektive histomorphometrische Ermittlung der Ausgangsdefektgrößen durch die zwischenzeitlich eingetretene partielle bzw. subtotale Reossifikation der Defekte nicht möglich war. Es fällt die erhebliche Schwankungsbreite der Messwerte auf, da von intraoperativ ermittelten Werten teilweise Flächen mit Artefakten (z. B. Querschnitte von Defekte tangierenden Zahnkeimen) subtrahiert werden mussten. Hinzu kommen Variabilitäten bei der histologischen Schnittstufung sowie biologische Variabilitäten der Tiere. So lagen die ermittelten Querschnittsflächen der Ausgangsdefekte kritischer Größe zwischen minimal 129,3 mm² bei einem Tier der Gruppe T und maximal 289,8 mm² bei einem Tier der Gruppe O.

Tabelle 11 Klinisch ermittelte Querschnittsflächen der Ausgangsdefekte 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)

	Ausgangsdefekt		Ausgangsdefekt	
	5 Wochen	mm ²	8 Monate	mm ²
Bio-Oss®	O 1 li	289,8		
	O 1 re	231,9		
	O 2 li	219,7	T 2 li	218,7
	O 2 re	200,8	T 2 re	229,1
	O 3 li	249,3	T 3 li	129,3
	O 3 re	216,2	T 3 re	152,3
	Mittelwert	234,6	Mittelwert	182,4
	Standardabweichung	31,5	Standardabweichung	49,1

Aufschluß über das Reossifikationsverhalten des Knochens nach KAM-Implantation gibt eine vergleichende Beurteilung der Knochendefektquerschnittsflächen der Ausgangsdefekte mit residuellen Knochendefekten 5 Wochen resp. 8 Monate p. i.. Letztere ergaben sich aus

der Summe der histomorphometrisch ermittelten Parameter KAM-Reste, Bindegewebesanteile, erweiterte Markräume, Vakanzen und Artefakte. Tabelle 12 weist aus, dass sich die Defekte querschnittbezogen 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) etwa auf ca. 1/3 der Ausgangsdefektfläche verkleinert haben (Gruppenmittelwert 31,7%). 8 Monate p. i. (Gruppe T) ist eine Verkleinerung auf 1/6 des Ausgangswertes erfolgt (Gruppenmittelwert 17,8%), was Ausdruck einer weitgehenden Reossifikation der Knochendefekte sowie einer bereits fortgeschrittenen Biodegradation des KAM ist. Während in der Gruppe O eine moderate Standardabweichung vorliegt (2,7%) ist diese in der Gruppe T relativ hoch (9,5%), was auf einen stark abweichenden Wert bei Tier 2 links (6,4%) zurückzuführen ist, den man statistisch betrachtet, als „Ausreißer“ bezeichnen könnte.

Nicht nur in den ersten 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® sondern auch im weiteren Verlauf bis zu 8 Monaten hat eine deutliche Defektverkleinerung stattgefunden, wobei die auf Ausgangsdefekte bezogene Differenz der Defektquerschnittsflächen sich um ca. 1/8 (13,9%) weiter verkleinerte. Diese Differenz ist unter Berücksichtigung der hohen Standardabweichung in Gruppe T statistisch signifikant ($p = 0,011$).

Tabelle 12 *Histomorphometrisch ermittelte Querschnittsflächen der Restdefekte 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)*

	Restdefekt		Restdefekt		Restdefekt	
	5 Wochen	mm ²	%	8 Monate	mm ²	%
Bio-Oss®	O 1li	85,3	29,6			
	O 1 re	72,8	31,5			
	O 2 li	76,3	34,7	T2 li	14,3	6,4
	O 2 re	57,9	29,1	T2 re	33,6	14,1
	O 3 li	87,4	35,3	T3 li	35,9	28,1
	O 3 re	66,0	29,9	T3 re	31,3	22,4
	Mittelwert	74,3	31,7	Mittelwert	28,8	17,8
	Standardabweichung	11,3	2,7	Standardabweichung	9,8	9,5

In Tabelle 13 sind die histomorphometrisch ermittelten Werte noch vorhandener KAM-Anteile flächenbezogen dargestellt. Nach 5 Wochen sind 6,8% (Gruppe O) und nach 8 Monaten (Gruppe T) lediglich 3,4% Bio-Oss® nachweisbar. In der Gruppe O sind die ermittelten Werte für die Einzeldefekte relativ gleichmäßig verteilt, während in der Gruppe T die Einzelwerte stärker voneinander abweichen, woraus eine relativ hohe Standardabweichung (2,2%) bezogen auf den Gruppenmittelwert (3,4%) resultiert.

Vergleicht man die Werte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von Bio-Oss® ergibt sich in diesem Zeitraum histomorphometrisch eine flächenmäßige Verkleinerung der

Biomaterialanteile um ca. die Hälfte (von 6,8% auf 3,4%). Diese Differenz erweist sich trotz hoher Standardabweichungen in Gruppe T statistisch als signifikant ($p=0,011$). Bei der später flächenbezogen zu ermittelnden Knochenneubildungsrate (Tab. 15) wird zu beurteilen sein, ob die Biodegradation zeitlich angepasst erfolgt, da nur dann eine optimale Reossifikation der Knochendefekte gewährleistet ist.

Anzumerken ist, dass bei der histologischen Aufbereitung der Präparate eine Schrumpfung der KAM-Partikel eintritt und aus diesem Grund Anteile von Bio-Oss® herausgelöst sein können, so dass die Ergebnisse nicht unbedingt exakt den wirklichen Gegebenheiten entsprechen. Zudem unterliegt die KAM-Biodegradation auch individuellen Kriterien, was insbesondere beim Vergleich der an unterschiedlichen Tieren durchgeführten Langzeit- und Kurzzeit-*In-vivo*-Testungen zu berücksichtigen ist.

Tabelle 13 *Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile von Bio-Oss®-Anteilen 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)*

	Biomaterial		Biomaterial		Biomaterial	
	5 Wochen	mm ²	%	8 Monate	mm ²	%
Bio-Oss®	O 1 li	19,3	6,8			
	O 1 re	14,6	6,4			
	O 2 li	11,8	5,3	T 2 li	10,1	4,4
	O 2 re	11,2	5,6	T 2 re	9,7	4,1
	O 3 li	17,4	7,0	T 3 li	6,3	4,8
	O 3 re	21,5	9,7	T 3 re	0,2	0,1
	Mittelwert	16,0	6,8	Mittelwert	6,6	3,4
	Standardabweichung	4,2	1,6	Standardabweichung	4,6	2,2

Auch das Vorhandensein von sich differenzierendem Bindegewebe in den Defektregionen wurde histomorphometrisch quantifiziert. Es ist als Vorstufe der Geflechtknochenbildung zu werten. Tabelle 14 gibt die dabei ermittelten Werte wieder. 5 Wochen nach KAM-Implantation konnte ein Anteil von 20,7% (Gruppe O, Mittelwert) differenziertem Bindegewebe detektiert werden; 8 Monate p. i. war es noch ein relativ hoher Anteil von 12,4% (Gruppe T, Mittelwert). Somit hatten die flächenbezogen ermittelten Werte residueller Bindegewebsanteile im Defektquerschnitt von der 5. Woche bis zum 8. Monat p. i. von Bio-Oss® lediglich von ca. 1/5 der Fläche auf ca. 1/8 der Fläche reduziert. Diese relativ geringe Differenz ist statistisch nicht signifikant ($p>0,05$).

Tabelle 14 *Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile von Bindegewebs-Anteilen 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)*

	Bindegewebe		8 Monate	Bindegewebe		
	5 Wochen	Bindegewebe mm ²		Bindegewebe %	Bindegewebe mm ²	Bindegewebe %
Bio-Oss®	O 1 li	55,7	19,3			
	O 1 re	47,6	20,7			
	O 2 li	50,4	22,9	T2 li	2,0	1,0
	O 2 re	35,5	17,6	T2 re	16,1	6,8
	O 3 li	62,6	25,2	T3 li	27,0	21,2
	O 3 re	40,5	18,4	T3 re	28,6	20,8
	Mittelwert	48,7	20,7	Mittelwert	18,4	12,4
	Standardabweichung	9,9	2,9	Standardabweichung	12,3	10,2

Tabelle 15 zeigt defektbezogen die ermittelten Flächenanteile neu gebildeten Knochengewebes 5 Wochen bzw. 8 Monate nach KAM-Implantation, die sich durch Subtraktion der Flächen der Restdefekte von denen der Ausgangsdefekte ergeben. Von der 5. Woche bis zum 8. Monat p. i. steigt die Knochenneubildungsrate von 68,3% auf 82,3% an (Mittelwerte Gruppe O bzw. Gruppe T). Das bedeutet, dass bereits nach 5 Wochen ca. 2/3 des Defektquerschnittes durch ein Knochenregenerat ausgefüllt ist; nach 8 Monaten erhöht sich dieser Anteil auf 4/5 des Defektquerschnittes. Diese Differenz ist statistisch signifikant ($p=0,011$). Während die Standardabweichung der Werte der Gruppe O gering ist (2,7%), ist die der Gruppe T infolge stärkerer Streuung der Einzelwerte deutlich höher (9,5%).

Tabelle 15 *Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile neu gebildeten Knochengewebes 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®- Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)*

	Knochen		8 Monate	Knochen		
	5 Wochen	Knochen mm ²		Knochen %	Knochen mm ²	Knochen %
Bio-Oss®	O 1 li	204,6	70,5			
	O 1 re	159,2	68,5			
	O 2 li	143,4	65,3	T2 li	204,3	93,6
	O 2 re	142,9	70,9	T2 re	195,5	85,9
	O 3 li	161,9	64,7	T3 li	93,4	71,9
	O 3 re	150,2	70,1	T3 re	121,0	77,6
	Mittelwert	160,4	68,3	Mittelwert	153,6	82,3
	Standardabweichung	23,0	2,7	Standardabweichung	54,8	9,5

Die ergänzende graphische Darstellung der histomorphometrischen Daten lässt erkennen (Abb. 34), dass mit zunehmender Verweildauer von Bio-Oss® der Grad der knöchernen Defektkonsolidierung zunimmt, wobei der KAM-Anteil sich allmählich durch Biodegradation verringert.

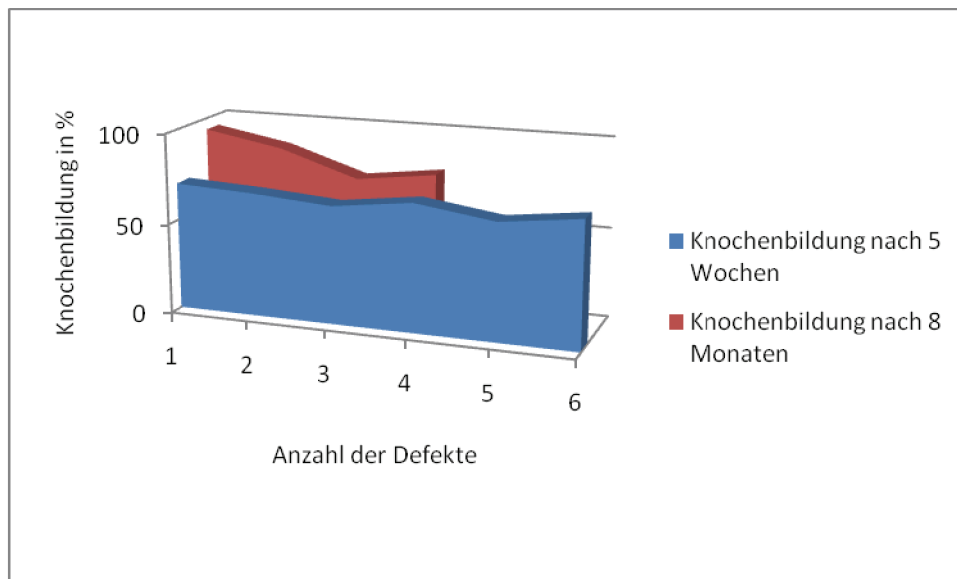


Abbildung 34 Histomorphometrischer Vergleich der flächenbezogenen Knochenbildung innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppenmittelwerte, Angabe in %)

Die histomorphometrisch flächenbezogen ermittelten Werte für erweiterte Markräume sind sowohl 5 Wochen als auch 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation mit 0% bzw. 0,4% (Gruppe O bzw. T) vernachlässigbar gering (Tab.16), was dafür spricht, dass Bio-Oss® ein KAM ist, welches eine zügige Defektüberbrückung gewährleistet, ohne dass ossäre „Regenerationslücken“ entstehen. Da es jedoch KAM gibt, bei denen die Biodegradation unangepaßt verläuft - speziell bei einer zu frühzeitigen Biodegradation bzw. Resorption - ist dieser Parameter ein nicht unwesentlicher quantifizierbarer histologischer Befund.

Tabelle 16 Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile der erweiterten Markräume 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)

	erweiterte Markräume		erweiterte Markräume		erweiterte Markräume	
	5 Wochen	mm ²	%	8 Monate	mm ²	%
Bio-Oss®	O 1 li	0,0	0,0			
	O 1 re	0,0	0,0			
	O 2 li	0,0	0,0	T 2 li	0,0	0,0
	O 2 re	0,0	0,0	T 2 re	3,2	1,4
	O 3 li	0,0	0,0	T 3 li	0,0	0,0
	O 3 re	0,0	0,0	T 3 re	0,0	0,0
	Mittelwert	0,0	0,0	Mittelwert	0,8	0,4
	Standardabweichung	0,0	0,0	Standardabweichung	1,6	0,7

Die angeführten Befunde bestätigen, dass die Histomorphometrie eine aussagekräftige Methode zur quantitativen Auswertung der histologischen Untersuchungsergebnisse ist. Durch zusätzliche Bearbeitung der digitalisierten Histofotogramme mittels der Software

Adobe Photoshop wurden durch eine differente Farbgebung unterschiedliche feingewebliche Kompartimente erzielt, die eine automatische qualitative Erfassung der Flächeneinheiten im Defektquerschnitt ermöglichte. Diese bezog sich insbesondere auf die für die Untersuchung wesentlichen Parameter Defektverkleinerung, Knochenneubildung und Biodegradation des zu testenden KAM. Es mussten folgende Handycaps in Kauf genommen werden, welche die histomorphometrischen Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben: Bei der Berechnung der Querschnittsflächen der Ausgangsdefekte wurde auf - im Vergleich zur Histomorphometrie weniger genaue - klinisch ermittelte Parameter zurückgegriffen, da eine retrospektive histomorphometrische Rekonstruktion aufgrund fortgeschrittener Ossifikation der Defekte nicht möglich war. Hohe Standardabweichungen bei einzelnen Parametern waren durch anatomische Variabilitäten bei den Tieren sowie geringe Abweichungen bei den standardisierten Defektsetzungen und bei der normierten histologischen Aufarbeitung der Untersuchungsmaterials bedingt.

Grundsätzlich war nach Implantation von Bio-Oss® in artifizielle Unterkieferdefekte kritischer Größe zunächst eine vorwiegend randständige Knochenapposition nachweisbar, wie es die histologischen Befunde 5 Wochen p. i. belegen. Die marginale Ossifikation war jedoch zum gleichen Zeitpunkt deutlich stärker ausgeprägt als in der von KRATZKE (2003) untersuchten Kontrollgruppe ohne KAM-Implantation. Danach beginnen auch im Zentrum der Knochendefekte herdförmige Knochenneubildungen, die insbesondere in unmittelbarer Umgebung der KAM-Partikel lokalisiert sind und bis zum 8. Monat p. i. an Intensität zunehmen. Partiiell handelt es sich um eine Verbundosteogenese, was auf eine osteoprotektive Wirkung von Bio-Oss® hindeutet. Die Unterkiefer der Kontrolltiere ohne KAM-Implantation wiesen dagegen nach 8 Monaten infolge mangelnder zentraler Ossifikation Restdefekte auf, wobei die verbliebenen Defekte etwa die Hälfte der ursprünglichen Defektgröße ausmachten (SCHIE 2007).

5. Diskussion

5.1. **Vergleichende Erörterung der klinischen und röntgenologischen Ergebnisse**

Die Ergebnisse einer Testung des KAM Bio-Oss® an artifiziellen Unterkieferdefekten kritischer Größe bei Göttinger Miniaturschweinen nach kurzer (5 Wochen) und langer Implantationsdauer (8 Monate) sollten anhand von klinischen, röntgenologischen und histologischen Untersuchungen vergleichend erörtert werden, wobei ergänzend histomorphometrische und histochemische Verfahren herangezogen wurden. Das Ziel dieser *In-vivo*-Studie war es, das Reossifikationsverhalten in den Defektregionen sowie die Osteointegration und Biodegradation von Bio-Oss® mittels differenter Untersuchungsmethoden qualitativ und quantitativ zu erfassen, da nur die Synopse der oben angeführten Befunde ein reales Bild vermitteln kann. Schließlich wurden die gewonnenen Ergebnisse mit korrespondierenden Befunden zweier innovativer KAM, NanoBone® und Ostim®, die am gleichen Tiermodell erzielt wurden, vergleichend diskutiert. Diese Befunde wurden im Rahmen der interdisziplinären Forschungsgruppe „Knochenregeneration“ an der Universität Rostock von ALBRECHT (2008) und SCHNEIDER (2009) erarbeitet.

Dabei stellte sich die Frage der Übertragbarkeit der gewonnenen tierexperimentellen Befunde auf die Verhältnisse beim Menschen. Hier gilt das Schwein - ein Wirbeltier mit nur geringer phylogenetischer Distanz zum Menschen sowie omnivorem Kautyp - als günstig, wobei trotzdem eine Zurückhaltung bei der Interpretation der Befunde geboten erscheint – insbesondere so lange keine Bestätigung bei einer zweiten geeigneten Tierspezies vorliegt. Eine orientierende Beurteilung der Vor- und Nachteile der getesteten KAM ist jedoch möglich, wobei die aus ethischen Gründen mit begrenzter Tieranzahl durchgeführten Untersuchungen in allen Fällen eine statistische Absicherung erlauben.

Lediglich autogene transplantierte Spongiosa, der so genannte Goldstandard, ist osteogen wirksam, da sie lebende Knochenzellen enthält, die teilweise über einen längeren Zeitraum proliferationsfähig bleiben und eine Osteogenese induzieren. Bei der Übertragung autogener Kompakta kommt jedoch praktisch keine osteogene Wirkung zustande, da nahezu alle ossären Zellelemente wegen ungenügender Gefäßversorgung absterben. Heterologe resp. xenogene KEM enthalten Knochenzellen, die durch Konservierung oder andersartige Vorbehandlung ihre knochenbildende Potenz verloren haben. Autogene Transplantate sind anderen Knochen- und Implantaten einschließlich KAM überlegen, da sie selbst bei ungünstigen Heilungsbedingungen im ersatzschwachen Lager einsetzbar sind. Herkömmliche KEM können nur indirekt die Knochenneubildung

begünstigen, indem sie osteokonduktiv wirksam sind; d. h. Leitstrukturen für die Knochenregeneration bilden, die anschließend partiell biodegradiert und in das Knochenregenerat eingebaut werden. Moderne KAM, zu denen neben Bio-Oss®, Ostim® und NanoBone® gehören, sollen angepasst möglichst vollständig biodegradiert werden und eine osseoprotektive Wirkung entfalten, was zu überprüfen war.

Die klinische Beurteilung diente lediglich der orientierenden Einschätzung der ossären Regeneration in den Defektregionen, da sie aufgrund der Erfassungsmodalität der Daten eine geringere Genauigkeit als die sich anschließende histologische und morphometrische Analyse aufwies. Nachfolgend werden die charakteristischen klinischen Befunde je eines Tieres pro Versuchsgruppe mit Abbildungen unterlegt dargestellt (Abb. 35-40). Während sich 5 Wochen post implantationem (p. i.) von Bio-Oss® noch eine geringgradige Muldenbildung im Kortikalisbereich mit klinischen Methoden erfassen ließ (Abb. 35), war dies 8 Monate nach Applikation dieses KAM bei vollständig konsolidierten Knochendefekten nicht mehr möglich (Abb. 36). Gleichartige Tierversuche mit den KAM Ostim® und NanoBone® an der Mandibula von Göttinger Miniaturschweinen ergaben nur geringfügig abweichende klinische Befunde. Der Ossifikationsprozess in den Defektregionen erschien klinisch 5 Wochen nach KAM-Implantation bei Einsatz von NanoBone® geringfügig besser als bei Verwendung von Bio-Oss® (Abb. 37). 5 Wochen nach Ostim®-Implantation war die kortikale muldenartige Einziehung in der Defektregion am stärksten (Abb. 39). 8 Monate nach Implantation von NanoBone® deutete sich - wie bei Verwendung von Bio-Oss® - klinisch eine vollständige Reossifikation der Unterkieferdefekte an (Abb. 36, Abb. 38). Bei Verwendung von Ostim® war das klinische Ergebnis etwas ungünstiger, da 8 Monate p. i. noch eine geringe muldenförmige Einziehung der vestibulären Kortikalis nachweisbar war (Abb. 40).

Im Gegensatz zu einer von KRATZKE (2003) untersuchten, nicht mit KAM-versorgten Kontrollgruppe konnte in allen Versuchsgruppen 5 Wochen p. i. klinisch eine deutliche Defektverkleinerung festgestellt werden. Als kritisch zu beurteilen ist, dass die Zahl der untersuchten Knochendefekte in der Kontrollgruppe bei identischer Versuchsdurchführung geringer war und die histomorphometrische Auswertung methodisch abweichend erfolgte.



Abbildung 35 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Tier O3)



Abbildung 36 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Tier T1)

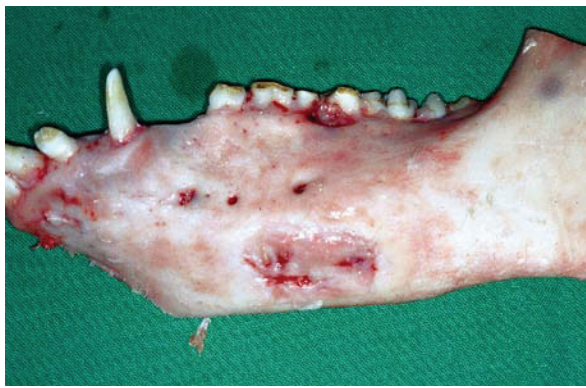


Abbildung 37 5 Wochen p. i. von NanoBone® (Tier P1)



Abbildung 38 8 Monate p. i. von NanoBone® (Tier S1)



Abbildung 39 5 Wochen p. i. von Ostim® (Tier N2)



Abbildung 40 8 Monate p. i. von Ostim® (Tier R2)

Abbildung 35-40: Klinische Befunde bei Göttinger Miniaturschweinen - Unterkieferdefekte kritischer Größe nach Implantation verschiedener KAM

Die röntgenologischen Untersuchungen erlaubten keine exakt quantifizierbaren Rückschlüsse auf den Ossifikationsgrad der artifiziiellen Unterkieferdefekte nach Implantation von Bio-Oss®, da das KAM aufgrund ähnlicher Radioluzenz wie natürlicher Knochen von diesem kaum zu differenzieren war. Dies gilt in Sonderheit für die Befunde 5 Wochen nach Defektsetzung (Abb. 41), während 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation röntgenologisch sich ein knöcherner Durchbau abzeichnete, ohne dass KAM-Anteile eindeutig auszumachen waren (Abb. 42).

Röntgenologisch stellten sich nach 5-wöchiger Implantationszeit sowohl bei Ostim® als auch bei NanoBone® Restdefekte dar. In den Versuchsgruppen mit Ostim® zeigten sich in der Defektregion keine KAM-Anteile (Abb. 43), wobei die Kontrastgebung bei den mit NanoBone® gefüllten Defekten nach 5 Wochen deutlich stärker war (Abb.45). Besonders bei Ostim® ließen transluzente inhomogene Zonen in der ehemaligen Defektregion noch nach 8 Monaten auf vorhandene Hohlräume schließen (Abb. 44). Die kortikalen Defektbereiche erschienen röntgenologisch bei beiden Versuchsgruppen gut knöchern durchbaut. Die Homogenität des Röntgenbefundes 8 Monate nach Implantation von NanoBone® deutete auf eine gute Reossifikation hin (Abb. 46).

Somit ließen die ergänzenden Röntgenuntersuchungen der Defektregionen sowohl 5 Wochen als auch 8 Monate p. i. – ähnlich wie die orientierenden klinischen Untersuchungen – kaum differenzierbare Gruppenunterschiede erkennen.

