

Aus der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Histomorphometrische und immunhistologische Analyse
von Extraktionsalveolen nach einer vierwöchigen Heilungsperiode**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Kerrin Gratecap
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	2
2. Abstrakt	6
3. Einleitung	9
4. Literaturverzeichnis	11
4.1. Knochen.....	11
4.1.1. Aufbau des Knochens	11
4.1.2. Zellen des Knochens.....	12
Osteoblasten.....	12
Osteozyten.....	14
Bone-Lining-Cells	14
Osteoklasten.....	14
4.1.3. Desmale und chondrale Ossifikation.....	15
4.1.4. Angiogenese	16
Endothelzellen	17
4.1.5. Modelling und Remodelling.....	17
4.2. Knochenwundheilung nach Zahnextraktion.....	18
4.2.1. Die Extraktionsalveole	18
4.2.2. Heilung der Extraktionsalveole	19
4.2.3. Gewebsveränderungen nach Zahnextraktion.....	24
4.3. Knochenersatzmaterialien	26
4.3.1. Einteilung der Knochenersatzmaterialien	27
4.3.2. Bio-Oss / Bio-Oss Collagen.....	28
4.4. Untersuchung der heilenden Extraktionsalveole	31
4.4.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen	31
4.4.2. Histomorphometrische Untersuchungen	31

4.4.3.	Immunhistologische Untersuchungen.....	32
4.4.3.1.	Marker der osteoblastären Differenzierungskaskade	32
	Cbfa1	34
	Osteonectin.....	34
	Osteocalcin	35
4.4.3.2.	Endothelmarker	35
	CD 31	36
5.	Fragestellung	37
6.	Material und Methoden	38
6.1.	Auswahl der Patienten.....	38
6.2.	Chirurgisches Verfahren	38
6.2.1.	Extraktion der Zähne	38
6.2.1.1.	Augmentierte Alveolen.....	39
6.2.1.2.	Nichtaugmentierte Alveolen.....	39
6.2.2.	Postoperative Phase.....	39
6.2.3.	Implantatinsertion und Probeentnahme.....	39
6.3.	Aufbereitung der Proben.....	40
6.4.	Übersichtsfärbung.....	41
6.4.1.	Prinzip.....	41
6.4.2.	Färbung – Masson-Goldner-Trichrom	42
6.5.	Immunhistologie.....	43
6.5.1.	Prinzip.....	43
6.5.2.	Färbung – APAAP	44
6.5.2.1.	Positiv- und Negativkontrollen	45
6.6.	Histomorphometrie	50
6.6.1.	Auswertung der Übersichtsfärbung	50

6.6.2.	Auswertung der immunhistologischen Färbung.....	51
6.7.	Statistische Analyse.....	53
7.	Ergebnisse.....	55
7.1.	Morphologische Charakteristika	56
7.1.1.	Übersichtsfärbung.....	56
7.1.2.	Immunhistologische Färbung.....	59
7.2.	Histomorphometrische Messungen	62
7.2.1.	Ergebnisse der nicht augmentierten Alveolen	62
7.2.2.	Ergebnisse der augmentierten Alveolen.....	62
7.2.3.	Vergleich der augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen...	65
7.2.4.	Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse der Knochenneufornation ...	66
7.3.	Immunhistologische Messungen	67
7.3.1.	Ergebnisse der nicht augmentierten Alveolen (Cbfa1, OSN, OC).....	68
	Cbfa1	70
	Osteonectin.....	69
	Osteocalcin	70
7.3.2.	Ergebnisse der augmentierten Alveolen (Cbfa1, OSN, OC).....	71
	Cbfa1	73
	Osteonectin.....	72
	Osteocalcin	73
7.3.3.	Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse der immunhistologischen Messungen (Cbfa1, OSN, OC).....	74
7.3.3.1.	Vergleich immunreaktiver Zellen der coronalen und apikalen Bereiche.....	74
7.3.3.2.	Vergleich immunreaktiver Zellen zwischen augmentierten und nicht augmentierten Alveolen	74
7.3.4.	Ergebnisse der CD 31 - Expression durch Endothelzellen.....	75

7.4.	Korrelation von Knochenneuformationsrate und immunhistologisch - positiv expressierenden Zellen (Cbfa1, OSN, OC)	76
8.	Diskussion	77
8.1.	Histomorphometrische Untersuchungen	77
8.2.	Immunhistologische Untersuchungen	82
8.3.	Schlussfolgerung	86
9.	Literaturverzeichnis	88
10.	Abkürzungsverzeichnis	102
11.	Eidesstattliche Versicherung	104
12.	Lebenslauf	106
13.	Publikationsliste	107
14.	Danksagung	108

2. Abstrakt

Einleitung: Das Ziel dieser Studie war die histomorphometrische und immunhistologische Untersuchung von humanen Extraktionalveolen nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode.

Material/Method: Im Rahmen der Studie wurden 25 Zähne bei 10 Patienten extrahiert. Alle Alveolen wurden sorgfältig kürettiert und danach mit Bio-Oss Collagen (n=12) augmentiert oder der Spontanheilung (n=13) überlassen. Nach 4-wöchiger Einheilzeit wurden während der Implantatsetzung Probiopsien entnommen und analysiert. Es erfolgte eine histomorphometrische Auswertung der intraalveolären Knochenneuformationsrate und die immunhistologische Analyse des osteogenen und angiogenen Potentials mit den Antikörpern Cbfa1, Osteonectin, Osteocalcin, sowie mit CD 31. Mit Hilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests, dem Mann-Whitney-U-Test, der zweifaktoriellen parameterfreien Varianzanalyse und des Spearmans`rho – Tests wurde untersucht, ob das Augmentationsverfahren einen Einfluß auf die Knochenneuformationsrate sowie auf das osteogene bzw. angiogene Potential hat.

Ergebnisse: Die durchschnittliche Knochenneuformationsrate lag bei 9 % in den nicht augmentierten Alveolen und bei 11 % in den augmentierten Alveolen. Apikal zeigte sich eine signifikant höhere Knochenneuformationsrate als coronal. Das Augmentationsverfahren hatte darauf keinen Einfluß.

Innerhalb der provisorischen Matrix der ungefüllten Alveolen lagen die Durchschnittswerte der positiv expressierenden Zellen bei 56 % (Cbfa1), 45 % (Osteonectin) und 18 % (Osteocalcin). CD 31 positive Zellen wurden im Durchschnitt ein Score von 6 zugeteilt. Die gefüllten Alveolen zeigten durchschnittliche Werte von 57 % (Cbfa1), 32 % (Osteonectin) sowie 25 % (Osteocalcin) und CD 31 positive Zellen zeigten einen Score von 5. Bei allen verwendeten Antikörpern waren signifikant mehr positiv gefärbte Zellen im apikalen als im coronalen Bereich. Der Vergleich der augmentierten und nicht augmentierten Alveolen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Schlussfolgerung: Die Knochenneuformationsrate zeigte große interindividuelle Unterschiede und war im apikalen Bereich der Alveole am größten. Die provisorische Matrix zeigt ein hohes osteogenes und angiogenes Potential. In den nicht augmentierten Alveolen sind bereits ein Fünftel der Zellen Osteoblasten. Das aktive Zentrum des osteogenen und angiogenen Potentials befindet sich nach einer 4 -

wöchigen Heilungsperiode im apikalen Bereich. Die Augmentation mit Bio-Oss Collagen hatte keinen Einfluss, weder auf die Knochenneufaltungsrate noch auf die Osteogenese und Angiogenese während der initialen Wundheilung.

Abstract

Purpose: The aim of this study was the histomorphometric and immunohistological analysis of human extraction sockets after 4 weeks of healing.

Material/Methods: Within this study 25 teeth in 10 patients were extracted. In all sockets a curettage was performed and the sockets were augmented with Bio-Oss Collagen (n=12) or were non-augmented (n=13). After 4 weeks of healing at implant placement bone biopsies were obtained and a histomorphometric analysis of the bone formation rate and a immunohistochemical evaluation of the osteogenic and angiogenic potential with the monoclonal antibodies Cbfa1, Osteonectin, Osteocalcin and CD 31 were performed. For the statistical analysis the Wilcoxon-Signed-Rank-test, Mann-Whitney-U-test, Spearman's rho-test and the two-factorial analysis for repeated measurements were used investigating differences between the augmented and non-augmented sockets.

Results: The mean new bone formation rate was 9 % in the non-augmented sockets and 11 % in the augmented sockets. The bone formation rate was significant higher in the apical region than in the coronal region. No difference was found between the grafted and non-grafted sockets.

In the provisional matrix the ungrafted sockets displayed a median amount of 56 % (Cbfa1), 45 % (Osteonectin) and 18 % (Osteocalcin) positive cells. The median CD 31 score was 6. The grafted sockets showed a median amount of 57 % (Cbfa1), 32 % (Osteonectin) and 25 % (Osteocalcin) expressing cells and a median CD 31 score of 5. No difference was found between the augmented and non-augmented sockets. In the apical region more positive staining cells were found than in the coronal region.

Conclusions: The bone formation rate shows interindividual variations and is initiated from the apical region of the extraction socket. The provisional matrix displayed a high osteogenic and angiogenic potential; where as one of five cells are mature osteoblasts in the non-augmented sockets. The active zone of the osteogenic and angiogenic potential after 4 weeks of healing is located in the apical region. The grafting procedure with Bio-Oss Collagen did not influence the bone formation rate as well as the osteogenesis and angiogenesis.

3. Einleitung

Nach dem Verlust eines Zahnes steht die Rehabilitation mittels zahnärztlicher Implantate heute immer mehr im Vordergrund. Um dabei ein funktionell und ästhetisch adäquates Ergebnis zu erzielen, ist neben der Qualität des Alveolarknochens ein ausreichendes Knochenvolumen für eine stabile Implantatverankerung von entscheidender Bedeutung (Schneider 1999).

Der Alveolarfortsatz ist ein zahnabhängiges Gewebe. Sowohl das Volumen als auch die Gestalt des Alveolarfortsatzes wird durch die Form und die Achsenneigung des Zahnes bestimmt. Er entwickelt sich mit der Bildung und dem Durchbruch der Zähne und bildet sich nach ihrem Verlust wieder zurück (Schroeder 1992). Es resultiert eine Reduktion des ursprünglichen Knochenvolumens am Alveolarkamm, sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung (Atwood 1971, Fickl et al. 2008, Farmer & Darby 2014). Diese resorptiven Veränderungen können zu funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen führen und erschweren sowohl implantologische als auch prothetische Rekonstruktionsmaßnahmen (Fickl et al. 2008, Mardas et al. 2015).

Um diesen Veränderungen rechtzeitig entgegen wirken zu können und einen idealen Zeitpunkt für eine implantatprothetische Rehabilitation zu finden, ist ein detailliertes Wissen über die biologischen Vorgänge innerhalb der Alveole notwendig (Schropp et al. 2003). Über die Ausbildung und Reifung eines Blutkoagulums kommt es zur Organisation einer provisorischen Matrix, welche schrittweise von Geflecht- und später von Lamellenknochen ersetzt wird (Amler 1969). Untersuchungen über den initialen Heilungsprozess wurden in den vergangenen Jahren vor allem an tierexperimentellen Studien evaluiert (Cardaropoli et al. 2003, Araújo et al. 2009). Bisher erfolgte Studien an humanen Extraktionsalveolen sind bis dato beschränkt (Amler 1969, Boyne 1966, Evian et al. 1982), aber von entscheidender Bedeutung da es zu berücksichtigen gilt, dass sich die physiologischen Umbauraten der einzelnen Spezies voneinander unterscheiden (Pearce et al. 2007).

Für den Erhalt des Alveolarknochens post extractionem werden verschiedene Ansätze diskutiert. Neben der Sofortimplantation, welche in klinischen und tierexperimentellen Studien keinen klaren Vorteil hinsichtlich der Prävention zeigte (Araújo 2005, Botticelli et al. 2004, Covani et al. 2004, Schropp et al. 2003a, 2003b, Sanz et al. 2010), kommen unterschiedliche Knochenersatzmaterialien für augmentative Maßnahmen im Sinne einer Socket - Preservation zum Einsatz. Tierexperimentelle und humane Studien

dokumentieren die Anwendung des xenogenen Knochenersatzmaterials Bio-Oss in der zahnärztlichen Chirurgie und berichten über einen osteokonduktiven Effekt (Berglundh & Lindhe 1997, Jensen et al. 1996, Artzi et al. 2000, Araújo et al. 2015). Welchen Einfluss Bio-Oss auf die Knochenneuf ormation und auf das osteogene sowie angiogene Potential während der initialen Wundheilung in humanen Alveolen hat, ist bis dato noch nicht geklärt, spielt aber eine entscheidende Rolle um ein optimales Zeitmanagement für implantatprothetische Therapieansätze formulieren zu können.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, mit Bio-Oss Collagen augmentierte und nicht augmentierte humane Extraktionsalveolen nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode vergleichend zu untersuchen. Dabei galt es histomorphologisch die Knochenneuf ormationsrate zu bestimmen sowie das osteogene und angiogene Potential mesenchymaler Stammzellen in der provisorischen Matrix immunhistologisch zu evaluieren.

4. Literaturverzeichnis

4.1. Knochen

Der Knochen zählt zu den Stützgeweben des Körpers und ist eine hoch spezialisierte Form des Bindegewebes. Er besteht zu etwa 50 % aus Mineralien, zu 25 % aus Wasser und zu 25 % aus organischen Bestandteilen. Als Stützapparat bietet er dem Körper funktionellen Halt, dient als Schutz der inneren Organe und des Zentralnervensystems und nimmt aktiv am Calciumstoffwechsel des Körpers teil (Junqueira 2005).

Das Knochengewebe ist ein Verband von Knochenzellen mit Zwischenzellsubstanz und besitzt die Fähigkeit, bei Beschädigung komplett adäquates neues Knochengewebe zu bilden und zu einer Restitutio ad integrum zu führen (Braun & Rüter 1996).

4.1.1. Aufbau des Knochens

Makroskopisch setzt sich der Knochen aus zwei Schichten zusammen. Die **substantia compacta** bildet die feste äußere Oberfläche des Knochens und macht etwa 85 % des Gesamtknochens im Körper aus, während die **substantia spongiosa** mit etwa 15 % der Gesamtknochenmasse, sich innerhalb des Knochens befindet (Mundy 1999). Sie besteht aus kleinen schwammartig angeordneten Knochenbälkchen, die sich entlang der Zug- und Drucklinien (Trajektorien) ausrichten.

Umhüllt wird der Knochen auf der äußeren Oberfläche von einer Bindegewebsschicht, dem **Periost**. Dieses besteht aus einer inneren, zell- und gefäßreichen Schicht und einer äußeren Faserschicht. Durch das Periost werden Blutgefäße und vegetative Nervensysteme an den Knochen herangeführt. Auf der inneren Oberfläche wird die substantia compacta von dem **Endost** überzogen und somit vom Markraum abgegrenzt. Es besteht aus einer dünnen Lage von flachen Bindegewebszellen (Hees & Sinowatz 2000).

Strukturell wird zwischen Geflechtknochen, zusammengesetztem Knochen, und lamellärem Knochen differenziert (Garg 2006). Der **Geflechtknochen** wird auch als Primärknochen bezeichnet und tritt sowohl bei der Knochenentwicklung als auch bei der Frakturheilung auf. Er ist gekennzeichnet durch seine zufällige Anordnung der Kollagenfibrillen und einem niedrigeren Mineralgehalt als der Lamellenknochen, wodurch er eine geringere mechanische Festigkeit aufweist. Der Geflechtknochen wird

resorbiert und langsam durch den reiferen lamellären Knochen ersetzt. Während des Ersatzes von Primärknochen durch lamellären Knochen wird der Knochen als **zusammengesetzter oder plexiformer Knochen** bezeichnet, bei dem man ein Gitternetzwerk aus Geflechtknochen gefüllt mit lamellärem Knochen sehen kann (Garg 2006, Hahn & Klotz 2008). Der **Lamellenknochen** des Erwachsenen besteht aus einer organisierten Kollagen-Protein-Mineralstruktur und verleiht ihm dadurch eine höhere Stabilität und Festigkeit (Marx & Garg 1998). Kollagenfibrillen sind in einem Lamellensystem angeordnet, die sich in Schichten konzentrisch um einen zentralen Kanal reihen. Dieser sogenannte Havers-Kanal enthält nutritive Blutgefäße, Nerven und Bindegewebe und bildet zusammen mit den Speziallamellen das **Osteon**. Das Osteon ist sowohl in der substantia compacta parallel zur Oberfläche angeordnet, wie auch in der substantia spongiosa, jedoch weniger regelmäßig (Lüllmann-Rauch 2006, Hees 2000). Die Havers-Kanäle der einzelnen Osteone kommunizieren mit der Knochenmarkshöhle, dem Periost und untereinander durch seitlich verlaufende Volkmann-Kanäle und sichern somit die Blutversorgung und Reizleitung des Knochens. Die einzelnen Lamellen bestehen aus Kollagenfaserbündeln, welche in eine mineralische Grundsubstanz eingebettet sind. In diese mineralische Grundsubstanz werden anorganische Bestandteile wie Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatitkristallen eingelagert, was zu einer Verkalkung der Knochenmatrix führt. Ebenfalls vorhanden sind auch Zitat- und Karbonationen, sowie geringe Mengen Magnesium-, Kalium- und Natriumsalze. Die Kollagenfasern dienen den mineralischen Bestandteilen hierbei als Kristallisationskeime (Junqueira 2005).

4.1.2. Zellen des Knochens

Aus dem Knochengewebe lassen sich folgende Zellarten morphologisch abgrenzen:

Osteoblasten

Die Osteoblasten sind kubisch, zylinderförmige, stoffwechselaktive Zellen, die sich auf den endostalen und periostalen Knochenoberflächen befinden. Sie differenzieren sich aus den mesenchymalen pluripotenten Knochenvorläuferzellen und synthetisieren und sezernieren einen Großteil der organischen Knochenmatrix.

Die Hauptsyntheseprodukte sind zu 90 % das Kollagen Typ 1 und nicht-kollagene Proteine (Tab. 1).

Tab. 1: Proteine des Knochens

Protein	Anteil	Funktion
Kollagen Typ 1	90-95 %	Bildung der Kollagenfibrillen, verleiht Elastizität und hohe Zugfestigkeit
Osteocalcin	1-2 %	Bindung von Calcium und Hydroxylapatit durch Carboxyglutaminsäurereste, inhibiert Mineralisierung des Knochens
Osteonectin	2 %	Glykoprotein mit hoher Affinität und Bindung an Calcium, Hydroxylapatit und Kollagen, Regulierung der Zellproliferation und Zell-Matrix-Interaktionen, stimuliert Prolineinbau in Kollagen
Osteopontin	1 %	Bindung der Osteoblasten an die extrazelluläre Matrix, stimuliert Bindung der Osteoklasten während der Resorption
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)	0,1 %	Fähigkeit der Chemotaxis, Beeinflussung von Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen, Stimulation der Synthese von extrazellulärer Matrix im Knorpel- und Knochengewebe
Sialoproteine	2 %	dient als Adhäsionsmolekül, stimuliert die Bildung von Hydroxylapatit
Proteoglykane	gering	Beeinflussung der Zell-Matrix-Interaktion, Bindung von TGF- β

Während der Osteogenese werden Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor beta (TGF- β), BMP's und Platelet Derived Growth Factor (PDGF) von Osteoblasten sezerniert und in die Knochenmatrix eingebaut (Mundy 1999).

Die Freisetzung der Syntheseprodukte erfolgt dort, wo die Zelloberfläche mit der Knochenmatrix in Kontakt steht. Diese freigesetzte, noch nicht verkalkte Schicht, wird als Osteoid bezeichnet. In diese Schicht werden nun Mineralien, wie bereits oben beschrieben (siehe 4.1.1.), eingebettet und der neu gebildete Knochen in konzentrisch aufeinander folgenden Schichten, den genannten Speziallamellen, angeordnet.

Mit nachlassender Aktivität bilden die Osteoblasten Zellfortsätze aus und werden zunehmend flacher.

Osteozyten

Haben reife Osteoblasten erfolgreich Knochen gebildet und sind vollständig von mineralisierter Knochenmatrix eingemauert, formen sie sich in Osteozyten mit leicht basophilem Zytoplasma um (Sodek & McKee 2000). Die Osteozyten liegen in sogenannten Lakunen und haben lange dendritische Zellausläufer, die in Canaliculi verlaufen und durch Gap Junctions untereinander in Verbindung stehen. Sie sind für die Ernährung des Knochens und die Signalvermittlung innerhalb des harten Gewebes zuständig (Junqueira 2005, Garg 2006).

Bone-Lining-Cells

Die Bone-Lining-Cells, oder auch Knochendeckzellen genannt, gehören wie die Osteozyten zur Familie der Osteoblasten (Parfitt 1994). Sie gelten als ruhende oder inaktive Osteoblasten, welche nach Beendigung der Knochenbildung flach auf der Knochenoberfläche verbleiben. Die flachen, spindelförmigen Zellen sind mit weniger zytoplasmatischen Organellen ausgestattet, was auf eine niedrige Aktivität sowohl beim Zellmetabolismus als auch bei der Proteinsynthese verweist (Buser 2010). Über Gap Junctions halten die Bone-Lining-Cells die Kommunikation untereinander aufrecht (Miller et al. 1989). Sie spielen eine Rolle beim Mineralaustausch des Knochens und es wird vermutet, dass die Zellen am Remodelling-Prozess beteiligt sind (Parfitt 1994, Everts et al. 2002). Als Teil des „Bone remodeling compartment“ (BRC) lösen sich zu Beginn des Knochenumbaus die Bone-Lining-Cells von der Knochenoberfläche. Die Knochenoberfläche wird zugänglich für Osteoklasten, so dass eine Resorption der mineralisierten Matrix durch die Osteoklasten erfolgen kann (Hauge et al. 2001).

Osteoklasten

Die im aktiven Zustand knochenabbauenden Osteoklasten sind große, vielkernige Riesenzellen, die in flachen Aushöhlungen, den Howship'schen Lakunen, zu finden sind. Sie stammen aus den Zellen der körpereigenen Abwehr, den Monozyten (Garg 2006). Die Monozyten wandern während der Entwicklung aus dem Knochenmark über den Blutweg in den Knochen ein und wandeln sich dort zu Osteoklasten um (Sodek & McKee 2000).

Die Osteoklastenaktivität und Formation ist abhängig von einer Aktivierung des membranständigen Rezeptors RANK (Receptor for Activation of Nuclear Faktor Kappa-B) und von stimulierenden Faktoren, wie M-CSF (monocyte colony stimulating factor) (Proff & Römer 2009). Die Osteoklastendifferenzierung durch RANKL und RANK wird durch eine Cell-Cell-Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten ausgeführt.

Membranständige RANK-Liganden auf der Oberfläche der Osteoblasten binden sich an den passenden Rezeptor RANK von Osteoklastenvorläuferzellen und initiieren dadurch die Differenzierung zu Osteoklasten (Proff & Römer 2009).

OPG (Osteoprotegerin), welches ebenfalls auf den Osteoblasten produziert wird, zeigt eine hemmende Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung und kann neben dem Parathormon, Glukokortikoiden und Vitamin D das RANK/RANKL/OPG - System beeinflussen und die Knochenresorption steuern (Hahn & Klotz 2008, Proff & Römer 2009).

4.1.3. Desmale und chondrale Ossifikation

Die Bildung des Knochens kann im Körper auf unterschiedlichen Wegen ablaufen. Unterschieden wird die desmale/direkte Ossifikation von der chondralen/indirekten Ossifikation (Eames et al. 2003). Bei der **desmalen Ossifikation** dient das Bindegewebe als Gerüst für die Ablagerung der Knochenmatrix (Buser 2010). Mesenchymale Bindegewebszellen differenzieren sich direkt zu Osteoblasten, die anschließend die Produktion von Osteoid aufnehmen. Diese Art der Knochenheilung findet man an den Knochen des Schädels, der Mandibula sowie an der Clavicula (Schiebler & Korf 2007, Welsch 2006, Olsen et al. 2000). Die **chondrale Ossifikation** bestimmt die Entwicklung langer und kurzer Röhrenknochen und wird indirekt über eine knorpelige Vorstufe gebildet (Schiebler & Korf 2007). Aus dem mesenchymalen Bindegewebe differenzieren sich Chondrozyten, die ein Abbild des Knochens aus hyalinem Knorpel bilden, welcher im folgenden durch Knochen ersetzt wird. Man unterscheidet hierbei die perichondrale von der enchondralen Ossifikation (Eames et al. 2003). Im Rahmen der perichondralen Ossifikation kommt es zunächst im Bereich der Diaphyse zur Bildung einer perichondralen Knochenmanschette, die den Knorpel von außen umschließt und von den osteogenen Zellen des Perichondriums gebildet wird. Gleichzeitig kommt es zum Abbau der inneren Knorpelmatrix, so dass eine Markhöhle entsteht und es zur Einsprossung von Blutgefäßen und Mesenchymzellen aus dem

Perichondrium kommt (Welsch 2006, Schiebler & Korf 2007). Es folgt die enchondrale Ossifikation in den Epiphysen. Hierbei hypertrophieren die Chondrozyten des hyalinen Modells und sterben ab. Sie hinterlassen Lakunen, in welche Blutgefäße und mesenchymale Stammzellen eindringen. Die Mesenchymzellen entwickeln sich zu Osteoblasten, welche die Knochenmatrix sezernieren. Die ursprüngliche Knorpelmatrix hingegen wird durch Chondroklasten abgebaut (Welsch 2006, Eames et al. 2003, Olsen et al. 2000).

4.1.4. Angiogenese

Eine entscheidende Grundlage für den Strukturerhalt und die Regeneration des Knochens ist die Angiogenese. Sie beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen der umgebenden Gewebe (Kleinheinz et al. 2002).

Die Bildung neuer Blutgefäße geht meist von Kapillaren aus. Die bereits vorhandenen Gefäße erweitern sich und werden vermehrt durchlässig (Carmeliet 2000, Welsch 2006). Durch die Freisetzung von Proteasen aus dem Endothel kommt es zum Abbau der Basallamina und der das Gefäß umgebenden extrazellulären Matrix (Boujard et al. 2014). Dies ermöglicht eine Migration und anschließende Proliferation der Endothelzellen. Es bilden sich Stränge aus endothelialen Zellen, die elongieren und ein Kapillarlumen ausbilden. Abschließend wird eine Basallamina um das neu entstandene Gefäß gebildet und mit Perizyten und glatten Muskelzellen stabilisiert (Welsch 2006, Boujard et al. 2014). Der komplexe Vorgang der Angiogenese wird von zahlreichen Stimulatoren und Inhibitoren koordiniert. Neben einer Stickstoffoxid - induzierten Vasodilatation, welche der Initiation der Angiogenese stets voraus geht (Carmeliet 2000), spielen endothelspezifische Wachstumsfaktoren wie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Angiopoietine (ANG-1) als Stimulatoren der Endothelmigration und –proliferation eine entscheidende Rolle (Welsch 2006).

Eine enge Interaktion zwischen Angiogenese und Osteogenese in der Frakturheilung wurde bereits mehrfach beschrieben (Lienau et al. 2009, Brandi & Collin-Osdoby 2006, Qu et al. 2011, Alt et al. 2011). Neben der indirekten Wirkung über die gesteigerte Bereitstellung von osteogenen Progenitorzellen durch das sich entwickelnde Gefäßsystem, spielt für die knöcherne Regeneration die erhöhte Expression von osteogenen Faktoren durch die Endothelzellen eine entscheidende Rolle (Kleinheinz et al. 2002).

Endothelzellen

Endothelzellen bilden die innere Auskleidung des gesamten Blutgefäßsystems (Risau 1995, Sumpio et al. 2002). Die flachen, polygonalen Zellen bilden das Endothel, ein einschichtiges Plattenepithel welches einer Basallamina aufsitzt. Sie sind in Richtung des Blutstroms leicht gestreckt angeordnet und untereinander durch tight junctions und gap junctions verbunden (Zille & Tillmann 2010). Diese endothelialen Zell- Zell-Kontakte bestimmen die Permeabilität der Blutgefäße. Durch seine anatomische Lage als Grenzschicht bildet das Endothel eine physikalische Barriere zwischen dem Blut und dem extravasalem Raum und ist für eine Vielzahl von Aufgaben zuständig (Sumpio et al. 2002). Es reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut, synthetisiert Vasokonstriktoren und Vasodilatoren zur Modulation des Blutflusses und der Gefäßreaktion, reguliert inflammatorische und immunologische Prozesse und stellt aufgrund seiner antikoagulatorischen und antithrombotischen Wirkung, ein wesentlichen Faktor der Hämostase dar (Sumpio et al. 2002, Welsch 2006). Durch die Expression von verschiedenen Rezeptoren, wie beispielsweise für den Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), zur Förderung der Angiogenese (Schiebler & Korf 2007) oder inflammatorischen Mediatoren, wie Histamin und Thrombin (Klinke et al. 2004, Vanhoutte & Mombouli 1996), wird den Endothelzellen eine weitere wichtige Funktion zur Erkennung und Umsetzung von zellulären Signalen aus den Blutkompartimenten zugesprochen.

4.1.5. Modelling und Remodelling

Der gesamte Knochen befindet sich fortwährend in einem dynamischen Zustand. Er unterliegt ständigen Veränderungen und Anpassungsvorgängen, die beispielsweise von der Aktivität der Knochenzellen und von Belastungsmomenten bestimmt wird. Täglich werden etwa 0,7 % des menschlichen Skeletts resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt (Marx & Garg 1998). Unterschieden wird dabei Knochenmodelling und Knochenremodelling.

Beim **Modelling** des Knochens kommt es zu einer Konturierung und Formung des wachsenden Knochens. Osteoblasten und Osteoklasten agieren hierbei unabhängig voneinander, so dass in einigen Gebieten Knochen abgebaut und in anderen Gebieten Knochen angebaut wird. Das Knochenmodelling kann sowohl die Größe als auch die Form des Knochens verändern (Garg 2006).

Das **Knochenremodelling** hingegen bezeichnet die miteinander verbundene Aktion der beiden Zelltypen. Es ist ein zyklischer Prozess, der den Status quo aufrecht erhält und nicht die Größe oder Form ändert. Knochenremodelling entfernt durch osteoklastäre Resorption einen Teil des alten Knochens und ersetzt ihn durch die Aktivität von Osteoblasten mit neuem Knochen (Garg 2006).

Überwiegt Knochenabbau durch Osteoklasten resultiert ein Knochenverlust, überwiegt der Knochenaufbau durch Osteoblasten, kommt es zu einem Zuwachs an Knochengewebe (Sodek & McKee 2000, Kawamura et al. 2007). Remodellingvorgänge haben das Ziel, die optimale Festigkeit der Knochen zu erhalten, Mikroläsionen zu reparieren und die Knochenarchitektur an äußere Einflüsse anzupassen. Kommt es zu einer Änderung der Belastungsintensität auf den Knochen, folgt eine strukturelle Anpassung an die vorherrschende funktionelle Belastung. Dieser Prozess wird als „Wolffsches Gesetz“ bezeichnet. Es besagt, dass der Knochen sich aufbaut und an Festigkeit zunimmt, wenn er belastet wird. Wird der Knochen nicht oder nur wenig belastet, kommt es zum Abbau des Knochengewebes (Wolf 1995, Frost 1994).

4.2. Knochenwundheilung nach Zahnextraktion

4.2.1. Die Extraktionsalveole

Als Zahnalveole wird eine Vertiefung des Ober- und Unterkieferknochens bezeichnet, in der die Wurzel des Zahnes durch das parodontale Ligament verankert ist.

Mit der Entwicklung und dem Durchbruch der Zähne entwickelt sich der Alveolarknochen (Schroeder 1992). Er besteht aus 2 Komponenten. Der eigentliche Alveolarknochen bildet die innere Wand der Alveole und liegt unmittelbar lateral des parodontalen Ligaments. Er wird wie das Wurzelzement und das parodontale Ligament, aus dem Ektomesenchym gebildet und auch als Bündelknochen bezeichnet. Der Bündelknochen bezeichnet den Teil des Knochens, dem die Fasern des parodontalen Ligaments entspringen und ist somit entwicklungsgeschichtlich und funktionell Teil des Zahnhalteapparates. Er spielt eine maßgebliche Rolle bei den Veränderungen des Alveolarknochens nach Verlust eines Zahnes (Araújo & Lindhe 2005). Der restliche Teil des Kieferknochens ist periostalen Ursprungs und entwickelt sich aus Zellen, die unabhängig von der Zahnentwicklung gebildet werden (Lindhe et al. 1999).

Das parodontale Ligament dient als Aufhängung des Zahnes in der Alveole und ermöglicht die Verteilung der funktionellen Kräfte über den Alveolarknochen auf den Alveolarfortsatz. Es besteht aus gefäß- und zellreichem kollagenem Bindegewebe und strahlt mit seinen Fasern von der lamina dura des Alveolarknochens in das Zement der Zahnwurzel ein. Die Fasern des parodontalen Ligaments, die in den Knochen und das Zement des Zahnes eingebettet sind, werden als Sharpey'sche Fasern bezeichnet und aus Fibroblasten des parodontalen Ligaments produziert (Lindhe et al. 1999, Schroeder 1992, McCulloch & Bordin 1991).

Bedeckt wird der Alveolarfortsatz von der Gingiva. Die Gingiva besteht aus einem gingivalen Epithel, dem Verbindungsepithel und dem subepithelialen Bindegewebe, mit den darin enthaltenen Blutgefäßen und Nervenfasern.

Die Gesamtheit aus Alveolarknochen, parodontalem Ligament, Zement und Gingiva wird als Parodontium (Zahnhalteapparat) bezeichnet und bildet eine entwicklungsgeschichtliche, biologische und funktionelle Einheit (Schroeder 1992). Es unterliegt gewissen Altersveränderungen und ist morphologischen und funktionellen Veränderungen sowie Einflüssen aus dem Mundhöhlenmilieu unterworfen (Lindhe et al. 1999).

Muss ein Zahn aufgrund von Traumata, fehlgeschlagenen Wurzelkanalbehandlungen oder starker kariöser Zerstörung aus seiner Alveole entfernt werden, kommt es zur intraalveolären Durchtrennung des parodontalen Ligaments und der anschließenden Entfernung des Zahnes aus seiner Alveole. In der so entstandenen Extraktionsalveole setzt nun die natürlich verlaufende Wundheilung mit primärer Bildung eines Blutkoagulums ein.

4.2.2. Heilung der Extraktionsalveole

Jede Wundheilung ist ein komplexer Vorgang, an dem alle Gewebselemente beteiligt sind. Allgemein kann die Wundheilung in eine exsudative Phase, resorptive Phase, proliferative Phase und regenerative Phase unterteilt werden (Lippert 2012).

Die Prozesse in einer heilenden Extraktionsalveole wurden erstmalig histologisch an Tiermodellen (Euler 1923, Claflin 1936, Alling & Kerr 1957, Huebsch et al. 1952, Simpson 1960) und später an humanen Alveolen (Mangos 1941, Amler et al. 1960, 1969) evaluiert. In der Vielzahl der Studien werden die aufeinanderfolgenden Zell- und Gewebsveränderungen während der Alveolenheilung untersucht und beschrieben,

ohne jedoch detaillierte Angaben über die unterschiedlichen Bereiche innerhalb der Alveole und über die Quantität und Qualität der Zellen zu machen. Es existieren nur wenige humane Studien, welche den Heilungsprozess über einen längeren Zeitraum analysieren und die Qualifizierung und Quantifizierung der beteiligten Zellen betrachten (Devlin & Sloan 2002, Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2012). Genauere Untersuchungen zum Heilungsablauf in der Extraktionsalveole sind in der Literatur vor allem in tierexperimentellen Studien evaluiert worden (Cardaropoli et al. 2003, Araújo & Lindhe 2005, Araújo et al. 2009, Jensen et al. 2007, Rothamel et al. 2007). Die Ergebnisse müssen jedoch vorsichtig auf die Verhältnisse am Menschen übertragen werden, da der Knochen turnover und damit die Zeit der verschiedenen Schritte, die zur Bildung von mineralisiertem Knochen führen, sich beim Menschen von den Tiermodellen unterscheiden (Pearce et al. 2007). Dennoch kann ein gewisses Muster ausgemacht werden, welches bei der natürlich stattfindenden Wundheilung nach Extraktion abläuft:

1.- 3. Tag

Unmittelbar nach Entfernung des Zahnes füllt sich die leere Alveole durch Schädigung der Gefäße mit Blut. Die erste lokale Reaktion führt zur Vasokonstriktion der Gefäße. Durch Thrombozytenadhärenz und chemotaktische Faktoren setzt sich die Gerinnungskaskade in Gang und führt zur Koagulation des Blutes. Das sich bildende Blutkoagulum setzt sich aus Erythrozyten und Thrombozyten, eingebettet in ein Fibrinnetzwerk, zusammen und kleidet die Alveole vollständig aus (Boyne 1966, Amler 1969). Dies ist die Voraussetzung für eine ungestörte Wundheilung und bildet das Leitgerüst für den weiteren Heilungsverlauf.

Nach 48 Stunden ist die Bildung eines Fibrinnetzwerkes zu erkennen und es wandern neutrophile Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten in das Koagulum ein. Im Zentrum des Blutkoagulums kommt es durch Hämolyse zur Bildung von flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen und zeigt die beginnende Auflösung des Koagulums (Amler 1969). Peripher ist die Bildung von Granulationsgewebe, definiert als stark vaskularisiertes Gewebe mit Entzündungszellinfiltraten, zu beobachten (Amler 1969, Trombelli et al. 2008). Mit der proliferativen Phase beginnt ab dem 3. Tag die Kapillarproliferation und das Blutkoagulum wird langsam von Granulationsgewebe ersetzt.

1. Woche

Im Laufe der ersten Woche schreitet die zelluläre Organisation der Wunde fort. Durch die Proliferation von Endothelzellen, induziert durch Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und FGF2 (Fibroblast Growth Factor-2), wird die weitere Angiogenese, welche essentiell für die nachfolgende Knochenregeneration ist, gefördert (Long et al. 1995, Reilly et al. 1998). Vom Wundrand ausgehend kommt es zur Proliferation des Gingivaepithels, welches sich langsam über das Fibrinnetz zentralwärts schiebt. Boyne und Amler dokumentieren die ersten Knochenneufahrungen innerhalb der humanen Alveole, wobei in ihren histologischen Untersuchungen keine spezifischen Angaben über histomorphometrische Messungen sowie über das Zellgeschehen innerhalb der einzelnen Gewebe gemacht werden (Boyne 1966, Amler 1969).

2. Woche

Ausgehend vom Alveolenrand und Alveolenboden setzt zunehmend die Reorganisation des Granulationsgewebes zu provisorischer Matrix ein (Amler 1969). Die provisorische Matrix wurde erstmalig von Cardaropoli in einer tierexperimentellen Studie als bindegewebige Struktur beschrieben, welche aus einer Vielzahl von Mesenchymzellen, eingebettet in eine fibröse Matrix, besteht (Cardaropoli et al. 2003). Neben der provisorischen Matrix, zeigen sich Inseln von Geflechtknochen (Amler 1996, Boyne 1966, Ahn & Shin 2008). In einer immunhistologischen Untersuchung von 2002 zeigten Devlin & Sloan an drei Alveolen von Tumorpatienten, dass sich entlang des Alveolenrandes und der neugeformten Trabekelstrukturen Osteoblastenvorläuferzellen sowie Osteoblasten abzeichnen. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper Cbfa1, SB-10 und SB-20 demonstrierten sie erstmalig in einer humanen Studie das osteogene Potential der provisorischen Matrix. Aufgrund der geringen Probandenzahl und der möglichen Einflussfaktoren aufgrund der Tumorerkrankung, ist die Aussagekraft jedoch nur als bedingt einzustufen (Devlin & Sloan 2002).

3. Woche

Nach 3 Wochen ist das Gewebe unter der Epithelschicht gut organisiert. In der provisorischen Matrix nimmt die Anzahl der Leukozyteninfiltrate ab. In einer dichten kollagenreichen Matrix hat sich ein Gefäßnetzwerk integriert (Amler 1969, Trombelli et al. 2008).

4. Woche

In der vierten Woche füllt sich die Alveole von apikal immer mehr mit Geflechtknochen. Ahn & Shin dokumentieren im Zeitraum von 2 - 4 Wochen an 3 Patienten eine Knochenneuformationsrate von 15 %, wobei Trombelli et al. im gleichen Zeitraum nur 7 % verzeichnen konnte (Ahn & Shin 2008, Trombelli et al. 2008). Weitere metrische Angaben sind bis dato an humanen Alveolen nicht zu finden.

Der Geflechtknochen zeichnet sich aus durch fingerähnliche Projektionen von mineralisiertem Gewebe in einer Bindegewebsmatrix. Oftmals umgeben die Trabekel ein oder mehrere Gefäßstrukturen und der sich neu gebildete Knochen wird umsäumt von Osteoid und Osteoblasten (Trombelli et al. 2008, Evian et al. 1982). In der aktiven Zone entlang der Oberfläche des sich neuformierenden Knochens, kommt es zu einer zunehmenden osteogenen Aktivität. Dies demonstrierten Trombelli und seine Mitarbeiter mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren BMP-7 und Osteocalcin, zum Nachweis von osteogenen Zellen. Zusätzlich zeigten sie für diesen Zeitraum eine hohe Anzahl an Endothelzellen, als Zeichen einer starken Vaskularisierung in der Bindegewebsmatrix, welche sich jedoch im Laufe des Heilungsprozesses reduzierte (Trombelli et al. 2008). Um den initialen Heilungsprozess der ganzen Alveole beurteilen zu können, ist jedoch die Kenntnis über das osteogene Potential der mesenchymalen Stammzellen innerhalb der gesamten provisorischen Matrix von entscheidender Bedeutung, sowie auch der Reifegrad der beteiligten Zellen. Allerdings sind für diesen Zeitraum bis dato in der Literatur keine detaillierten Angaben zu finden. Auch der mögliche Einfluss durch die Anzahl der osteogenen Zellen oder der Gefäße auf die Knochenformationsrate ist bisher nicht evaluiert worden.