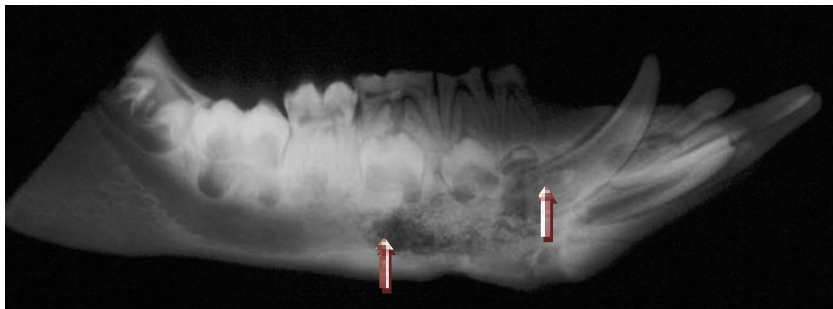


Abbildung 41 *Bio-Oss®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i.(Gruppe O)*

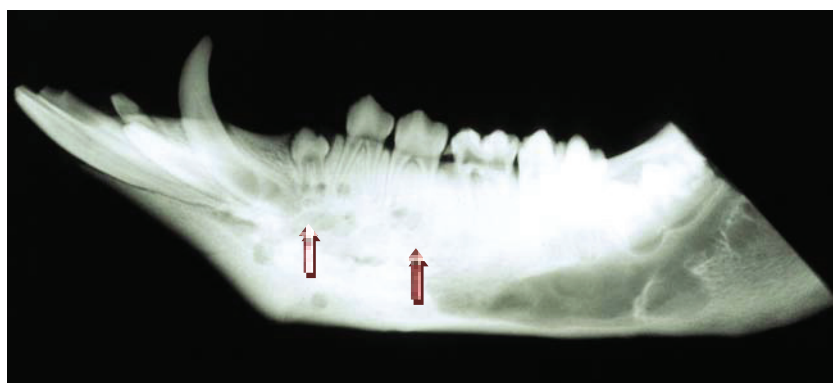


Abbildung 42 *Bio-Oss®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i.(Gruppe T)*

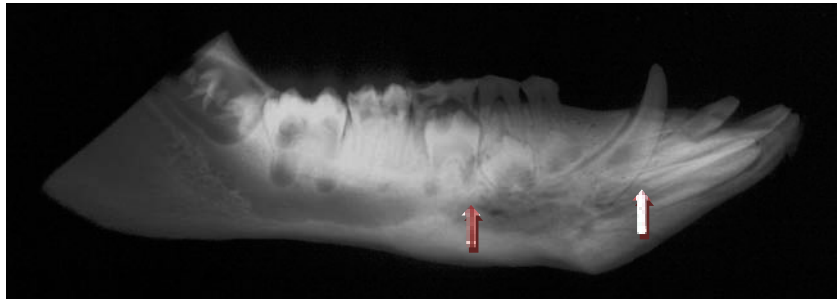


Abbildung 43 Ostim®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i. (Gruppe N)

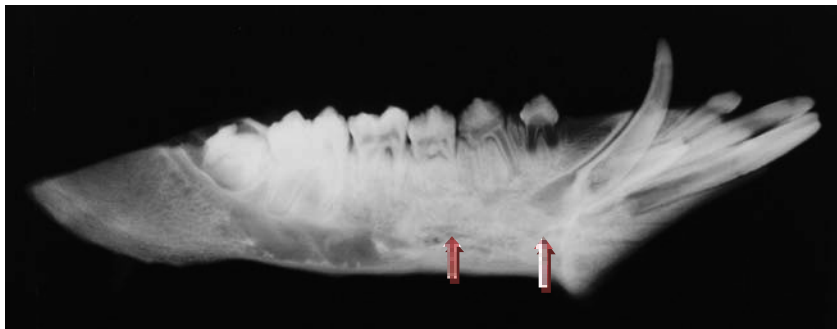


Abbildung 44 Ostim®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i (Gruppe R)

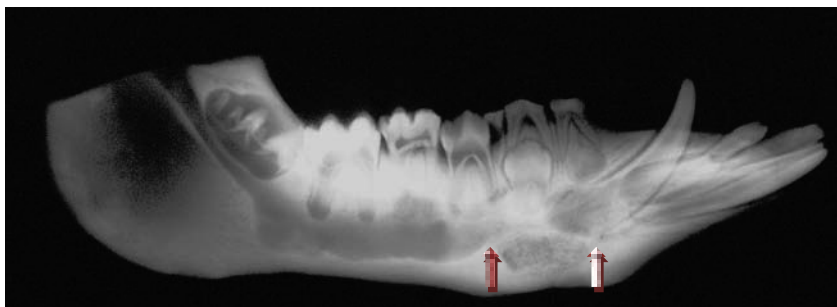


Abbildung 45 NanoBone®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i (Gruppe P)

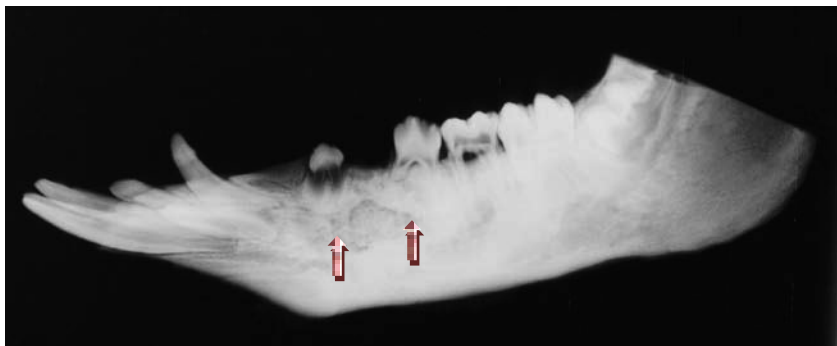


Abbildung 46 NanoBone®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i (Gruppe S)

Abbildungen 41-46 : Röntgenologische Befunde (geteilte Unterkiefer, seitlicher Strahlengang) bei Göttinger Miniaturschweinen mit Unterkieferdefekten kritischer Größe nach Implantation verschiedener KAM

5.2. Vergleichende Erörterung der histologischen Ergebnisse

Die wesentlich aussagekräftigeren histologischen Untersuchungen zeigten 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® sporadisch über die gesamte Defektregion verteilte Herde neu gebildeten Geflechtknochens, teilweise an der Oberfläche der KAM-Restpartikel. Es dominierte jedoch zellreiches Granulationsgewebe (vergl. Abb. 27. Kapitel: 4.3.1.). Die Defekthöhle war überwiegend von einer bindegewebigen Narbe aufgefüllt, im Unterschied zu den Kontrolluntersuchungen ohne KAM-Implantation, bei denen sich im größten Teil des Defektes ein unauffälliges fettzellreiches Knochenmark gebildet hatte (KRATZKE 2003). Nach Implantationsdauer von 8 Monaten war eine deutliche Knochenformation auf der Oberfläche der residuellen KAM-Partikel nachweisbar. Ein Hinweis dafür, dass die Leitschienenfunktion des devitalisierten Knochengerüsts von Bio-Oss® für die osteogenen Wirtszellen funktioniert. Die KAM-Partikel wurden während reparativer Osteoneogenese physiologisch integriert, so dass nach 8 Monaten das körperfremde KAM Bio-Oss® in einen festen Verbund mit dem neu gebildeten Knochen eingegangen war. Histologisch zeigten sich deutliche ossäre Brückenbildungen zwischen den noch vorhandenen Bio-Oss®-Partikeln, wobei einige Partikel bereits vollständig in den neu gebildeten Knochen eingebettet waren.

5 Wochen p. i. von Ostim® bzw. NanoBone® waren bei beiden Versuchsgruppen histologisch Restdefekte in der Mandibula erkennbar. Nach Einsatz beider KAM zeigten sich kaum entzündliche Reaktionen. Während residuelle KAM-Anteile bei Verwendung von NanoBone® 5 Wochen p. i. noch deutlich nachweisbar waren, fanden sich zeitgleich bei Einsatz von Ostim® nur noch geringe Anteile.

8 Monate p. i. sind die getesteten KAM fast vollständig biodegradiert und in das Remodeling des Knochens einbezogen. Ein osteoklastärer Abbau konnte bei Bio-Oss® und noch in stärkerem Maße bei NanoBone® nachgewiesen werden. Zudem fanden sich bereits Biomineralisationskerne und Knochengewebsneubildung im Inneren der eingebrachten KAM. Bio-Oss® und NanoBone® zeigten somit histologisch ein nahezu gleichartiges biologisches Verhalten (Abb. 47). Bei Ostim® fanden sich zeitgleich (8 Monate p. i.) in keinem Fall ein Restdefekt resp. bindegewebiges Ersatzgewebe. Die KAM-Reste waren äußerst geringfügig, was auf eine unangepasste frühe Biodegradation hindeutet. Entzündliche Begleitreaktionen fehlten, jedoch imponierten erweiterte Markräume, die bis zu 1/5 des Defektquerschnittes einnahmen, wodurch die mechanische Belastungsfähigkeit des Knochens leidet. Im gesamten ehemaligen Defektbereich war vorwiegend randständig neu gebildeter Geflechtknochen mit einer feinen Trabekelstruktur

nachweisbar, so dass man - abgesehen von den Befunden im ossären Markbereich - von einer guten Reossifikation ausgehen kann. (Abb. 48)

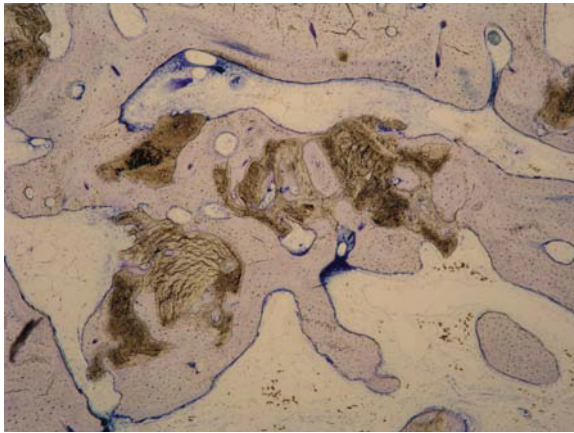


Abbildung 47 Histologischer Befund 8 Monate nach Implantation von NanoBone® mit osteointegrierten KAM-Partikeln (Originalvergr.:40x)

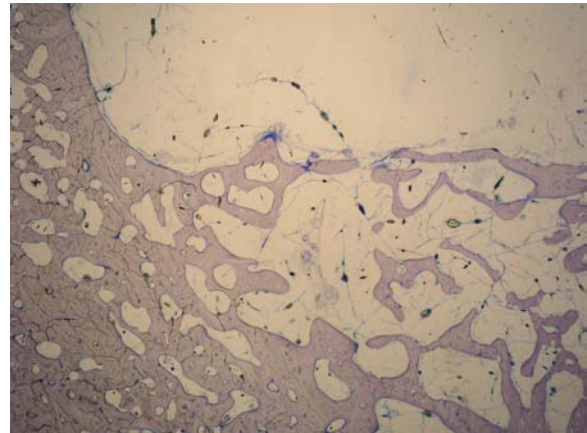


Abbildung 48 Histologischer Befund 8 Monate nach Implantation von Ostim® (Gruppe R) mit neu gebildetem spöngiösen Knochen und hämatopoetischen aktiven Markräumen (Originalvergr.:12,5x)

Die Größenzunahme der Markräume (als „erweiterte Markräume“ bezeichnet) kann durch die Anordnung der den Knochen bildenden und/oder resorbierenden Zellen bedingt sein. Zudem wird Ostim® schneller resorbiert als neu gebildetes Knochengewebe einwachsen kann. Die Resorptionsgeschwindigkeit im Vergleich zum Eindringen von Knochengewebe erscheint in diesem Zusammenhang allerdings zweitrangig, da Bindegewebe den Defekt vor dem osteogenen Gewebe auffüllt. Um seiner Platzhalterfunktion gerecht zu werden, soll ein KAM mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut werden, mit der das Knochengewebe gebildet wird. Außerdem besteht die Gefahr, dass ein pastöses KAM wie Ostim® nicht am Implantationsort verbleibt, sondern „abschwimmt“. Es ist anzunehmen, dass die Knochenneubildung im Defektzentrum trotz vorzeitiger Resorption der Ostim®-Partikel dadurch zustande kam, dass mesenchymale Zellen aus dem einsprossenden Bindegewebe oder ortständiger Natur in Osteoblasten umgewandelt wurden. Grundsätzlich war 8 Monate p. i. aller 3 getesteten KAM eine sehr gute randständige Knochenapposition nachweisbar, die jedoch nicht allein den applizierten Biomaterialien zuzuschreiben ist, da dieser Effekt in geringerem Maße auch in der Kontrollgruppe zu beobachten war.

Resümierend verläuft der Reossifikationsprozess im Bereich der artifiziell gesetzten Unterkieferdefekte in 4 Stufen ab, von denen die erste Stufe durch stark vaskularisiertes Granulationsgewebe gekennzeichnet ist (SCHWEIBERER 1970), welches Serum und Blutzellen enthält und zahlreiche KAM-Partikel einschließt. Hochporöse, großporige

KAM, wie Bio-Oss®, NanoBone® und Ostim®, die auch Makroporen mit einem Durchmesser bis zu 1 mm besitzen, begünstigen ein frühzeitiges Einwachsen von Gefäßsprossen. Die einzelnen KAM-Partikel sind mit dicht gelagerten Fibroblasten ähnlichen Zellen umgeben.

In der zweiten Stufe des Regenerationsprozesses sollen bei einem optimal wirksamen KAM osteoblastenartige Zellen die KAM-Partikel umschleiden, was bei Bio-Oss® und den beiden Vergleichsprodukten zumeist der Fall war. An der Grenzschicht zwischen KAM-Partikeln und umgebenden Bindegewebe entsteht infolge Osteoblasteneinwirkung zunächst unverkalkte Knochengrundsubstanz, das so genannte Osteoid, als Ausdruck einer frühen desmalen Ossifikation. Durch Einwachsen von Kollagenfasern sowie Einlagerung von Kalzium- und Phosphatsalzen bildet sich Geflechtknochen, dessen Trabekel an Größe zunehmen und residuelles Granulationsgewebe umschließen. Parallel dazu organisieren sich die Osteoblasten einerseits zu Osteozyten und Osteoklasten werden gebildet. So wird ein funktioneller Umbau des neu gebildeten Knochens möglich.

In der dritten Stufe der ossären Regeneration, in welcher der neu gebildete Knochen größtenteils mineralisiert, erfolgt die Biodegradation der KAM und ihr Ersatz durch Geflechtknochen. Wenn sich Osteoklasten unmittelbar an KAM-Partikel anlagern und diese abbauen, was bei NanoBone® am häufigsten zu beobachten war, ist das ein Hinweis auf einen natürlichen Abbau des KAM im Rahmen des physiologischen „bone remodelings“. Es hat den Vorteil der zeitlichen Anpassung an den Knochenregenerationsprozess.

In der Stufe vier des Konsolidierungsprozesses beginnt der Umbau des primär gebildeten Geflechtknochens in lamellären Knochen, wobei je nach Art des eingesetzten KAM ein differenter Anteil unterschiedlich strukturierter KAM-Restpartikel histologisch nachweisbar ist. So sind z. B. residuelle NanoBone®-Partikel bis zu 12 Monate p. i. nachweisbar (GÖTZ et al.2008).

5.3. Vergleichende Erörterung ergänzender histochemischer Ergebnisse

Um die beschriebenen Vorgänge der defektbezogenen Reossifikation näher charakterisieren zu können, wurden ergänzende histochemische Untersuchungen sowohl nach Implantation von Bio-Oss® als auch des Vergleichspräparates NanoBone® durchgeführt. Wegen der schnellen Biodegradation von Ostim® waren mit diesem Material keine vergleichenden Untersuchungen möglich. Die histochemischen Untersuchungen waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Sie wurden von einer kooperierenden Forschungsgruppe im Bereich Oralbiologische Grundlagenforschung an der Universität Bonn durchgeführt, deren Leiter, Herr Prof. Dr. W. Götz, uns freundlicherweise die Erlaubnis erteilte, die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit vergleichend darzustellen.

Die Alkalische Phosphatase (AP) gilt als Marker für die Osteoblastenaktivität; in der histochemischen Nachweisreaktion stellt sie sich als braunes Präzipitat dar (siehe Methodik Kap. 3.6.3.). Die Oberfläche von neu gebildeten Knochenbälkchen ist stark AP-positiv, da sich dort ein Saum knochenbildender Zellen befindet. In Abbildung 49 ist ein solches Präparat mit bereits fortgeschrittener Knochenbildung 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® dargestellt. Eine schwach positive AP-Reaktion findet sich auch in der Umgebung der ossär eingeschlossenen KAM-Partikel, was auf ihre osteokonduktive Wirkung hinweist.

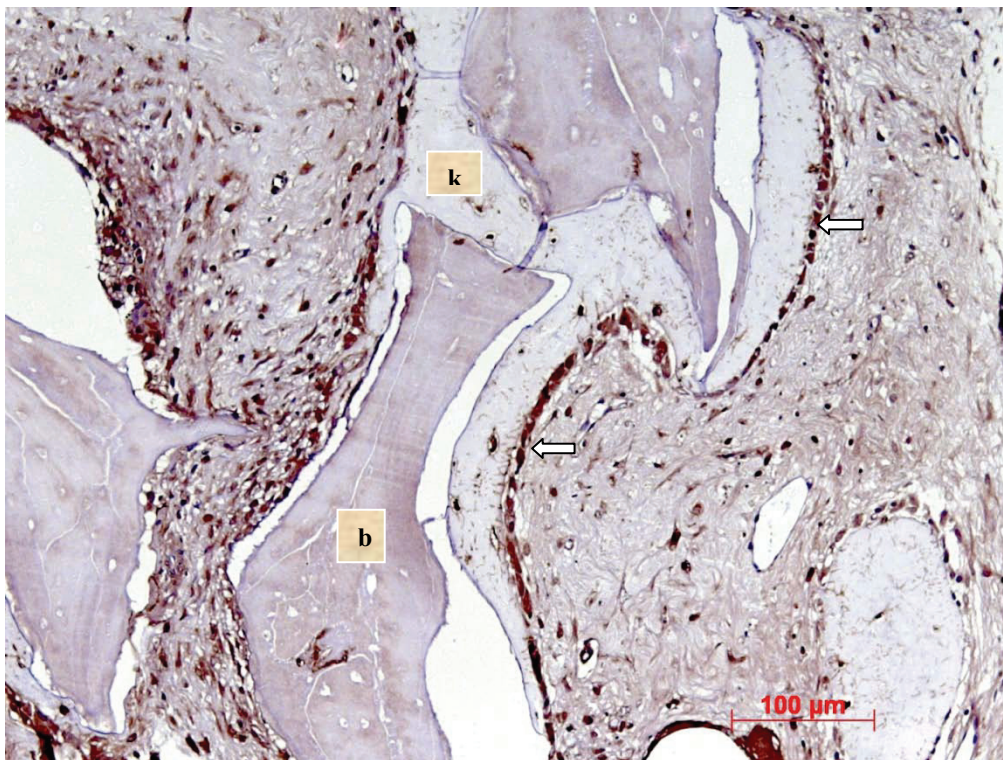


Abbildung 49 Osteoblastensäume am neugebildeten Knochen (k) mit positiver AP-Reaktion (Pfeile), eingeschlossener Bio-Oss®-Partikel (b) 5 Wochen p. i.

5 Wochen nach Implantation von NanoBone® lag bezüglich des neugebildeten Knochens ein ähnlicher histochemischer Befund wie beim Testmaterial Bio-Oss® vor (Abb. 50): eine stark positive AP-Reaktion im Bereich der Osteoblastensäume sowie eine schwach positive Reaktivität im Bereich des Bindegewebes, der neu gebildeten Knochenmatrix und der Gefäßwände. Zusätzlich fand sich nicht nur in der Umgebung, sondern auch im Zentrum der NanoBone®-Partikel eine stark positive AP-Reaktion, was darauf hindeutet, dass Osteoblasten in die hochporösen KAM-Partikel einwandern und innerhalb dieser eine Knochenbildung initiieren. Letztlich ist dies ein Hinweis darauf, dass NanoBone® ein hohes osteokonduktives Potenzial besitzt, welches sich nicht nur auf die Materialoberfläche beschränkt.

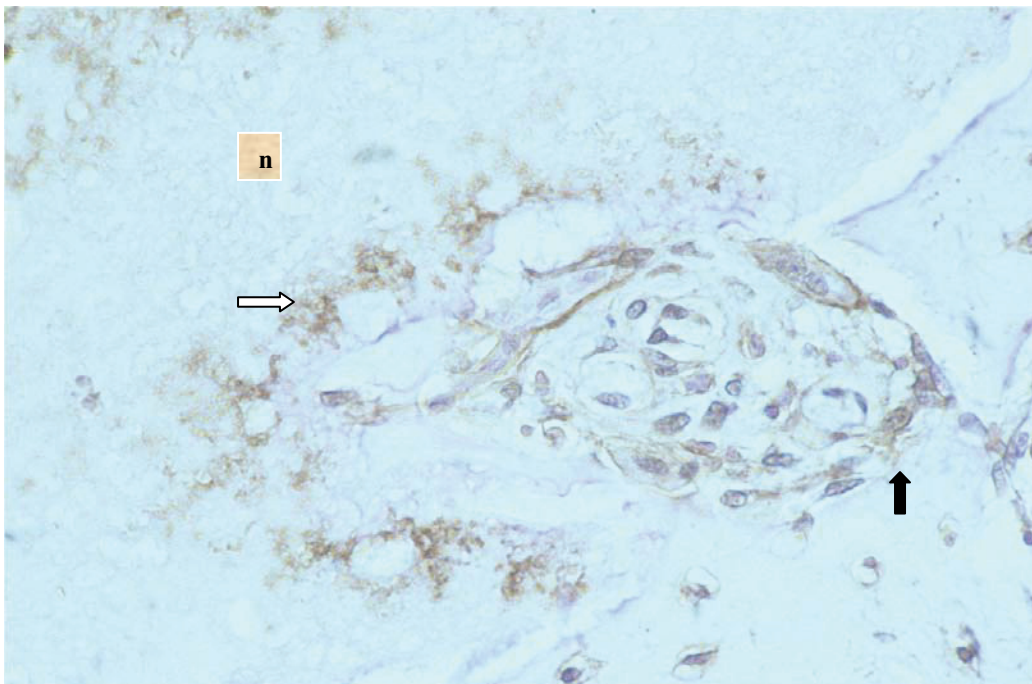


Abbildung 50 NanoBone®-Partikel (n) mit positiver AP-Reaktion im Inneren (Pfeil weiß) und seiner Umgebung (Pfeil schwarz) 5 Wochen p. i. (Originalvergr.:200x)

Die Tartrat-Resistente Alkalische Phosphatase (TRAP) gilt als Markerenzym für knochenresorbierende Zellen vom „Osteoklastentyp“ und tritt im histologischen Präparat als rotbraunes Endprodukt in Erscheinung. 5 Wochen p. i. fanden sich Osteoklasten im Kontakt zu den Bio-Oss®-Partikeln relativ selten (Abb. 51). Eine osteoklastische Aktivität im Sinne der Biodegradation wurde jedoch durch das Vorhandensein von Resorptionslakunen im KAM belegt. Die Penetration von Gefäßen und spätere Bildung neuer Knochenformationen innerhalb der Partikel spricht für eine langsame Biodegradation von Bio-Oss®.



Abbildung 51 *Bio-Oss®-Partikel (b) 5 Wochen p. i., TRAP-positive Zellen an der Oberfläche (Pfeil), TRAP-Reaktion*

Zeitgleich nach NanoBone®-Implantation fanden sich TRAP positive Zellen entlang der Oberfläche des neu gebildeten Knochens, speziell dort wo Knochenumbauvorgänge stattfinden (Abb. 52). Daneben zeigten sich Zellen mit TRAP-Aktivität in direktem Kontakt zu NanoBone®-Partikeln, was darauf hindeutet, dass der Abbau dieses KAM vorwiegend osteoklastär im Rahmen des physiologischen ossären Remodelingprozesses erfolgte. Aus welchen Gründen Osteoklasten bevorzugt NanoBone®-Oberflächen besiedeln, sollte vor dem Hintergrund des proteinogenen Charakters des KAM diskutiert werden (GÖTZ et al.2008).



Abbildung 52 Zu 2/3 ossär eingeschlossener NanoBone®-Partikel (n) mit TRAP positiven Osteoklasten (Pfeile) an seiner Oberfläche 5 Wochen p. i. (Originalvergr.: 20x)

Mittels spezifischer monoklonaler Antikörper ist die immunhistochemische Spezifizierung von Zellen mit BMP-Aktivität möglich. Dabei handelt es sich um den Nachweis knochenspezifischer Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie, die als Regulatorproteine für die Formation von Knochen und Knorpel verantwortlich sind und u. a. die Osteoblastenbildung anregen. Das zwischen den neu gebildeten Knochen trabekeln und den Bio-Oss®-Partikeln liegende Weichgewebe enthielt nur wenige Fettzellen, war sehr gut vaskularisiert und zeigte gelegentlich Entzündungsreaktionen. 5 Wochen p. i. dieses KAM zeigte sich eine bindegewebige Narbe in den Defektregionen. Der Implantationsort war von einem breiten trabekulären Knochensaum umgeben, ein Durchbau der Kortikalis war nicht vorhanden. Bio-Oss® bewirkte initial ein gutes Partikel bezogenes Knochenwachstum. An ihrer Oberfläche fanden sich punktförmige schwarzbraune Präzipitate, die auf eine positive BMP2-Aktivität der dort lokalisierten Osteoblasten hinwiesen. Das KAM selbst reagierte negativ (Abb. 53).