5. - 8. Woche

In der Alveole zeigt sich neben der provisorischen Matrix nun dominierend neugebildeter Knochen (Boyne 1966, Amler 1969, Evian et al. 1982, Trombelli et al. 2008). In einer immunhistologischen Studie an menschlichen Extraktionsalveolen wurde das osteogene Potential von mesenchymalen Stammzellen in der provisorischen Matrix von Heberer et al. metrisch untersucht. Nach immunhistologischer Analyse durch die 3 monoklonalen Antikörper Cbfa1, Osteonectin und Osteocalcin stellten sie fest, dass die provisorische Matrix einen hohen Anteil an der Reifung von sich entwickelnden Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten hat. In ihrer Untersuchung zeigte sich, dass in den einzelnen Proben unterschiedliche Reifestadien nebeneinander vorlagen, wobei

reife Osteoblasten weniger als ein Drittel einnahmen (Heberer et al. 2012). In einer Studie an Hundemodellen gab Cardaropoli et al. an, dass die Knochenneuf ormation von apikal beginnt (Cardaropoli et al. 2003). Das entspricht der Beobachtung von Heberer et al. an humanen Alveolen. Es stellten sich zu diesem Zeitpunkt Unterschiede in den apikalen und coronalen Regionen dar, wobei sich apikal ein stärkerer Reifegrad als coronal zeigte (Heberer et al. 2012).

9. - 12. Woche

In der 9. - 12. Woche zeigt sich der Knochen hauptsächlich als Trabekel von Lamellenknochen mit sekundären Osteonen, neben Inseln von Geflechtknochen mit primären Osteonen (Heberer et al. 2011, Trombelli et al. 2008). Im Zusammenhang mit dem Remodellierungsprozess von Geflechtknochen zu Lamellenknochen, kommt es zu Knochenmarksformationen. Das Knochenmarksgewebe zeigt histologisch eine große Anzahl an Blutgefäßen, Entzündungszellen und Fettzellen (Cardaropoli et al. 2003, Trombelli et al. 2008). Der Modelling- und Remodellingprozess schreitet weiterhin fort. In tierexperimentellen Untersuchungen wurde die Bildung einer Hartgewebsbrücke unter der marginalen Mukosa, welche kontinuierlich vom alten Knochen der Alveole vom mesialen zum distalen Rand verläuft, beschrieben (Cardaropoli et al. 2003 & 2005, Araújo & Lindhe 2005, Araújo et al. 2008, Rothamel et al. 2007). Diese Beobachtung konnte in den humanen Studien nicht bestätigt werden (Boyne 1966, Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2008, Heberer et al. 2011).

Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass der Reifezustand des neugebildeten Gewebes und damit die Quantität und Qualität des neuen Knochens, zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Wundheilung variieren kann (Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2008, Heberer et al. 2011). Amler et al. beschreibt in seiner Untersuchung das Auffüllen der Alveole nach 40 Tagen zu 2/3 mit mineralisiertem Knochen, während bei Evian et al. die Alveolen nach 10 Wochen vollständig mit Knochen gefüllt waren (Amler 1969, Evian et al. 1982). Bei Trombelli und Mitarbeitern hingegen zeigte sich in seinen Proben nach 12 - 24 Wochen 41% an mineralisiertem Gewebe und sie stellten fest, dass die Formationen von neuem Knochen in den Extraktionsalveolen nach 24 Wochen noch nicht vollständig abgeschlossen waren (Trombelli et al. 2008).

Nachdem hier nun aufgezeigt wurde wie der Heilungsprozess in der Alveole abläuft, soll im folgenden Abschnitt die Dimensionsveränderung in der Extraktionsalveole betrachtet werden.

4.2.3. Gewebsveränderungen nach Zahnextraktion

Nach Extraktion des Zahnes kommt es im Verlauf der knöchernen Regeneration zu chronischen, progressiven und irreversiblen Veränderungen des Alveolarkamms. Es zeigen sich sowohl in der Höhe als auch in der Breite erhebliche Volumenverluste (Petrovsky & Massler 1967, Schropp et al. 2003b, Fickl et al. 2008, Araújo & Lindhe 2005). Wie sich in einer Studie von Schropp et al. zeigen ließ, findet der Hauptanteil dieser Veränderungen innerhalb der ersten 12 Monate nach Entfernung des Zahnes statt. Sie konnten eine Abnahme der bucco-lingualen Knochenbreite von 50 % innerhalb von 12 Monaten nachweisen, wobei zwei Drittel der Resorption in den ersten 3 Monaten stattfand (Schropp et al. 2003b, Johnson 1969). In einem Review über die postextraktionellen Dimensionsveränderungen in humanen Alveolen stellten Tan und Mitarbeiter dar, dass sich horizontal ein Knochenverlust von 29 – 63 % und vertikal ein Verlust von 11 – 22 % in den ersten 3 bis 6 Monaten vollzieht (Tan et al. 2012).

Die resorptiven Veränderungen in der vertikalen Dimension sind unterschiedlich ausgeprägt und zeigen sich besonders stark an den buccalen Alveolarwänden (Schropp et al. 2003b). Der Abbau der buccalen und lingualen Knochenlamellen wurde vor allem in tierexperimentellen Studien näher untersucht (Araújo & Lindhe 2005, Fickl et al. 2008, Araújo et al. 2008). Man kam zu dem Schluss, dass die anatomische Struktur des Bündelknochens entscheidend an den Atrophievorgängen des Alveolarkamms beteiligt ist. Bei der Extraktion des Zahnes kommt es zum Abriss der Sharpey'schen Fasern aus dem Bündelknochen. Der Verlust seiner Funktion, die Verankerung des Zahnes zu gewährleisten und die nun fehlende physiologische Kraffteinwirkung, führen zur schrittweisen Resorption des Bündelknochens (Araújo & Lindhe 2005).

Da die vestibuläre Knochenwand sehr dünn und oftmals nur aus Bündelknochen bestehen kann, ist sie besonders stark den resorptiven Vorgängen ausgesetzt (Araújo & Lindhe 2005). Die linguale bzw. palatinale Knochenwand hingegen ist meistens ausreichend dick und besteht, neben dem schmalen Anteil des Bündelknochens, hauptsächlich aus dem Alveolarknochen selbst, welcher keine funktionelle Verbindung zur Zahnwurzel aufweist. Die linguale/palatinale Wand ist ebenfalls den resorptiven

Vorgängen unterworfen, jedoch weniger stark als die buccale Wand (Cardaropoli et al. 2003, Araújo & Lindhe 2005, Fickl et al. 2008, Trombelli et al. 2008). Araújo und Lindhe postulierten in ihrer Studie am Hundemodell einen deutlichen Unterschied der knöchernen Struktur im buccalen und lingualen Bereich in apikokoronaler Richtung. Die buccale Wand lag nach 8 Wochen 2 mm (+/- 0,2 mm) apikal der lingualen Wand (Araújo & Lindhe 2000).

Sowohl Pietrokovski & Massler als auch Schropp et al. fanden in ihren Untersuchungen lokale Unterschiede hinsichtlich der Zahnposition im Kiefer. Hierbei zeigte sich im Bereich der Molaren eine stärkere Resorption als im Bereich der Prämolaren (Pietrokovski & Massler 1967, Schropp et al. 2003b). Werden multiple Extraktionen benachbarter Zähne gleichzeitig durchgeführt, kann es zu einer stärkeren Atrophie in apikokoronaler Richtung kommen als bei Einzelzahnextraktionen (Johnson 1963, Chen et al. 2004). Bei einem zahnlosen Kiefer zeigt sich die Formveränderung des Alveolarfortsatzes in einem vorhersagbaren Muster. Die Atrophie des Alveolarkamms im Oberkiefer erfolgt von vestibulär nach oral (zentripetal) und im Unterkiefer von oral nach vestibulär (zentrifugal) (Cawood & Howell 1988, Pietrokovski et al. 2007). Dieses Resorptionsmuster führt zu ungünstigen sagittal und transversalen Verhältnissen, wodurch eine prothetische Versorgung sowie die Insertion von Implantaten auf Grund des geringen Knochenniveaus erschwert wird.

Die Resorption des alveolären Knochens hat, neben dem Verlust an knöcherner Begrenzung, auch Konsequenzen für die mechanische Stützung des benachbarten Weichgewebes. Es kommt zum Verlust der hartgewebigen Unterstützung der befestigten Gingiva und zu einer Reduktion der Weichgewebe. Dies hat eine Abflachung der interdentalen Papillen zur Folge. Der Strukturverlust führt zur Verschiebung der mukogingivalen Grenzlinie und zum Breitenverlust der keratinisierten Gingiva (Tal 1997, Farmer & Darby 2014).

Um den unweigerlich auftretenden Resorptionen entgegen wirken zu können, wurde in den letzten Jahren zunehmend Knochenersatzmaterialien verwendet. Um einen Überblick über die zurzeit zur Verfügung stehenden Knochenersatzmaterialien zu bekommen, werden diese im Folgenden zusammenfassend erläutert.

4.3. Knochenersatzmaterialien

Zur Behandlung von Knochendefiziten kommen in der heutigen Zahnmedizin, neben dem autologen Knochentransplantat, verschiedene Knochenersatzmaterialien zum Einsatz. Knochenersatzmaterialien haben die Aufgabe den Knochenheilungsprozess zu fördern und dienen als Gerüst für die Knochenregeneration.

Die Regeneration des knöchernen Defekts kann hierbei durch Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion erfolgen (Misch & Dietsch 1993, Lane 1995).

Alle Knochenaufbaumaterialien besitzen zumindest eine oder mehrere dieser drei Wirkungsweisen (Lane 1995). **Osteogenetisches Material** enthält Osteoblasten und direkte Vorläuferzellen, die in geeigneter Umgebung zur Knochenbildung fähig sind. Die osteogenen Zellen können die Knochenbildung im Weichgewebe fördern oder ein schnelleres Knochenwachstum in knöchernen Defekten stimulieren. Diese Eigenschaft besitzt lediglich das vitale autogene Knochentransplantat, wobei der spongiöse Teil des Knochens durch seine große Oberfläche reichhaltig an Osteoblasten ist und somit eine höhere Osteogenität aufweist (Misch & Dietsch 1993, Garg 2006, Hahn & Klotz 2008). **Osteoinduktion** bezeichnet die Fähigkeit, undifferenzierte Mesenchymzellen des Empfängerorgans chemotaktisch anzuziehen und in Osteoblasten zu differenzieren. Diese Stimulation und Chemotaxis wird durch die Wachstumsfaktoren induziert, die in der Transplantatmatrix lokalisiert sind, wie z.B. Bone Morphogenic Proteins (BMP's) -2, -3 und -7, welche zur Transforming Growth Factor (TGF) – β Familie gehören. Sie stellen damit sogenannte Morphogene dar und sind nicht auf die Präexistenz von vitalen Knochenzellen angewiesen (Misch & Dietsch 1993, Urist 1965, Urist et al. 1968). Durch **Osteokonduktion** wird eine physikalische Matrix bzw. eine Leitstruktur geschaffen, in welche der umgebende Knochen einwachsen kann. Osteokonduktive Materialien ermöglichen eine Knochenapposition ausgehend von bestehendem Knochen, regen jedoch keine Knochenneubildung an. Um das Knochenwachstum entlang seiner Oberfläche zu fördern, benötigt ein osteokonduktives Transplantat die Anwesenheit von bereits vorhandenem Knochen oder von differenzierten mesenchymalen Stammzellen (Misch & Dietsch 1993, Garg 2006).

An Knochenersatzmaterialien werden generell zahlreiche Anforderungen gestellt. Das ideale Knochenersatzmaterial sollte gut in den vorhandenen Knochendefekt

einwachsen. Sie sollten biokompatibel sein und es sollte kein Risiko der Übertragung bestimmter Erkrankungen auf den Empfänger ausgehen.

Zusätzlich sollten sie neben der Porosität und Resorbierbarkeit eine reaktionslose Integration ermöglichen, mechanisch stabil sein und eine einfache Lagerung und unbegrenzte Verfügbarkeit in Menge und Form des Materials aufweisen.

4.3.1. Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Zur Durchführung augmentativer Maßnahmen steht eine Vielzahl an biologischen oder synthetischen Knochenersatzmaterialien zur Verfügung. Man unterscheidet autologe Transplantate von Allotransplantaten, Xenotransplantaten und alloplastischen Materialien (Buser 2010).

Autologe Transplantate

Bei autologen Transplantaten stammt der gewonnene Knochen vom Patienten selbst. Sie können in Form von Knochenblöcken, partikulärem Knochenmaterial oder als Knochenspäne zur Anwendung kommen (Buser 2010). Als Spenderregionen stehen sowohl intraorale Entnahmestellen wie der Tuber maxillae, Ramus mandibulares und die Symphyse des Unterkiefers oder auch extraorale Regionen wie die Crista iliaca, Ilium, Fibula oder das Tibiaplateau zur Verfügung (Canady et al. 1993, Misch & Dietsch 1993, Hjørting-Hansen 2002). Autologe Transplantate heilen in 3 Phasen durch Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion ein (Misch & Dietsch 1993).

Durch die autologe Herkunft ist das Material vollkommen biokompatibel, zeigt keine immunologischen Reaktionen und eine Übertragung von Krankheiten ist nicht möglich. Die Nachteile bei der Verwendung von autologem Knochen liegen in der begrenzten Verfügbarkeit und der entstehenden Morbidität in der jeweiligen Spenderregion (Lane 1995, Takamoto et al. 2013).

Allotransplantate

Als Allotransplantate werden Knochentransplantate bezeichnet, bei denen der Spender und der Empfänger genetisch nicht identisch sind, aber von der gleichen Spezies abstammen (Misch & Dietsch 1993). Sie wirken osteokonduktiv und können als frisch gefrorener Knochen (FFB), gefriergetrockneter allogener Knochen (FDBA) oder demineralisierter gefriergetrockneter allogener Knochen (DFDBA) eingesetzt werden.

Der Vorteil liegt in der ausreichenden Verfügbarkeit und der Vermeidung von Donormorbidität. Aufgrund genetischer Differenzen ist jedoch eine zelluläre und humorale Abstoßungsreaktion nicht auszuschließen und es besteht die Gefahr der Infektionsübertragung (Lane 1995, Fretwurst et al. 2014).

Alloplastische Materialien

Bei den alloplastischen Knochenersatzmaterialien handelt es sich um rein synthetisch hergestellte Materialien, mit rein osteokonduktiven Eigenschaften. Sie sind verfügbar in Form von Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat oder auch aus Polymeren und bioaktivem Glas. Der Vorteil besteht darin, dass sie aufgrund ihrer rein synthetischen Natur keine Krankheiten übertragen können und keine Begrenzung der quantitativen Verfügbarkeit besteht (Misch & Dietsch 1993).

Xenotransplantate

Bei den xenogenen Knochenersatzmaterialien stammen Spender und Empfänger nicht von der gleichen Spezies. Sie können aus tierischen Quellen (Rind, Schwein oder Pferd) oder aus knochenähnlichen Mineralien, wie aus kalkbildenden Korallen oder Algen, gewonnen werden. Xenotransplantate zeigen eine hohe Biokompatibilität und wirken rein osteokonduktiv. Als einer der bekanntesten und meistverwendeten Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft gilt das Bio-Oss und soll im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

4.3.2. Bio-Oss / Bio-Oss Collagen

Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland) ist ein aus boviner Spongiosa produziertes Hydroxylapatit, welches durch chemische und thermische Behandlung von allen organischen Komponenten befreit wurde. Nach der Aufbereitung und Sterilisation, kann das Material als Knochenaufbaumaterial ohne Erzeugung einer Immunreaktion und Übertragung von Krankheiten eingesetzt werden (Hislop et al. 1993). In einer 2006 veröffentlichten wissenschaftlichen Stellungnahme der DGZMK wird Bio-Oss für den Einsatz in der Parodontologie und Implantologie als unbedenklich eingestuft.

Die deproteinisierte bovine Knochenmatrix besitzt eine der humanen Spongiosa ähnliche kristalline- und morphologische Struktur. Durch sein großmaschiges interkonektierendes Porensystem erleichtert es die Angiogenese und die Migration von

Osteoblasten (Yildirim et al. 2000). Zur Augmentation der Extraktionsalveolen in der hier vorliegenden Studie wurde **Bio-Oss Collagen** (Firma Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Schweiz) appliziert. Bio-Oss Collagen wird aus Bio-Oss Spongiosa-Granulat mit einem Zusatz von 10 % hochgereinigtem porcinem Kollagen Typ I hergestellt. Das beigefügte Kollagen dient der Vernetzung der Spongiosapartikel und soll eine bessere Zelladhäsion ermöglichen. Zusätzlich erlaubt es eine leichtere Modellation und Applikation des Materials.

In der zahnärztlichen Chirurgie wird das Bio-Oss/Bio-Oss Collagen unterschiedlich angewendet. Neben dem Einsatz für Sinusbodenaugmentationen (Piattelli et al. 1999) oder zur Behandlung parodontaler Defekte (Sculean et al. 2005), wird Bio-Oss zum Auffüllen von Extraktionsalveolen im Zuge der Socket-Preservation genutzt. Die Socket-Preservation umfasst regenerative Maßnahmen zur Stabilisierung des Blutkoagulums um möglichen resorptiven Veränderungen nach Zahnextraktion entgegen wirken zu können. Das Ziel ist dabei der Volumenerhalt der Alveole sowie eine Steuerung der Weichgewebsregeneration, um später weiterführend implantieren oder konservativ-prothetisch versorgen zu können.

Bio-Oss gilt als sehr biokompatibel und zeigt osteokonduktive Eigenschaften (Berglundh 1997, Jensen et al. 1996, Artzi et al. 2000). Die knöcherne Integration von Bio-Oss als auch von Bio-Oss Collagen konnte in unterschiedlichen in vivo Studien gezeigt werden. Die Hydroxylapatit-Partikel werden von neu gebildetem Knochen umgeben und dienen als Gerüst für die Bildung des neuen Knochen (Araújo et al. 2008, Heberer et al. 2011). In der Literatur existieren einige wenige humane Studien, welche die Wechselwirkungen von Bio-Oss/Bio-Oss Collagen in der Alveole beschreiben (Carmagnola et al. 2003, Artzi et al. 2000, Heberer et al. 2008, 2011, Araújo et al. 2015). Die Untersuchungen dokumentieren vor allem den Langzeitverlauf der heilenden Alveolen. Fundierte metrische Aussagen über humane mit Bio-Oss Collagen augmentierte Alveolen werden in der Literatur erst ab einer 6-wöchigen Heilungsperiode von Heberer et al. beschrieben (Heberer et al. 2008, 2012). Sie zeigten hierbei signifikante Unterschiede zwischen den coronalen und apikalen Bereichen auf. Die Knochenneuformationsrate betrug apikal durchschnittlich 40 % und coronal durchschnittlich 20 % (Heberer et al. 2008). Zu einem späteren Zeitpunkt der Alveolenheilung demonstrierte Carmagnola et al. in seiner histologischen Studie mit Bio-Oss augmentierten Alveolen, dass nach einer Heilungsperiode von 7 Monaten 40 % der Bio-Oss Partikel in Kontakt mit neugeformten Knochen standen (Carmagnola et al. 2003). Die Integration der Bio-Oss Partikel nach 9

Monaten zeigte 82 % an neuen Knochenformationen entlang der Partikel, wobei auch hier Unterschiede zwischen den apikalen und coronalen Regionen zu verzeichnen waren (Artzi et al. 2000).

Die Wirkung des Fremdmaterials in der Alveole während der initialen Wundheilung, ist bisher nur an Hundemodellen untersucht worden (Araújo et al. 2009, 2010). Araújo zeigte in seinen histologischen Analysen, dass die Bio-Oss Partikel in der frühen Phase der Heilung in das Fibrinnetzwerk des Blutkoagulums eingeschlossen werden. An die Oberflächen der Partikel setzen sich polymorphonukleäre Leukozyten ab, welche in einer 2. Phase von Osteoklasten ersetzt werden. Nach 1 - 2 Wochen dokumentierte Araújo Formationen von neuem Knochen und entlang der Partikel ließen sich Osteoblasten nachweisen (Araújo et al. 2010). Kritisch anzumerken ist die geringe Anzahl an Gewebeproben. Pro dokumentiertem Zeitabschnitt stand jeweils nur eine Gewebeprobe zur Verfügung (Araújo et al. 2010). Histomorphometrische Messungen an Bio-Oss Collagen augmentierten Alveolen ergaben am Hundemodell eine Knochenneuformationsrate von 15 - 30 % nach einer 2-wöchigen Heilungsperiode (Araújo et al. 2009, 2010).