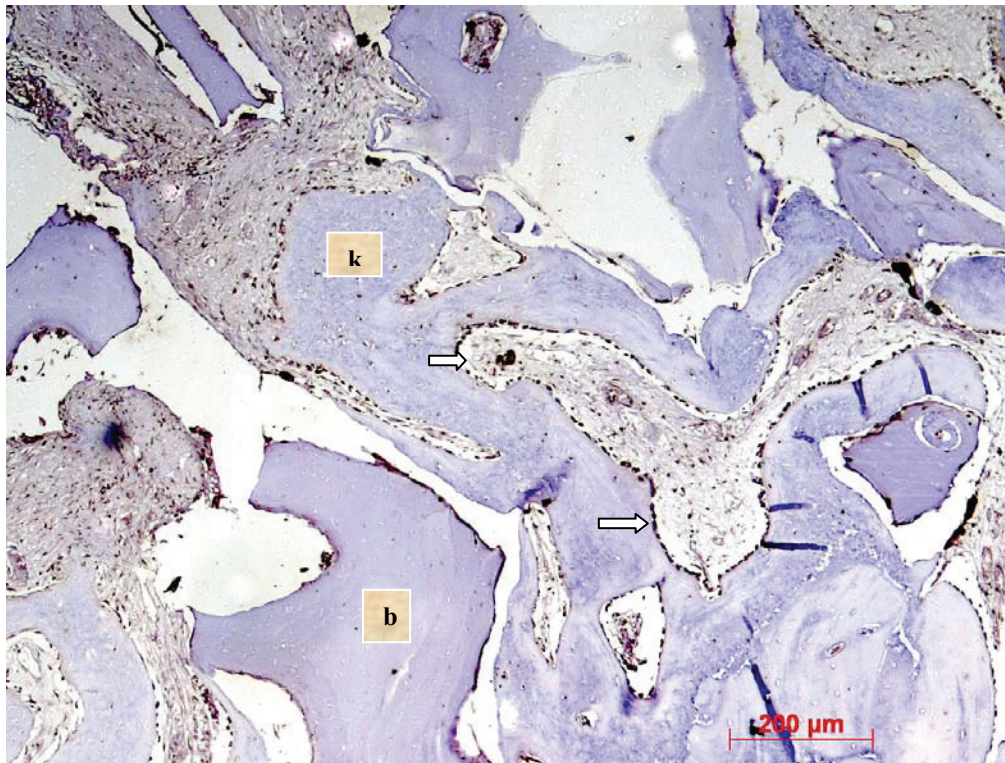


Abbildung 53 Areale mit fortgeschrittener Knochenneubildung (k) und granulären Resten von Bio-Oss® (b) 5 Wochen p. i., an der Oberfläche der Knochen trabekel zahlreiche BMP2-positive Osteoblasten (Pfeile)

Immunhistochemisch waren 5 Wochen p. i. von NanoBone® - analog zu Bio-Oss® - erhöhte BMP2-Aktivitäten im neu gebildeten Knochen - hier besonders im Bereich der Osteoblastensäume sowie im Osteoid - nachweisbar (Abb. 54). So konnte sich ein Geflechtknochenregenerat bilden, das die Partikel der HA-Matrix einschließt. Hervorzuheben sind jedoch BMP2-positive Präzipitate an der Oberfläche und im Zentrum der NanoBone®-Partikel, was darauf hindeutet, dass diese knochenspezifischen Wachstumsfaktoren mit Proteincharakter offenbar von der KAM-Matrix während der Einheilungszeit aus dem Blutserum und/oder der Gewebsflüssigkeit absorbiert wurden. Das wird durch das lockere Strukturgefüge und die hohe Porosität von NanoBone® begünstigt, wodurch letztlich dieses KAM eine osteoinduktive Wirkung vermitteln kann. Die BMP-Freisetzung erfolgt unmittelbar nach Zerstörung der Gefäße infolge des chirurgischen Eingriffs. Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch Knochenzellen diese Proteine gebildet haben könnten oder diese von neugebildeten Gefäßen während der 5-wöchigen Reparationsphase herangeführt wurden.

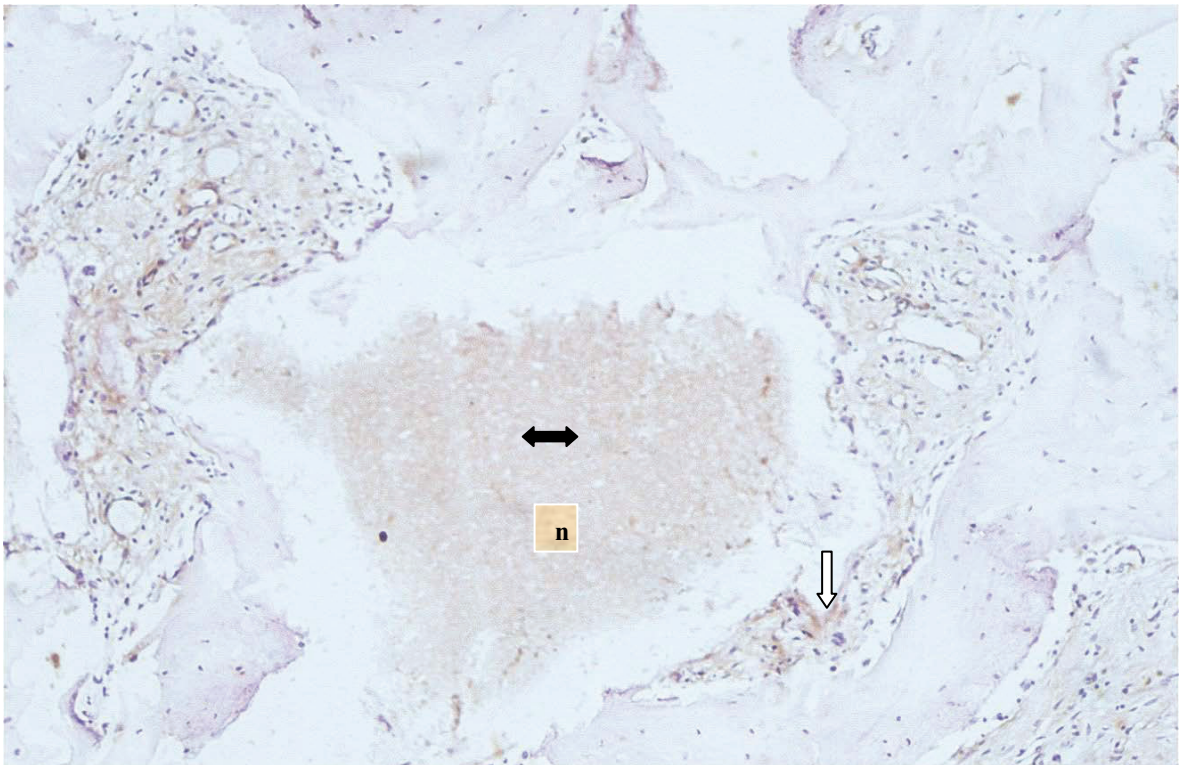


Abbildung 54 Nachweis erhöhter BMP 2-Aktivität 5 Wochen p. i. von NanoBone® (n): Im Bereich der Osteoblastensäume und der KAM-Partikel (marginal: Pfeil weiß; zentral: Pfeil schwarz; Originalvergr.:10x)

Eine vergleichende Beurteilung der Einflussfaktoren auf die Konsolidierung der artifiziell gesetzten Knochendefekte ergab für Bio-Oss® eine positive Korrelation zwischen Implantationsdauer und ermittelter Knochendichte einerseits und zum Grad der Biodegradation der KAM-Partikel andererseits. Weitgehend analoge Ergebnisse fand SCHNEIDER (2009) anhand gleichartiger Untersuchungen mit NanoBone®. 8 Monate p. i. lag eine nahezu vollständige Knochenregeneration vor, was auf gute osteokonduktive Eigenschaften des KAM hindeutet. Die frühzeitige Adhäsion bioaktiver Proteine und Mediatoren an der Oberfläche der NanoBone®-Partikel ermöglicht eine zügige Ossifikation. Ihre früh einsetzende Biodegradation führt zu einem Anstieg der lokalen Kalzium- und Phosphatkonzentration, was die Mineralisation des sich neu bildenden Knochens beschleunigt. Das Argument, jede KAM-Implantation habe eine die Knochenbildung behindernde, entzündliche Begleitreaktion zur Folge – wie z. T. bei Einsatz von Bio-Oss® zu beobachten – blieb nicht unwidersprochen. So konnten MAHY & URIST (1988) nachweisen, dass Entzündungsmediatoren speziell für den osseinduktiven Prozess bedeutsam sind. Beispielsweise konnte ein Einfluss von IL-1 β auf heterotrope Effekte von BMP nachgewiesen werden, indem IL-1 β gerichtete monoklonale Antikörper an den gleichen Ort wie BMP appliziert wurden und diese die Entstehung von

Knochengewebe blockierten, wogegen die Gabe dieses Zytokins die BMP-Wirkung signifikant verstärkte.

Resümierend ist festzustellen, dass *In-vivo* 5 Wochen nach Implantation sowohl von Bio-Oss® als auch von NanoBone® die verbliebenen Restpartikel dieser KAM ossär eingeschlossen waren und durch den Nachweis der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität eine Osteoidapposition an der Grenzfläche dieser Partikel mit Hilfe histochemischer Marker indirekt nachgewiesen werden konnte, was auf eine Stimulation der Ossifikation eindeutig hinweist. Vergleichende histochemische Befunde für Ostim® lagen aus materialtechnischen Gründen nicht vor.

5.4. Vergleichende Erörterung der semiquantitativen histologischen und histomorphometrischen Ergebnisse

Die semiquantitative histologische Untersuchung soll aufgrund ihres orientierenden Charakters einleitend nur kurz angesprochen werden. Die Bewertung der zur Verfügung stehenden histologischen Präparate 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) ergab - auf die Flächen der Unterkieferquerschnitte bezogen - eine defektbezogene Knochenneubildungsrate von 52% (Gruppenmittelwert). Vergleichsweise konnte 8 Monate p. i. des gleichen KAM eine Knochenneubildungsrate von 81% nachgewiesen werden. Die stärkste defektbezogene Knochenbildung war somit innerhalb der ersten 5 Wochen p. i. zu verzeichnen, während diese bis zum 8. Monat mit geringerer Geschwindigkeit weiter zunahm. Demgegenüber verlief die Biodegradation von Bio-Oss® weitgehend kontinuierlich. 5 Wochen p. i. war flächenbezogen ein Anteil von 75% Bio-Oss®-Partikeln nachweisbar, der bis zum 8. Monat nach der Implantation auf 32% sank.

Bei der Implantation von NanoBone® wurde 5 Wochen p. i. bei semiquantitativer Bewertung eine durchschnittliche Knochenbildung von 59% erreicht (ALBRECHT 2008), die 8 Monate p. i. auf 87% anstieg (SCHNEIDER 2009). Damit liegen beide Werte etwas über den für Bio-Oss® ermittelten. 5 Wochen p. i. waren 65% an residuellen Nanobone®-Partikeln auffindbar (ALBRECHT 2008), welche 8 Monate p. i. noch 50% ausmachten (SCHNEIDER 2009) und somit ein ähnliches Biodegradationsverhalten wie Bio-Oss® anzeigte. Semiquantitativ histologisch lag 5 Wochen p. i. die Knochenneubildungsrate in der Ostim®-Gruppe mit 84% am höchsten, während residuelle KAM-Anteile zeitgleich lediglich in geringem Maße (21%) vorhanden waren (ALBRECHT 2008). 8 Monate p. i. war die Knochenneubildungsrate bei Ostim® mit 73% am geringsten; gegenüber dem Wert 5 Wochen p. i. war sogar ein Rückgang zu verzeichnen.

Die aussagekräftigeren histomorphometrischen Ergebnisse nach Implantation von Bio-Oss® in artifizielle Unterkieferdefekte kritischer Größe sollen eingehender erörtert werden. Die computergestützte Analyse der tierexperimentellen Untersuchungsergebnisse ergab 5 Wochen nach Implantation des KAM Bio-Oss® eine flächenbezogene Knochenneubildungsrate von 68,3%, welche bis zum 8. Monat p. i. auf 82,3% anstieg, was der vergleichsweise höchste Wert zu diesem Zeitpunkt war (Tab.17). Diese Ergebnisse bestätigen die semiquantitativen histologischen Befunde bezüglich einer schnellen Reossifikation der Kieferdefekte innerhalb der ersten 5 Wochen und eines

deutlichen Nachlassens der Geschwindigkeit der permanent fortschreitenden Knochenneubildung bis zum 8. Monat p. i..

Tabelle 17 Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: Knochenneubildung und KAM-Anteile in Unterkieferdefekte kritischer Größe bei Miniaturschweinen 5 Wochen und 8 Monate nach KAM-Implantation (Gruppenmittelwerte)

5 Wochen			8 Monate		
Versuchsgruppen	Biomaterial % Mittelwerte	Knochen % Mittelwerte	Versuchsgruppen	Biomaterial % Mittelwerte	Knochen % Mittelwerte
Ostim®*	0,2	81,3	Ostim®*	0,1	75,4
BioOss®	6,8	68,3	BioOss®	3,4	82,3
NanoBone®*	7,3	60,8	NanoBone®*	5,7	78,1

* Ostim® und NanoBone® (nach Schneider 2009 und Albrecht 2008)

Beim Referenzmaterial Ostim® wurde 5 Wochen p. i. mit 81,3% die vergleichsweise höchste defektbezogene Knochenneubildungsrate erreicht. Diese sank jedoch bis zum 8. Monat p. i. lediglich auf 75,4% ab, was zu diesem Zeitpunkt der vergleichsweise niedrigste Wert war (SCHNEIDER 2009; ALBRECHT 2008). Offensichtlich stagniert der Ossifikationsprozess nach anfänglich hoher Aktivität, da Ostim® unangepasst frühzeitig abgebaut wird und deshalb nicht bis zum Abschluss des Reossifikationsprozesses im Bereich der Defekte als osteokonduktive Matrix zur Verfügung steht. Dadurch verlangsamt sich der Ossifikationsprozess in der Endphase und kommt vielfach zum Stillstand, bevor eine vollständige Reossifikation eingetreten ist. Deshalb verbleiben zentrale Restdefekte im Kieferknochen, die histologisch oft als „erweiterte Markräume“ imponieren.

Die für das KAM NanoBone® ermittelte Knochenneubildungsrate war 5 Wochen und 8 Monate p. i. mit 60,8% resp. 78,1% geringer als die beim Einsatz von Bio-Oss® ermittelten Werte (SCHNEIDER 2009; ALBRECHT 2008). Diese Differenzen sind bei der relativ kleinen Probenzahl allerdings von untergeordneter Bedeutung.

Histomorphometrisch ermittelt erfuhr der Knochenzuwachs nach Implantation von Bio-Oss® von der 5. Woche bis zum 8. Monat eine Steigerung um 13,9%, während dieser bei Einsatz von NanoBone® sogar einen Wert von 17,2% erreichte. Gegenüber Ostim®, bei dem sich im gleichen Zeitraum ein negativer „Knochenzuwachs“ von 6,8% abzeichnet, ist der Zuwachs an Knochenmasse zwischen der 5. Woche und dem 8. Monat nach KAM-Implantation sowohl bei Bio-Oss® ($p=0,011$) als auch NanoBone® ($p=0,004$) signifikant größer (Abb.55).

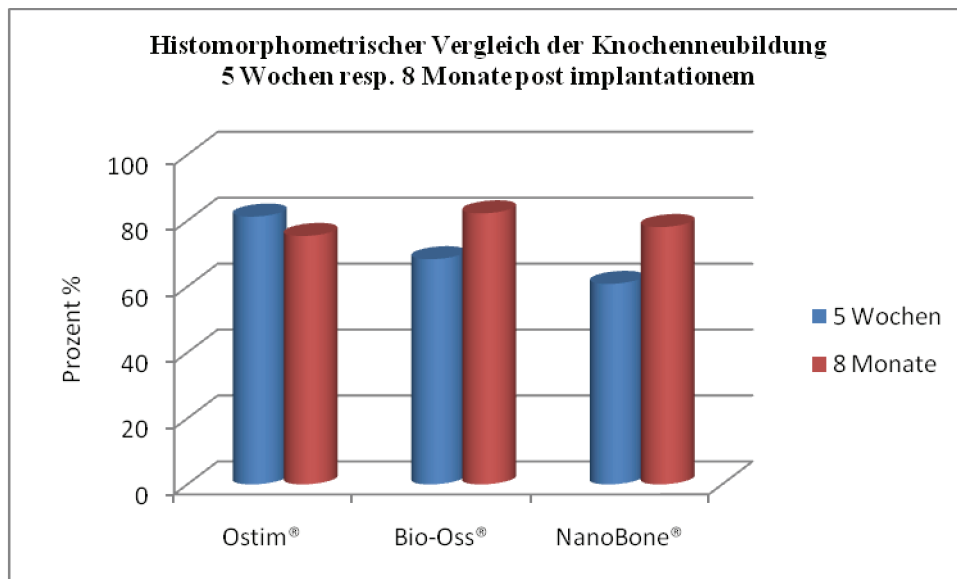


Abbildung 55 Graphische Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: Knochenneubildung 5 Wochen und 8 Monate nach KAM-Implantation (Gruppenmittelwerte) (Angaben für Ostim® und NanoBone® nach Schneider 2009 und Albrecht 2008)

In der Kontrollgruppe ohne KAM-Implantation ließ sich histomorphometrisch nach 5 Wochen lediglich eine relative Defektverkleinerung von 27,1% (+/- 22,6%) ermitteln, die nach 8 Monaten auf 48,4% (+/- 20%) anstieg (KRATZKE 2003, SCHIE 2007). Das war zu beiden Zeitpunkten signifikant weniger, als bei Einsatz aller drei getesteten KAM.

Eine vergleichende Analyse der histomorphometrischen Daten des Biodegradationsverhaltens von Bio-Oss® und den beiden Referenzprodukten ist in Abbildung 56 graphisch veranschaulicht. So betrug der Anteil nicht degradierteter Bio-Oss®-Partikel unter Berücksichtigung der bei der histologischen Aufarbeitung möglicherweise herausgefallenen KAM-Anteile 5 Wochen p. i. 16,0% (6,8%)*, während es 8 Monate später noch 5,0% (3,4%) waren (siehe Tabelle 28 im Anhang). Das bedeutet, dass in der 5. Woche p. i. noch ca. 1/6 der Bio-Oss®-Partikel nachweisbar waren, während es 8 Monate danach nur noch 1/20 waren. Obwohl dieser Befund von der semiquantitativen histologischen Bewertung abweicht, möchte ich diesen aufgrund der exakteren Ermittlungsgrundlage höher bewerten.

* Werte in Klammern ohne Berücksichtigung der möglicherweise herausgefallenen KAM-Anteile

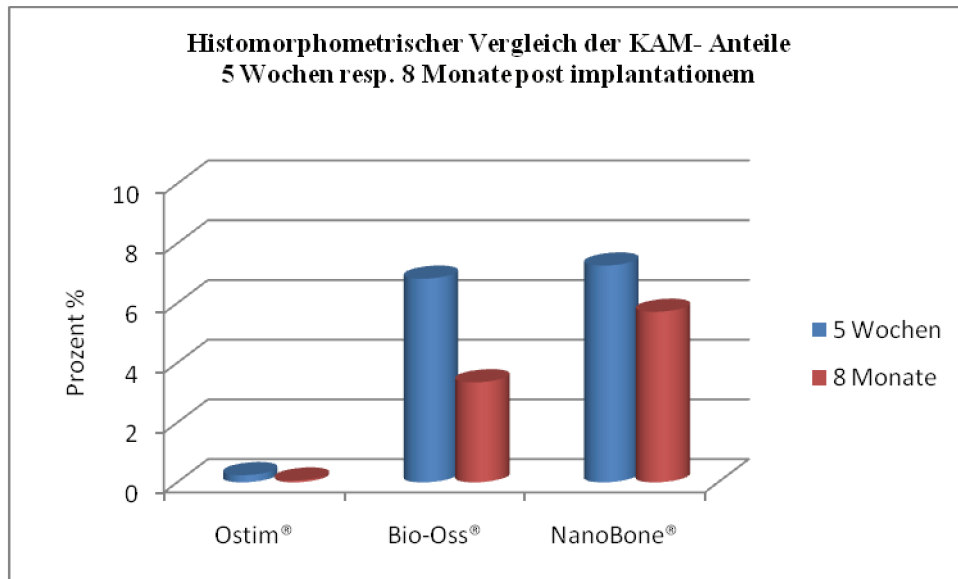


Abbildung 56 Graphische Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: KAM-Anteile 5 Wochen und 8 Monate p. i. (Gruppenmittelwerte) ohne Berücksichtigung der bei der Aufarbeitung evtl. herausgefallenen KAM-Partikel (Angaben für Ostim® und NanoBone® nach Schneider 2009 und Albrecht 2008)

Die hier nachgewiesene weitgehende Biodegradation von Bio-Oss® innerhalb von 8 Monaten weicht von den Beobachtungen anderer Autoren ab, die teilweise eine geringere Biodegradationsrate ermittelten. CAMELO et. al (1998) führten eine histomorphometrische Studie der knöchernen Integration von Bio-Oss® an Humanbiopsien von zwei Patienten durch, denen das bovine KAM ohne Verwendung einer Membran in parodontale Defekte appliziert wurde. Nach Beobachtungszeiträumen von 6 bis 9 Monaten – vergleichbar mit den Langzeitversuchen dieser Studie – wurden die extraktionswürdigen Zähne im Block mit umgebenden Knochen entfernt und histologisch aufbereitet. Es konnten histomorphometrisch Knochenanteile von 24,9% bzw. 31,6%, Bio-Oss®-Anteile von 26,2% bzw. 33,7% sowie Bindegewebsanteile von 34,7%. bzw. 48,9% ermittelt werden. Der Anteil residueller Bio-Oss®-Anteile fällt in der vorliegenden Studie geringer aus. Dagegen konnten BERGLUNDH & LINDHE (1992) am Hundemodell bioptisch nachweisen, dass 4 Monate p. i. 17,1% und 7 Monate danach noch 10,8% Bio-Oss® vorhanden war. Dies spiegelt analog zu den eigenen Untersuchungen eine zeitlich fortschreitende Biodegradation mit kontinuierlich abnehmendem KAM-Anteil wieder. JENSEN et al. (1996) und SCHMITT et al. (1997) konnten in einer vergleichenden Studie mit verschiedenen KAM am Kaninchenmodell zeigen, dass 8 Wochen p. i. Knochengewebe in die Mikroporen der KAM-Partikel eingewachsen ist, jedoch keine osteoklastäre Resorption der bovinen Partikel zu beobachten war. Biopsiestudien nach Implantation synthetischer KAM auf HA-Basis in Femurdefekte bestätigten ihren

osseoprotektiven Einfluss. Nach zwei Wochen war eine weitgehende und nach zwölf Wochen eine vollständige ossäre Einscheidung der residuelle KAM-Partikel in regelmäßig texturierten Lamellenknochen nachweisbar (OSBORN & DONATH 1984). Durch die Beimengung von autogenem Knochen zu Bio-Oss®-Implantaten kann es durch Übertragung lebender Osteoblasten mit osteogentischer Potenz zur Bildung neuer Knochenformationen kommen (SCHLEGEL & NEUKAM 2002).

5 Wochen nach Implantation von NanoBone® waren mit 8,4% (7,3%)* deutlich weniger KAM-Reste nachweisbar als bei Einsatz von Bio-Oss®, während 8 Monate p. i. der für NanoBone® ermittelte Wert von 5,7% (5,7%) dem von Bio-Oss® nahe kommt. Die für das Biodegradationsverhalten von Ostim® angegebenen Werte sind nach 5 wöchiger Kontrollzeit mit einem Anteil von 6,8% (0,2%) KAM deutlich geringer als beim Einsatz von Bio-Oss®, jedoch nur wenig geringer als bei Verwendung von NanoBone®. 8 Monate nach Implantation von Ostim® ist nur noch 0,1% (0,1%) des KAM nachweisbar, was sich deutlich von den beiden Referenzmaterialien unterscheidet (Abb.56).

Mittels der histologischen und in Sonderheit der histomorphometrischen Untersuchungen kann resümierend eine gute Leitschienenfunktion im Sinne der Osteokonduktion der KAM Bio-Oss® und NanoBone® im Bereich von Defekten kritischer Größe am Unterkiefer bei Miniaturschweinen belegt werden. Auch das Biodegradationsverhalten beider KAM weist günstige Werte auf, es verläuft weitgehend synchron zur Knochenneubildung in den Defektregionen, wobei die Kontrollen 5 Wochen bzw. 8 Monate p. i. erfolgten. Das Referenzprodukt Ostim® wird dagegen zu schnell biodegradiert. 8 Monate p. i. ist es kaum mehr nachweisbar, was zur Folge hat, dass die Leitschienenfunktion aufgrund unangepassten KAM-Abbaus vorzeitig verloren geht.

Die bei der statistischen Signifikanzprüfung der histomorphometrisch ermittelten Parameter Knochenneubildungsrate, residuelle Biomaterialanteile und - soweit vorhanden - Restdefektausdehnung nach *In-vivo*-Testung von Bio-Oss® und zwei Referenz-KAM sind in Tabelle 18 dargestellt. Diese beziehen sich auf die Querschnittflächen der Ausgangsdefekte, wobei jeweils die 5 Wochen und 8 Monate p. i. ermittelten Gruppenmittelwerte verglichen werden. Nach Implantation von Bio-Oss® ist eine signifikante Zunahme der Knochenneubildungsrate von der 5. Woche bis zum 8. Monat nachweisbar.

* Werte in Klammern ohne Berücksichtigung der möglicherweise herausgefallenen KAM-Anteile

Dieser Trend ist bei Verwendung von NanoBone® ebenfalls vorhanden, während nach Implantation von Ostim® kein signifikanter Knochenzuwachs jenseits der 5. Kontrollwoche vorhanden ist. Infolgedessen verkleinern sich die Restdefekte zwischen der 5. Woche und dem 8. Monat p. i. bei Einsatz von Bio-Oss® und NanoBone® signifikant ($p < 0,05$), während dies bei der Verwendung von Ostim® nicht der Fall ist. Obwohl sich Restanteile aller getesteten KAM von der 5. Woche bis zum 8. Monat p. i. verringern, ist die histomorphometrisch ermittelte Differenz nur für Bio-Oss® signifikant.