Die Kenntnis über die Heilungsvorgänge während der initialen Phase ist von entscheidender Bedeutung um ein frühes implantologisches Zeitmanagement aufstellen zu können. In unterschiedlichen Studien hat man aufzeigen können, dass die resorptiven Veränderungen während der postextraktionellen Phase womöglich durch Knochenersatzmaterialien aufgehalten werden können. Einige Tierstudien bestätigen, dass durch die sofortige Augmentation der Alveole eine Reduktion des Volumenverlustes erzielt werden konnte. Die Resorption des Bündelknochens konnte hierbei jedoch nicht verhindert werden (Araújo et al. 2008, Nevins et al. 2006, Fickl et al. 2008). In einer Untersuchung zeigte Nevins et al. an Bio Oss - augmentierten Alveolen, dass die buccalen Knochenwände nach 3 Monaten bei 15 von 19 untersuchten Alveolen eine Resorptionsrate von weniger als 20 % hatten. Bei der Kontrollgruppe hingegen, wiesen 12 der 17 nicht augmentierten Alveolen einen Verlust der buccalen Wand von mehr als 20 % auf (Nevins et al. 2006). Fickl et al. verdeutlichten ebenfalls einen reduzierten vertikalen Volumenverlust von Bio-Oss Collagen augmentierten Alveolen nach einer 2 und 4- monatigen Heilungsperiode. Sie schlussfolgerten, dass Bio-Oss Collagen die vertikale Schrumpfung minimieren, jedoch nicht völlig verhindern kann (Fickl et al. 2008).

Da der Einfluss von Bio-Oss Collagen auf die Geweberegeneration in heilenden Extraktionsalveolen entscheidend ist um weitere therapeutische Maßnahmen zu formulieren, lag ein Fokus der hier vorliegenden Studie darin augmentierte Alveolen in Bezug auf die Knochenneuf ormation und den Einfluss auf die Osteogenese und Angiogenese hin zu evaluieren.

4.4. Untersuchung der heilenden Extraktionsalveole

Um die Knocheneuf ormationsrate in den Extraktionsalveolen und das osteogene Potential der mesenchymalen Stammzellen sowie die Vaskularisation in der provisorischen Matrix in der heilenden Extraktionsalveole untersuchen zu können, bediente sich die vorliegende Studie bestimmter histomorphometrischer und immunhistologischer Untersuchungsmethoden.

4.4.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie können einzelne Gewebestrukturen, Zellen und Organellen untersucht werden. Hierzu werden Schnitte des entnommenen Gewebes angefertigt und die einzelnen Gewebekomponenten durch unterschiedliche Färbemethoden sichtbar gemacht.

Durch die Lichtmikroskopie werden Objekte durch optische Abbildungen mit Linsen vergrößert. Das vom Objekt kommende Licht wird durch eine Kombination von mindestens 2 Linsensystemen, dem Objektiv und dem Okular optisch abgebildet. Das Licht durchquert zunächst den Kondensator, der es sammelt und unter maximaler Ausleuchtung an das Objekt weiterleitet und dieses durchleuchtet. Durch die Linsen des Objektivs wird das Objektbild vergrößert und in Richtung der Okularlinsen projiziert, welche das Bild zusätzlich vergrößern und ein virtuelles Bild erzeugen. Das vergrößerte Bild wird entweder auf die Netzhaut des Betrachters projiziert oder kann mit Hilfe eines Kamerasystems aufgenommen und digitalisiert werden (Holtmann et al. 2013).

4.4.2. Histomorphometrische Untersuchungen

Als Histomorphometrie wird die quantitative Aufarbeitung von Gewebe bezeichnet. Histomorphometrische Untersuchungen von Knochenbiopsien liefern Informationen über den Knochenaufbau und -umbau, welche mit Hilfe anderer Messverfahren, wie

Knochendichtemessung oder biologische Marker des Knochenumbaus, nicht erbracht werden können. Hierbei werden Gewebestrukturen in einem histologischen Bild vermessen und durch quantifizierbare Messwerte charakterisiert (Vedi & Compston 2003). Histomorphometrische Analysen von Knochen erfordern, dass sie einfach erkannt und unterschieden werden können. Die computerunterstützte Methode benötigt hierbei einen Schwarz-Weiß-Effekt zwischen mineralisiertem und nichtmineralisiertem Gewebe, welcher durch unterschiedliche Färbemethoden, wie z.B. durch Hämatoxylin-Eosin (HE) oder auch Masson-Goldner-Trichrom Färbung, erreicht werden kann. Das Computerprogramm wird für die Untersuchungen auf die darzustellenden Strukturen geeicht (bestimmter Grauwert, Farbe), ein virtuelles 2D-Bild aufgebaut und anschließend die notwendigen Abmessungen vorgenommen (Lang 2013).

4.4.3. Immunhistologische Untersuchungen

4.4.3.1. Marker der osteoblastären Differenzierungskaskade

Mit Hilfe unterschiedlicher Marker können osteoblastäre Differenzierungen und damit die Bildung von Knochen nachgewiesen werden. Im Laufe ihrer Entstehung durchwandern osteoblastäre Zellen verschiedene Reifestadien. Der Ursprung liegt in den mesenchymalen Stammzellen, welche sich durch die Fähigkeit zur Selbstreplikation und die Differenzierbarkeit in verschiedenen Geweben auszeichnen (Pittenger et al. 1999).

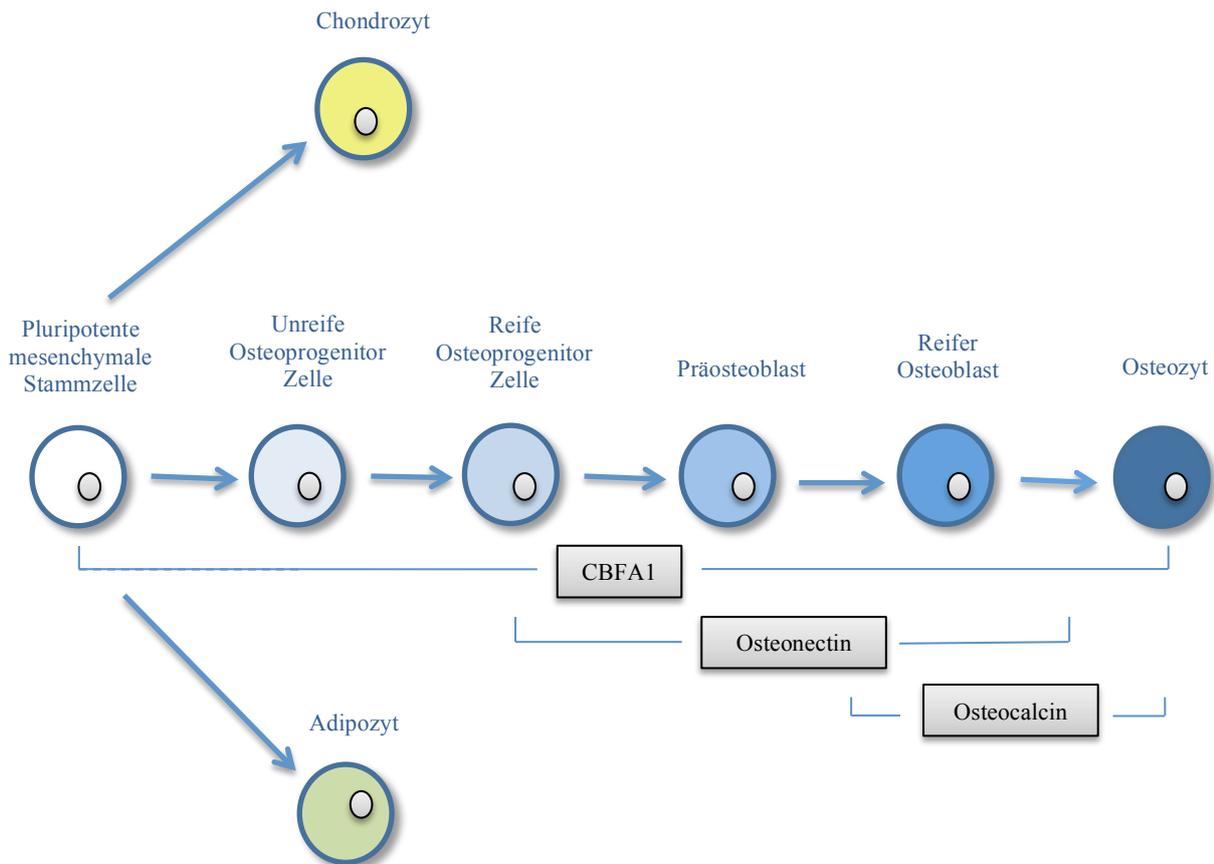


Abb. 1 : Verschiedene Reifestufen innerhalb der osteoblastären Differenzierung mit Expression der osteoblastären Marker (modifiziert nach Komori & Kishimoto 1998)

Während der osteogenen Differenzierung ergibt sich ein grundlegendes Muster über das Auftreten von extrazellulären Matrixproteinen, Zelloberflächenproteinen und Transkriptionsfaktoren die als zuverlässig und weitgehend speziesübergreifend gelten und als Marker für den Nachweis von Osteoblasten genutzt werden (Bruder et al. 1997, Franceschi et al. 2007). Zu den klassischen Markern der osteoblastären Differenzierung zählen hierbei die alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein, Cbfa1 und Osteocalcin (Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1997, Komori & Kishimoto 1998). Zum besseren Verständnis der immunhistologischen Ergebnisse dieser Arbeit, werden die hier verwendeten osteoblastären Marker im Folgenden etwas näher erläutert.

Cbfa1

Der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (Core-Binding-Factor- α 1), auch bekannt als Runx2, AML3 oder PEBP2 α A, ist ein leitendes Gen bei der Kontrolle der

Osteoblastendifferenzierung. Während der Knochenentwicklung steuert das Protein die Differenzierung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen und die terminale Differenzierung hypertropher Chondrozyten (Franceschi et al. 2007). Cbfa1 gilt als Marker der frühen Osteoblastendifferenzierung. Mit der Determinierung in die osteogene Differenzierungslinie ist der Transkriptionsfaktor auf der mesenchymalen Zelle nachweisbar (Ducy et al. 1997).

Das Cbfa 1-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 6 (6p21) lokalisiert und besitzt eine sogenannte „Runt Domäne“, welche für die Bindung an die DNS und damit für die Transkriptionsaktivitäten verantwortlich ist (Otto et al. 1997). Über die Bindung an Promotorregionen beeinflussen Cbfa1-Proteine bestimmte Zielgene und regulieren somit deren Expression. Zu den bekanntesten Zielgenen gehören osteoblastenspezifische Gene wie die von Kollagen I, Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Ameloblastin oder Osteopontin (Ducy et al. 1997, Komori 2008, Rath-Deschner et al. 2010).

Kommt es zur Mutation des Gens, tritt bei Patienten ein verlangsamtes Körperwachstum und eine verspätet einsetzende skelettale Entwicklung, entsprechend einer Cleidocranialen Dysplasie, auf (Jensen 1994, Otto et al. 1997). Ogawa et al. zeigten 1993 in einer tierexperimentellen Studie, dass es bei einer vollständigen Inaktivierung von Cbfa1 zu einer mangelhaften Osteoblastenreifung und einem vollständigen Ausbleiben der Knochenentwicklung bei Mäusen kam (Ogawa et al. 1993).

Osteonectin

Osteonectin ist ein phosphoryliertes Glykoprotein und identisch mit Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein (SPARC) und BM-40. Das häufigste nicht-kollagene Protein in der Knochenmatrix hat Calcium- und Kollagenbindende Eigenschaften und die Fähigkeit Zellproliferation und Zell-Matrix Interaktionen zu regulieren (Termine et al. 1981, Young et al. 1992, Lane & Sage 1994). Zusätzlich kann Osteonectin die Angiogenese und die Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) stimulieren (Shankavaram et al. 1997). Das Osteonectinmolekül weist eine starke Affinität zu Kollagen Typ I auf und stimuliert den Prolineinbau in Kollagen. Gleichzeitig bindet das Glykoprotein Calcium, Kollagen und Hydroxylapatit und kann dadurch die Mineralisation des Knochens induzieren (Termine et al. 1981).

In der frühen Phase der Matrixreifung exprimiert, tritt Osteonectin an aktiven Ossifikationszentren auf und gilt als spezifischer Marker für knochenproduzierende Prozesse. Es wird in Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten und von hypertrophen Chondrozyten der knorpeligen Wachstumsplatten synthetisiert (Young et al. 1992).

Osteonectin-defiziente Mäuse weisen eine normale Skelettentwicklung auf, zeigen jedoch eine eingeschränkte Fähigkeit zur Knochenneubildung und zum Remodelling. Dies spiegelt sich in einer negativen Knochenbilanz und der Entwicklung einer Osteopenie wieder (Delany et al. 2000).

Osteocalcin

Osteocalcin besteht aus 49 Aminosäuren und ist mit zirka 1,5 % das zweithäufigste nicht-kollagene Matrixprotein. Es ist der Gruppe der γ -Carboxyglutaminsäure (Gla) beinhaltenden Proteine zuzuordnen und wird daher auch als Bone Gla Protein (BGP) bezeichnet (Price et al. 1976). Mittels seiner Gla-Reste bindet Osteocalcin Calcium und Hydroxylapatit und ist damit an Kalzifizierungsprozessen beteiligt (Ducy et al. 1997, Berry et al. 2003). Im Vergleich zu anderen nicht-kollagenen Proteinen wird Osteocalcin zu einem späten Zeitpunkt der Matrixreifung, mit Beginn der Mineralisierung der extrazellulären Matrix, von aktiven Osteoblasten synthetisiert. Es gilt als hochspezifischer Marker der reifen osteoblastären Zellen (Hauschka et al. 1989).

Das Osteocalcin-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1q25-q31. Die Expression des Proteins wird durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ stimuliert und durch den Transkriptionsfaktor Cbfa1 reguliert (Rodan & Harada 1997, Ducy 2000).

Bei Ausschaltung des Osteocalcin-Gens zeigten Mäuse eine abnorm erhöhte Knochenmineralisierung. Es zeigte sich eine Zunahme der Knochensubstanz bei gleichzeitig verminderter Bruchfestigkeit und Einengung des Markraums, wie auch beim Bild der Osteopetrose.

4.4.3.2. Endothelmarker

Endothelzellen exprimieren spezifische Marker, welche hilfreich bei der Identifizierung dieser Zellen in vivo und in vitro sein können. In vielen Fällen wurden diese Moleküle durch monoklonale Antikörper, die sich gegen Endothelzellen richten, entdeckt

(Garlanda & Dejana 1997). Zum Nachweis der Bildung von neuen Blutgefäßen während der Knochenneuformationen in den Alveolen wurde im Rahmen dieser Studie CD 31 als Antikörper verwendet.

CD 31

Das transmembrane Glykoprotein Platelet endothelial cell adhesion molecule – 1 (PECAM – 1 = CD 31), gehört zu der Familie der Immunglobuline, welche eine Zell–zu–Zell-Adhäsion vermitteln (Scholz & Schaper 1997, Newmann 1997). Zelladhäsionsmoleküle (CAM = cell adhesion molecule) treten auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung mit anderen Proteinen und ermöglichen einen Zusammenhalt von Geweben, sowie die Kommunikation von Zellen miteinander.

PECAM - 1 ist auf den Zellen des vaskulären Systems weit verbreitet. Es wird mit einer hohen Dichte auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und findet sich darüber hinaus in schwacher Ausprägung auf Leukozyten und Thrombozyten (Delisser et al. 1997, Newman 1997). Diese Verteilung lässt auf eine wichtige Beteiligung an den Gefäßfunktionen schließen. Innerhalb der vaskulären Endothelzellen ist das Glykoprotein in der Zellmembran lokalisiert, hauptsächlich der dem Gefäßlumen zugewandten Seite (Scholz & Schaper 1997). Es verfügt über homophile und heterophile Bindungsstellen, welche entscheidend für die endotheliale Proliferation sind. Das Glykoprotein nimmt an der Regulation der Angiogenese, der Gefäßpermeabilität und der transendothelialen Migration von Leukozyten bei Entzündungen teil (Delisser et al. 1997, Scholz & Schaper 1997).

PECAM-1 wird als universeller und hochspezifischen Marker von Endothelzellen in Gewebeschnitten und isolierten Zellen beschrieben, da es ausschließlich auf Zelltypen endothelialen Ursprungs und Zellen der weißen Blutzellpopulation exprimiert wird, jedoch nicht auf Mesothelzellen (Hewett & Murray 1993). Er gilt derzeit als einer der verlässlichsten immunhistochemischen endothelialen Zellmarker und dient als Nachweis von neugebildeten Gefäßen im Rahmen der Angiogenese sowie von Gefäßtumoren.

5. Fragestellung

In der vorliegenden Untersuchung wurden humane Extraktionsalveolen 4 Wochen post extractionem histomorphometrisch und immunhistologisch ausgewertet. Dabei galt es folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie hoch ist die Knochenneuformationsrate
 - a) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode?
 - b) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode mit Bio-Oss Collagen augmentiert?
2. Gibt es Unterschiede bezüglich der Knochenneuformationsrate im coronalen und apikalen Bereich sowie zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen?
3. Wie hoch ist das osteogene Potential von Cbfa1-, Osteonectin- und Osteocalcin positiven mesenchymalen Stammzellen in der provisorischen Matrix
 - a) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode?
 - b) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode mit Bio-Oss Collagen augmentiert?
4. Stellt sich ein Unterschied bezüglich des osteogenen Potentials im coronalen und apikalen Bereich sowie zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode dar?
5. Wie stark ist die Vaskularisation in der provisorischen Matrix
 - a) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode?
 - b) nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode mit Bio-Oss Collagen augmentiert?
6. Zeigt die Vaskularisation statistische Signifikanzen im coronalen und apikalen Bereich und zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen?
7. Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Knochenneuformationsrate und der Anzahl von Cbfa1-, Osteonectin- und Osteocalcin- positiv expressierenden Zellen erkennen?

6. Material und Methoden

Bevor die im folgenden beschriebene wissenschaftliche Untersuchung durchgeführt werden konnte, erfolgte die Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland.

6.1. Auswahl der Patienten

Im Rahmen dieser Studie standen 25 Gewebeproben von insgesamt 10 gesunden Patienten mit geplanter Extraktion zur Verfügung. Das Patientenkollektiv bestand aus 6 Frauen und 4 Männern, im Alter von 30 bis 72 Jahren. Die Anamnese der Patienten war unauffällig. Sie hatten keine systemischen Erkrankungen, nahmen nicht regelmäßig Medikamente ein und waren Nichtraucher. Patienten mit einer akuten Parodontitis, aktiven parodontalen Läsionen und stark resorbierten Alveolarwänden, mit einer verbleibenden Resthöhe von weniger als 5 mm, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Zähne mit eindeutig sichtbaren akuten oder chronischen Entzündungsprozessen sowie apikalem Abszess, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Für alle extrahierten Zähne war die Versorgung der entstandenen Lücke mit einem Implantat geplant.

6.2. Chirurgisches Verfahren

Die Extraktion der Zähne, die Insertion der Implantate sowie die Entnahme der Proben, erfolgte durch die Oberärztin Frau PD Dr. Nahles in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Charité, Campus Virchow Klinikum.

6.2.1. Extraktion der Zähne

Nach sorgfältiger Anamneseerhebung und Auswertung des klinischen und röntgenologischen Befundes, erfolgte die Entfernung der Zähne unter Lokalanästhesie. Je nach zu extrahierendem Zahn erhielten die Patienten entweder eine vestibuläre und orale Infiltrationsanästhesie oder eine Leitungsanästhesie mit Ultracain® DS forte mit einem Adrenalinzusatz von 1:100000 (Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main, Germany).

Die Entfernung aller Zähne erfolgte ausschließlich mit Hilfe des Periotoms und der entsprechenden Extraktionszange. Es wurde zuvor kein Mucoperiostlappen gebildet. Dazu wurde das desmodontale Ligament gelöst und die Zähne anschließend vorsichtig

mit der Zange luxiert und extrahiert. Somit konnte das chirurgische Trauma des umgebenden Gewebes möglichst gering gehalten werden. Alle vier Alveolarwände blieben intakt. Durch sorgfältige Kürettage der Extraktionswunden wurde vorhandenes Granulationsgewebe und Detritus entfernt und das Einbluten in die Alveole, zur Bildung eines Blutkoagulums, sichergestellt. Alle Extraktionsalveolen heilten ohne primären Wundverschluß. Die Auswahl der Alveolen, welche mit Bio-Oss Collagen augmentiert und welche der Selbstheilung überlassen werden sollten, erfolgte Anhand einer Randomisierungsliste.