Tabelle 18 Statistische Signifikanzprüfung: Differenzen ausgewählter Parameter 5 Wochen und 8 Monate nach Implantation unterschiedlicher KAM in Unterkieferdefekte kritischer Größe (Angabe der asymptotischen Signifikanz)

Gruppen	Knochenneubildung %	Biomaterial %	Restdefekt %
Ostim® N/R*	0,055	0,721	0,055
Bio-Oss® O/T	0,011	0,011	0,011
NanoBone® P/S*	0,004	0,423	0,004

* Ostim® und NanoBone® (nach Schneider 2009 und Albrecht 2008); graue Felder = Signifikanzen

Resümierend ist aus der histomorphometrischen Analyse abzuleiten, dass Ostim®, Bio-Oss® und NanoBone® die Regeneration ossärer Defekte deutlich stimulieren, wobei die beiden letzt genannten KAM den klinischen Anforderungen an ein KAM bei Kieferdefekten kritischer Größe am besten gerecht werden.

5.5. Vergleichende Erörterung der Ergebnisse von Humanhistologien bei Einsatz von Bio-Oss® und der Referenzpräparate

Durch histologische Untersuchungen unterlegte klinisch-röntgenologische Kontrolluntersuchungen nach Implantation des in dieser Arbeit tierexperimentell getesteten KAM Bio-Oss® können zusätzlich Hinweise vermittelt werden. Da eine Übertragung tierexperimenteller Ergebnisse auf die Verhältnisse beim Menschen nur mit großer Zurückhaltung möglich ist, stellen stichprobenartige bioptische Kontrollen bei mit KAM behandelten Patienten eine wertvolle Ergänzung dar. Proben können z. B. in Form von Bohrzylindern im Rahmen von Implantatinsertionen nach Augmentation einer Kieferregion mit einem KAM gewonnen werden. Dabei sollen besonders Aspekte der Osteokonduktivität (ggf. auch der Osteoinduktivität) sowie der Biodegradation des eingesetzten KAM berücksichtigt werden.

Erstmals publizierten CALLAN & ROHRER (1993) die histologisch-bioptischen Befunde von 2 Patienten nach Implantation von Bio-Oss®. Die KAM-Partikel waren direkt von neu gebildetem Knochen umgeben; eine bindegewebige Zwischenschicht war nicht zu erkennen. Bio-Oss® wirkt osteokonduktiv, indem sein devitales Knochengewüst als Leitstruktur für die osteogenen Zellen dient; wobei sich die einsetzende Knochenbildung an dieser Matrix orientiert (SCHLICKWEI & PAUL 1991). Hervorzuheben sind zudem die große innere Oberfläche von Bio-Oss® und sein interkonnektierendes Porensystem.

Die Biodegradierbarkeit eingebrachter KAM ist ein zusätzlicher entscheidender Parameter. Erfolgt sie zu schnell, gefährdet sie in der Umbauphase die Integrität des Leitgerüsts, während ein zu langsamer Abbau des KAM verlängerte Persistenz bedeutet, wodurch der kontinuierliche Aufbau der Knochenstruktur behindert wird. Bei verlängerter oder permanenter Präsenz eines KAM fungiert das neu gebildete Knochengewebe lediglich als Füllmaterial innerhalb der Leitschiene, wodurch die Stabilität des Knochenregenerates leidet (SCHENK 1991).

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sprechen z. T. in Resorptionslakunen nachgewiesene Osteoklasten an der Oberfläche von Bio-Oss®-Partikeln für einen Abbau im Rahmen des ossären Remodelings. Daneben erfolgt dieser auch durch Makrophagen, wie histochemische Untersuchungen belegen können (Wolf 2008). Zur Einschätzung der Biodegradation von Bio-Oss® nach Sinusaugmentationen wurden von WALLACE et. al (1996) beim gleichen Patienten Biopsien nach unterschiedlichen Zeitintervallen (4, 8, 12 und 20 Monaten) entnommen. Dabei zeigte sich, dass das KAM zwischen dem 12. und 20. Monat abgebaut und in vitalen Knochen umgewandelt wird.

MEIER & WOLF publizierten 2007 erste Resultate bioptischer Untersuchungen an Patienten mit dem Referenzprodukt NanoBone®. Es waren Einzelproben in Form von Bohrzylindern, die im Rahmen von Implantatinsertionen 3-4 Monate nach Augmentation der Kieferregion mit dem NanoBone® gewonnen und histologisch untersucht wurden. Dabei konnte bestätigt werden, dass NanoBone® aufgrund seiner extrem großen Oberfläche stark osteokonduktiv wirkt und die Knochenregeneration deutlich stimuliert. Inzwischen liegen von MEIER und Mitarbeitern (2008) Biopsien von 17 Patienten 3-5 Monate nach Implantation von NanoBone® vor, die einen vorrangig osteoklastären Abbau des KAM belegen. Nach einer schnellen Resorption der Kieselgel-Matrix verbleiben im Rahmen des physiologischen „bone remodelings“ nanokristalline HA-Partikel, die angepasst an die Knochenneubildung biodegradiert werden. Wie ergänzende histochemische Untersuchungen von GÖTZ und Mitarbeitern (2008) an Proben von 12 Patienten belegen, sind NanoBone®-Partikel in der Lage, Knochenmatrixproteine wie BMP 2, Collagen 1, Osteocalcin und Osteopontin an sich zu binden. Aufgrund der von ihnen ausgehenden osteogenen Wirkung kann NanoBone® indirekt eine osteoinduktive Wirkung vermitteln, was eine Besonderheit dieses KAM darstellt.

Für Ostim® liegen keine eindeutig verwertbaren Humanstudien vor, da aufgrund der schnellen Biodegradation bei Biopsien schon nach wenigen Monaten keine KAM-Partikel mehr nachweisbar sind. Somit ist kein Vergleich mit Bio-Oss® und dem Referenzprodukt NanoBone® möglich.

Eine Bewertung der für Bio-Oss® vorliegenden Untersuchungsergebnisse im Vergleich zu den in der Forschungsgruppe getesteten Referenzprodukten soll abschließend unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Literaturquellen vorgenommen werden. Das nanokristalline HA-Hydrogel Ostim® ist ein leicht applizierbares KAM mit sehr guter Osteokonduktivität, was sich jedoch wegen seiner schnellen Resorption nicht für Kieferknochendefekte kritischer Größe eignet, da es neben einer geringen mechanischen Belastbarkeit eine ungenügende zentrale Knochenbildung aufweist. Seine Hauptindikation sind spaltförmige ossäre Defekte, die schwer zugänglich sind.

Als geeignetes Referenzprodukt für das bovine Bio-Oss® bei der Versorgung größerer Kieferknochendefekte - speziell solcher kritischer Größe - ist NanoBone® anzusehen, das aus einer vollsynthetisch hergestellten nanokristallinen HA-Kieselgel-Matrix besteht. Beide KAM zeigen eine gute Osteokonduktivität, so dass eine zügige defektbezogene Knochenneubildung erfolgt. Die Untersuchungen von SPECTOR (1994), nach denen die

physikalischen Eigenschaften von Bio-Oss® denen des synthetischen KAM auf HA-Basis grundsätzlich überlegen sind, konnten wir nicht bestätigen. Weder Mikrofrakturen innerhalb der synthetischen KAM noch die Knochenregeneration behindernde fibröse Abkapselungen ihrer HA-Partikel konnten nachgewiesen werden. Das gilt allerdings nur für synthetische KAM auf nanokristalliner HA-Matrix-Grundlage nicht für die herkömmlich im Sinterverfahren hergestellten Biokeramiken, wie z. B. Endobone® (Fa. Merck Biomaterialien, Darmstadt). Letzteres ist weniger porös, besitzt keine Nanoporen und weniger Mikroporen; es wirkt deshalb nur gering osteokonduktiv, so dass sich lediglich ein keramoossäres Regenerat ausbildet (BIENENGRÄBER et al. 2006).

Berechtigt bleibt die Frage, ob von Bio-Oss® möglicherweise die Gefahr einer Infektion mit Viren oder Prionen ausgehen kann. Dieses schließt der Hersteller zwar aus, scheint aber nicht absolut sicher zu sein, da es insbesondere bei der Übertragung von BSE noch erhebliche Kenntnislücken gibt, z. B. die Möglichkeit einer kumulierenden Krankheitsauslösung (SSC Document 2000).

Abschließend ist festzustellen, dass Bio-Oss® ein geeignetes KAM zur Behandlung von Kieferknochendefekten kritischer Größe sowohl beim Schwein als auch beim Menschen darstellt. Inzwischen sind jedoch neue vollsynthetische KAM auf HA-Matrix-Basis entwickelt worden, die ähnlich gute osteokonduktive Eigenschaften haben und im Falle von NanoBone® teilweise sogar Vorteile aufweisen. Deshalb zeichnet sich ein Trend dahingehend ab, dass Bio-Oss® - z. Zt. das bevorzugte KAM in der Kiefer-Gesichtsregion - möglicherweise schon in naher Zukunft durch innovative vollsynthetische KAM verdrängt werden könnte. Auf diese Weise können die durch ein KAM bovinen Ursprungs bedingten Restrisiken sicher ausgeschaltet und zugleich einzelne biologische Eigenschaften optimiert werden.

6. Zusammenfassung

Die klassische allogene Knochentransplantation zur Versorgung ossärer Defekte des Viszerokraniums wird zunehmend durch die Implantation innovativer Knochenaufbaumaterialien (KAM) verdrängt, wodurch für die Patienten die zusätzliche Belastung eines Zweiteingriffes zur Transplantatentnahme entfällt. Ziel dieser Arbeit war eine vergleichende *In-vivo*-Testung des xenogenen KAM Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Schweiz).

Vorangestellt ist ein themenbezogener Literaturüberblick, in dem insbesondere folgende Schwerpunkte herausgestellt werden: grundlegende anatomische Erkenntnisse, historische Hintergründe, Klassifizierungen der Knochenersatzmaterialien (KEM) bzw. KAM sowie der physiologische Ablauf der Knochenregeneration. Diese stellen die Basis für die vorliegende Studie dar.

Als Modell für die tierexperimentelle Studie dienten 6 adulte Göttinger Minischweine, bei denen beidseitig artifizielle Unterkieferdefekte kritischer Größe ($> 5 \text{ cm}^3$) gesetzt wurden, die nicht spontan reossifizieren können. In 12 Knochendefekte wurde Bio-Oss® implantiert, von denen letztlich nur 10 auswertbar waren (Einzelheiten siehe Kap. 3.6.2.) Die Versuchstiere wurden nach entsprechenden Zeitintervallen - 5 Wochen bzw. 8 Monate - post implantationem (p. i.) getötet und die Unterkiefer initial klinisch und röntgenologisch untersucht und danach histologisch aufgearbeitet. Die histologische Bewertung erfolgte qualitativ und orientierend semiquantitativ. Zudem wurden ausgewählte Präparate histomorphometrisch und histochemisch analysiert.

Klinisch zeigte sich bei allen Versuchstieren im Rahmen der Kurzzeittestung (5 Wochen p. i.) eine muldenartige Einziehung der Defektregion; bei der Langzeittestung (8 Monate p. i.) lag eine vollständige ossäre Konsolidierung vor.

Röntgenologisch war eine Differenzierung zwischen knöchernen Regeneraten und Bio-Oss®-Anteilen 5 Wochen p. i. nur schwer und 8 Monate p. i. kaum mehr möglich. Ursachen waren eine ähnliche Radioluzenz von KAM-Anteilen und neu gebildetem Knochen sowie Überlagerungseffekte bei der intravital angewendeten Unterkieferlateraltechnik.

Histologisch konnte eine gute osteokonduktive Wirkung des getesteten KAM nachgewiesen werden. Defektbezogen wurde die Osteoneogenese durch Bio-Oss® deutlich angeregt und das KAM selbst gut osteointegriert, wobei es 8 Monate p. i. schon eine fortgeschrittene Biodegradation aufwies.

Die semiquantitativ-histologische Bewertung ergab 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation eine Defektverkleinerung auf ca. die Hälfte (52%) und am Ende des Versuches, 8 Monate p. i., resultierte eine Knochenneubildungsrate von 81%. KAM-Anteile waren bei den mit Bio-Oss® versorgten Defekten 5 Wochen p. i. zu 75% vorhanden. Es konnten neu gebildete Knochenformationen auf der Oberfläche der Bio-Oss-Partikel nachgewiesen werden, welche diese teilweise einschlossen und feine Trabekelstrukturen zwischen den KAM-Partikeln ausbildeten. Es zeigten sich in nahezu allen histologischen Präparaten Verbundosteogenesen unterschiedlicher Ausprägung: nach 5 Wochen betrug ihr Anteil ca. 1/3 (34%) und nach 8 Monaten fast die Hälfte (43%). Diese Befunde belegen die gute Osteointegration von Bio-Oss®. Residuelle KAM-Anteile fanden sich 8 Monate p. i. noch zu ca. einem Drittel (32%).

Mit Hilfe ergänzender histochemischer Befunde konnten funktionelle Hinweise bezüglich der Aktivitäten der Osteoblasten, des Wachstumsfaktors Bone Morphogenic Protein 2 (BMP2) und der Tartrat-Resistenten Alkalischen Phosphatase (TRAP) gewonnen werden, die Rückschlüsse auf die Regenerationsförderung durch die KAM Bio-Oss® und NanoBone® und ihr Biodegradationsverhalten zuließen.

Die histomorphometrische Auswertung ergab bei Einsatz von Bio-Oss® eine signifikante Zunahme der defektbezogenen Knochenneubildung mit Tendenz zur fortschreitenden Biodegradation des KAM. Der Vergleich der histomorphometrischen Ergebnisse mit den ebenfalls in der Forschungsgruppe getesteten Referenzmaterialien Ostim® (Heraeus-Kulzer, Hanau), einem KAM auf Hydroxylapatit(HA)-Hydrogel-Basis, und einem neuartigen, im Sol-Gel-Verfahren hergestellten, nanokristallinen KAM auf HA-SiO₂-Basis, das seit 2006 unter dem Namen NanoBone® (Artoss GmbH, Rostock) verfügbar ist, erfolgt in der Diskussion. Aufgrund der hohen Osteokonduktivität von Bio-Oss® wird 8 Monate p. i. in Knochendefekte kritischer Größe eine vollständige ossäre Konsolidierung erreicht. Zudem zeigte sich ein weitgehend angepasstes Biodegradationsverhalten bei der *In-vivo-Testung*. Ähnliche günstige defektbezogene Knochenneubildungsraten konnten nach Implantation der beiden Referenzpräparate beobachtet werden. Das Biodegradationsverhalten von NanoBone® ist aufgrund seiner Anpassung an den Knochenneubildungsprozess als günstig einzuschätzen, während Ostim® aufgrund seiner Hydrogelstruktur vorzeitig resorbiert wird, was sich nachteilig auf die zentrale Ossifikation größerer Knochendefekte auswirkt.

Anwendern ist zu empfehlen, sich bei gleicher Eignung für ein vollsynthetisches KAM zu entscheiden, das frei von jeglichen Risiken für den Patienten ist. Beide vergleichend getesteten KAM sind diesbezüglich dem Präparat Bio-Oss® aufgrund seiner bovinen Herkunft überlegen. Speziell bei ossären Defekten kritischer Größe ist NanoBone® zu bevorzugen, während Ostim® sich besonders für schmale, schwer zugängliche Knochendefekte eignet.

II Literaturverzeichnis

1. ADLER, C.P. (1997): Knochenkrankheiten. Diagnostik, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
2. AEBI, M. (1991): Biologischer oder artifizieller Knochenersatz? In: Huggler A.H., Kuner, E. H. (Hrsg.): Aktueller Stand beim Knochenersatz. Berlin Heidelberg New York, Springer, S. 1-9
3. AEBI, M.;GANZ, R. (1989): Future directions in research: Outlook. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
4. AEBI, M.;REGAZZONI, P.;SCHWARZENBACH, O. (1989): Segmental bone grafting: comparison of different types of grafts in dogs. Int Orthop 13: 1-11
5. ALBRECHT, J. (2008): In-vivo-Testung ungesinterter, nanokristalliner Knochenaufbaumaterialien auf Hydroxylapatit-Basis bei der Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe. Med Diss Rostock
6. ARNOLD, I.;FROST, H.;BUSS, R. (1971): The osteocyte as a bone pump. Clin orthop 78: 47
7. ARTOSS (2005): Produktinformationen zu NanoBone®. www.artoss.com Informationsbroschüren
8. ASPENBERG, P.;TUREK, T. (1996): BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependent on implantation site. Acta Orthop. Scand. 67: 3-6
9. AUBIN,J.; LIU, F.; MALAVAL,L.;GUPTA,A.(1995): Osteoblast and Chondroblast Differentiation. Bone 17: 77-83
10. AXHAUSEN, G. (1908): Histologische Untersuchungen über Knochentransplantation am Menschen. Dtsch. Z.Chir. 91: 388
11. BAIRD, A.;WALICKE, P.A. (1989): Fibroblast growth factors. Br. Med. Bull. 45: 438-452
12. BARKA, T.; ANDERSON, PJ (1962): Histochemical methods for acid phosphatase using pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem. 10: 741-755
13. BARNES, G.L.;KOSTENUIK, P.J.;GERSTENFELD, L.C.;EINHORN, T.A. (1999): Growth factor regulation of fracture repair. J. Bone Miner. Res. 14: 1805-1815

14. BARTH, A. (1893): Über histologische Befunde nach Knochenimplantation. Arch Klin Chir 46: 409
15. BASCHKIRZEW, H.J.;PETROW, N.N. (1912): Beiträge zur freien Knochenüberpflanzung. Dtsch. Z.Chir. 113: 490
16. BASSETT, C.A.L. (1972): Clinical implications of cell function in bone grafting. Cline Orthop 87: 49-59
17. BELANGER, L. (1971): Osteocytic resorption. Academic Press, New York
18. BERGLUNDH, T., LINDHE, J.:Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog. Clin Oral Impl Res 8, 117-124(1997)
19. BEREITER, H.;HUGGLER, A.H.;KITA, K.;SPECTOR, M. (1989): Histological response to natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. In: Aebi M., Regazzoni P. (Hrgs.): Bone Transplantation. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag, S. 209-210
20. BERNHARD, G.W. (1991): Healing and repair of osseous defects. Dent Clin North Am 35: 469-477
21. BIENENGRÄBER, V.;GERBER, T.;WOLF, E.;HENKEL, K.O. (2006): Biologische Grundlagen eines synthetischen Knochenaufbaumaterials. Implantologie 4: 48-52
22. BIENENGRÄBER,V.; LENZ, S.; KIRCHHOFF, M.; HENKEL, K.-O.(2008): A novel osteoinductive bone grafting substitute? Cranio-maxilifacial Implant Directions 3; No. 3, 36-39 (Osteoinduktion durch Nanobone®)
23. BLOCK, M.S.;KENT, J.N. (1998): Simultaneous placement of hydroxylapatite-coated implants and autogenous bone grafts. In: Jensen O.T. (Hrgs.): The Sinus Lift Bone graft. Chicago, Quintessence, S. 129-143
24. BOSCH, C.;MELSEN, B.;VARGERVIK, K. (1998): Importance of the critical size defect in testing boneregeneration materials. J craniofac Surg 9(4): 310-316
25. BOSTROM, M.P.;ASNIS, P. (1998): Transforming growth factor beta in fracture repair. Clin. Orthop. 355:124-131
26. BREKKE, E.;TOTH, J.M. (1998): Principles of Tissue Engineering applied to programmable osteogenesis. J Biomed Mat Res: Applied Biomaterials 43 (4): 380-398
27. BROWN, K.L.;CRUESS, R.L. (1982): Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery: A review. J Bone Joint Surg 64 A: 270-279
28. BUCHARDT, H. (1983): The biology of bone graft repair. Clin Ortho 174: 28-42

29. BUCHARDT, H. (1987): Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18: 187-196
30. BUCHARDT, H. (1989): Biology of cortical bone graft incorporation
In: Aebi M., Regazzoni (Hrgs.): *Bone transplantation*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, S. 23-29
31. BUCUR, C. (2003): Reossifikation von Unterkieferdefekten bei fehlendem Periost mit und ohne Titanfolienabdeckung (Eine tierexperimentelle Studie am Miniaturschwein). *Med Diss Rostock*
32. BUSER, D.;SCHENK, R. (1995): Standortbestimmung der membrangestützten Knochenregeneration in der oralen Implantologie Teil1: Wissenschaftliche Grundlagen. *Implantologie* 3: 209-226
33. BUSH, L.F.;GARBER, C.Z. (1948): The bone bank. *JAMA* S. 588-594
34. CALLAN, D.P.;ROHRER, M.D. (1993): Use of bovine-derived hydroxyapatit in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report. *J Periodontal* 64: 575-582
35. CAMELO, M., NEVINS, M.L., SCHENK, R.K., SIMION, M., RASPERINI, G., LYNCH, S.E., NEVINS, M.: Clinical, radiographic and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss® and Bio-Gide. *Int J Periodont Rest Dent* 18, 321-331 (1998)
36. CANALIS, E.;MC CARTHY, T.;CENTRELLA, M. (1988): Growth factors and regulation of bone remodelling. *J Clin Invest* 81: 277
37. CARTER, D.R. (1984): Mechanical loading histories and cortical bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 36: 19-24
38. COHEN, R.E.;MULLARKY, R.H. (1993): Anorganic bovine bone and bovine bone/collagen composites in regenartive periodontal therapy. *Biol Ther Dent* 9: 3-4
39. COHEN, R.E.;MULLARKY, R.H.;NOBLE, B.;COMEAU, R.L.;NEIDERS, M.E. (1994): Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine bone implantation in rats. *J Periodontal* 65: 1008-1015
40. CZITROM, A.A. (1989): Bone banking in community hospitals. In: Aebi M., Regazzoni P. (Hrgs.): *Bone Transplantation*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, S. 151-154
41. DAMIEN, C.J.;PARSONS, J.R. (1991): Bone graft and bone sustitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2: 187-208
42. DANIELLI, J.F. (1953): *Cytochemistry: A Critical Approach*. Wiley, New York.

43. DONATH, K.;BREUNER, G. (1982): A method of study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sägeschliff-technique. *J. Oral. Path.* 11: 318-326
44. DOTY, S.;SCHOFIELD, B. (1972): Electron microscopic localization of hydrolytic enzymes in osteoclasts. *Histochem J* 4: 245
45. EHMKE, B.;FLEMMING, T.F.: Knochen und Knochenersatzmaterialien zur parodontalen Regeneration. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK). 1998.
46. EITEL, F. (1987): Morphologische Aspekte der Knochenregeneration In: Wolter D., Jungbluth K.-H. (Hrsg.): Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 185. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, S. 11-30
47. EITEL, F.;SCHWEIBERER, L.;SAUR, K.L.T.;KLAPP, F. (1980): Theoretische Grundlagen der Knochentransplantation: Osteogenese und Revaskularisierung als Leistung des Wirtslagers. In: Hierholzer G., Zilch H. (Hrsg.): Transplantatlager und Implantatlager bei verschiedenen Operationsverfahren. Heidelberg, Springer, S. 1-12
48. ENNEKING, W.F.;BURCHARDT, H.;PUHL, J.J.;PIOTROWSKI, G. (1975): Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone transplants. *J Bone Joint Surg* 57: 237-252
49. FETNER, A.E.;HARTIGAN, M.S.;LOW, S.B. (1994): Periodontal repair using PerioGlas in nonhuman primates: Clinical and histologic observations. *Compend. Contin. Educ. Dent.* 15: 932-938
50. FRAME, J.W. (1987): Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 16: 642-655
51. FRIEDENSTEIN, A.J. (1973): Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: Hard tissue growth, repair and remineralization. In: (Hrsg.): Ciba Foundation Symposium 11 (new series) Amsterdam, London-New York, Associated Scientific Publishers, S. 169-182
52. FRIEDMANN, A. (1998a): Osteologiekongress in Venedig vom 14. bis 16. Mai 1998. *Parodontol.* 3: 275-289
53. FROST, H. (1998): Vital biomechanics of bone-grafted dental implants. In: Jensen O.T. (Hrsg.): *The Sinus Bone Graft*. Chicago, Quintessence, Chapter 3, S. 17-29
54. FROST, H.M. (1966): *The bone biodynamics in osteoporosis und osteomalcia*. Thomas, Springfield
55. GARG, A.K. (1999): Grafting materials in repair and restoration. In: Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E. (Hrsg.): *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Illinois, Quintessence publishing Co, S. 83-104

56. GEISTLICH BIOMATERIALS (2006): Produktinformationen zu Bio-Oss® - Patienten- und Anwenderinformationsbroschüren
57. GERNGROSS, H.;BURRI, C.;KINZL, L.;MERK, J.;MÜLLER, G.-W. (1982): Komplikationen an der Entnahmestelle autologer Spongiosatransplantate. Akt Traumatol 12: 146-152
58. GERNREICH, N.C.;GERHARDUS, A.;VELASCO-GARRIDO, M., eds (2003): Knochen- und Knochenersatzmaterialien zur parodontalen Regeneration und zum Knochenaufbau für Implantate. Eine systematische Bewertung der medizinischen Wirksamkeit., ed. Schwartz F.W., Gerhardus A., Köbberling J., Raspe H., Graf von der Schulenburg J.M. Vol. 32., Asgard-Verlag: Sankt Augustin. 40-49.
59. GOMORI, G. (1952): Microscopic Histochemistry. University Press. Chicago
60. GÖTZ, W.;GERBER, T.;MICHEL, B.;LOSSDÖRFER, S.;HENKEL, K.O.;HEIDEMANN, F. (2008) Immunhistochemical characterization of nanocrystalline hydroxylapatite silica gel (NanoBone®) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws Clin. Oral Impl. Res. 2008; 19: 1016-1026
61. GROB, D. (1989): Autologous bone grafts. Problems at the donor site. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
62. GÜNTHER, K.P.;SCHARF, H.P.;PESCH, H.J.;PUHL, W. (1998): Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Orthopädie 27: 105-117
63. HABAL, M.B.;REDDI, A.H. (1992): Different forms of bone grafts. In: Habal M.B., Reddi A.H. (Hrgs.): Bone grafts and bone substitutes. Saunders, Philadelphia,
64. HAEREUS- Kulzer® (seit 2003) Produktinformation zu Ostim® www.ostim-dental.de Patienten- und Anwenderinformationsbroschüren
65. HANCOX, N. (1972): Biology of bone. Cambridge University Press, Cambridge
66. HEGEDUS, Z. (1923): The rebuilding of the alveolar processes by bone transplantation. Dental Cosmos 65: 736
67. HEIMKE, G. (1990): Osseo-integrated implants. CRC Press, Boca Raton
68. HENKEL, K.O.;Gerber, T.;Dietrich, W.;Bienengräber, V. (2004): Neuartiges Knochenaufbaumaterial auf Kalziumphosphatbasis.
69. HERAEUS-KULZER (2003): Produktinformationen zu Ostim®. www.ostim-dental.de Patienten- und Anwenderinformationsbroschüren

70. HIRSCH, J.M.;ERICSSON, I. (1991): Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clin Oral Impl Res* 2: 91-96
71. HOLDEN, C.E.A. (1972): The role of blood supply to soft tissue healing of disphyseal fractures. *J Bone Joint Surg* 54 A: 993-1000
72. HOLLINGER, J.O.;KLEINSCHMIDT, A.O. (1992): Animal models in bone research. In: Habal M.B., REDDI A.H. (Hrgs.): *Bone Grafts and Bone Substitution*. New York, W.B.Saunders, S. 133-146
73. HÜRZELER, M.B. (1997): Versorgung der augmentierten Kieferhöhle mit implantatgetragenen Zahnersatz: Eine tierexperimentelle und klinische Studie. Quintessenz-Verl.-GmbH,
74. INCLAN, A. (1942): The Use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Jt Surg* A24: 81
75. JANDE, S.;BELANGER, L. (1973): The life cycle of the osteocyte. *Clin Orthop* 94: 281
76. JARCHO, M. (1981): Calciumphosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orth.* 157: 259-278
77. JENSEN, O.T.;SHULMAN, L.B.;BLOCK, M.S.;IACONO, V.J. (1998a): Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 13
78. JENSEN, S.S.;AABOE, M.;PINHOLT, E.M.;HJORTING-HANSEN, E.;MEISEN, F.;RUYTER, L.E. (1996): Tissue Reaction and Material Characteristics of four Bone Substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11: 55-66
79. JUNQUEIRA, L.C.;CARNEIRO, J. (1986): Knochen und Knochenverbindung. In: Junqueira L.C., Carneiro J. (Hrgs.): *Histologie*. Springer Verlag, S. 169-195
80. KATTHAGEN, B.D. (1986): Knochenregeneration mit Knochenersatzmitteln. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
81. KIRKER-HEAD, C.A.;GERHART, T.N.;SCHELLING, S.H.;HENNING, G.E.;WANG, E.;HOLTROP, M.E. (1995): Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop*. 318: 222-230
82. KLAWITTER, J.J.;HULBERT, S.F. (1971): Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res* 2: 161-229

83. KLINGE, B.;ALBERIUS, P.;ISAKSSON, S.;JÖNSSON, J. (1992): Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Biomed Mater Res* 2: 161-229
84. KNESE, I.H. (1959): Die Ultrastruktur des Knochengewebes. *Dtsch Med Wochenschrift* 84: 1640-1644
85. KOCH, S. (2003): Sinusaugmentation mit dem xenogenen Knochenersatzmaterial Bio-Oss® in Kombination mit Eigenblut versus Bio-Oss® in Kombination mit autogenem enoralen Knochen. 1, Wissenschaftsverlag Mainz, Aachen, Mainz
86. KOECK, B.;WAGNER, W. (1996): Implantologie. In: Diedrich P., Heidemann D., Horch H.H., Koeck B. (Hrsg.): *Praxis der Zahnheilkunde*. München, Urban & Schwarzenberg, S. 1-218
87. KOHAL, R.J. (1997): Knochenersatzmaterialien in der Parodontologie und zahnärztlichen Implantologie. *Zahnärztl. Mitt.* 8: 56-61
88. KRATZKE, J. (2003): Stimulieren autolog transplantierte Osteoblasten die Reossifikation von Unterkieferdefekten? *Med Diss Rostock*
89. KUNDT, G.;KRENTZ, H. (2003): Medizinische Biometrie - Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung. Mit Prüfungsfragen und Übungsarbeiten. 153-157
90. LANE, J.M. (1995): Bone graft substitutes. *Western J. Med.* 565-567
91. LENTRODT, J. (1988): Geschichtliche Entwicklung der Knochenersatzmaterialien am Kiefer. *Dtsch Zahnärztl Z* 43: 9-15
92. LENZ, S. Persönliche Mitteilung 2009
93. LEVANDER, G. (1934): Über Knochenneubildung bei Knochentransplantation. *Zbl. Chir.* 61: 409
94. LEXER, E. (1924): Die freien Transplantationen. *Neue deutsche Chirurgie* Bd. 26 Stuttgart
95. LILIENFELD-TOAL, H. (1992): Wachstumsfaktoren und Knochenremodelling. In: *Aktuelle Aspekte der Osteologie* 18-23, Springer-Verlag, Heidelberg
96. LORENZETTI, M.;MOZATTI, M.;CAMPANINO, P.P.;VALENTE, G. (1998): Bone augmentation of the inferior floor of the maxillary sinus with autogenous bone or compositegrafts: A histologic-histomorphometric preliminary report. *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.* 13: 69-76
97. LUHR, H.G. (1976): Ein Plattensystem zur Unterkieferkonstruktion einschließlich des Gelenkersatzes. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 31: 747-748

98. LYNCH, S.E.;GENCO, R.J.;MARX, R.E. (1999): tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence books 86-99
99. MAHY, P.;URIST, M. (1988): Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human IL-1 β . Clin Orthop 237: 236-244
100. MARCHAND (1899): Zur Kenntnis der Knochentransplantation. Verh. dtsh. path. Ges. 368
101. MARX, R.E.;GARG, A.K. (1998): Bone graft physiology with use of platelet-rich plasma and hyperbaric oxygen. In: Jensen O.T. (Hrsg.): The Sinus Lift Bone Graft. Chicago, Quintessence, S. 183-189
102. MARX, JR.SC. (1997):The bone lining cell: a distinct phenotyp? Calcif Tissue Int 41:1-5
103. MEIER, J.; WOLF, E.; BIENENGRÄBER, V.(2008): Einsatz des synthetischen nanostrukturierten KAM NanoBone® bei Sinusbodenelevation. Implantologie 16: 301-314
104. MEIER, J.; WOLF, E.:(2007): Umbau des nanokristallinen Knochenersatzmaterials NanoBone® im histologischen und immunhistochemischen Bild
105. MERZ, B.R.;SUTTER, F.;LANG, N. (1997): Implant dentistry - development and current focus. Technol. Health Care 5: 191-197
106. MISCH, C.E.;DIETSCH, F. (1993): Bone-grafting materials in implant dentistry. Implant Dent. 2: 158-167
107. MOHAN, S.;BAYLINK, D.J. (1991): Bone growth factors. Clin. Orthop. 263: 30-48
108. MOY, J.;LUNDGREN, S.;HOLMES, R.E. (1993): Maxillary sinus augmentation: Histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. J Oral Maxillofac Surg 51: 857-862
109. MÜLLER, R.T. (1989): Knochentransplantation und Aids. Z Orthop 127: 527
110. MÜLLER, W. (1993): Knochenregeneration in Theorie und Praxis. Bericht über den Fortbildungskurs vom 7.Juni 1993 im Messe- und Kongresszentrum Basel.Schweiz. Monatsschr. Zahnmed. 103: 1179-1182
111. NASH, T.J.;HOWLETT, C.R.;MARTIN, C.;STEELE, J.;JOHNSON, K.A.;HICKLIN, D.J. (1994): Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone 15: 203-208
112. NEIDTHADT,A.; DR.SEIBL,R. (2006)Vergleich der totalen Porosität und der mittleren Porengröße von Strauman® Bone Ceramic mit ausgewählten,

113. NUSSBAUM, V. (1875): Über die Behandlung unglücklicher Vorkommnisse nach einfachen und komplizierten Beinbrüchen, insbesondere über Knochentransplantationen. *Ärztliches Intelligenzblatt*. In: Graf V., Kerschensteiner, Ranke H., Rothmund V., Schleisse V., Seitz (Hrsg.): München, S. 72-75
114. OLLIER, L. (1867): *Traité experimental et clinique de la régénération des os de la production artificielle du tissu osseux*.
115. OSBORN, J.F.; DONATH, K.: Die enossale Implantation von Hydroxylapatitkeramik und Trikalziumphosphatkeramik: Integration versus Substitution. *Dtsch Zahnärztl Z* 39, 970-976 (1984)
116. PEETZ, M. (1997): Characterization of xenogeneic bone material Boyne, P.J. (ed) *Osseous reconstruction of the maxilla and the mandibel*, Quintessence, S. 87-100
117. PINHOLT, E.M.; BANG, G.; HAANAES, H.R. (1991): Alveolar ridge augmentation in rats by combined hydroxylapatite and osteoconductive material. *Scand. J. Dent. Res.* 99:
118. POLLICK, S.; SHORES, E.C.; HOLMES, R.E.; KRAUT, R.A. (1995): Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 915-922
119. RATEITSCHAK, K.H.; RATEITSCHAK, E.M.; WOLF, H.F. (1989): *Parodontologie*. In: Rateitschak K.H., Wolf H.F. (Hrsg.): *Farbatlanten der Zahnmedizin 1*. Thieme Verlag, S. 1-400
120. REDDI, A.H. (1981): Cell biology and biochemistry of enchondral bone development. *Collagen Res* 1: 209-226
121. REDDI, A.H. (1998): Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin. Orthop.* 355: 66-72
122. REDDI, A.H. (2001): Bone morphogenetic Proteins: From basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 83-A: S1, 1-6
123. REDDI, A.H.; WIENTROUB, S.; MUTHUKUMARAN, N. (1987): Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18: 207-213
124. REFIOR, H.J.; HACKENBROCH, M.; WIRTH, C.J. (1998): Knochenersatzstoffe. *Orthopädie* 2: 71-79

125. RENOLDS, J. (1968): Inhibition by calcitonin of bone resorption induced in vitro by vitamin. A. Proc R Soc Lond (Biol) 170: 61
126. ROBERTS, W.E.;GARETTO, L.P.;DECASTRO, R.A. (1989): Remodeling of devitalized bone threatens periosteal margin integrity of endosseous titanium implants with threaded or smooth surface: Indications for provisional loading and axillary directed occlusions. J Ind Dent Assoc 68: 19-24
127. ROBERTS, W.E.;TURLEY, P.K.;BREZNIAK, N.;FELDER, P.J. (1987): Bone physiology and metabolism. J Calif Dent Assoc 15: 54-61
128. ROMEIS, B. (1989): Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg, München
129. SACHS, L. (1999): Angewandte Statistik. Springer, Berlin, Heidelberg
130. SAILER, H.F. (1980): Die Knochenersatzplastik des Unterkiefers durch identische allogene, gefriergetrocknete Unterkiefertransplantate im Tierversuch. Dtsch Zahnärztl Z 35: 11-14
131. SALTIKOV, S. (1909): Über Replantation lebender Knochen. Beitr. path. Anat. 45: 440
132. SCHENK, R.;WILLENEGGER, H. (1964): Zur Histologie der primären Knochenheilung. Langenbecks Arch Chir 308: 440-452
133. SCHENK, R.K. (1978): Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau. Unfallheilkunde 82: 219-227
134. SCHENK, R.K. (1987): Cytodynamics and histodynamics of primary bone repair. In: Lane J.M. (Hrgs.): Fracture healing. Churchill Livingstone, New York: 23-32
135. SCHENK, R.K. (1991): Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. In: Huggler A.H., Kuner E.H. (Hrgs.): Aktueller Stand beim Knochenersatz. Hefte der Unfallheilkunde. Berlin, Springer, S. 23-35
136. SCHENK, R.K.;BUSER, D.;HARDWICK, W.R.;DAHLIN, C. (1994): Healing pattern of bone regeneration membrane protected defects: A histologic study in the canine mandibel. Int. J. Oral Maxillafac. Implants 9: 13-29
137. SCHIE, U. (2007) Reossifikation von Unterkieferdefekten nach Implantation im Sinterverfahren hergestellter Knochenersatzmaterialien auf Kalziumphosphatbasis. Med Diss Rostock
138. SCHLEGEL, A.K. (1996): Knochenersatzmaterial Bio-Oss. Schweiz Monatsschr Zahnmed 106 (2) 141-9(1)

139. SCHLEGEL, K.A.;NEUKAM, F.W. (2002): Augmentationen, Knochenersatzmaterialien, Membranen. In: Reichert P.A., Hausamen J.-E., Becker J., Neukam F.W., Schliephake H., Schmelzeisen R. (Hrsg.): Curriculum Zahnärztliche Chirurgie Band 1; Kapitel 16.9. Quintessenz-Verlag-GmbH, S. 443-459
140. SCHLICKWEI, W.;PAUL, C. (1991): Experimentelle Untersuchung zum Knochenersatz mit bovinem Apatit. In: Huggler A.H., Kuner E.H. (Hrsg.): Aktueller Stand beim Knochenersatz. Hefte zur Unfallheilkunde. Springer, Berliner, S. 59-69
141. SCHMITT, J.M.;BUCK, D.C.;JOH, S.P.;LYNCH, S.P.;HOLLINGER, J.O. (1997): Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. J Periodontal 68: 1043-1053
142. SCHNEIDER,S. (2009) Ergebnisse der noch unpublizierten Promotionschrift, Persönliche Mitteilung
143. SCHWEIBERER, L. (1970): Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und mit denaturierter Knochengrundsubstanz. Hefte Unfallheilkunde 103
144. SCHWEIBERER, L. (1971): Der heutige Stand der Knochentransplantation. Chirurg 42: 252-257
145. SIMONDS, R.J.;HOLMBERG, S.D.;HURWITZ, R.L. (1992): Transmission of human immunodeficiency virus typ 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 326: 726-732
146. SPALLEK, H.;DESCHNER, J. (1995): Glossar der Grundbegriffe für die Praxis. Knochentransplantation und Implantation. Parodontol. 4: 331-336
147. SPECTOR, M. (1994): Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. Clin Plast Surg 21: 437-444
148. SPOM, M.B.;ROBERT, A.B. (1988): Peptide growth factors are multifunctional. Nature 332: 217-219
149. SSCDocument (2000): (Scientific Steering Coimmittee) Opinion Oral Exposure of Humans to the BSE Agent Infective Dose and Species Barrier. Meeting 13-14 April
150. STANCARI, F.;ZANNI, B.;BERNARDI, F.;CALANDRIELLO, M.;SALVATORELLI, G. (2000): Anwendung von kopolymerisierten Polylactid-Polyglycolidsäuren als Knochenersatzmaterialien. Quintessence 51: 47-52
151. TRIPPEL, S.B.;COUTIS, T.A.;EINHORN, G.R.;MUNDY;ROSENFELD, R.G. (1996): Growth factors as therapeutic agents. J. Bone Joint Surg. Am. 78: 1272-1286
152. URIST, M.R. (1965): Bone formation by autoinduction. Science 150: 893-899

153. URIST, M.R., ed. Fundamental and clinical bone physiology. 1980: Lippincott, Philadelphia.
154. URIST, M.R.;DELANGE, R.J.;FINERMAN, G.A. (1983): Bone cell differentiation and growth factors. Science 220: 680-686
155. VAUGHAN, J. (1975): The physiology of bone. Clarendon, Oxford
156. WALLACE, S.S.;FROUM, S.J.;TARNOW, D.P. (1996): Histologische Untersuchung eines Verfahrens der Sinusanhebung: Ein klinischer Bericht. Int J Parodontol & Rest Zahnheilkd 16: 47-51
157. WALTER, P.V. (1821): Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. J Chir Augenheilk S. 571
158. WEIBRICH,G.; TRETTIN , R.; GNOTH, S.H.; GÖTZ, H.; DUSCHNER, H.; WAGNER, W. (2000) Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien mittels Gasadsorption. Mund Kiefer Gesichtschir.;4(3):148-152.
159. WEIß, P.P.D.m., Dr. med.dent. (1966): Knochen-, Knorpel- und Zahn-Knochen transplantation in der Mundhöhle. Eine tierexperimentelle Studie. Carl Hanser Verlag, München
160. WHITE, E.;SHORES, E.C. (1986): Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. Dent Clin North Am 30: 49-67
161. WIKIPEDIA <http://wikipedia.Org/wiki/zahnformel> (22.09.2008)
162. WIKIPEDIA <http://de.wikipedia.org/wiki/Immunhistochemie> (19.04.2009)
163. WILLIAMS, D.F. (1987): Definitions in Biomaterials. Progress in biomedical Engineering. 4, Elsevier, Amsterdam
164. WILSON, J.;LOW, S.B. (1992): Bioactive ceramics for periodontal treatment: Comparative studies in the Patu monkey. J. Appl. Biomater. 3: 123-129
165. WOLF, B.: Persönliche Mitteilung 2009
166. WOZNEY, J.M. (1995): The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. J. Periodontol. 66: 506-510
167. WOZNEY, J.M.;ROSEN, V. (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin. Orthop. 346: 26-37

168. YOUNG, R.W. (1962): Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats. *J Cell Biol.* 14: 357-370

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. med. V. Bienenraber bin ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine umfangreiche Betreuung zu großem Dank verpflichtet. Ein weiterer Dank gilt Frau Dip. Biol. Dr. Lenz für ihre intensive Betreuung, insbesondere bei der histomorphometrischen Auswertung.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. K.- O. Henkel für die Durchführung der Operationen sowie Frau D. Gütschow, Frau S. Niemierski, und Herrn Wolter für die Durchführung der histologischen Aufarbeitung der Proben. Für die Hilfe bei der bildlichen Dokumentation möchte ich mich sehr bei Frau Kindermann bedanken.

Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Nachsorge und Haltung der Tiere danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät (Leiterin: Frau Prof. Dr. B. Vollmer). Zudem gilt mein Dank für die Überwachung der Operationen dem betreuenden Tierarzt, Herrn Dr. H. Rohmann.

Die Röntgenbilder wurden mit Unterstützung des Institutes für Diagnostische und Interventionelle Radiologie erstellt und beurteilt. Speziell danke ich Herrn Oberarzt Dr. V. Hingst und seinen Mitarbeiterinnen.

Herrn Dipl. Ing. G. Fulda vom Elektronenmikroskopischen Zentrum bin ich für die ausführlichen Anwendungshinweise des Computerprogramm Analysis® zu Dank verpflichtet.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Ing. habil. G. Kundt, Institut für Medizinische Statistik und Biometrie, für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Analyse der Untersuchungsergebnisse.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Götz und seinem Forschungsteam der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität-Bonn (Bereich Oralbiologische Grundlagenforschung) für die zur Verfügungstellung der histochemischen Präparate und die Möglichkeit ihrer Verwendung in dieser Arbeit danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, 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 fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als der angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.

Alle fremden Quellen, die wörtlich oder inhaltlich übernommen wurden, sind an entsprechenden Stellen kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner in-oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock übertrage ich das Recht, diese Dissertation zu vervielfältigen und zu vertreiben.

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vergleich der spezifischen Oberfläche von ausgewählten KEM (nach WEIBRICH et. al. 2000)	28
Abbildung 2 Humaner Knochen mit kleinen und kompakten natürlichen Apatitkristallen (TEM 100'000x)	29
Abbildung 3 Bio-Oss® mit kleinen und kompakten Nanokristallen ähnlich humanem Knochen (TEM 100'000x)	29
Abbildung 4 Schematische Darstellung der knöchernen Integration boviner Partikel (nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)	30
Abbildung 5 Augmentation eines Kieferknochendefektes mit Bio-Oss® (nach GEISTLICH BIOMATERIALS 2006)	31
Abbildung 6 Zahnformel Milchgebiss	36
Abbildung 7 Zahnformel adultes Gebiss	36
Abbildung 8 Unterkiefer eines Schweins mit Zahndurchbruchzeiten (schematische Darstellung nach BRIEDERMANN 1995)	36
Abbildung 9 Narkotisiertes Miniaturschwein, Markierung zur Defektsetzung im Bereich der anterioren Mandibula	37
Abbildung 10 Operationssitus: Markierung der Defektgröße durch Bohrungen mittels Rosenbohrer	38
Abbildung 11 Operationssitus: „critical size defect“ (>5 cm ³) im anterioren Unterkiefer	38
Abbildung 12 Herausgetrennter Knochenblock	38
Abbildung 13 Teilansicht des rechten Unterkiefers eines Minipigs 5 Wochen nach Applikation von Bio-Oss® mit deutlich erkennbarer Defektregion (Pfeile) (O3)	39
Abbildung 14 Positionierhilfe zur Lagerung der Minipigs beim Röntgen nach BUCUR (2003)	41

- Abbildung 15** *Postmortale Röntgenaufnahme beider Unterkieferhälften im seitlichen Strahlengang nach Applikation von Bio-Oss® (Versuchstier O2)* 41
- Abbildung 16** *Postoperative Röntgenaufnahme mittels Unterkieferlateraltechnik nach Applikation von Bio-Oss® (Versuchstier O3 links)* 41
- Abbildung 17** *Herausgetrennte Knochenstücke, die in kompatible Schnittsegmente (links) gesägt werden* 42
- Abbildung 18** *Eingescanntes entkalktes Präparat (1200dpi) 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® (Gr. O), HE- Färbung, Vergr.3x* 45
- Abbildung 19** *Präparat nach Bearbeitung mit Adobe Photoshop, HE-Färbung, Vergr. 3x* 45
- Abbildung 20** *Befund 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® (O2). Pfeile markieren den makroskopisch erkennbaren Restdefekt. (linker Unterkiefer, bukkale Ansicht)* 49
- Abbildung 21** *Befund 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® (T2); makroskopisch guter Knochendurchbau in der Defektregion. Pfeile markieren den Restdefekt. (linker Unterkiefer, bukkale Ansicht)* 49
- Abbildung 22** *Postoperative Röntgenaufnahme (Lateraltechnik, linker Unterkiefer dargestellt) nach Bio-Oss®-Implantation (O2), Defektlänge mit Pfeilen markiert)* 52
- Abbildung 23** *Röntgenaufnahme 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (O 3; UK geteilt, seitlicher Strahlengang)* 52
- Abbildung 24** *Röntgenaufnahme 8 Monaten nach Bio-Oss®-Implantation (T 1) UK geteilt, seitlicher Strahlengang)* 52
- Abbildung 25** *Übersicht: Querschnitt durch die Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O) mit neu gebildetem spongiösem Knochen und relativ breiter Kortikaliszone. Zahlreiche integrierte Bio-Oss®-Partikel (Pfeil) erkennbar; Ausgangsdefekgröße noch abgrenzbar,(Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.:3x)* 54

- Abbildung 26** Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O).
Knochenbälckchen formieren sich an der Oberfläche einzelner KAM-Partikel (Pfeil). (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.: 100 x) **55**
- Abbildung 27** Defektregion 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppe O) Biomaterial (Pfeil) eingebettet in entzündlich infiltriertes Bindegewebe. Der neu gebildete Knochen hat sich direkt meist ohne trennenden Bindegewebsaum an die KAM-Partikel angelagert. (Trenn-Dünnschliff, Giemsa-Toluidin, Originalvergr.: 160 x) **55**
- Abbildung 28** Übersicht: Querschnitt der Defektregion 8 Monate nach der Bio-Oss®-Implantation (Gruppe T): knöchern integrierte KAM-Partikel (Pfeil schwarz) und Neuformation des Mandibularkanals (Pfeil weiß) (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 3x) **56**
- Abbildung 29** Gut osteointegrierte Bio-Oss®-Partikel (Pfeil) in spongiösen Knochen 8 Monate p. i., (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 80x) **57**
- Abbildung 30** Ausschnitt mit gutem Reossifikationsgrad 8 Monate p. i.; Pfeile markieren Restpartikel (entkalkter Paraffinschnitt, HE-Färbung, Originalvergr.: 320x) **57**
- Abbildung 31** Graphische Darstellung: Gruppenvergleich der semiquantitativ histologisch ermittelten Einzelparameter aus Tabelle 10 (O: 5 Wochen; T: 8 Monate p. i. von Bio-Oss®) **61**
- Abbildung 32** Graphische Darstellung: Einzelparameter aller Knochendefekte (Mittelwerte) 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) **62**
- Abbildung 33** Graphische Darstellung: Einzelparameter für jeden Knochendefekt (Mittelwerte) 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss® (Gruppe T) **63**
- Abbildung 34** Histomorphometrischer Vergleich der flächenbezogenen Knochenbildung innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Gruppenmittelwerte, Angabe in %) **68**
- Abbildung 35** 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Tier O3) **72**
- Abbildung 36** 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Tier T1) **72**