6.2.1.1. Augmentierte Alveolen

Zur Augmentation der Alveolen kam Bio-Oss Collagen (Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland) zum Einsatz. Das Knochenersatzmaterial wurde mit Hilfe einer chirurgischen Schere (Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Germany) der Alveole angepasst, so dass es drucklos appliziert werden konnte und die Höhe der Alveole nicht überschritt.

6.2.1.2. Nichtaugmentierte Alveolen

Die Alveolen, welche nicht durch Knochenersatzmaterial augmentiert wurden, unterlagen der Selbstheilung.

6.2.2. Postoperative Phase

Nach Extraktion der Zähne erfolgte keine Antibiotikatherapie. Eine Kontrolle des Wundheilungsverlaufs erfolgte nach 1, 7 und 28 Tagen. Die Extraktionswunden wurden auf mögliche postoperative Entzündungen, Wunddehiszenzen, mukosalem Erythema und auf Verlust des Materials untersucht.

6.2.3. Implantatinsertion und Probeentnahme

Vier Wochen nach Extraktion der Zähne fand die Implantation statt. Die Schleimhaut war bei allen Patienten ohne sichtbare Veränderung, entsprechend dem zeitlich normalen Heilungsverlauf, verheilt.

Mit Hilfe einer vor Zahnextraktion gefertigten Bohrschablone, konnte die genaue Lage der Extraktionsalveolen bestimmt werden. Nach Lokalanästhesie durch Ultracain DS

forte 1:100000 (Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main, Germany), wurde eine crestale Schnittführung und die Präparation eines Mukoperiostlappens durchgeführt. Die Aufbereitung des Implantatbettes sowie die Implantatinsertion erfolgten gemäß dem Protokoll des jeweiligen Herstellers. Es wurden Implantate der Firma Camlog Rootline (Camlog Biotechnologies, Wimsheim, Germany) oder Straumann ITI (Straumann AG, Basel, Switzerland) verwendet. Alle folgenden Bohrungen wurden mit geringer Drehzahl von 800 bis 1200U/min und unter permanenter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Im Zuge der Implantatbettbohrung wurde mit einer Entnahmetiefe von mindestens 7 mm eine Biopsie aus dem Zentrum der Alveole entnommen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Trepanbohrers mit einem Durchmesser von 2 mm (Straumann AG, Basel, Switzerland). Nach dem Einbringen des Implantates mittels einer Drehmomentratsche wurde der Mukoperiostlappen repositioniert. Die Wundränder wurden adaptiert und speicheldicht durch mehrere Einzelknopfnähte verschlossen (5-0 Monocryl, resorbierbar, Ethicon, Hamburg, Germany).

6.3. Aufbereitung der Proben

Um die coronalen und apikalen Bereiche identifizieren zu können, wurden die Proben vor der Aufbereitung durch den Chirurgen am coronalen Ende markiert (Marker II/Superfrost, Precision Dynamics Corp., San Fernando, CA, USA). Alle Knochenproben mit einer Länge von 7 mm wurden daraufhin für 2 Tage in 4 % gepuffertes Formaldehyd fixiert und nach Wässerung unter fließendem Leitungswasser, durch EDTA-Entkalkungslösung bei 37°C entkalkt. Anschließend konnte die vollständige Dehydratation der Proben erfolgen. Dies wurde durch eine ansteigende Alkoholreihe im Gewebeeinbettautomaten realisiert.

Zur Einbettung des entnommenen Gewebes in einen Paraffinblock kam die Paraffingießstation EG1160 zum Einsatz. Das zuvor mit dem Lösungsmittel Xylol inkubierte Gewebe wurde in einen Wärmeschrank gegeben, wo das Xylol bei 58-60°C verdampfte und durch flüssiges Paraffin ersetzt werden konnte. Die Proben wurden in Gießformen als Block gegossen und auf einem Eisblock abgekühlt. Zum Fertigen der Schnitte wurden die gekühlten Blöcke mit einem Mikrotom 2065 zugeschnitten. Die Schnitte hatten eine Dicke von 3 µm und wurden in einer Wasserwanne aufgefangen. Nach dem Strecken im Wasserbad erfolgte das Aufziehen auf 75x25x1mm große

Objektträger. Im Anschluss wurden die Objektträger sorgfältig beschriftet und für 24 h bei Zimmertemperatur getrocknet.

Um in den folgenden Schritten eine Färbung der hergestellten Schnitte erreichen zu können, musste zuvor das Paraffin wieder vollständig entzogen werden.

Dies geschah über zweimaliges spülen mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe.

Entparaffinierung der Gewebeschnitte

- 2 mal in Xylol (je 10 Minuten)
- 100 % Ethanol (5 Minuten)
- 90 % Ethanol (2 Minuten)
- 80 % Ethanol (1 Minute)
- 70 % Ethanol (1 Minute)
- Aqua dest. (5 Minuten)

6.4. Übersichtsfärbung

6.4.1. Prinzip

Mittels der Übersichtsfärbung können verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden. Sie dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen in einem mikroskopischen Bild.

In der hier vorliegenden Arbeit kam die Trichromfärbung nach Masson-Goldner zum Einsatz. Mit Trichromfärbungen werden durch den kombinierten Einsatz dreier unterschiedlicher Färbelösungen Muskelfasern, Kollagenfasern, Fibrin und Erythrozyten selektiv dargestellt. Die verschiedenen Farbstoffe der Trichromfärbung unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße und ergeben so eine differenzierte Anfärbung der einzelnen Gewebebestandteile.

Die Zellkerne färben sich bräunlich-schwarz, das Zytoplasma ziegelrot, Erythrozyten orangegelb, Bindegewebe grün und Osteoid rot. Mineralisiertes Knochengewebe stellt sich leuchtend grün dar, unverkalktes Knochengewebe hellgrün.

6.4.2. Färbung – Masson-Goldner-Trichrom

Um die Zellkerne der Schnitte sichtbar zu machen, erfolgte anfangs eine 2-minütige Inkubation mit Weigerts - Eisenhämatoxylin. Das Ansetzen der Lösung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Präparate wurden unter fließendem Wasser für 10 Minuten gewaschen und anschließend mit Säurefuchsin - Ponceau für 5 Minuten gefärbt. Es folgte eine Spülung mit 1 % iger Essigsäure.

Zur Differenzierung und Sichtbarmachung des Bindegewebes mussten die Präparate für 15 Minuten mit Phosphormolybdänsäure - Orange - G inkubieren. Hierbei kam es zur Aufnahme des azidophilen Farbstoffes in positiv geladenes Gewebe. Nach wiederholtem Spülen mit 1%iger Essigsäure wurden die Schnitte mit Lichtgrün gegen gefärbt, nochmals mit Essigsäure gespült und durch dreimaliges eintauchen in 100 % Alkohol entwässert. Abschließend wurden die Präparate für 2-mal 5 Minuten in Xylol gespült und zur Fixierung und Mikroskopierung in Vitroclud eingedeckt.

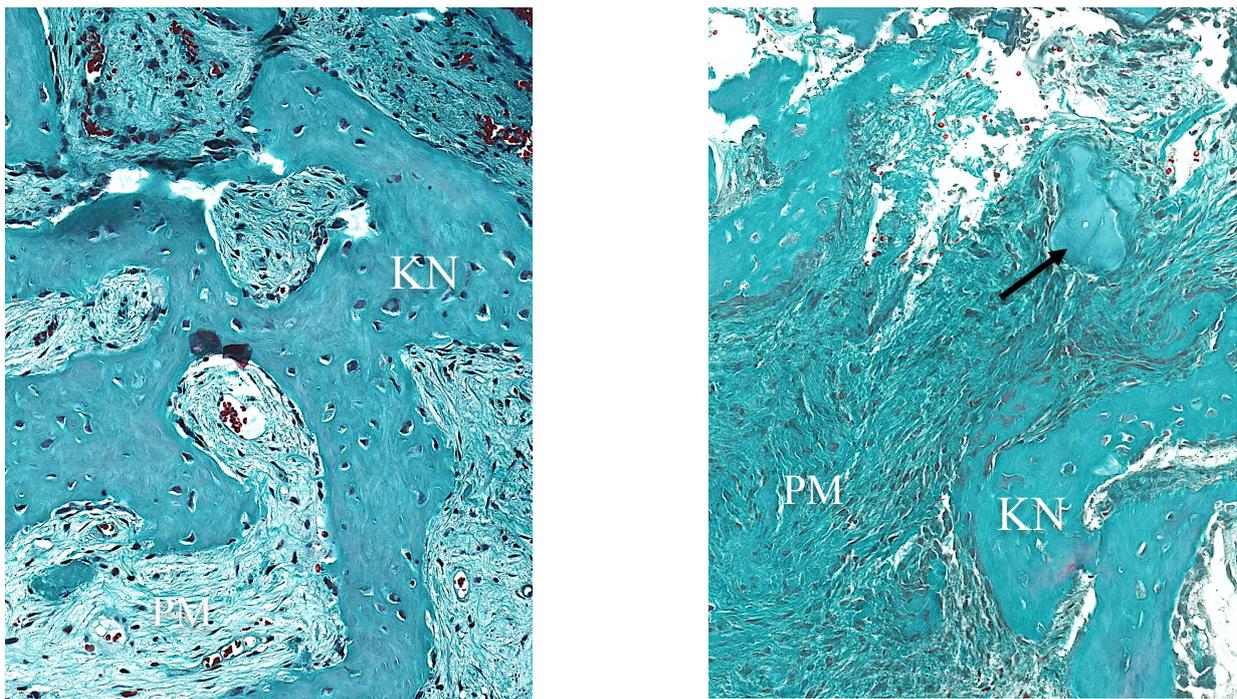


Abb. 2: Entnommene Gewebeproben angefärbt in der Trichromfärbung nach Masson-Goldner (x20). Links 4 Wochenprobe ohne Bio-Oss, rechts entnommene 4 Wochenprobe mit Bio-Oss Partikeln (Pfeil). (KN = Knochenneubildung, PM = Provisorische Matrix)

6.5. Immunhistologie

6.5.1. Prinzip

Durch immunhistologische Analysen können die an der Knochenheilung beteiligten Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dadurch kann bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist.

Die immunhistologische Färbung dieser Arbeit erfolgte durch die APAAP - Methode (Alkalische – Phosphatase – Anti – Alkalische – Phosphatase). Die Durchführung dieser Methode basiert auf der Beschreibung durch Cordell et al. und bietet die Möglichkeit bestimmte Zellantigene nachzuweisen (Cordell et al. 1984).

Die Alkalische – Phosphatase – Anti – Alkalische – Phosphatase beschreibt einen Komplex aus dem Enzym **alkalische Phosphatase** und dem dagegen gerichteten Antikörper **anti-alkalische Phosphatase**.

Hierbei werden Gewebeproben zunächst mit einem unkonjugiertem Primärantikörper beschichtet, welcher sich an das nachzuweisende Antigen bindet. In einem zweiten Schritt wird ein Brückenantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, aufgetragen, um anschließend den Immunkomplex aus monoklonalem Antikörper und alkalischer Phosphatase hinzuzufügen.

Dieser lösliche Immunkomplex wird abschließend durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht. Hierbei werden der alkalischen Phosphatase, ein Enzym das Phosphorsäureester hydrolysiert, organische Phosphatverbindungen angeboten. Die alkalische Phosphatase spaltet Phosphat ab und die freigesetzte Verbindung reagiert zu einem farbigen Endprodukt.

Der Brückenantikörper muss stets im Überschuss vorliegen, so dass eine der beiden antigenbindenden Regionen an den Primärantikörper bindet und der andere antigenbindende Arm zur Anlagerung des Enzym-Immunkomplexes zur Verfügung steht. Als Primär- und Immunkomplexantikörper dienen in dieser Studie monoklonale Maus-Antikörper, während beim Brückenantikörper polyklonale Kaninchen – Anti – Maus IgG genutzt werden. Die Antikörper sollten eine hohe Spezifität und Affinität zu den nachweisenden Antigenen haben und keine Kreuzreaktion mit anderen Epitopen (Antigenbindungsstellen) zeigen.

Der Vorteil dieser Methode ist die verstärkte Markierung. Durch wiederholte Zugabe von Brückenantikörpern kann eine Signalverstärkung erfolgen und somit eine geringe Menge von Antigenen nachgewiesen werden.

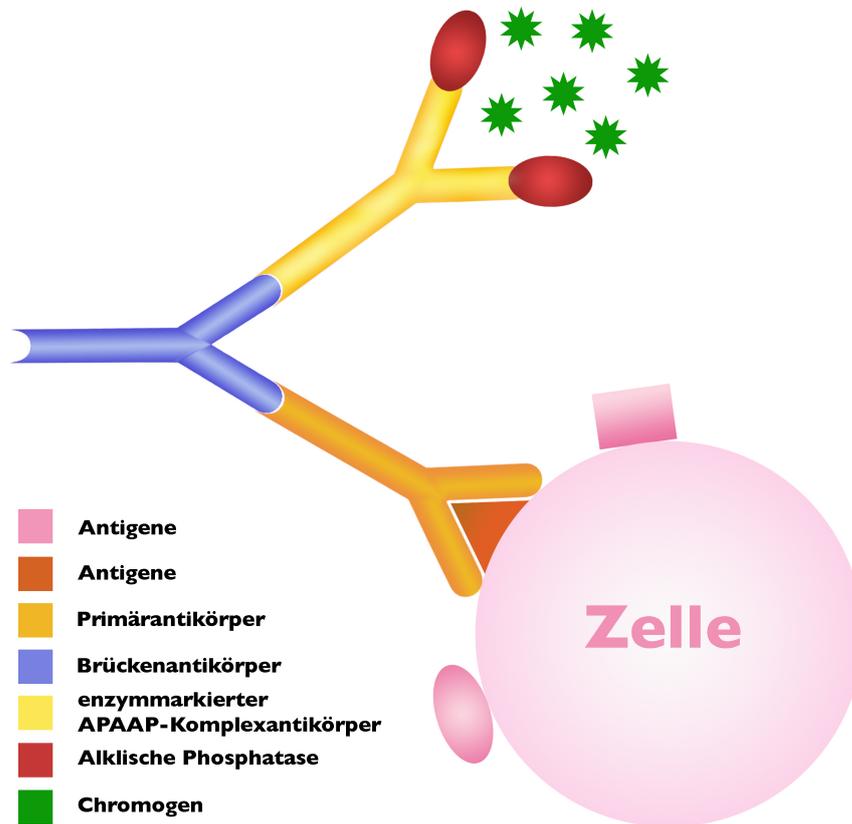


Abb. 3: Schematische Darstellung der APAPP – Methode

6.5.2. Färbung – APAAP

Um die gefertigten Schnitte mittels der APAAP - Methode anfärben zu können, folgte der Entparaffinierung mit Xylol und Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe, eine zusätzliche 10-minütige Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol. Anschließend erfolgte eine Antigendemaskierung mittels Citratpuffer und Mikrowellenbehandlung. Dazu wurden die Schnitte in mikrowelleneignete Gefäße gegeben welche mit Citratpuffer (Target Retrieval Solution pH 6,1) gefüllt waren und 30 Minuten hitzeinduziert. Nach Abkühlung der Schnitte wurden diese in Tris Buffered Solutions (TBS - Puffer) gewaschen und über Nacht bei 4°C gelagert. Zur Absättigung

niedrig affiner Bindungsstellen des Gewebes und damit zur Reduktion unspezifischer Anfärbungen folgte eine 20-minütige Inkubation mit einem Proteinblock. Nach Blockierung der Biopsien wurden diese mit den **Primärantikörpern** Osteonectin (Maus, Verdünnung 1:2000), Osteocalcin (Maus, Verdünnung 1:10) und Cbfa1 (Kaninchen, Verdünnung 1:200) für 120 Minuten bei 37°C überschichtet. Die Immunlokalisation der Blutgefäße erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers CD31 (Maus, Verdünnung 1:20). Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Schnitte 3-mal in TBS-Spülpuffer gewaschen. Schnitte mit Cbfa1 Antikörpern mussten zusätzlich mit einem Maus-Anti-Kaninchen Antikörper (Maus, Verdünnung 1:40) für 30 Minuten inkubiert werden.

Nach wiederholtem Waschen mit TBS - Spülpuffer folgte in einem weiteren Schritt das Hinzuführen des **Brückenantikörper** Kaninchen-Anti-Maus (Kaninchen, Verdünnung 1:40). Diese wurden ebenfalls verdünnt und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden alle Schnitte für 40 Minuten mit dem **APAAP-Komplex** (Maus, Verdünnung 1:100) überschichtet und wiederum 3-mal mit TBS-Puffer gespült.

Zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde das Substrat-Chromogen-Fuchsin verwendet. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers gemischt und 10 - 30 Minuten, je nach Sicht, inkubiert. Nach 5-minütigem Spülen mit TBS - Spülpuffer wurden die Präparate für 2 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt, unter fließendem Wasser für 5 Minuten gebläut und wiederholt 2-mal in Aqua dest. gespült.

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in Kaisers Glyceringelantine und Deckgläsern eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

6.5.2.1. Positiv- und Negativkontrollen

Um die Spezifität der Antikörper kontrollieren zu können und das Vorhandensein der Antigene nachzuweisen sind Positivkontrollen durchgeführt worden. Hierzu diente humanes Knochenmark, entnommen aus dem Beckenkamm.

Als Negativkontrolle wurden Schnitte herangezogen, welche anstelle des primären Antikörpers mit nichtimmunisiertem Serum und in gleicher Verdünnung inkubiert wurden.

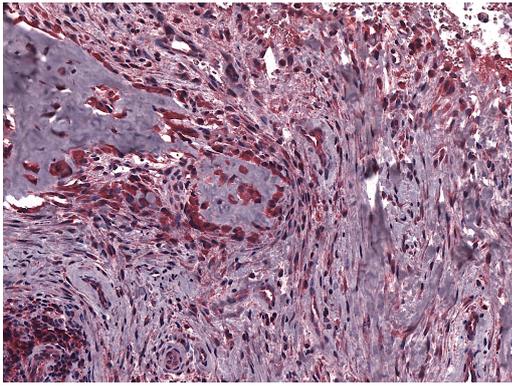


Abb. 4a: APPAP-Methode
Nachweis des monoklonalen Antikörpers
Cbfa1 (Vergrößerung x20)

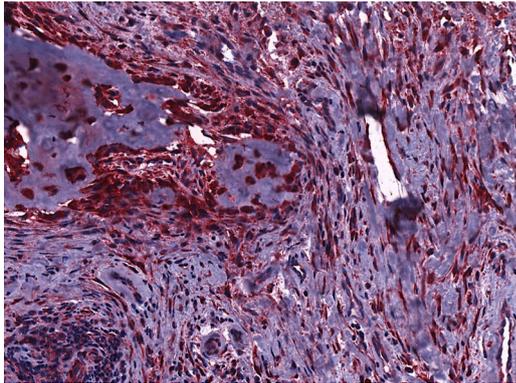


Abb. 4b: APPAP-Methode
Nachweis des monoklonalen Antikörpers
Osteonectin (Vergrößerung x20)

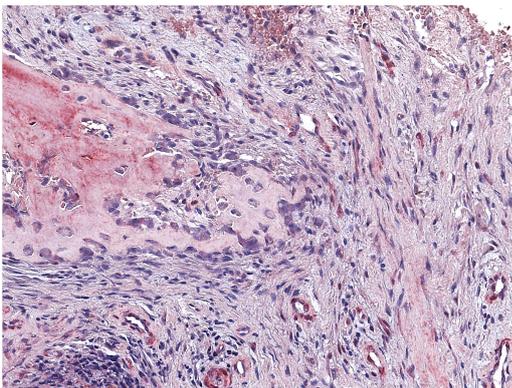


Abb. 4c: APPAP-Methode
Nachweis des monoklonalen Antikörpers
Osteocalcin (Vergrößerung x20)

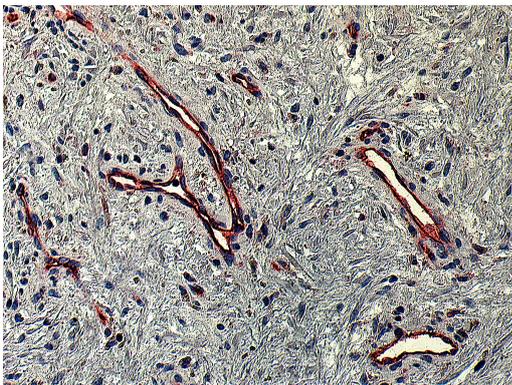


Abb. 4d: APPAP-Methode
Nachweis des monoklonalen Antikörpers
CD 31 (Vergrößerung x20)

Abb. 4 a - d: Immunhistochemische Färbung

Die Abbildungen zeigen 4 zentrale Schnitte einer apikal entnommenen Gewebeprobe mit unterschiedlichem Antikörpernachweis.