Abbildung 37 5 Wochen p. i. von NanoBone® (Tier P1)	72
Abbildung 38 8 Monate p. i. von NanoBone® (Tier S1)	72
Abbildung 39 5 Wochen p. i. von Ostim® (Tier N2)	72
Abbildung 40 8 Monate p. i. von Ostim® (Tier R2)	72
Abbildung 41 Bio-Oss®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i. (Gruppe O)	73
Abbildung 42 Bio-Oss®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i. (Gruppe T)	73
Abbildung 43 Ostim®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i. (Gruppe N)	74
Abbildung 44 Ostim®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i. (Gruppe R)	74
Abbildung 45 NanoBone®: Röntgenaufnahme 5 Wochen p. i. (Gruppe P)	74
Abbildung 46 NanoBone®: Röntgenaufnahme 8 Monate p. i. (Gruppe S)	74
Abbildung 47 Histologischer Befund 8 Monate nach Implantation von NanoBone® mit osteointegrierten KAM-Partikeln (Originalvergr.:40x)	76
Abbildung 48 Histologischer Befund 8 Monate nach Implantation von Ostim® (Gruppe R) mit neu gebildetem spöngiösen Knochen und hämatopoetischen aktiven Markräumen (Originalvergr.:12,5x)	76
Abbildung 49 Osteoblastensäume am neugebildeten Knochen (k) mit positiver AP-Reaktion (Pfeile), eingeschlossener Bio-Oss®-Partikel (b) 5 Wochen p. i.	78
Abbildung 50 NanoBone®-Partikel (n) mit positiver AP-Reaktion im Inneren (Pfeil weiß) und seiner Umgebung (Pfeil schwarz) 5 Wochen p. i. (Originalvergr.:200x)	79
Abbildung 51 Bio-Oss®-Partikel (b) 5 Wochen p. i., TRAP-positive Zellen an der Oberfläche (Pfeil), TRAP-Reaktion	80
Abbildung 52 Zu 2/3 ossär eingeschlossener NanoBone®-Partikel (n) mit TRAP positiven Osteoklasten (Pfeile) an seiner Oberfläche 5 Wochen p. i. (Orginalvergr.: 20x)	81
Abbildung 53 Areale mit fortgeschrittener Knochenneubildung (k) und granulären Resten von Bio-Oss® (b) 5 Wochen p. i., an der Oberfläche der Knochen trabekel zahlreiche BMP2-postive Osteoblasten (Pfeile)	82

- Abbildung 54** *Nachweis erhöhter BMP 2-Aktivität 5 Wochen p. i. von NanoBone® (n): Im Bereich der Osteoblastensäume und der KAM-Partikel (marginal: Pfeil weiß; zentral: Pfeil schwarz; Originalvergr.:10x)* **83**
- Abbildung 55** *Graphische Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: Knochenneubildung 5 Wochen und 8 Monate nach KAM-Implantation (Gruppenmittelwerte) (Angaben für Ostim® und NanoBone® nach Schneider 2009 und Albrecht 2008)* **87**
- Abbildung 56** *Graphische Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: KAM-Anteile 5 Wochen und 8 Monate p. i. (Gruppenmittelwerte) ohne Berücksichtigung der bei der Aufarbeitung evtl. herausgefallenen KAM-Partikel (Angaben für Ostim® und NanoBone® nach Schneider 2009 und Albrecht 2008)* **88**
- Abbildung 57** *Klinischer Befund der Gruppe N 5 - Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **M**
- Abbildung 58** *Klinischer Befund der Gruppe O - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **N**
- Abbildung 59** *Klinischer Befund der Gruppe P - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **O**
- Abbildung 60** *Klinischer Befund der Gruppe R und S - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **P**
- Abbildung 61** *Klinischer Befund der Gruppe T - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **Q**
- Abbildung 62** *Klinischer Befund der Gruppe T - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers* **R**
- Abbildung 63** *Röntgenologischer Befund der Gruppe N nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links* **S**
- Abbildung 64** *Röntgenologischer Befund der Gruppe O nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links* **T**

- Abbildung 65** *Röntgenologischer Befund der Gruppe P nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links* **U**
- Abbildung 66** *Röntgenologischer Befund der Gruppe R nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links* **V**
- Abbildung 67** *Röntgenologischer Befund der Gruppe T nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links* **W**
- Abbildung 68** *Röntgenologischer Befund der Gruppe S nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links* **X**
- Abbildung 69** *Histologische Querschnitte ausgewählter Präparate aller Vergleichsgruppen; Präparate 1) und 2) NanoBone® (Dünnschliff, Toluidinblau, 3x); Präparate 3) und 4) Bio-Oss® (HE-Färbung und Toluidinblau 3x); Präparate 5) und 6) Ostim® (HE-Färbung und Toluidinblau 3x)* **Y**
- Abbildung 70** *Präparat der Kontrollgruppe ohne Applikation eines Biomaterials mit bindegewebiger Defektüberbrückung und beginnender Knochenbildung vom Rand her; der Mandibularkanal beginnt sich neu zu formieren (KRATZKE 2003)* **Z**
- Abbildung 71** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von Ostim® (Gruppe N) (Angaben in mm²; n=6)* **EE**
- Abbildung 72** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) (Angaben in mm²; n=6)* **EE**
- Abbildung 73** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von NanoBone® (Gruppe P). (Angaben in mm²; n=6)* **EE**
- Abbildung 74** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von Ostim® (Gruppe R). (Angaben in mm²; n=6)* **FF**
- Abbildung 75** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppe T). (Angaben in mm²; n=4)* **FF**
- Abbildung 76** *Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von NanoBone® (Gruppe S). (Angaben in mm²; n=6)* **FF**

Abbildung 77 *Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von Ostim® (Gruppen N und R; Angabe in %)* **GG**

Abbildung 78 *Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppen O und T; Angabe in %)* **GG**

Abbildung 79 *Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von NanoBone® (Gruppen P und S; Angabe in %)* **GG**

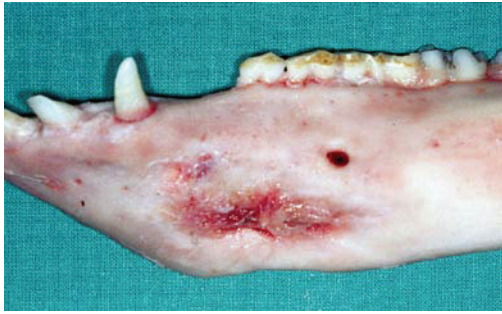
IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Nomenklatur der Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien (nach EHMKE & FLEMMING 1998, HÜRZELER 1997, KOECK & WAGNER 1996, RATEITSCHAK et al. 1989, SPALLEK & DESCHNER 1995)</i>	9
Tabelle 2 <i>Eigenschaften von Spongiosa, Bio-Oss® und gesintertes HA im Vergleich (SPECTOR 1994)</i>	28
Tabelle 3 <i>Versuchsaufbau</i>	35
Tabelle 4 <i>Vom Softwareprogramm Analysis® erstellte Tabelle der histomorphometrischen Messwerte, ausgegeben für das Präparat der Gruppe O (O1-7_5)</i>	45
Tabelle 5 <i>Klinisch ermittelte Defektgröße der Gruppe O - 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss®*</i>	49
Tabelle 6 <i>Klinisch ermittelte Defektgröße der Gruppe T - 8 Monate nach Implantation von Bio-Oss®*</i>	49
Tabelle 7 <i>Darstellung der klinisch ermittelten Defektgrößen</i>	50
Tabelle 8 <i>Semiquantitative histologische Untersuchung von Unterkieferdefekten kritischer Größe bei Miniaturschweinen- 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O)*</i>	59
Tabelle 9 <i>Semiquantitative histologische Untersuchung von Unterkieferdefekten kritischer Größe bei Miniaturschweinen- 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppe T)*</i>	59
Tabelle 10 <i>Semiquantitative histologische Befunde: Vergleich der Gruppenmittelwerte 5 Wochen (O) und 8 Monate (T) p. i. von Bio-Oss® in Knochendefekte kritischer Größe bei Miniaturschweinen *</i>	60
Tabelle 11 <i>Klinisch ermittelte Querschnittsflächen der Ausgangsdefekte 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	64
Tabelle 12 <i>Histomorphometrisch ermittelte Querschnittsflächen der Restdefekte 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	65
Tabelle 13 <i>Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile von Bio-Oss®-Anteilen 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	66

Tabelle 14 <i>Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile von Bindegewebs-Anteilen 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	67
Tabelle 15 <i>Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile neu gebildeten Knochengewebes 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®- Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	67
Tabelle 16 <i>Histomorphometrisch ermittelte Flächenanteile der erweiterten Markräume 5 Wochen bzw. 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation (Mittelwerte pro Defektregion)</i>	68
Tabelle 17 <i>Darstellung der histomorphometrischen Untersuchungsergebnisse: Knochenneubildung und KAM-Anteile in Unterkieferdefekte kritischer Größe bei Miniaturschweinen 5 Wochen und 8 Monate nach KAM-Implantation (Gruppenmittelwerte)</i>	86
Tabelle 18 <i>Statistische Signifikanzprüfung: Differenzen ausgewählter Parameter 5 Wochen und 8 Monate nach Implantation unterschiedlicher KAM in Unterkieferdefekte kritischer Größe (Angabe der asymptotischen Signifikanz)</i>	90
Tabelle 19 <i>Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der residuellen KAM-Anteile 5 Wochen p. i. (Angabe in mm²)</i>	AA
Tabelle 20 <i>Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der residuellen KAM-Anteile 8 Monate p. i (Angabe in mm²)</i>	AA
Tabelle 21 <i>Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der Anteile neu gebildeten Knochens 5 Wochen p. i. (Angabe in mm²)</i>	BB
Tabelle 22 <i>Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der Anteile neu gebildeten Knochens 8 Monate p. i. (Angabe in mm²)</i>	BB
Tabelle 23 <i>Histomorphometrische Gruppenmittelwert für die Parameter: Restdefektgröße, Knochenneubildung und Biomaterialreste 5 Wochen und 8 Monate p. i. (Angaben in mm²)</i>	CC
Tabelle 24 <i>Histomorphometrische Gruppenmittelwerte sämtlicher Parameter aller Tiere 5 Wochen p. i.</i>	DD

Tabelle 25 <i>Histomorphometrische Gruppenmittelwerte sämtlicher Parameter aller Tiere 8 Monate p. i.</i>	DD
Tabelle 26 <i>Histomorphometrie: Ergebnisse der deskriptiven Statistik sämtlicher Parameter 5 Wochen p. i.</i>	HH
Tabelle 27 <i>Histomorphometrie: Ergebnisse der deskriptiven Statistik sämtlicher Parameter 8 Monate p. i.</i>	HH
Tabelle 28 <i>Darstellung histomorphometrischer Ergebnisse unter Berücksichtigung der Artefakte – Versuchsergebnisse 5 Wochen bzw. 8 Monate p. i. im Rahmen der Forschungsgruppe</i>	HH

Anhang



N1 a



N1 b



N2 a



N2 b



N3 a

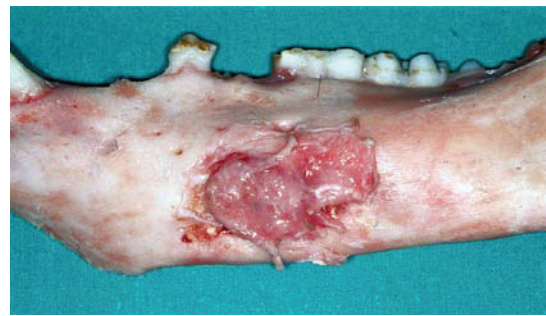


N3 b

Abbildung 57 Klinischer Befund der Gruppe N 5 - Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers



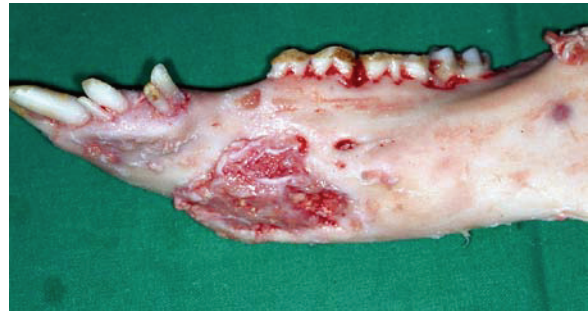
O1 a



O1 b



O2 a



O2 b



O3 a



O3 b

Abbildung 58 *Klinischer Befund der Gruppe O - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers*



P1 a



P1 b



P2 a



P2 b



P3 a



P3 b

Abbildung 59 *Klinischer Befund der Gruppe P - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers*



R2 a



R2 b



S1 a



S1 b



S1 c

Abbildung 60 *Klinischer Befund der Gruppe R und S - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers*



T2 a



T2 b



T2 c



T2 d



T2 e



T2 f

Abbildung 61 Klinischer Befund der Gruppe T - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers



T3 a



T3 b



T3 c



T3 d



T3 e

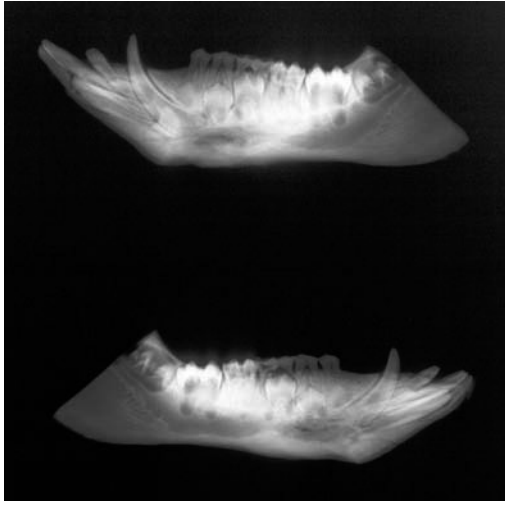


T3 f

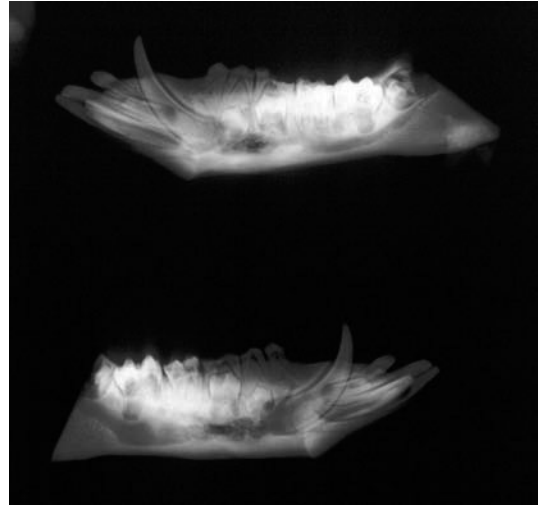


T3 g

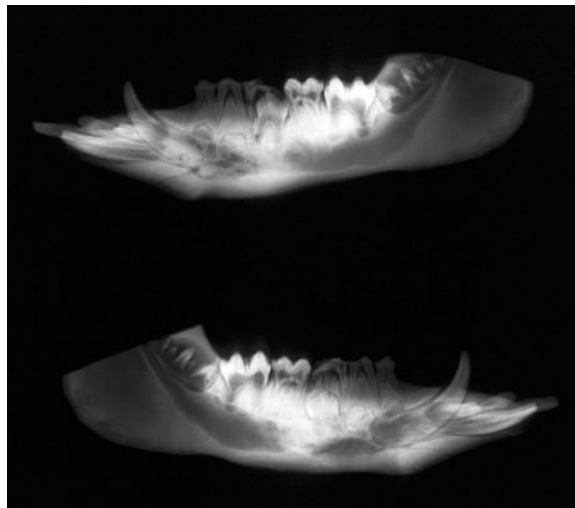
Abbildung 62 Klinischer Befund der Gruppe T - 5 Wochen nach Biomaterialapplikation und medianer Durchtrennung des Unterkiefers



N1

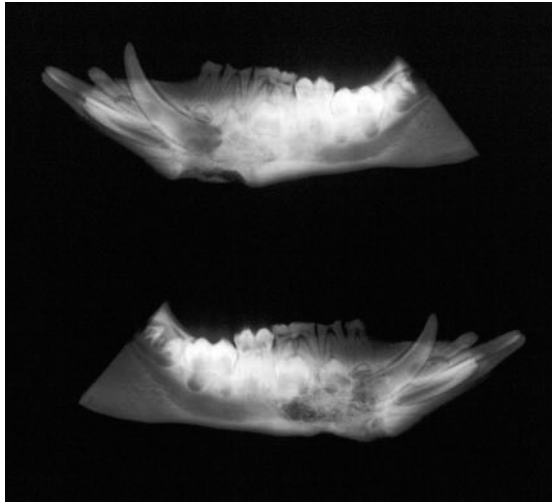


N2

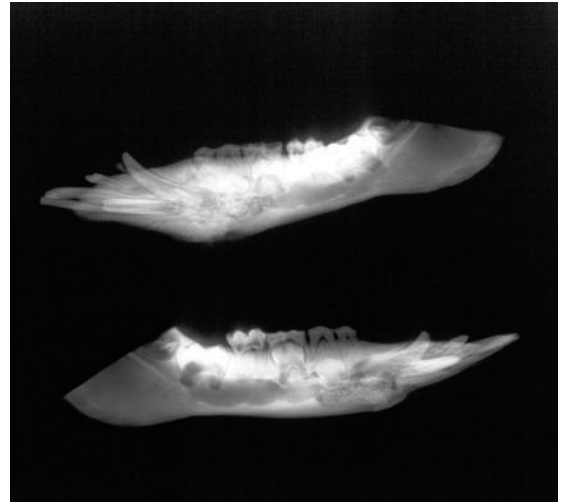


N3

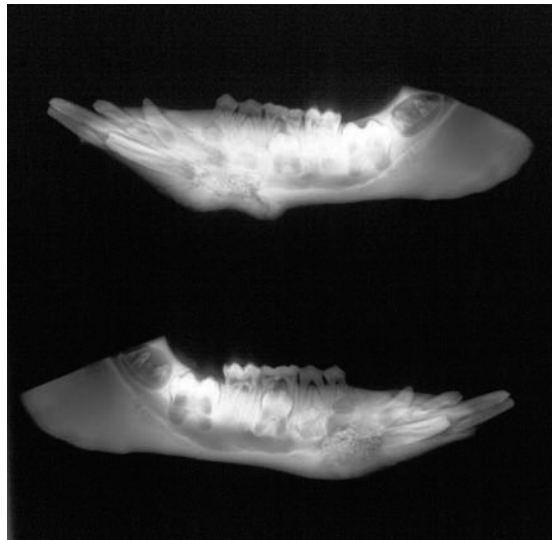
Abbildung 63 Röntgenologischer Befund der Gruppe N nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links



O1

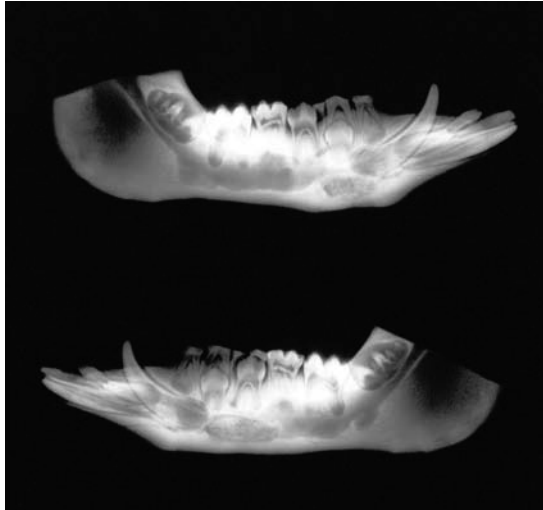


O2

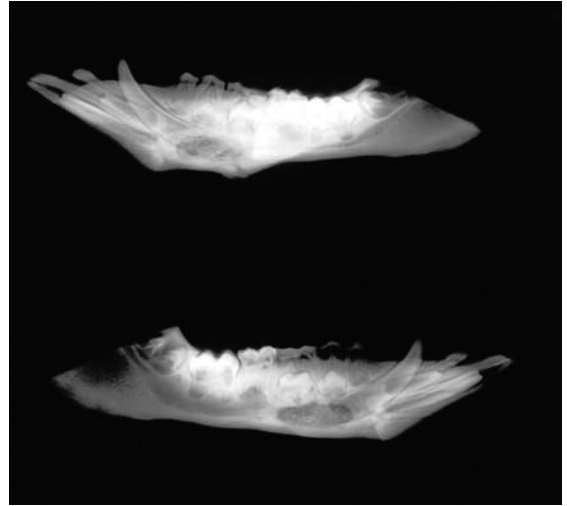


O3

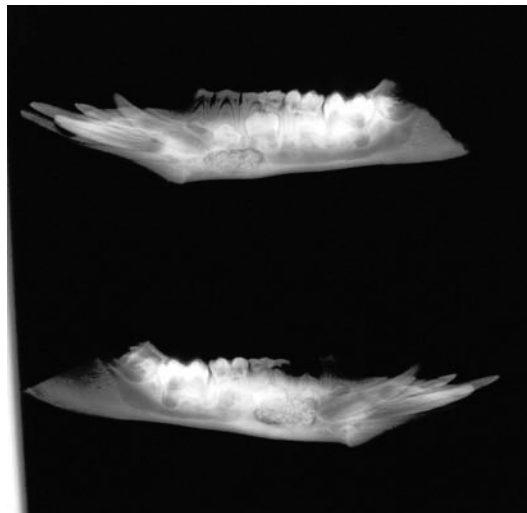
Abbildung 64 Röntgenologischer Befund der Gruppe O nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links



P1

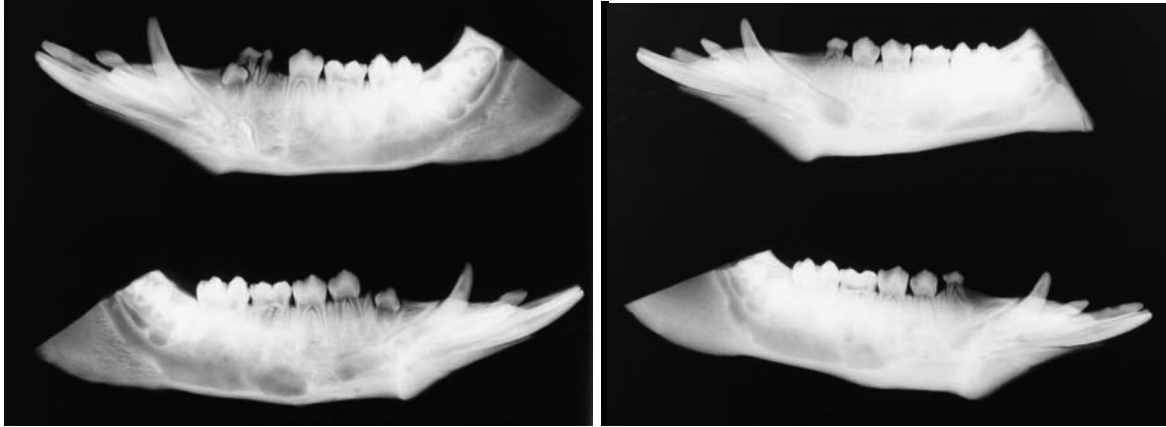


P2



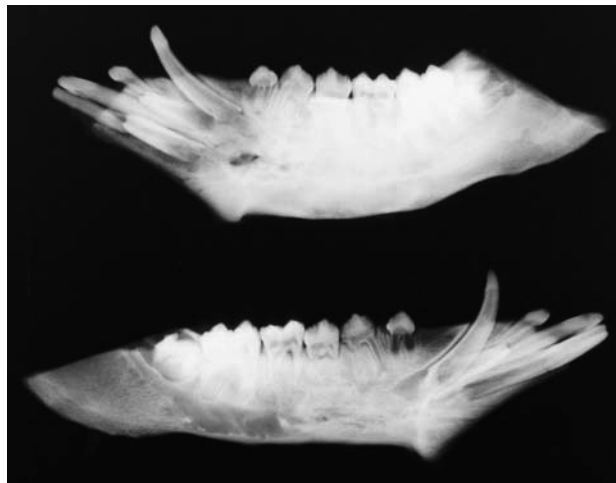
P3

Abbildung 65 Röntgenologischer Befund der Gruppe P nach 5 Wochen; Darstellung jeweils rechts und links



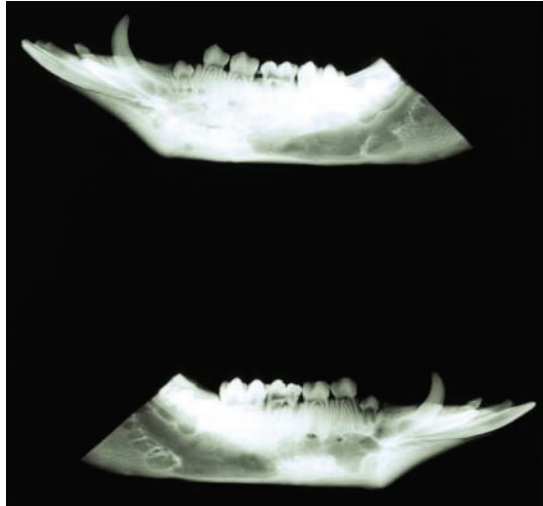
R1

R2

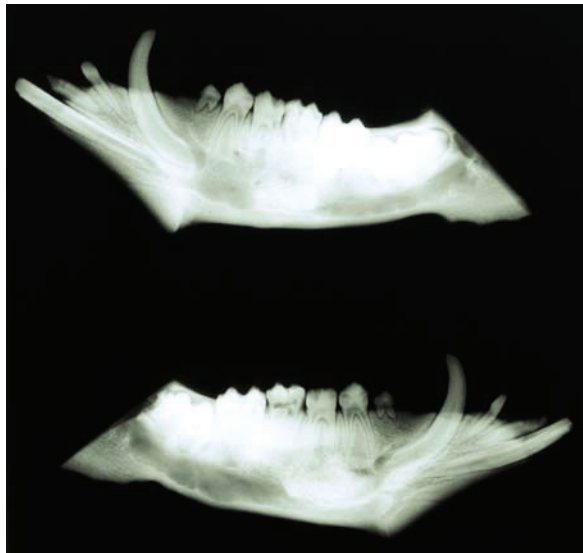


R3

Abbildung 66 Röntgenologischer Befund der Gruppe R nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links

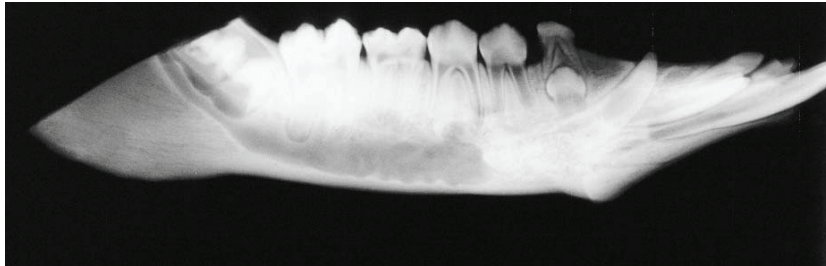


T2

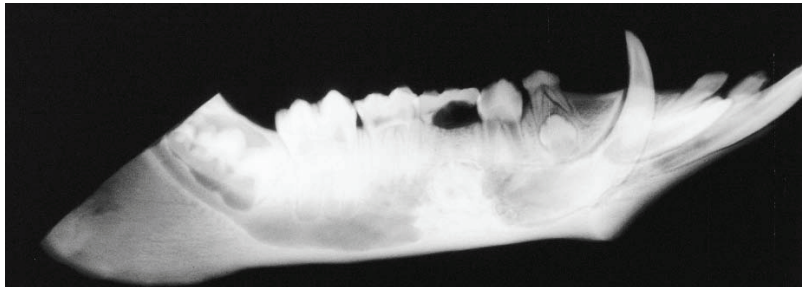


T3

Abbildung 67 Röntgenologischer Befund der Gruppe T nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links



S1

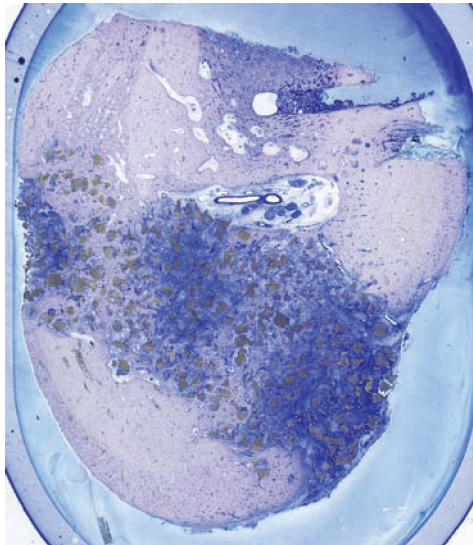


S1

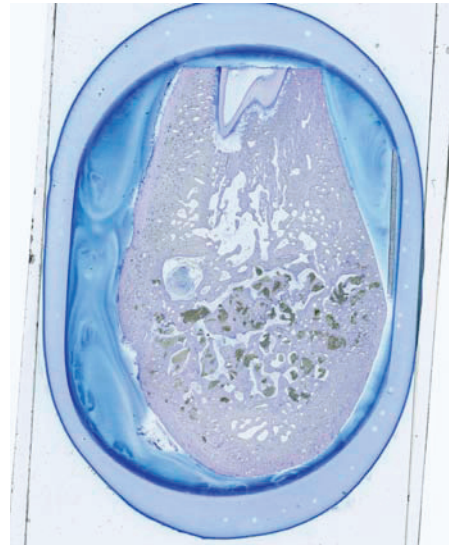


S3

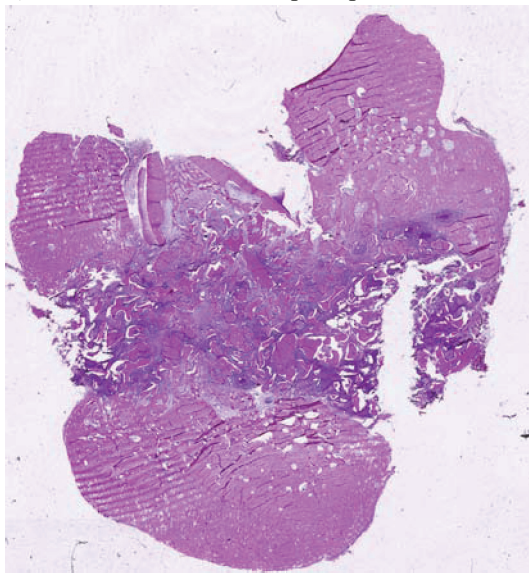
Abbildung 68 Röntgenologischer Befund der Gruppe S nach 8 Monaten; Darstellung jeweils rechts und links



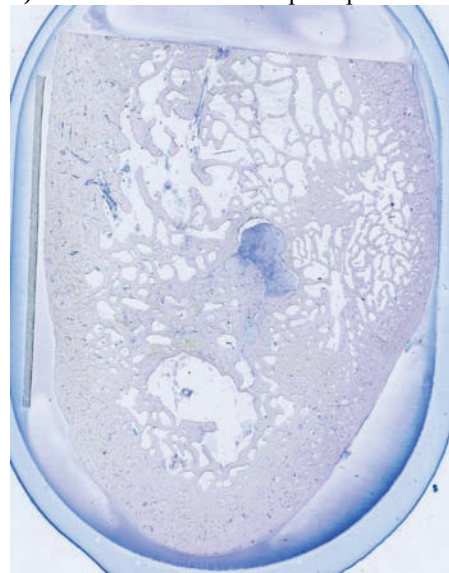
1) NanoBone® 5 Wochen postoperativ



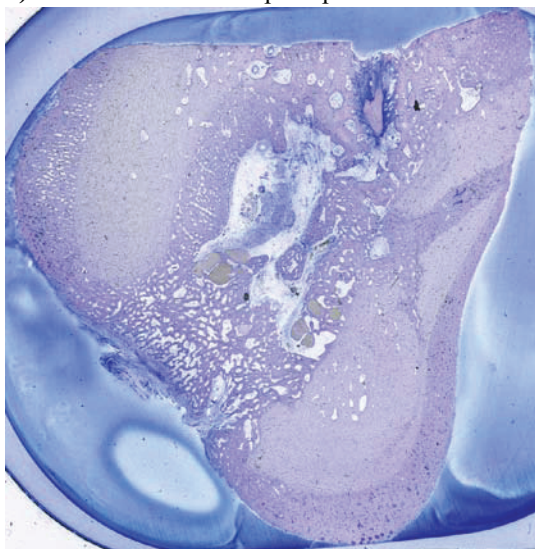
2) NanoBone® 8 Monate postoperativ



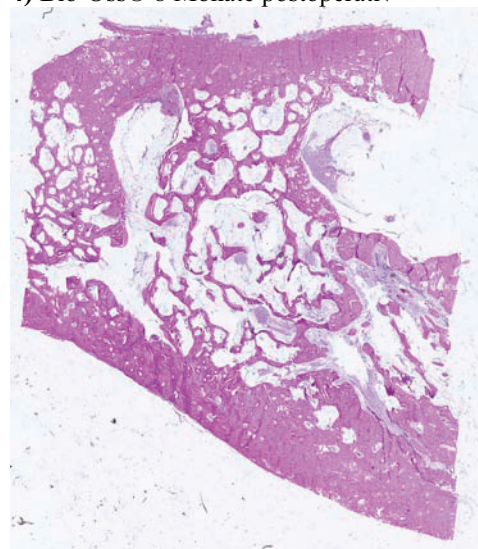
3) Bio-Oss® 5 Wochen postoperativ



4) Bio-Oss® 8 Monate postoperativ



5) Ostim® 5 Wochen postoperativ



6) Ostim® 8 Monate postoperativ

Abbildung 69 Histologische Querschnitte ausgewählter Präparate aller Vergleichsgruppen; Präparate 1) und 2) NanoBone® (Dünnschliff, Toluidinblau, 3x); Präparate 3) und 4) Bio-Oss® (HE-Färbung und Toluidinblau 3x); Präparate 5) und 6) Ostim® (HE-Färbung und Toluidinblau 3x)

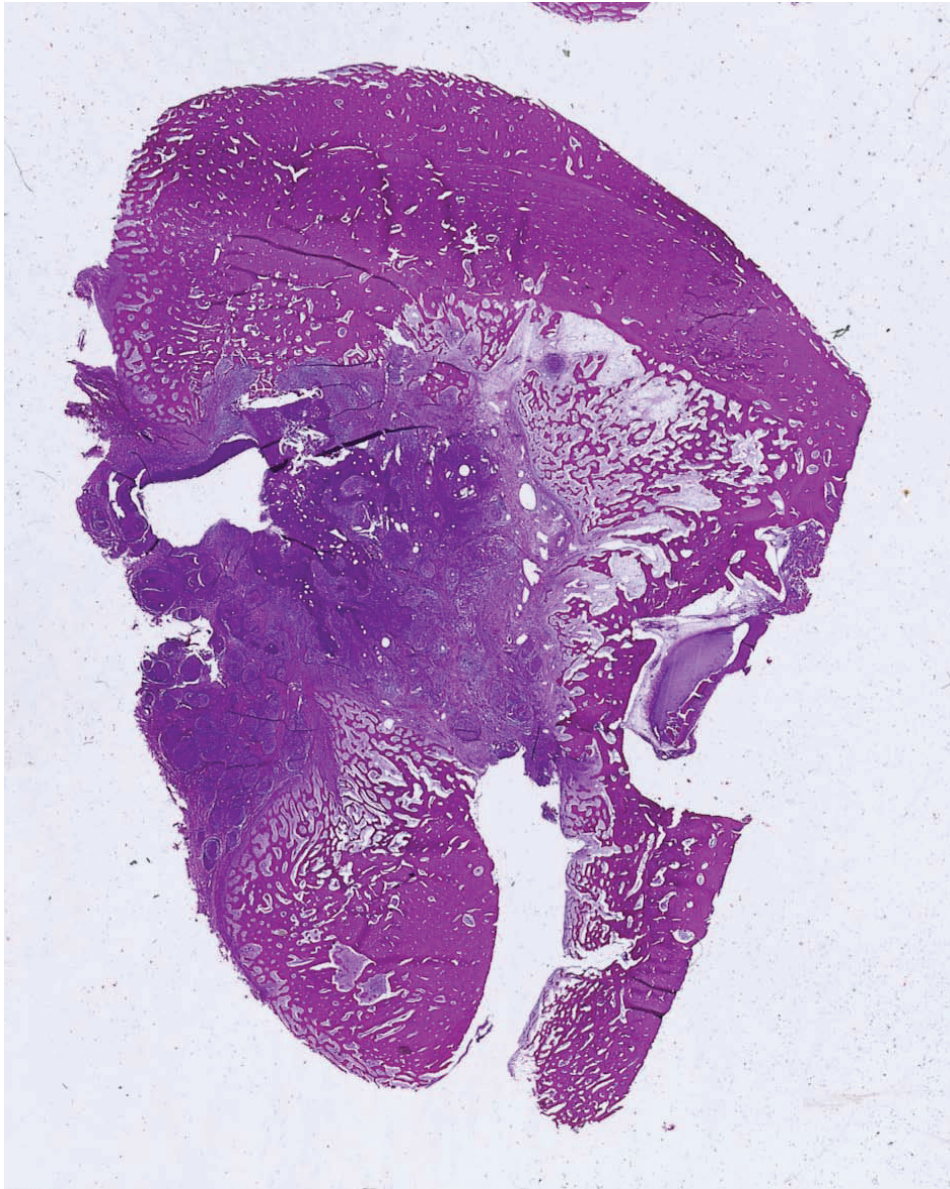


Abbildung 70 Präparat der Kontrollgruppe ohne Applikation eines Biomaterials mit bindegewebiger Defektüberbrückung und beginnender Knochenbildung vom Rand her; der Mandibularkanal beginnt sich neu zu formieren (KRATZKE 2003)

Tabelle 19 Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der residuellen KAM-Anteile 5 Wochen p. i. (Angabe in mm²)

Gruppe	Tier	BM Schnitt 1	BM Schnitt 2	BM Schnitt 3	BM Schnitt 4	BM Schnitt 5	BM Mittelwert
Ostim® (N)	1 re	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,01
	1 li	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2 re	2,34	0,00	0,00	1,56	11,0	2,98
	2 li	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3 re	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3 li	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Bio-ss® (O)	1 re	19,40	41,79	14,42	16,48	4,62	19,34
	1 li	20,60	28,52	9,24	12,44	2,32	14,62
	2 re	13,37	15,65	12,07	11,34	6,45	11,78
	2 li	9,13	13,52	2,88	14,21	16,06	11,16
	3 re	11,58	21,98	26,33	13,71	13,53	17,43
	3 li	23,86	35,34	30,44	8,56	9,52	21,54
NanoBone® (P)	1 re	14,39	16,73	14,59	11,40	10,07	13,44
	1 li	13,60	20,66	36,39	12,49	12,38	19,10
	2 re	11,84	18,58	25,61	9,19	11,66	15,38
	2 li	13,60	22,09	22,08	9,37	10,78	15,58
	3 re	12,96	27,00	28,03	10,55	6,00	16,91
	3 li	6,42	15,09	20,59	11,81	18,18	14,42

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

Tabelle 20 Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der residuellen KAM-Anteile 8 Monate p. i. (Angabe in mm²)

Gruppe	Tier	BM Schnitt 1	BM Schnitt 2	BM Schnitt 3	BM Schnitt 4	BM Schnitt 5	BM Mittelwert
Ostim® (R)	1 re	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1 li	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2 re	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,12
	2 li	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3 re	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3 li	0,55	1,09	0,00	0,32	0,86	0,56
Bio-Oss® (T)	2 re	0,00	11,02	12,25	23,15	3,99	10,08
	2 li	0,00	1,40	20,52	18,29	8,47	9,74
	3 re	0,00	0,00	0,45	25,05	6,05	6,31
	3 li	0,00	0,60	0,00	0,60	0,00	0,24
NanoBone® (S)	1 re	6,87	10,51	2,02	1,45	16,83	7,54
	1 li	13,57	25,88	11,52	14,50	13,50	15,79
	2 re	7,21	26,12	0,00	21,35	18,46	14,63
	2 li	21,71	18,13	10,40	3,21	8,62	12,41
	3 re	0,00	4,19	13,28	15,54	64,41	19,48
	3 li	1,74	5,73	0,83	2,36	1,48	2,23

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

Tabelle 21 Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der Anteile neu gebildeten Knochens 5 Wochen p. i. (Angabe in mm²)

Gruppe	Tier	Knochen Schnitt 1	Knochen Schnitt 2	Knochen Schnitt 3	Knochen Schnitt 4	Knochen Schnitt 5	Knochen Mittelwert
Ostim® (N)	1 re	203,65	195,41	200,64	196,06	189,75	197,10
	1 li	149,91	173,67	172,37	232,79	231,24	192,00
	2 re	162,92	162,51	149,74	176,91	164,53	163,32
	2 li	193,51	197,25	226,58	216,84	233,38	213,51
	3 re	158,99	160,22	153,28	183,07	185,83	168,28
	3 li	152,38	132,52	132,31	184,71	178,64	156,11
Bio-Oss® (O)	1 re	204,63	160,85	215,62	191,83	249,86	204,56
	1 li	127,54	147,08	171,87	158,86	190,40	159,40
	2 re	145,43	149,81	143,30	119,30	159,12	143,39
	2 li	114,16	120,13	170,33	151,75	157,98	142,87
	3 re	168,77	135,87	133,84	198,21	172,75	161,89
	3 li	158,02	131,53	134,84	166,91	159,81	150,22
NanoBone® (P)	1 re	126,14	159,97	141,48	177,67	165,11	154,07
	1 li	127,55	129,25	100,53	192,32	193,19	148,57
	2 re	145,93	139,14	125,36	175,86	163,79	150,02
	2 li	118,09	100,09	84,46	151,82	133,68	117,63
	3 re	121,20	103,44	76,71	126,89	109,54	107,56
	3 li	137,52	105,34	89,62	134,98	141,90	121,87

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

Tabelle 22 Histomorphometrischer Mittelwertvergleich der Anteile neu gebildeten Knochens 8 Monate p. i. (Angabe in mm²)

Gruppe	Tier	Knochen Schnitt 1	Knochen Schnitt 2	Knochen Schnitt 3	Knochen Schnitt 4	Knochen Schnitt 5	Knochen Mittelwert
Ostim® (R)	1 re	164,73	148,26	145,57	146,74	149,06	150,87
	1 li	156,15	125,51	112,47	128,67	128,31	130,22
	2 re	116,39	111,28	126,64	122,82	115,48	118,52
	2 li	185,98	139,08	171,34	158,31	156,81	162,30
	3 re	132,64	160,60	119,63	137,34	166,44	143,33
	3 li	122,28	140,54	141,93	129,23	141,88	135,17
Bio-Oss® (T)	2 re	182,47	233,84	206,63	195,22	203,44	204,32
	2 li	189,94	209,45	161,49	210,87	205,72	195,49
	3 re	96,71	96,96	72,54	84,47	116,24	93,38
	3 li	162,22	99,86	108,66	173,79	60,56	121,02
NanoBone® (S)	1 re	171,19	146,03	109,18	203,80	162,39	158,52
	1 li	200,1	187,50	182,18	204,07	189,67	192,70
	2 re	215,05	166,42	241,74	226,74	252,50	220,49
	2 li	87,36	127,68	121,50	173,18	141,94	130,33
	3 re	200,07	179,32	167,74	167,60	162,82	175,51
	3 li	110,58	75,57	107,63	121,19	137,09	110,41

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

Tabelle 23 Histomorphometrische Gruppenmittelwert für die Parameter: Restdefektgröße, Knochenneubildung und Biomaterialreste 5 Wochen und 8 Monate p. i. (Angaben in mm²)

	Gruppe	Min			Max			MW			S		
		DR	KN	BM	DR	KN	BM	DR	KN	BM	DR	KN	BM
5 Wochen	Ostim®	30,42	156,11	0,00	68,00	213,51	2,98	41,98	181,72	0,50	14,05	22,49	1,21
	Bio-Oss®	57,93	142,87	11,16	87,42	204,56	21,54	74,28	160,35	15,98	31,54	23,04	4,17
	NanoBone®	76,13	107,56	13,44	94,74	154,07	19,10	85,11	133,29	15,80	7,99	19,92	1,99
8 Monate	Ostim®	13,70	118,52	0,00	59,13	162,30	0,56	45,94	140,07	0,11	9,52	15,53	0,23
	Bio-Oss®	14,34	93,38	0,24	35,93	204,32	10,08	182,35	153,55	6,59	9,82	54,82	4,56
	NanoBone®	32,62	110,41	2,23	64,49	220,49	19,48	43,97	164,66	12,01	11,40	40,45	6,21

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

DR = Defektrest

KN = Knochen

BM = Biomaterial

Min = Minimalwerte

Max = Maximalwerte

MW = Mittelwerte

S = Standardabweichung

Tabelle 24 Histomorphometrische Gruppenmittelwerte sämtlicher Parameter aller Tiere 5 Wochen p. i.

Präparate	klin.Defekt-Zahn(mm ²)	Restdefekt (mm ²)	Restdefekt %	Biomaterial (mm ²)	Biomaterial %	Bindegewebe (mm ²)	Bindegewebe %	erw. Markraum (mm ²)	erw. Markraum %	Vakanz (mm ²)	Vakanz %	Artefakt (mm ²)	Artefakt %	Knochen neu (mm ²)	Knochen %
N Ili 1	229,55	30,57	13,17	0,01	0,01	9,52	4,14	9,97	4,24	11,07	4,78	0,00	0,00	197,10	86,05
N Ire 1	260,00	68,00	26,16	0,00	0,00	55,48	21,34	7,88	3,03	4,65	1,79	0,00	0,00	192,00	73,84
N 2li 1	209,00	45,68	21,86	2,98	1,43	27,39	13,11	4,80	2,30	9,63	4,61	0,88	0,42	163,32	78,14
N 2re 1	250,02	36,50	14,34	0,00	0,00	25,75	10,15	5,83	2,25	4,92	1,94	0,00	0,00	213,51	85,66
N 3li 1	209,00	40,72	19,48	0,00	0,00	20,68	9,90	6,83	3,27	13,21	6,32	0,00	0,00	168,28	80,52
N 3re 1	186,53	30,42	16,70	0,01	0,01	20,64	11,43	6,48	3,57	3,28	1,70	0,00	0,00	156,11	83,30
MW	224,02	41,98	18,62	0,50	0,24	26,58	11,68	6,96	3,11	7,79	3,52	0,15	0,07	181,72	81,25
O Ili 2	289,80	85,25	29,56	19,34	6,77	55,72	19,33	0,00	0,00	5,07	1,72	5,11	1,73	204,56	70,45
O1 re 2	231,93	72,79	31,54	14,62	6,44	47,63	20,72	0,00	0,00	5,16	2,15	5,36	2,23	159,15	68,46
O 2 li 2	219,68	76,28	34,71	11,78	5,33	50,39	22,92	0,00	0,00	8,18	3,76	5,94	2,70	143,39	65,29
O2 re 2	200,80	57,93	29,12	11,16	5,64	35,52	17,62	0,00	0,00	9,42	4,92	1,84	0,93	142,87	70,88
O3 li 2	249,31	87,42	35,28	17,43	7,04	62,57	25,24	0,00	0,00	2,70	1,11	4,73	1,89	161,89	64,72
O3 re 2	216,22	66,00	29,86	21,54	9,69	40,49	18,39	0,00	0,00	3,33	1,51	0,63	0,28	150,22	70,14
MW	234,62	74,28	31,68	15,98	6,82	48,72	20,70	0,00	0,00	5,64	2,53	3,93	1,63	160,35	68,32
P Ili 3	234,00	79,93	34,16	13,44	5,74	62,23	26,59	0,34	0,14	3,33	1,42	0,60	0,26	154,07	65,84
P1 re 3	240,00	91,43	38,10	19,10	7,96	68,67	28,61	0,05	0,02	2,82	1,18	0,79	0,33	148,57	61,90
P2 li 3	228,00	77,98	34,20	15,38	6,74	56,06	24,59	0,54	0,24	5,15	2,26	0,87	0,38	150,02	65,80
P2 re 3	212,37	94,74	44,37	15,58	7,30	69,63	32,60	0,00	0,00	6,66	3,13	2,86	1,35	117,63	55,63
P3 li 3	198,00	90,44	45,68	16,91	8,54	68,21	34,45	0,00	0,00	4,34	2,19	0,98	0,49	107,56	54,32
P3 re 3	198,00	76,13	38,45	14,42	7,28	57,26	28,92	0,93	0,47	2,53	1,28	0,99	0,50	121,87	61,55
MW	218,39	85,11	39,16	15,80	7,26	63,68	29,29	0,31	0,14	4,14	1,91	1,18	0,55	133,29	60,84

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

Tabelle 25 Histomorphometrische Gruppenmittelwerte sämtlicher Parameter aller Tiere 8 Monate p. i.