Tab. 2: Verwendete Materialien mit Herstellerangaben zur Aufbereitung der Proben und Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Verwendete Materialien	Hersteller
Formaldehyd-Lösung 4% gepuffert	Herbeta-Arzneimittel, Berlin Deutschland
EDTA-Entkalkungslösung	Herbeta-Arzneimittel, Berlin Deutschland
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Xylol	J.T.Baker, Deventer Holland
Ethanol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin Deutschland
Eisenhämatoxylin nach Weigert A Eisenchloridlösung nach Weigert B	Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma, Münster Deutschland
Ponceau-Säurefuchsin (Goldner III)	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Phosphormolybdänsäure-Orange-G	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
Goldner-Lösung III Lichtgrün	Waldeck GmbH & Co. KG Division Chroma, Münster, Deutschland
Vitroclud	R. Langenbrinck, Teningen Deutschland

Tab. 3: Verwendete Materialien mit Herstellerangaben zur immunhistologischen Färbung

Verwendete Materialien	Hersteller
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Target Retrieval Solution pH 6,1	DAKO S1699, Denmark A/S
Proteinblock	DAKO X0909, Denmark A/S
Antikörperverdünner	DAKO S2022, Denmark A/S
Cbfa1 Antikörper	United States Biological C7900-71, Lot: L8050168
Osteonectin Antikörper	United States Biological C8063-14, Lot: L8022150
Osteocalcin	R&D Systems Inc. MAB 1419, Lot: IFS0208051
CD 31 (Clon JC70A) IgG1	DAKO M0823, Lot: 00054859 Denmark A/S
Maus Anti Kaninchen Ig	DAKO M0737, Lot: 00033589, Denmark A/S
Kaninchen Anti Maus Ig	DAKO Z0259, Lot: 00039248, Denmark A/S
APAAP (Maus)	DAKO D0651, Lot: 00035032, Denmark A/S
Substrat-Chromogen-Fuchsin	DAKO K0624, Denmark A/S
Levamisol	DAKO K5000, Denmark A/S
Hämatoxylin	DAKO Cat:S2020 Lot:00002756, Denmark A/S
Kaisers Glyceringelantine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tab. 4: Verwendete Geräte und deren Hersteller

Verwendete Geräte	Hersteller
Citadel (Gewebeeinbettautomat)	Shandon
Paraffingießstadion EG 1160	LEICA
Mikrotom 2065	Reichert-Jung
Mikroskop-Axiophot	Zeiss

6.6. Histomorphometrie

Sowohl die Übersichtsfärbungen, als auch die immunhistologischen Färbungen wurden mittels des Photomikroskops „Axiophot“ ausgewertet (Axiophot 1 Zeiss, Jena, Germany).

Die gewünschten Schnitte wurden mit Hilfe des Scannersystem ScanScop T3 (Aperio Technologies Inc., Vista, USA) bei einer Auflösung von 0,25 µm/Pixel und einem 40-fachen Objektiv eingescannt. Die Bearbeitung und Vermessung der Aufnahmen erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm AxioVision Rel.4.6. (Zeiss, Jena, Germany).

6.6.1. Auswertung der Übersichtsfärbung

Mittels der Übersichtsfärbungen wurde das Gewebe zunächst unter dem Mikroskop histologisch untersucht. Für die morphologische und qualitative Analyse des Umbauprozesses wurden die gefärbten Präparate bei 40-facher Vergrößerung begutachtet. Die provisorische Matrix stellte sich als bindegewebige Struktur mit in fibröser Matrix eingebetteten Mesenchymzellen dar, während lebensfähiger Knochen als mineralisierte Gewebematrix mit, in Lakunen eingebetteten, Osteozyten definiert wurde.

Vor der histologischen Evaluation erfolgte zunächst die Kalibrierung mit einem Objektmikrometer. Dieser wurde diagonal auf dem Abbild platziert.

In jedem Präparat wurde der coronale und apikale Bereich des Schnittes bestimmt und jeweils ein zentraler Ausschnitt – ROI („Region of interest“) ausgewählt. Der zu untersuchende ROI wurde mit Hilfe der AxioCam MRc5-Kamera (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) aufgenommen und digitalisiert. Mit dem Bildanalyseprogramm AxioVision 4.6. konnte anschließend in den gewählten Ausschnitten neugebildeter Knochen, Bio-Oss Partikel und die provisorische Matrix markiert und über die Pixelzählung automatisch das relative Volumen errechnet werden. Durch die definierte Größe des ROI von 2665 x 1999 Pixel, wurde daraufhin der Anteil von neugebildetem Knochen, Bio-Oss und provisorischer Matrix errechnet und prozentual bestimmt.

mittels des digitalen Messprogramms vermessen. Hierbei wurde zunächst die Gesamtzahl mesenchymaler Zellen im ROI bestimmt und nach Zelldichte klassifiziert.

Klassifizierung der Zelldichte:

- 0 - 500 Zellen = geringe Zelldichte
- 500 - 1000 Zellen = mittlere Zelldichte
- 1000 - 2500 Zellen = hohe Zelldichte

Anschließend erfolgte die Markierung und Zählung der sehr stark antigenpositiven Zellen. Diese zeichneten sich, je nach Farbintensität und verwendetem Antikörper, durch einen rötlich bis bräunlich erscheinenden Schweif entlang des Zellkerns, aus.

Die Erkennung von Zellkernen und antigenpositiven Zellen durch das Bildanalyseprogramm Axio Vision 4.6., war durch die zuvor erfolgte Programmierung von Farbe und Größe der zu markierenden Objekte möglich. Auftretende Überlagerungen oder Artefakte im Bild wurden durch manuelle Korrektur ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der positiv expressierenden Zellen von Osteocalcin, Osteonectin und Cbfa1 in der provisorischen Matrix wurden prozentual von der Gesamtzellzahl ermittelt und ebenfalls kategorisiert.

Klassifizierung antigenpositiver Zellen von Cbfa1, Osteonectin und Osteocalcin:

- S I = 0 - 29 %
- S II = 30 - 49 %
- S III = 50 - 79 %
- S IV = 80 - 100 %

Die semi-quantitative Datenerhebung von CD31-gefärbten Biopsien wurde mittels des immunreaktiven Scores (IRS) erbracht. Die Werte für den Score ergeben sich nach Auswertung und Zählung durch Multiplikation der Werte für Farbintensität (0-3) und dem Prozentsatz positiver Zellen (0-4). Der IRS nimmt einen Wert zwischen 0 und 12 an und wird wie folgt interpretiert (Remmele & Stegner 1987).

Klassifizierung antigenpositiver Zellen mit CD 31 (IRS):

- 0 - 1 = keine Expression
- 2 - 3 = schwache Expression
- 4 - 8 = mäßig starke Expression
- 9 - 12 = starke Expression

Auch die immunhistologischen Messungen wurden von einer Person 3-mal zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, so dass abschließend die erhobenen Daten gemittelt und tabellarisch mit dem Excel-Programm erfasst wurden.

6.7. Statistische Analyse

Die mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel archivierten Datensätze wurden in das SPSS V13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und SAS V9.1. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) – Statistikprogramm importiert und die histomorphometrischen Daten deskriptiv analysiert.

Mit Hilfe von Nichtparametrischen Tests wurden mögliche Unterschiede auf ihre Signifikanz hin untersucht. Die Analyse der erhobenen Daten der Übersichtsfärbungen erfolgte zunächst mit Hilfe des **Wilcoxon-Signed-Rank-Test**, wobei hier geschaut wurde, ob sich Unterschiede in den coronalen und apikalen Bereichen der Proben zeigten. Stellten sich Unterschiede hinsichtlich der Knochenneuf ormation in den unterschiedlichen Bereichen dar, wurden diese vergleichend analysiert. Um einen induktiven Vergleich von unabhängigen Stichproben durchführen zu können, wurde der **Mann-Whitney-U-Test** genutzt. Hierbei galt es die Proben mit Bio-Oss und die Proben ohne Bio-Oss jeweils in den coronalen und apikalen Bereichen auf ihre statistische Signifikanzen hin zu prüfen. Um den möglichen Einfluss von abhängigen und unabhängigen Faktoren auf die Knochenneuf ormation in den Alveolen zu untersuchen, wurde anschließend eine **zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse** durchgeführt (Brunner et al. 2003). Hierbei galt der Bereich (coronal/apikal) als abhängiger Faktor und Bio-Oss (augmentiert/nicht augmentiert) als unabhängiger Faktor.

Die immunhistologischen Daten wurden ebenfalls mittels einer **zweifaktoriellen parameterfreien Varianzanalyse** untersucht. Hierbei wurde die Einflussnahme von

den Parametern coronal/apikal bzw. augmentiert/nicht augmentiert auf antigenpositive Zellen (Cbfa1, Osteonectin, Osteocalcin, CD31) hin analysiert.

Abschließend wurden die Ergebnisse der Übersichtsfärbung sowie der immunhistologischen Auswertung in Bezug gesetzt. Dies erfolgte durch den **Spearman's Rho-Test**. Spearman's Rangkorrelationskoeffizient ist ein Zusammenhangsmaß, mit dem sich der Zusammenhang zwischen 2 Variablen bestimmen lässt. Somit ließ sich der Einfluss von prozentualem Anteil des Knochens auf positive Werte von Cbfa1, Osteonectin und Osteocalcin evaluieren.

Für alle Tests wurde $P < 0.05$ als Signifikanzniveau definiert.

7. Ergebnisse

An der Studie beteiligt waren 10 Patienten, denen insgesamt 25 Zähne aus dem Oberkiefer (n = 19) und dem Unterkiefer (n = 6) extrahiert wurden. Nach Extraktion der Zähne folgte die Augmentation von 12 Alveolen, 13 Alveolen wurden nicht augmentiert und der Spontanheilung überlassen.

Der postoperative Heilungsverlauf war bei allen Patienten komplikationslos. Die klinische Beurteilung der Wunden zeigte einen regelgerechten Verlauf der Wundheilung und eine teilweise geschlossene Weichteilsituation nach 4 Wochen. Bei allen Patienten und allen 25 Extraktionsalveolen wurde eine Implantation nach 4 Wochen durchgeführt. Mittels Bohrschablone wurde die genaue Lage der Extraktionsalveolen lokalisiert und es erfolgte die Insertion von 25 Implantaten, mit gleichzeitiger Entnahme der Gewebebiopsien zur weiteren Analyse.

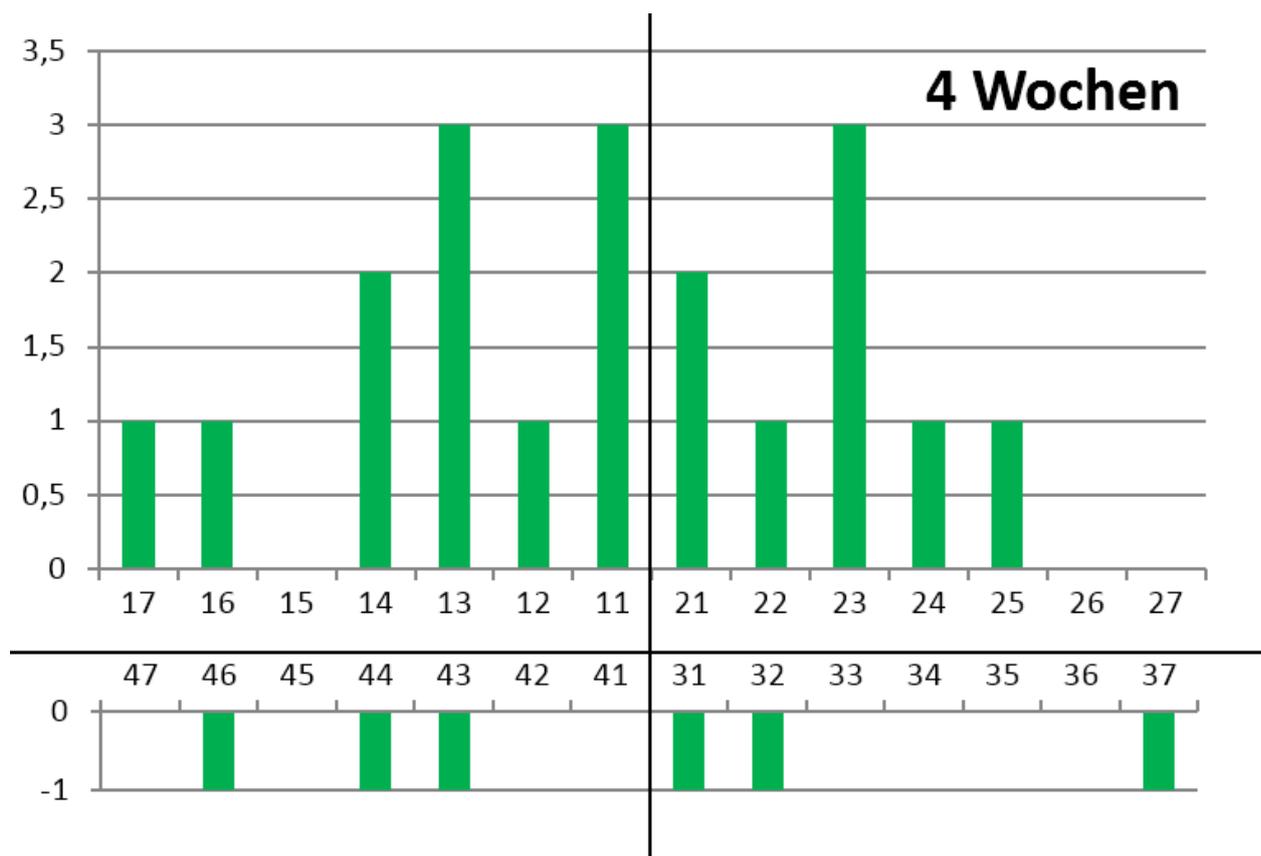


Abb. 6: Anzahl inserierter Implantate pro Zahnabschnitt

7.1. Morphologische Charakteristika

7.1.1. Übersichtsfärbung

In den entnommenen Gewebeproben stellten sich unter dem Mikroskop unterschiedliche Gewebstypen nebeneinander dar.

Die histologischen Untersuchungen zeigten in den 4 Wochen Proben im coronalen und zentralen Bereich dominierend provisorische Matrix. Das gesamte Gewebe zeichnete sich durch eine starke Vaskularisierung aus und von apikal bildeten sich Trabekel aus Geflechtknochen. Die einzelnen Gewebeproben waren in ihrer Entwicklung unterschiedlich stark fortgeschritten. Während in einigen Proben ausschließlich provisorische Matrix beobachtet werden konnte, zeigte sich in einer anderen Probe neben Geflechtknochen auch ein geringer Anteil an Lamellenknochen, sowie geringfügig Knochenmark.

In den entnommenen Gewebebiopsien der augmentierten Alveolen, waren Bio-Oss Partikel eingebettet in der Bindegewebsmatrix sichtbar. Die Oberfläche der Partikel war umgeben von Mesenchymzellen und beginnende Knochenneubildungen waren zu erkennen.

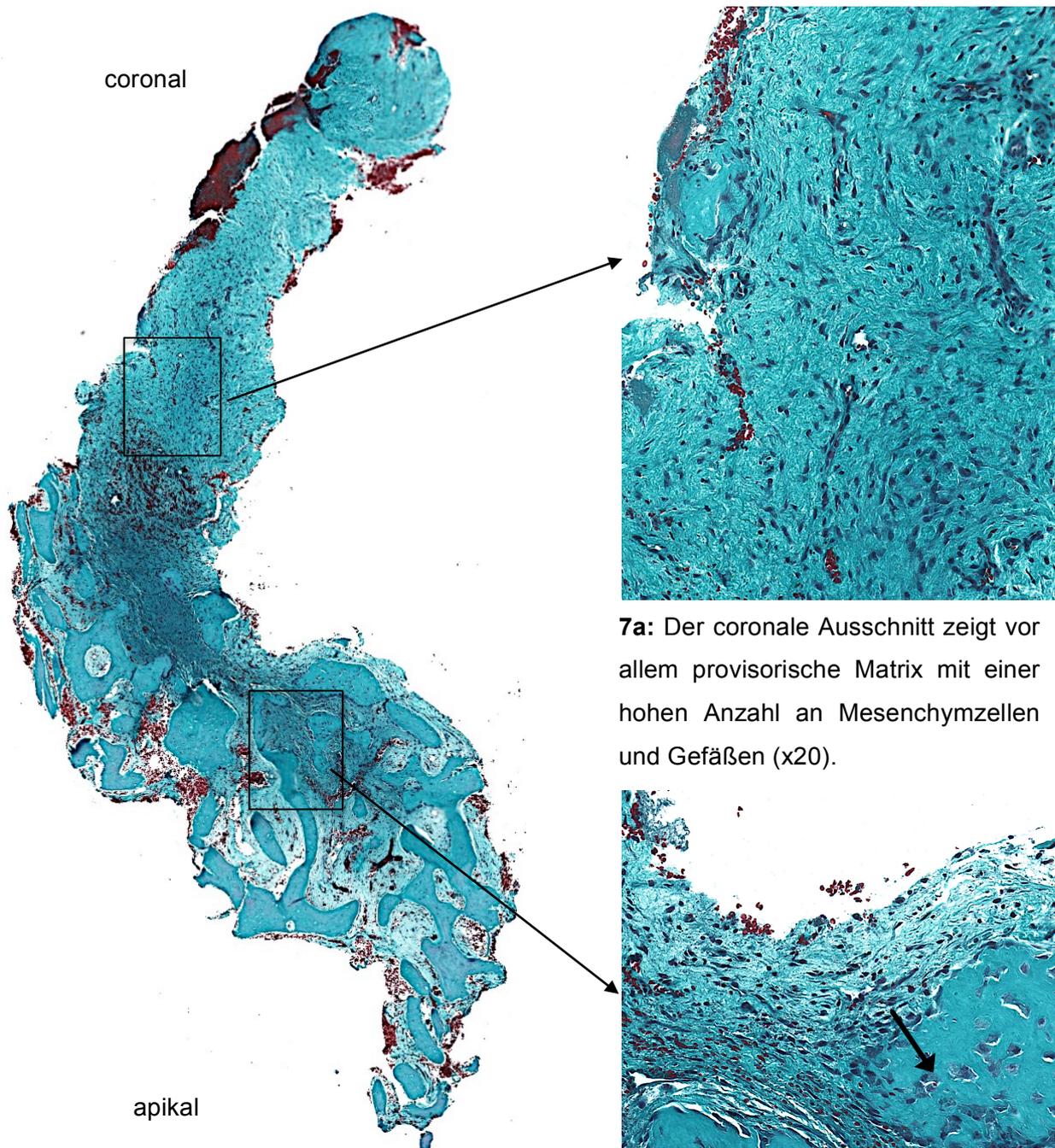
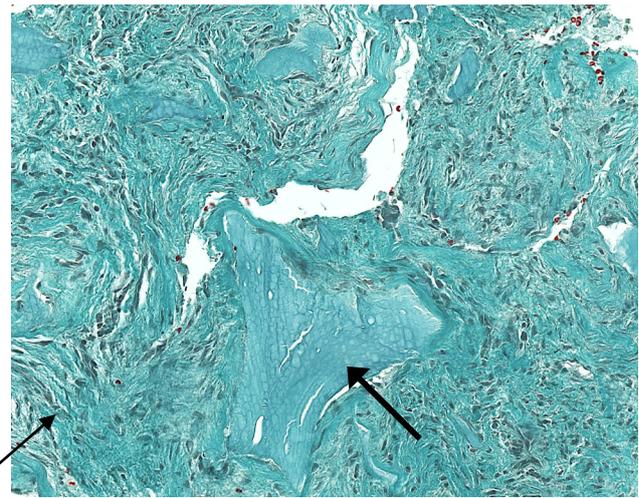
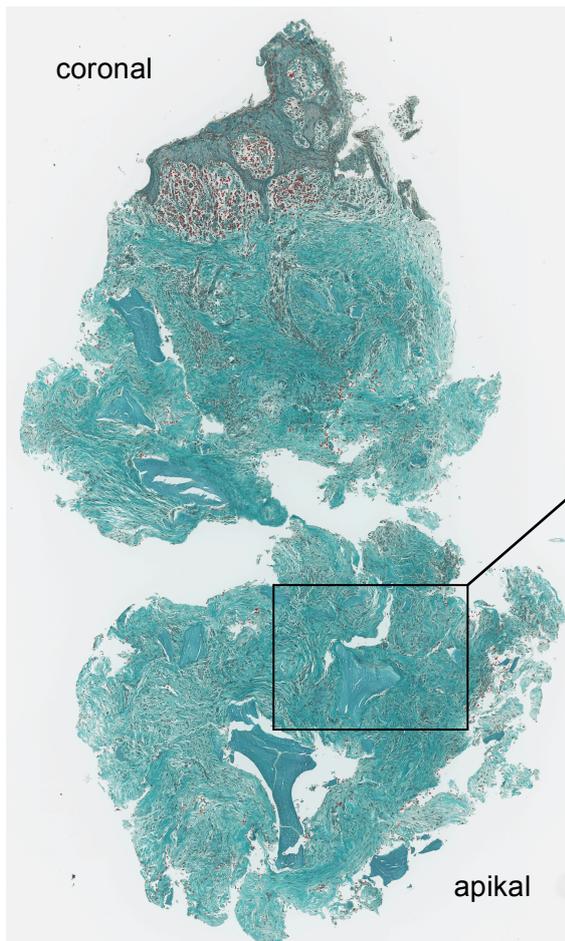


Abb. 7: Histologisches Bild einer nicht augmentierten Alveole (Masson-Goldner –Trichrom x2)

7a: Der coronale Ausschnitt zeigt vor allem provisorische Matrix mit einer hohen Anzahl an Mesenchymzellen und Gefäßen (x20).