R1 li 4	210,00	59,13	28,16	0,00	0,00	3,76	1,79	55,37	26,36	0,00	0,00	0,00	0,00	150,87	71,84
R1 re 4	167,06	36,84	21,56	0,00	0,00	4,52	2,62	32,32	18,94	0,00	0,00	0,00	0,00	130,22	78,44
R2 li 4	168,00	49,48	29,45	0,12	0,07	3,01	1,79	46,36	27,59	0,00	0,00	0,00	0,00	118,52	70,55
R2 re 4	196,00	33,70	17,19	0,00	0,00	4,53	2,31	29,17	14,88	0,00	0,00	0,00	0,00	162,30	82,81
R3 li 4	195,00	51,67	26,50	0,00	0,00	17,80	9,13	32,98	16,91	0,89	0,46	0,00	0,00	143,33	73,50
R3 re 4	180,00	44,83	24,90	0,56	0,31	13,28	7,38	30,21	16,78	0,77	0,43	0,00	0,00	135,17	75,10
MW	186,01	45,94	24,63	0,11	0,06	7,81	4,17	37,73	20,25	0,28	0,15	0,00	0,00	140,07	75,37
T2 li 5	218,66	14,34	6,39	10,08	4,42	2,03	0,96	0,00	0,00	2,23	1,00	0,00	0,00	204,32	93,61
T2 re 5	229,10	33,61	14,14	9,74	4,06	16,13	6,81	3,23	1,39	4,50	1,88	0,00	0,00	195,49	85,86
T3 li 5	129,32	35,93	28,08	6,31	4,79	26,97	21,17	0,00	0,00	2,66	2,12	0,00	0,00	93,38	71,92
T3 re 5	152,32	31,30	22,38	0,24	0,14	28,58	20,82	0,00	0,00	2,48	1,42	0,00	0,00	121,02	77,62
MW	182,35	28,80	17,75	6,59	3,35	18,43	12,44	0,81	0,35	2,97	1,61	0,00	0,00	153,55	82,25
S1 li 6	197,66	39,14	20,30	7,54	3,75	7,61	3,60	24,00	12,95	0,00	0,00	0,00	0,00	158,52	79,70
S1re 6	225,33	32,62	14,49	15,79	6,99	4,97	2,18	11,86	5,32	0,00	0,00	0,00	0,00	192,70	85,51
S2 li 6	258,80	38,31	14,94	14,63	5,80	7,44	2,73	14,91	5,93	1,33	0,48	0,00	0,00	220,49	85,06
S2 re 6	170,29	39,96	23,79	12,41	8,20	11,43	7,03	16,11	8,56	0,00	0,00	0,00	0,00	130,33	76,21
S3 li 6	240,00	64,49	26,87	19,48	8,12	33,80	14,08	11,21	4,67	0,00	0,00	0,00	0,00	175,51	73,13
S3 re 6	159,70	49,29	31,16	2,23	1,41	41,70	26,32	5,37	3,44	0,00	0,00	0,00	0,00	110,41	68,84
MW	208,63	43,97	21,92	12,01	5,71	17,82	9,32	13,91	6,81	0,22	0,08	0,00	0,00	164,66	78,08

*Gruppe N/R – Ostim®

persönliche Mitteilung

*Gruppe P/S – NanoBone®

persönliche Mitteilung

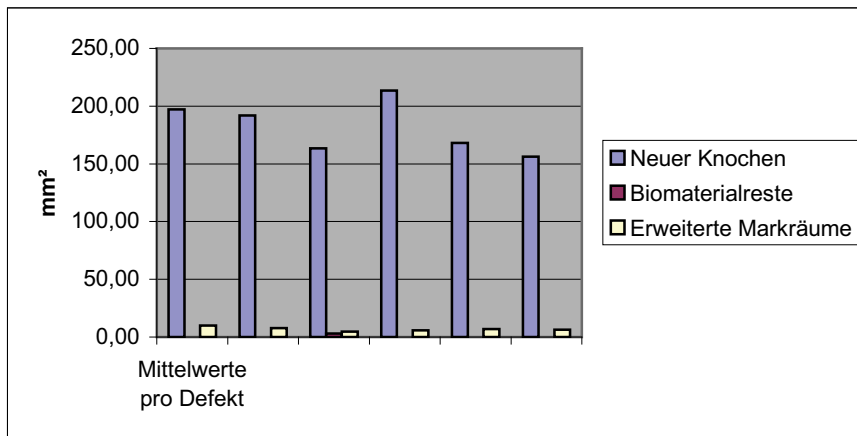


Abbildung 71 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von Ostim® (Gruppe N) (Angaben in mm²; n=6)

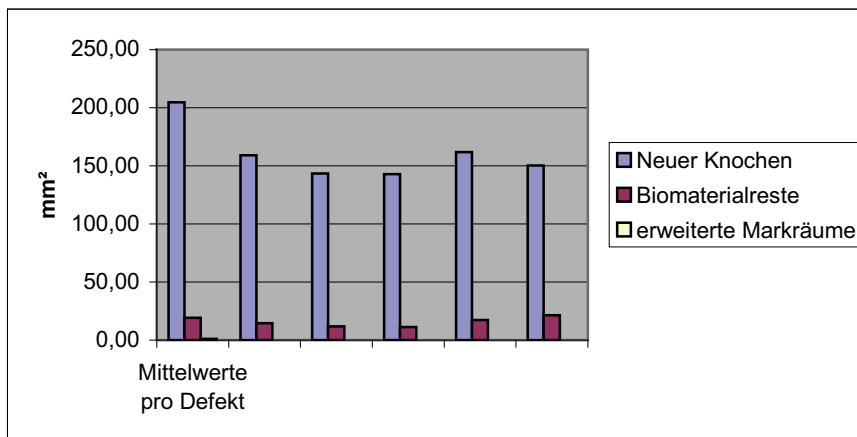


Abbildung 72 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von Bio-Oss® (Gruppe O) (Angaben in mm²; n=6)

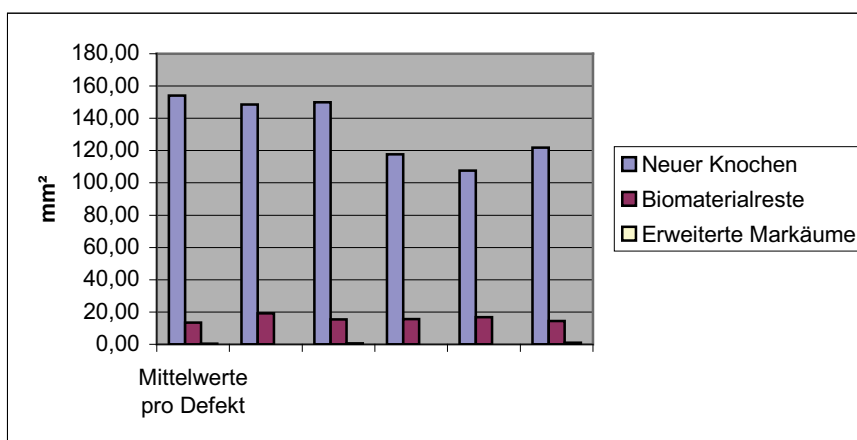


Abbildung 73 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 5 Wochen p. i. von NanoBone® (Gruppe P). (Angaben in mm²; n=6)

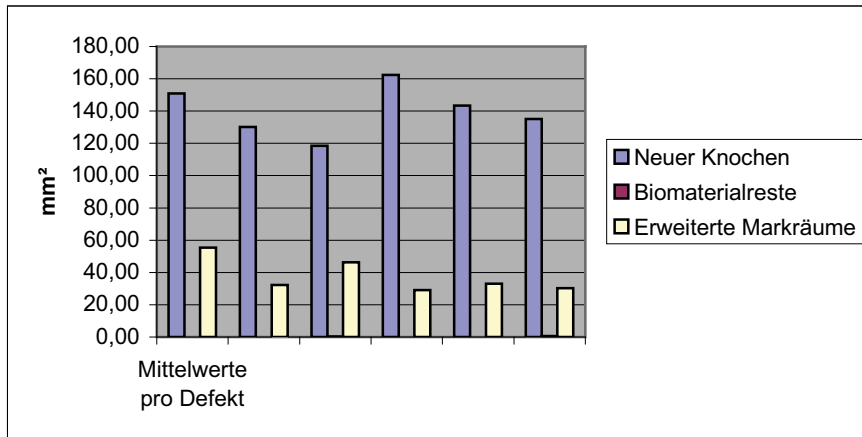


Abbildung 74 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von Ostim® (Gruppe R). (Angaben in mm²; n=6)

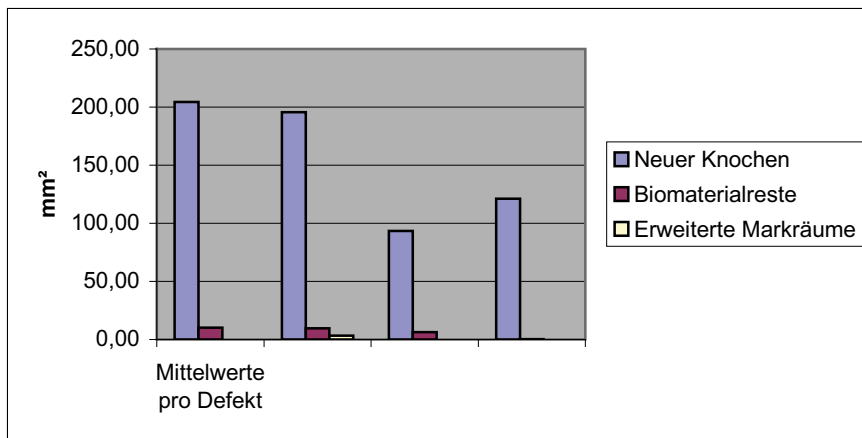


Abbildung 75 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppe T). (Angaben in mm²; n=4)

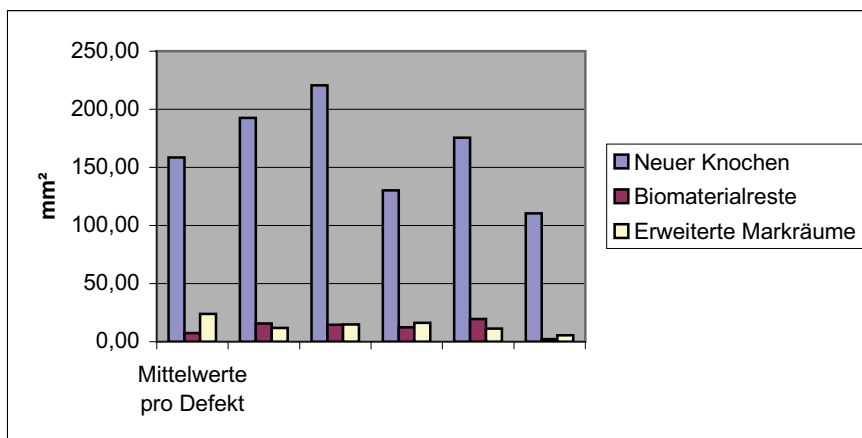


Abbildung 76 Histomorphometrie: Graphischer Mittelwertvergleich 8 Monate p. i. von NanoBone® (Gruppe S). (Angaben in mm²; n=6)

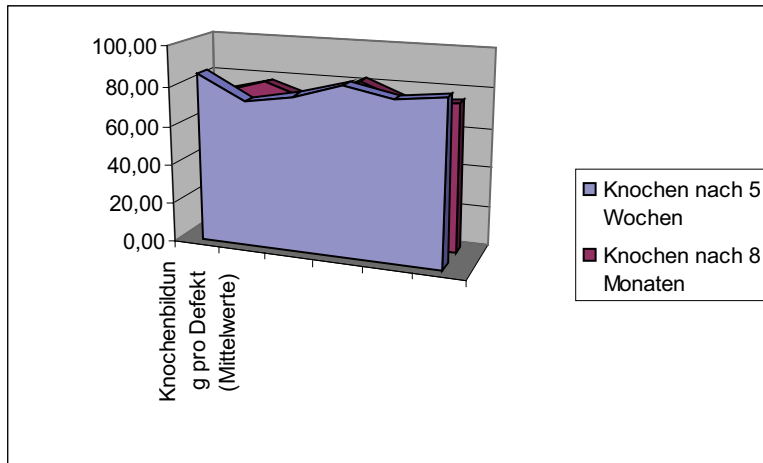


Abbildung 77 Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von Ostim® (Gruppen N und R; Angabe in %)

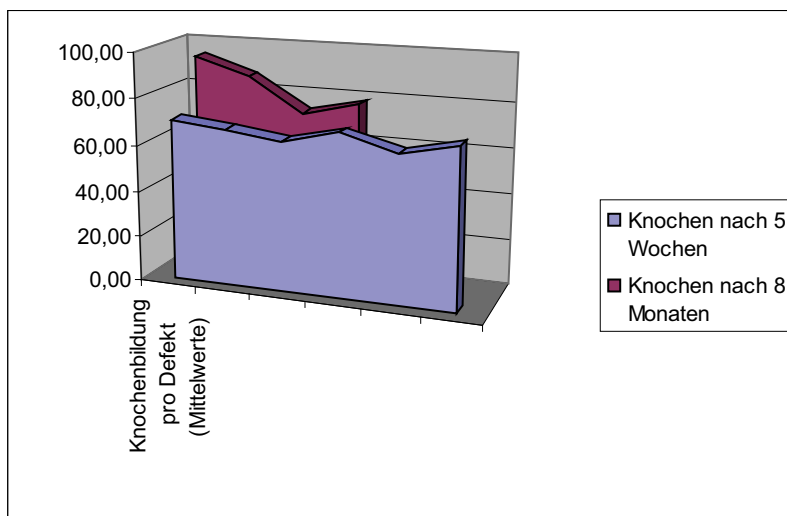


Abbildung 78 Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von Bio-Oss® (Gruppen O und T; Angabe in %)

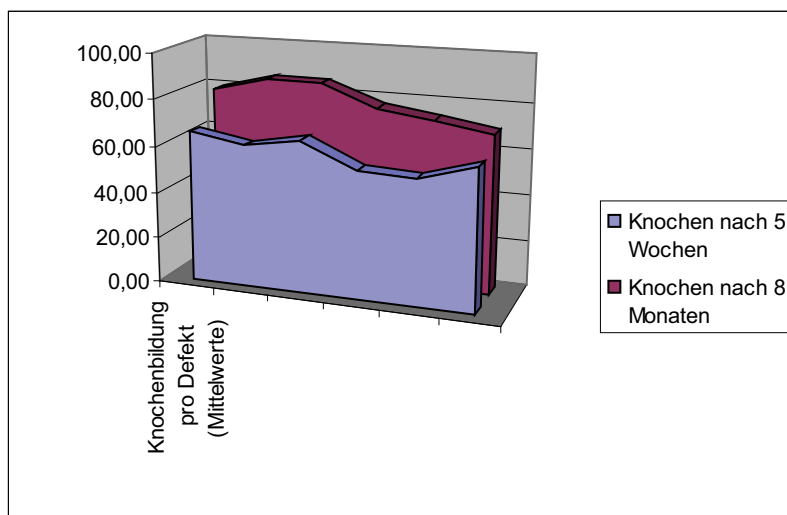


Abbildung 79 Histomorphometrie: Mittelwertvergleich der Knochenneubildungsraten innerhalb der Defekte 5 Wochen und 8 Monate p. i. von NanoBone® (Gruppen P und S; Angabe in %)

Tabelle 26 Histomorphometrie: Ergebnisse der deskriptiven Statistik sämtlicher Parameter 5 Wochen p. i.

Parameter	Mittelwerte			Standardabweichung		
	N	O	P	N	O	P
kl. Defekt (mm ²) 100%	224,02	234,62	218,39	27,78	31,54	18,28
Restdefekt (mm ²)	41,98	74,28	85,11	14,05	11,27	7,99
Restdefekt (%)	18,62	31,68	39,16	4,89	2,7	4,92
Biomaterial (mm ²)	0,5	15,98	15,80	1,21	4,17	1,99
Biomaterial (%)	0,24	6,82	7,26	0,58	1,55	0,97
Bindegewebe(mm ²)	26,58	48,72	63,67	15,48	9,87	6,04
Bindegewebe (%)	11,68	20,70	29,29	5,62	2,91	3,68
erw. Markraum (mm ²)	6,96	0,00	0,31	1,79	0,00	0,37
erw. Markraum (%)	3,11	0,00	0,14	0,76	0,00	0,18
Vakanz (mm ²)	7,79	5,64	4,14	4,05	2,66	1,57
Vakanz (%)	3,52	2,53	1,91	1,97	1,49	0,76
Artefakt (mm ²)	0,15	3,93	1,18	0,36	2,16	0,84
Artefakt (%)	0,07	1,63	0,55	0,17	0,88	0,40
Knochen neu (mm ²)	181,72	160,35	133,29	22,49	23,04	19,92
Knochen (%)	81,25	68,32	60,84	4,73	2,70	4,92

Tabelle 27 Histomorphometrie: Ergebnisse der deskriptiven Statistik sämtlicher Parameter 8 Monate p. i.

Parameter	Mittelwerte			Standardabweichung		
	R	T	S	R	T	S
kl. Defekt (mm ²) 100%	186,01	182,35	208,63	17,18	49,05	39,40
Restdefekt (mm ²)	45,94	28,8	43,97	9,52	9,82	11,4
Restdefekt (%)	24,63	17,75	21,92	4,56	9,49	6,64
Biomaterial (mm ²)	0,11	6,59	12,01	0,23	4,56	6,21
Biomaterial (%)	0,06	3,35	5,71	0,13	2,17	2,68
Bindegewebe(mm ²)	7,81	18,43	17,82	6,18	12,25	15,77
Bindegewebe (%)	4,17	12,44	9,32	3,23	10,16	9,42
erw. Markraum (mm ²)	37,73	0,81	13,91	10,65	1,62	6,2
erw. Markraum (%)	20,25	0,35	6,81	5,38	0,7	3,46
Vakanz (mm ²)	0,28	2,97	0,22	0,43	1,04	0,54
Vakanz (%)	0,15	1,61	0,08	0,23	0,5	0,19
Artefakt (mm ²)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Artefakt (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Knochen neu (mm ²)	140,07	153,55	164,66	15,54	54,82	40,45
Knochen (%)	75,37	82,25	78,08	4,56	9,49	6,64

Tabelle 28 Darstellung histomorphometrischer Ergebnisse unter Berücksichtigung der Artefakte – Versuchsergebnisse 5 Wochen bzw. 8 Monate p. i. im Rahmen der Forschungsgruppe

Liegedauer	Knochenbildung *		Biomaterialreste *	
	5 Wochen	8 Monate	5 Wochen	8 Monate
NanoBone® (n=6)	60,8%	80,8%	8,4%	5,7%
Ostim® (n=6)	73,8%	75,4%	6,8%	0,1%
Bio-Oss® (n=6)	68,3%	80,3%	16,0% (?)	5,0% (?)
Kontrolle (n=6)	24,0%	48,4%	-	-

*Angaben in % der Ausgangsdefektgröße
Rot : Signifikanz (p<0,01; Mann-Whitney-Test)

Persönliche Mitteilung an Frau Dr. S. Lenz

Thesen zur Inauguraldissertation

Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe mittels des bovinen Knochenaufbaumaterials Bio-Oss®

Eine tierexperimentelle Längsschnittstudie an Miniaturschweinen

vorgelegt von: Anja Gruber

- Rostock 2009 -

- 1) Goldstandard zur Rekonstruktion angeborener und erworbener Gesichtsschädeldefekte ist bisher die Transplantation autogener Spongiosa. Um den Patienten Belastung und mögliche Komplikationen eines Zweiteingriffes zu ersparen, wurden in den letzten Jahren zunehmend innovative Knochenaufbaumaterialien (KAM) eingesetzt, die einerseits osteokonduktiv wirken, d. h. eine Leitschienenfunktion für einwachsendes Knochengewebe aufweisen, und andererseits angepasst an die Reossifikation des Defektes und möglichst entzündungsfrei biodegradiert werden.
- 2) Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *In-vivo*-Testung eines derartigen KAM, speziell des Präparates Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Schweiz), welches boviner Herkunft ist und in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bevorzugt eingesetzt wird. In der Diskussion erfolgt eine Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse mit *In-vivo*-Testungen aus der Rostocker Forschungsgruppe, die an zwei innovativen alloplastischen KAM auf nanokristalliner Hydroxylapatit (HA)-Basis vorgenommen wurden.
- 3) Wegen ihres omnivoren Kautyps wurden 6 adulte Göttinger Miniaturschweine ausgewählt, bei denen Defekte kritischer Größe ($> 5\text{cm}^3$) im Bereich der anterioren Mandibula beiderseits gesetzt und mit Bio-Oss® versorgt wurden. Die Kontrollzeiten betragen bei je 3 Tieren mit 6 Defekten 5 Wochen bzw. bei je 2 Tieren mit 4 Defekten 8 Monate. Nach Tötung der Tiere erfolgten klinische, röntgenologische und histologische Untersuchungen der Defektregionen; letztere unter Einbeziehung histomorphometrischer und histochemischer Techniken. Hauptauswertungskriterien waren die defektbezogene Reossifikation sowie das Biodegradationsverhalten des zu testenden KAM.

- 4) Die klinische Untersuchung mit relativ grober metrischer Befunderhebung (Sonde, Stechzirkel und Lineal) ergab 5 Wochen nach Implantation von Bio-Oss® eine deutliche Defektverkleinerung, während 8 Monate post implantationem (p. i.) - abgesehen von einer narbigen Einziehung an der Knochenoberfläche - eine vollständige knöcherne Konsolidierung der Defekte zu verzeichnen war.
- 5) Die röntgenologischen Befunde waren nicht ausreichend quantifizierbar und dienten lediglich einer orientierenden Einschätzung. Bei Verwendung von Bio-Oss® zeigten sich 5 Wochen p. i. noch deutliche zentrale Aufhellungsareale, während sich 8 Monate p. i. röntgenologisch knochenähnliche Strukturen darstellten, was auf eine vollständige ossäre Konsolidierung der Defekte hindeutete. Eine metrische Erfassung der defektbezogenen Knochenneubildungsrate und des Biodegradationsverhaltens des KAM war röntgenologisch nicht möglich, da Knochen und KAM eine ähnliche Radioluzenz aufwiesen und speziell bei der Unterkieferlateraltechnik teilweise Überlagerungseffekte auftraten.
- 6) Histologisch zeigte sich 5 Wochen nach Bio-Oss®-Implantation eine deutlich einsetzende randständige und eine beginnende zentrale Knochenbildung in den Defektregionen sowie eine beginnende Tendenz zur Biodegradation des eingebrachten KAM. Es dominierte zu diesem Zeitpunkt ein fibröses Narbengewebe mit einzelnen entzündlichen Infiltraten. Daneben formierten sich bereits zarte Knochenbälkchen - z. T. im Sinne einer Verbundosteogenese - zwischen den Bio-Oss®-Partikeln. Das Vorhandensein von Riesenzellen im Kontakt zu Bio-Oss®-Partikeln deutete auf einen osteoklastären Abbau des KAM hin. Semiquantitativ histologisch ergab sich bei Einsatz von Bio-Oss® 5 Wochen p. i. eine Knochenneubildungsrate von ca. 50%.
- 7) 8 Monate nach Bio-Oss®-Implantation war histologisch die Knochenregeneration in den Defektregionen weitgehend abgeschlossen. Der Umbau des neu gebildeten Geflechtknochens in Lamellenknochen im Rahmen des ossären Remodelings war weit fortgeschritten, wobei die noch vorhandenen Bio-Oss®-Partikel gut osteointegriert wurden. Semiquantitativ histologisch konnte bei Verwendung von Bio-Oss® 8 Monate p. i. eine Knochenneubildungsrate von ca. 80 % ermittelt werden.

- 8) Eine Präzisierung der quantitativen feingeweblichen Befunderhebung konnte mittels der histomorphometrischen Analyse erreicht werden. Computergestützt wurden die Anteile neugebildeten Knochens und die verbliebenen Bio-Oss®-Partikel in den Defektregionen exakt erfasst. Auf diese Weise ließen sich auch die Defektgrößen sowie die defektbezogenen Knochenneubildungsraten nach Bio-Oss®-Implantation eindeutig ermitteln. 5 Wochen p. i. betrug die histomorphometrisch ermittelte Defektverkleinerung 68,3% und 8 Monate p. i. 82,3%. Von der 5. Woche bis zum 8. Monat p. i. konnte ein signifikanter Knochenzuwachs von 13,9 % erzielt werden ($p=0,001$). Der Anteil residueller Bio-Oss®-Partikel betrug 5 Wochen p. i. 6,8% und 8 Monate p. i. 3,4%, was eine statistisch signifikante Abnahme darstellt ($p=0,011$). Das entspricht einer an die Knochenneubildung angepassten Biodegradation des KAM.
- 9) Histochemische Befunde vermitteln durch Nachweis von Enzymproteinen funktionelle Hinweise. Mittels des Nachweises der alkalische Phosphatase (AP) kann die Osteoblastenaktivität erfasst werden. Eine stark erhöhte AP-Aktivität fand sich an der Oberfläche der neu gebildeten Knochenbälkchen und eine schwache AP-Aktivität in der Umgebung der ossär eingeschlossenen Bio-Oss®-Partikel. Verbunden mit einer erhöhten Aktivität des Wachstumsfaktors Bone Morphogenic Protein 2 (BMP 2) weist das auf eine hohe Osteokonduktivität von Bio-Oss® hin. Das Markerenzym Tartrat-Resistente Alkalische Phosphatase (TRAP) vermittelt Hinweise auf das Biodegradationsverhalten eines KAM. Bei Bio-Oss® war eine langsame, permanent fortschreitende Biodegradation nachweisbar, die partiell durch Osteoklasten erfolgte.
- 10) Sowohl die klinischen und röntgenologischen, als auch histologisch morphometrischen und histochemischen Befunde bestätigten in ihrer Gesamtheit eine gute osteokonduktive Wirkung des getesteten KAM Bio-Oss®, was durch eine nahezu vollständige Konsolidierung von Kieferknochendefekten kritischer Größe bei Miniaturschweinen innerhalb von 8 Monaten belegt werden konnte. Zudem zeigte sich eine weitgehend synchron zur Knochenregeneration einhergehende Biodegradation von Bio-Oss® im Rahmen des physiologischen ossären Remodelings.

- 11) Ein Vergleich des Testpräparates Bio-Oss® mit Ostim® (Haraeus-Kulzer, Hanau), einem pastösen HA-Hydrogel, und NanoBone® (Artoss, Rostock), einem granulären HA-Xerogel mit 24%-igem Si₂O-Anteil, ergab unter Berücksichtigung der histomorphometrischen Ergebnisse von SCHNEIDER (2009) und ALBRECHT (2008) folgende Aussage:
- 5 Wochen p. i. lag die defektbezogene Knochenneubildungsrate bei Einsatz von Ostim® mit 81,3% über und bei Verwendung von NanoBone® mit 60,8% unter dem für Bio-Oss® ermittelten Wert (68,3%), wobei die Differenzen statistisch signifikant waren.
- 8 Monate p. i. wurde bei Einsatz von Ostim® eine Knochenneubildungsrate von 75,4% ermittelt, was einen Rückgang gegenüber der 5. Woche p. i. bedeutet, während bei Verwendung von NanoBone® dieser Wert 78,1% betrug, was eine signifikante Zunahme gegenüber der 5. Woche p. i. darstellt. Beide Werte liegen - ohne statistische Signifikanz - unter dem für Bio-Oss® ermittelten Wert (82,3%). Bei Einsatz des KAM Bio-Oss® zeigte sich - ähnlich wie bei Verwendung von NanoBone® - eine bis zum 8. Monat p. i. kontinuierliche fortschreitende Stimulation der Knochenbildung in den Defektregionen. Bei Applikation von Ostim® kam es dagegen zu einer überstürzten Reossifikation der Defekte bis zur 5. Woche, die bis zum 8. Monat leicht rückläufig war. Ursache dafür ist das schnellere, unangepasste Biodegradationsverhalten dieses KAM.
- 12) Da Bio-Oss® und die vergleichend getesteten KAM NanoBone® und Ostim® die Knochenregeneration deutlich fördern, stellen sie bei der Behandlung von ossären Defekten der Kiefer-Gesichts-Region eine echte Alternative zum „Goldstandard“, dem autogenen Spongiosatransplantat, dar. Die tierexperimentellen Untersuchungen belegen, dass die beiden erstgenannten KAM weitgehend parallel zur Knochenneubildung biodegradiert werden, während Ostim® unangepasst schnell resorbiert wird. Dieses KAM eignet sich daher eher für schmale spaltförmige Knochendefekte mit geringer mechanischer Belastung als für Defekte kritischer Größe. Wägt man zwischen der Anwendung von Bio-Oss® und NanoBone® gegeneinander ab, sollte aus Sicherheitsgründen dem synthetischen KAM der Vorzug eingeräumt werden.