7b: Im apikalen Ausschnitt ist die Bildung von Geflechtknochen (Pfeil) zu erkennen. Die Oberfläche ist umsäumt von Osteoblasten (x20).



8a: Bio-Oss Partikel (Pfeil) eingebettet in provisorische Matrix. Die Oberfläche des Partikels ist von Osteoblasten umgeben und Knochenneformationen sind sichtbar (x20).

Abb. 8: Histologisches Bild einer mit Bio-Oss Collagen augmentierten Alveole (Masson-Goldner-Trichrom x2)

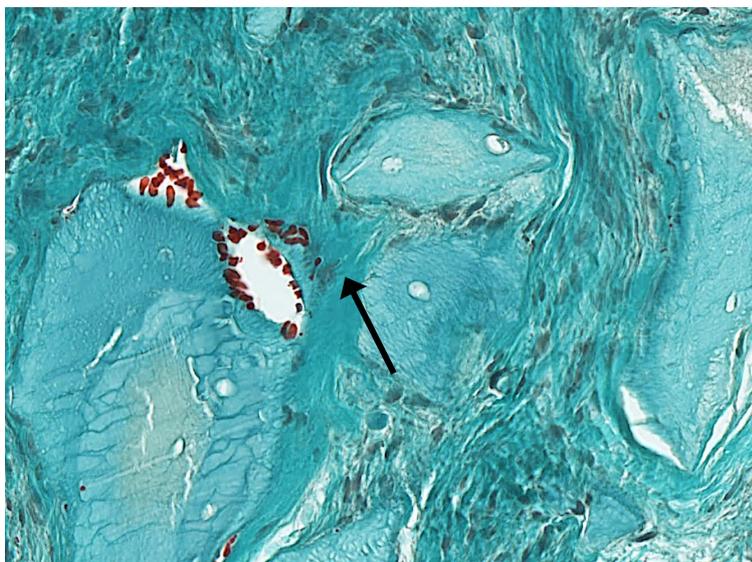


Abb. 9: Knochenneformation (Pfeil) entlang eines Bio-Oss Partikels (x40)

7.1.2. Immunhistologische Färbung

Im mikroskopischen Bild waren in allen untersuchten Gewebeschnitten jeweils Cbfa1-, Osteonectin-, Osteocalcin- und CD 31 - positiv expressierende Zellen sichtbar. In Cbfa1 und Osteonectin gefärbten Präparaten zeigten sich die positiven Zellen verteilt im gesamten Bereich der provisorischen Matrix und in direkter Nachbarschaft der Oberfläche von sich neu bildendem Knochen und Bio-Oss Partikeln.

Osteocalcin - positive Zellen waren ebenfalls in der gesamten provisorischen Matrix erkennbar, dominierten jedoch entlang von vaskulären Strukturen.

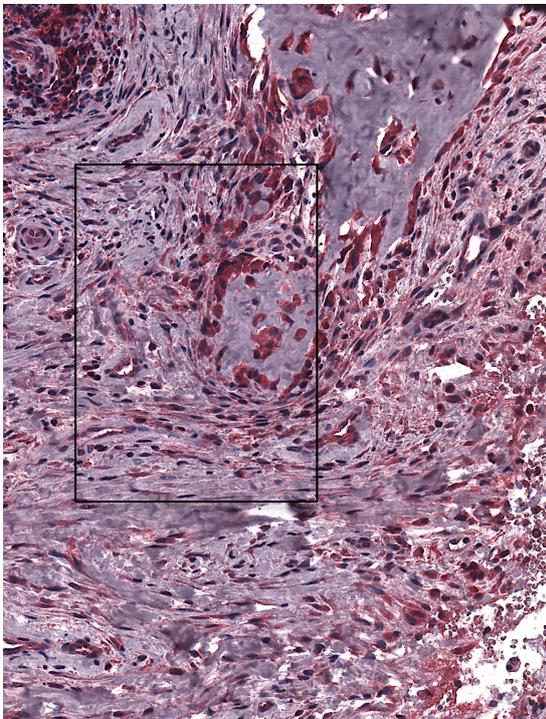
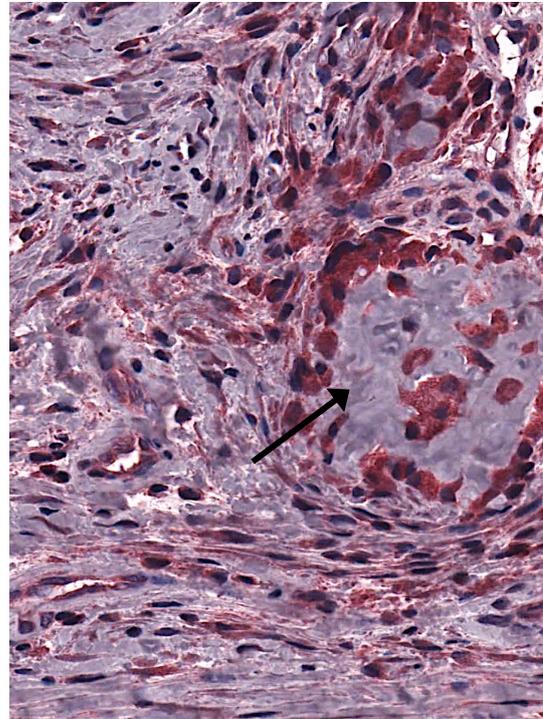


Abb.10: Entnommene Gewebebiopsie einer nicht augmentierten Alveole. Das mit Cbfa1 - angefärbte Präparat zeigt einen apikalen Ausschnitt aus der Alveole (x20).



10a: Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Bildung von neuem Knochen und eine zellreiche provisorische Matrix. Entlang der Oberfläche und im Inneren des sich entwickelnden Knochens sind Cbfa1 - positive Zellen (Pfeil) zu finden (x40).

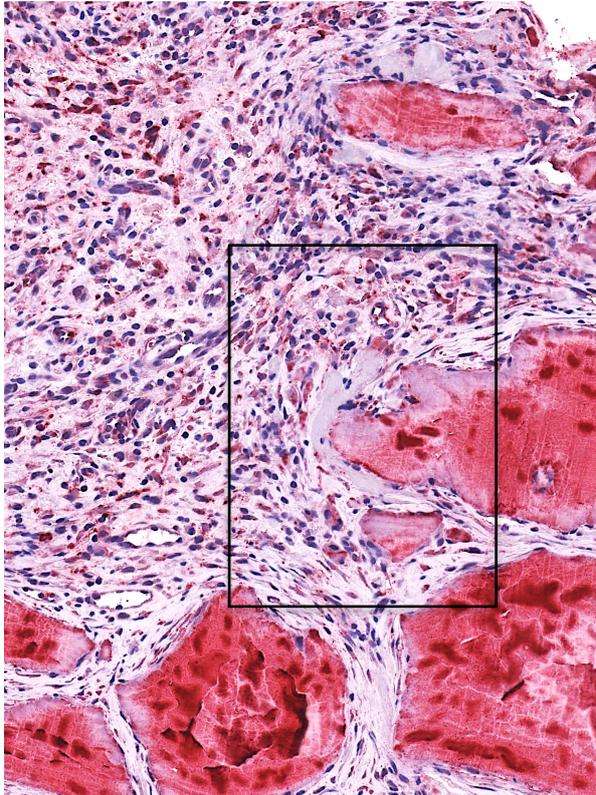
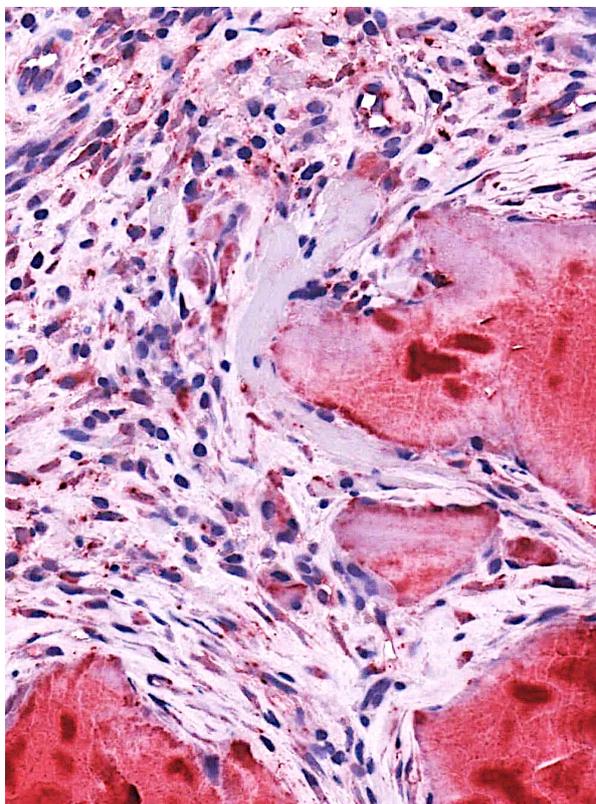


Abb.11: Histologisches Bild einer mit Osteonectin angefärbten Gewebebiopsie. Hierbei handelt es sich um den coronalen Teil einer augmentierten Alveole. Ein vergrößerter Ausschnitt ist in der folgenden Abbildung zu sehen (x20).



11a: Entlang der Bio-Oss Partikel ist die Bildung von neuem Geflechtknochen zuerkennen. Die provisorische Matrix zeigt eine hohe Dichte an mesenchymalen Stammzellen. Osteonectin positive Zellen finden sich verstreut in der gesamten provisorischen Matrix wieder und umgeben die Oberfläche der Bio-Oss Partikel sowie des neu gebildeten Knochens (x40).

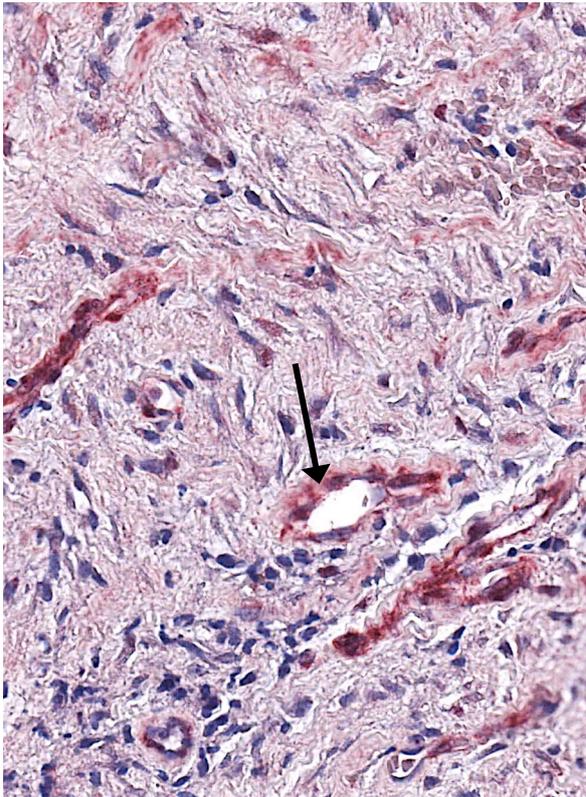


Abb.12: Osteocalcin-Färbung einer coronal entnommenen Gewebebiopsie einer nicht augmentierten Alveole. Die provisorische Matrix mit einer hohen Zelldichte zeigt eine hohe Anzahl an Gefäßen. Osteocalcin-positive Zellen sind hauptsächlich peri-vaskulär zu erkennen (Pfeil) (x40).

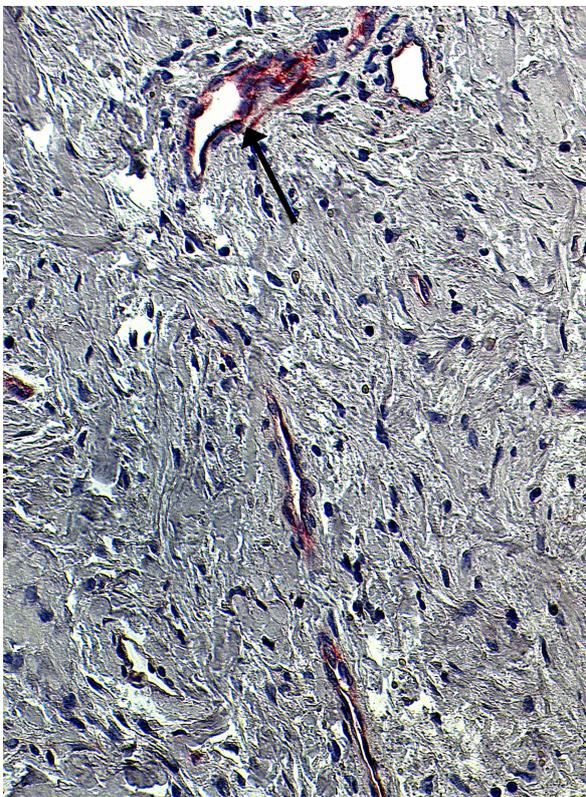


Abb.13: Biopsie einer mit Bio-Oss augmentierten Alveole. Innerhalb der zellreichen provisorischen Matrix zeigen sich ebenfalls Gefäße, welche umsäumt sind von Endothelzellen (Pfeil). Die rote Färbung demonstriert CD 31 – positive Zellen entlang der Gefäße (x20).

7.2. Histomorphometrische Messungen

7.2.1. Ergebnisse der nicht augmentierten Alveolen

Zur Evaluation standen 13 Extraktionsalveolen von 9 weiblichen und 4 männlichen Patienten zur Verfügung. Die **durchschnittliche Knochenneuformationsrate** aller nicht augmentierten Extraktionsalveolen betrug **9 %** (Bereich 0 - 44 %). Die provisorische Matrix, bestehend aus einer bindegewebigen Struktur und mesenchymalen Stammzellen, hatte einen durchschnittlichen Gesamtanteil von 91 % (Bereich 56 – 100 %). Die Knochenneuformationsrate der einzelnen Extraktionsalveolen ist in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

Gleichzeitig wurden die Werte in einen coronalen und apikalen Bereich unterteilt. Hierbei zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Knochenneuformationsrate. Während sich coronal durchschnittliche Werte von 4 % (Bereich 0 – 18 %) ergaben, fanden sich apikal 13 % (Bereich 0 – 44 %). Die provisorische Matrix hatte im coronalen Bereich einen durchschnittlichen Anteil von 96 % (Bereich 82 – 100 %) und im apikalen Bereich 86 % (Bereich 56 – 100 %). Die Menge an Knochenneuformation war im apikalen Bereich signifikant höher als im coronalen Bereich ($P = 0.005$).

7.2.2. Ergebnisse der augmentierten Alveolen

Insgesamt 12 mit Bio-Oss Collagen augmentierte Extraktionsalveolen von 4 Patienten wurden quantitativ analysiert. Die **durchschnittliche Knochenneuformationsrate** betrug insgesamt **11 %** (Bereich 0 – 51 %). Die durchschnittliche Gesamtsumme an Bio-Oss Partikeln aller Proben war 9 % (Bereich 5 – 34 %) und die der verbleibenden provisorischen Matrix 80 % (Bereich 60 – 100 %). Zwischen dem coronalen und apikalen Bereich zeigten sich Unterschiede. Die Messungen ergaben coronal eine durchschnittliche Knochenneuformationsrate von 6 % (Bereich 0 – 36 %), Bio-Oss Partikel 9 % (Bereich 5 – 34 %) und einen Anteil an provisorischer Matrix von 84 % (Bereich 60 – 100 %). Apikal betrug die Knochenneuformationsrate 16 % (Bereich 2 – 51 %), Bio-Oss Partikel 10 % (Bereich 5 – 33 %) und provisorische Matrix 76 % (Bereich 44 – 99 %).

Die Ergebnisse zeigten eine Signifikanz hinsichtlich der Knochenneuformationsrate zwischen dem coronalen und apikalen Bereich ($P = 0.010$). Die Knochenneuformation war im apikalen Bereich höher als im coronalen Bereich.

Tab. 5: Knochenneuformation der nicht augmentierten Alveolen

	Geschlecht	Regio	Bereich	Knochen (%)	Provisorische Matrix (%)
1	W	11	coronal	1	99
			apikal	2	98
2	W	11	coronal	1	99
			apikal	27	73
3	W	21	coronal	13	87
			apikal	19	81
4	W	13	coronal	0	100
			apikal	30 (2% KM)	68
5	W	23	coronal	18	82
			apikal	44	56
6	M	23	koronal	0	100
			apikal	0	100
7	M	43	coronal	11	89
			apikal	10	90
8	M	14	coronal	0	100
			apikal	15	85
9	W	14	coronal	1	99
			apikal	2	98
10	W	24	coronal	2	98
			apikal	19	81
11	W	46	coronal	0	100
			apikal	1	99
12	M	37	coronal	0	100
			apikal	6	94
13	W	21	coronal	0	100
			apikal	1	99
Mittelwert (%)				9	91

Tab. 6: Knochenneuformation der augmentierten Alveolen

	Geschlecht	Regio	Bereich	Knochen (%)	Bio-Oss (%)	provisorische Matrix (%)
1	W	44	coronal	0	11	89
			apikal	1	22	77
2	W	17	coronal	10	13	77
			apikal	49	7	44
3	W	16	coronal	4	1	95
			apikal	51	2	47
4	W	25	coronal	9	12	79
			apikal	24	3	73
5	W	12	coronal	0	2	98
			apikal	1	12	87
6	W	11	coronal	3	0	97
			apikal	10	1	89
7	W	13	coronal	36	4	60
			apikal	39	0	61
8	W	22	coronal	8	3	89
			apikal	5	16	79
9	W	32	coronal	6 (0,2% KM)	0	94
			apikal	11	1	88
10	W	31	coronal	0	0	100
			apikal	0	1	99
11	M	13	coronal	1	34	65
			apikal	4	33	63
12	M	23	coronal	0	33	67
			apikal	1	28	71
Mittelwert (%)				11	9	79

7.2.3. Vergleich der augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen

Zum Vergleich der unabhängigen Stichproben, wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U Test die Ergebnisse der coronalen Bereiche der augmentierten und nicht augmentierten Alveolen, sowie die Ergebnisse der augmentierten und nicht augmentierten apikalen Bereiche gegenüber gestellt. Insgesamt ergaben sich 50 Messwerte, die miteinander verglichen wurden. Die Knochenneufaltungsrate zeigte hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen, weder coronal ($P = 0.27$) noch apikal ($P = 0.93$).

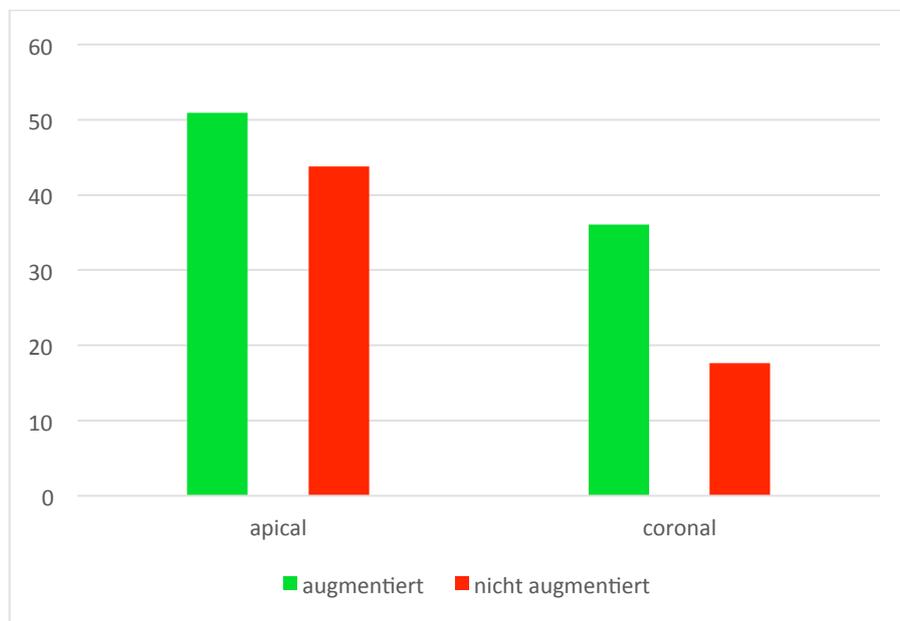


Abb. 14: Vergleich augmentierter und nicht augmentierter Alveolen im coronalen und apikalen Bereich

7.2.4. Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse der Knochenneubildung

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Messungen wurden abschließend mit Hilfe des Brunner-Tests statistisch analysiert. Bei der Analyse der 4 Wochenproben galt der Bereich (coronal / apikal) als abhängiger Faktor und Bio-Oss (augmentiert / nicht augmentiert) als unabhängiger Faktor. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen ($P = 0.55$), jedoch einen deutlich signifikanten Unterschied zwischen den coronalen und apikalen Bereichen ($P < 0.01$).

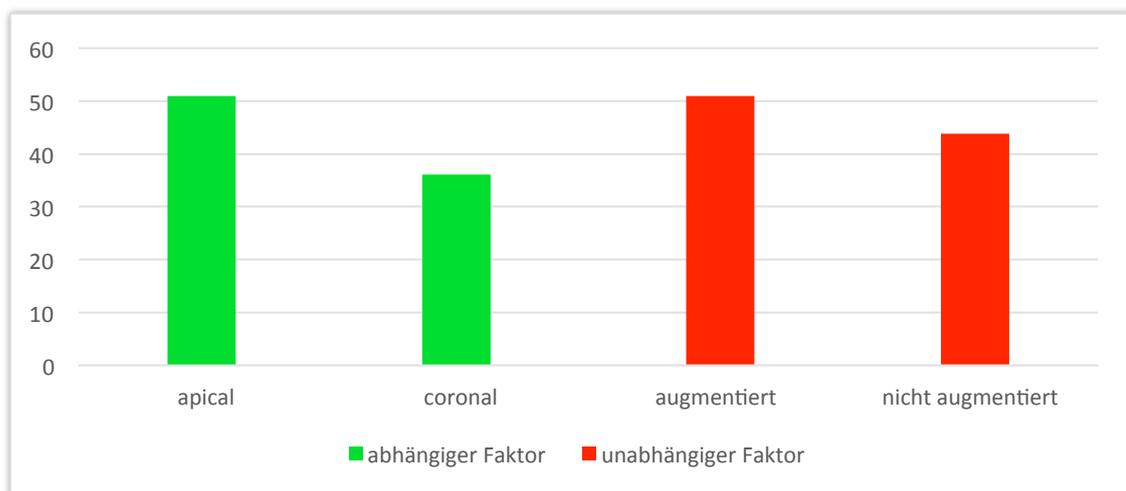


Abb. 15: Gegenüberstellung der apikalen/coronalen Bereiche sowie der augmentierten/nicht augmentierten Alveolen

7.3. Immunhistologische Messungen

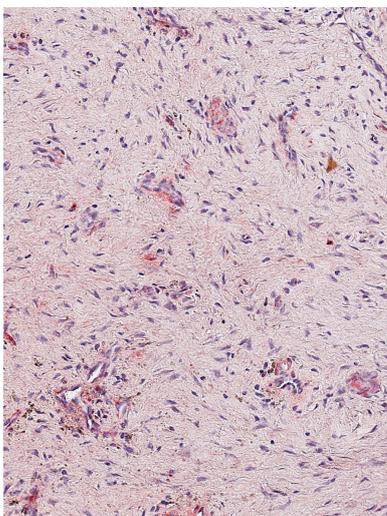
Die quantitative Auswertung der immunhistologisch-gefärbten Schnitte erfolgte an 13 nicht augmentierten Alveolen und 12 augmentierten Alveolen. Jeweils eine Probe aus den nicht augmentierten und den augmentierten Alveolen zeigten im apikalen Abschnitt einen hohen Grad an Ossifikation und somit einen geringen Anteil an provisorischer Matrix (< 50 %). Sie wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen, so dass jeweils 13 coronale und 12 apikale Abschnitte untersucht wurden.

Die entnommenen Gewebsschnitte zeigten unter dem Mikroskop eine unterschiedlich hohe Zelldichte in der provisorischen Matrix. Zur besseren Übersicht erfolgte eine Kategorisierung der Zelldichte. Die Verteilung der Proben in Bezug auf die Zelldichte stellte sich wie folgt dar:

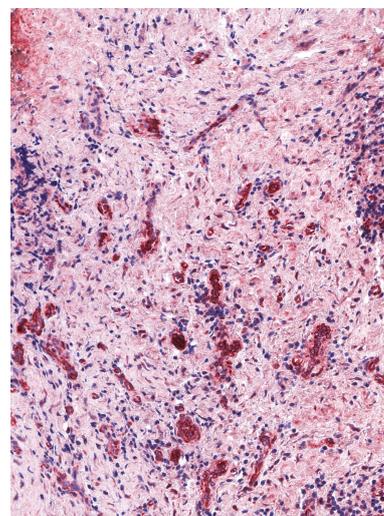
Im coronalen Bereich der Biopsien zeigten mehr als 1/3 (n = 18) eine mittlere Zelldichte (500 - 1000 mesenchymale Stammzellen) in der provisorischen Matrix. Zwei Präparate hatten eine geringe Zelldichte (< 500 mesenchymale Zellen) und drei Präparate eine hohe Zelldichte (> 1000 mesenchymale Stammzellen).

Im apikalen Bereich hatten nahezu 1/3 (n = 8) der Biopsien eine geringe Zelldichte (< als 500 mesenchymale Zellen) in der provisorischen Matrix, 72 % (n = 16) zeigten eine mittlere Zelldichte (500 - 1000 mesenchymale Stammzellen) und in einem Präparat war eine hohe Zelldichte (> 1000 mesenchymale Stammzellen) zu verzeichnen.

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Zelldichte zwischen den nicht augmentierten und augmentierten Alveolen (P = 0.22) sowie zwischen den coronalen und apikalen Bereichen (P = 0.16) zu erkennen.



< 500 mesenchymale Stammzellen



> 1000 mesenchymale Stammzellen

7.3.1. Ergebnisse der nicht augmentierten Alveolen (Cbfa1, OSN, OC)

Cbfa1

Die Zählung der Cbfa1-positiv reagierenden Zellen ergab ein durchschnittliches Ergebnis von 56 % (Bereich 23 - 82 %), wobei 53 % (Bereich 23 - 78 %) positive Zellen in der coronalen Region gefunden worden und 60 % (Bereich 38 - 82 %) in der apikalen Region. Die Verteilung der ermittelten Werte im coronalen und apikalen Bereich ist im folgenden Boxplot-Diagramm (Abb. 16) dargestellt.

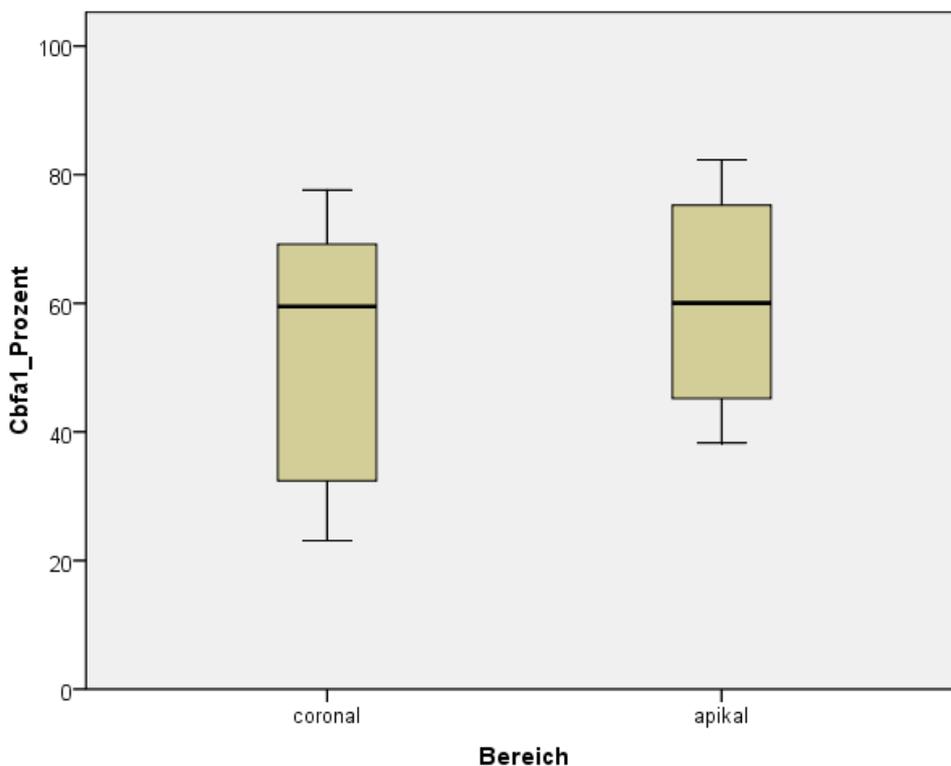


Abb.16: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Cbfa1-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der nicht augmentierten Alveolen

Osteonectin

Osteonectin-positive Zellen konnten bei den nicht augmentierten Alveolen durchschnittlich 45 % (Bereich 17 - 76%) gezählt werden. In der coronalen Region wurden 39 % (Bereich 17 - 67 %) und in der apikalen Region 51 % (Bereich 22 - 76 %) errechnet.

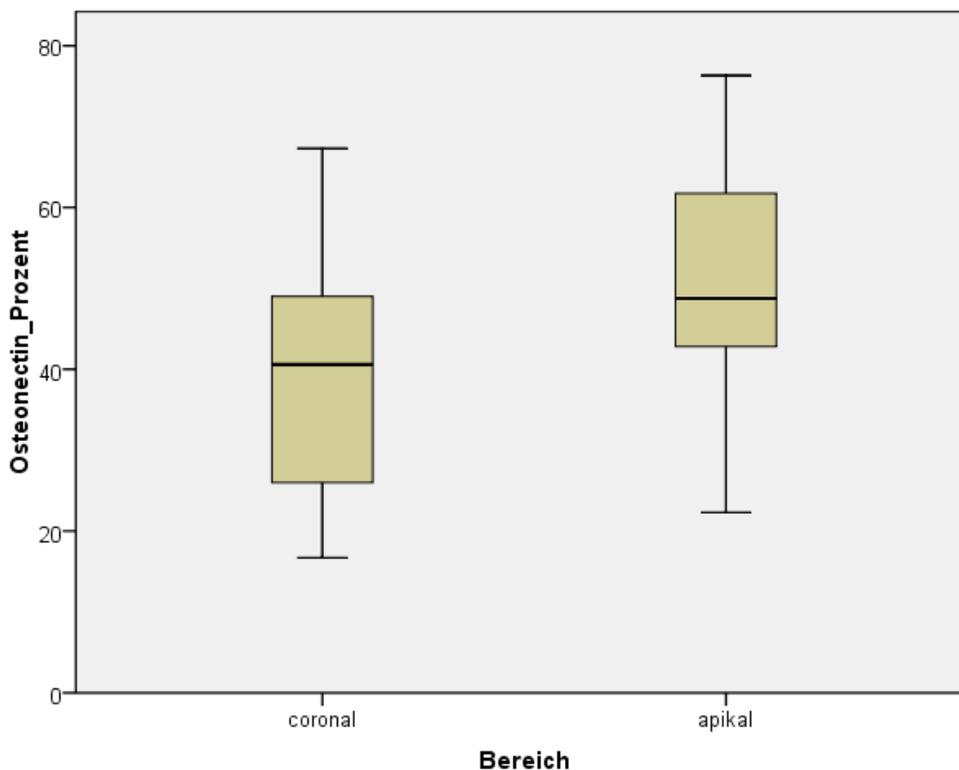


Abb. 17: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Osteonectin-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der nicht augmentierten Alveolen

Osteocalcin

Die immunhistologische Analyse von Osteocalcin-positiven Zellen ergab im Durchschnitt 18 % (Bereich 5 - 33 %). Auch hier zeigten sich Unterschiede im coronalen und apikalen Bereich. Coronal konnten 15 % (Bereich 5 - 33 %) und apikal 21 % (Bereich 11 - 33 %) positiv expressierende Zellen gefunden werden.

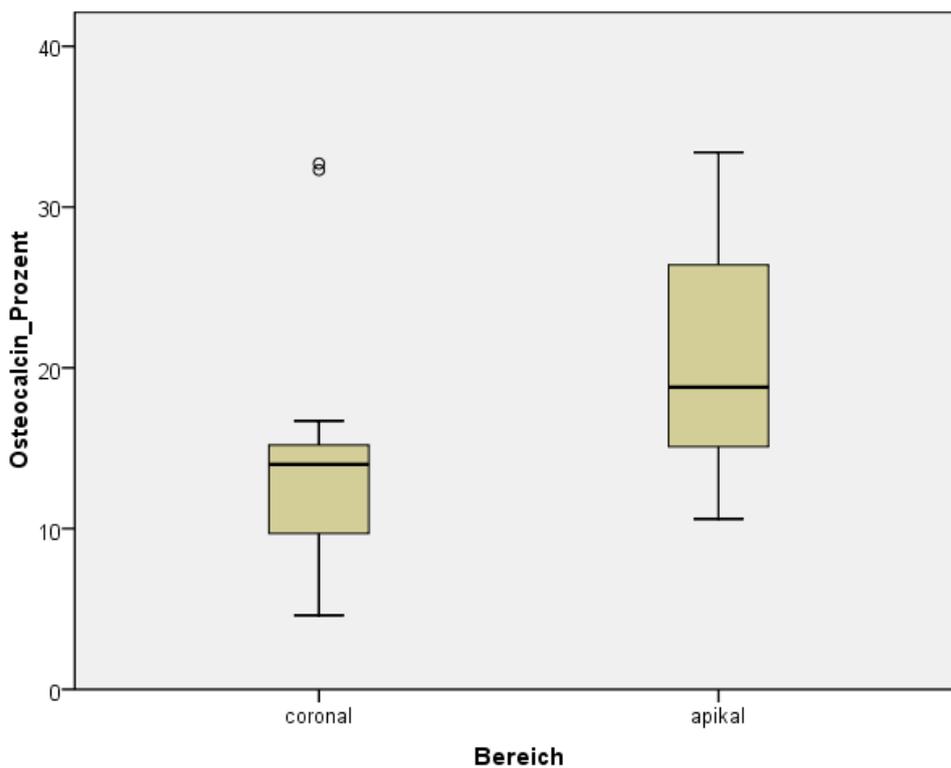


Abb. 18: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Osteocalcin-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der nicht augmentierten Biopsien (°Ausreißer)

7.3.2. Ergebnisse der augmentierten Alveolen (Cbfa1, OSN, OC)

Cbfa1

Die Messungen der mit Bio-Oss augmentierten Alveolen ergaben im Durchschnitt 57 % (Bereich 10 - 85 %) Cbfa1 positive Zellen. Im coronalen Bereich wurden 52 % (Bereich 10 - 83 %) errechnet und im apikalen Bereich 61 % (Bereich 19 - 85 %).

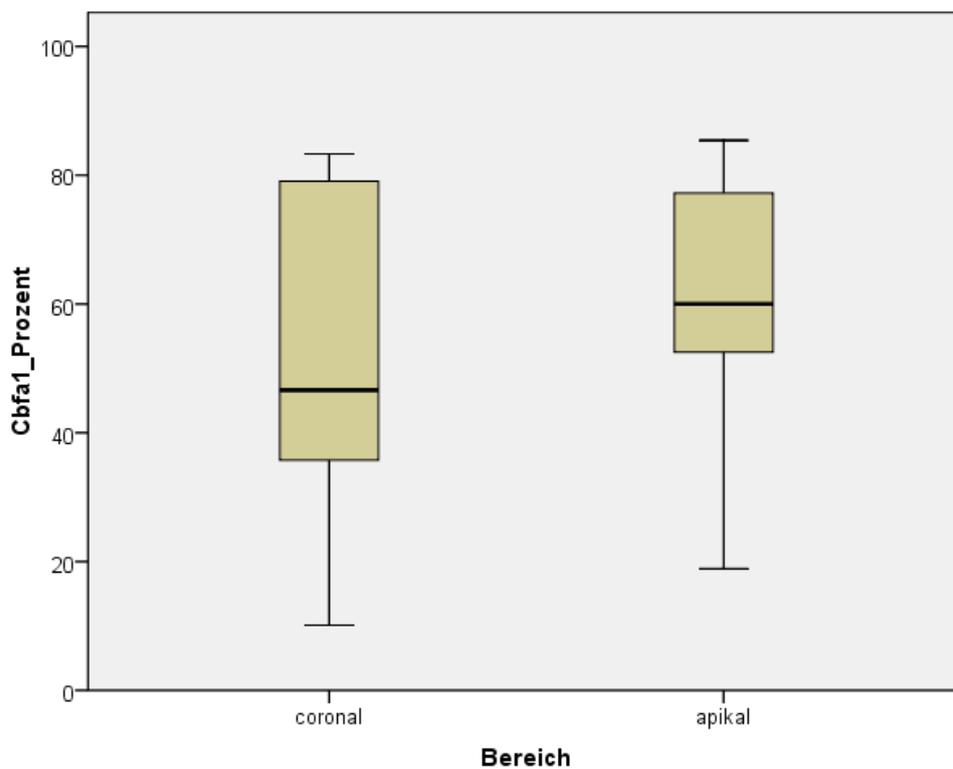


Abb. 19: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Cbfa1-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der augmentierten Alveolen

Osteonectin

Osteonectin positive Zellen ergaben durchschnittlich 32 % (Bereich 11 - 63 %). Es zeigten sich coronal 29 % (Bereich 11 - 48 %) und apikal 34 % (Bereich 17 - 63 %). Die Werteverteilung der coronalen und apikalen Bereiche ist im folgenden Boxplotdiagramm dargestellt.

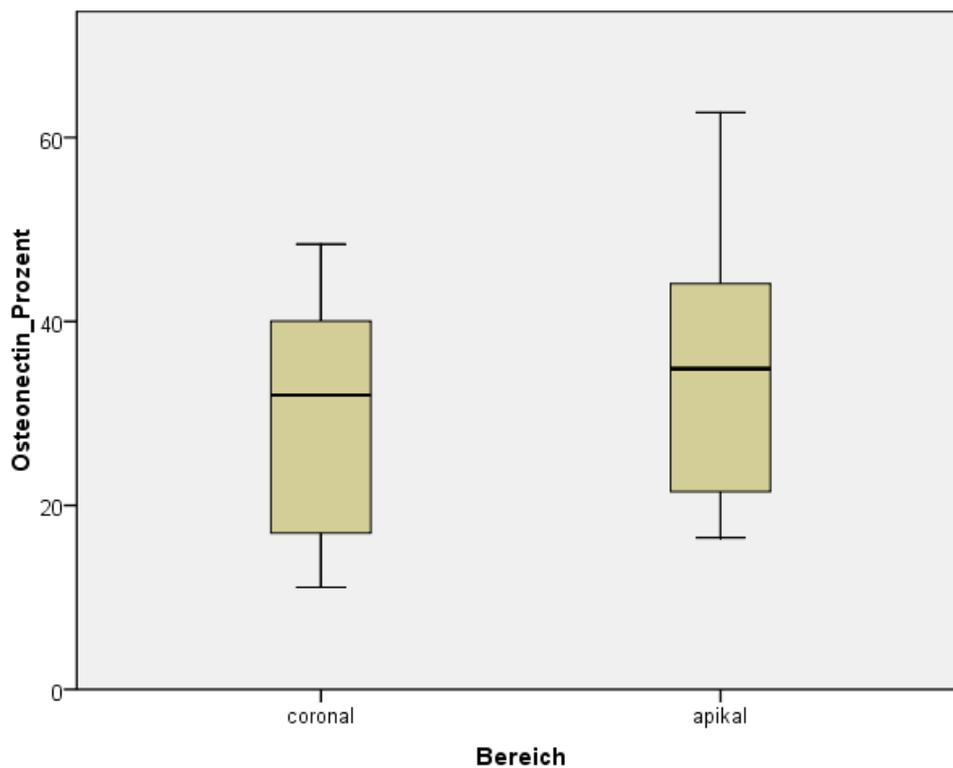


Abb. 20: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Osteonectin-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der augmentierten Alveolen

Osteocalcin

Bei der Zählung von Osteocalcin positiven Zellen wurde ein Durchschnitt von 25 % (Bereich 16 - 42 %) ermittelt, wobei 24 % (Bereich 16 - 42 %) im coronalen und 27 % (Bereich 18 - 40 %) im apikalen Abschnitt zu finden waren.

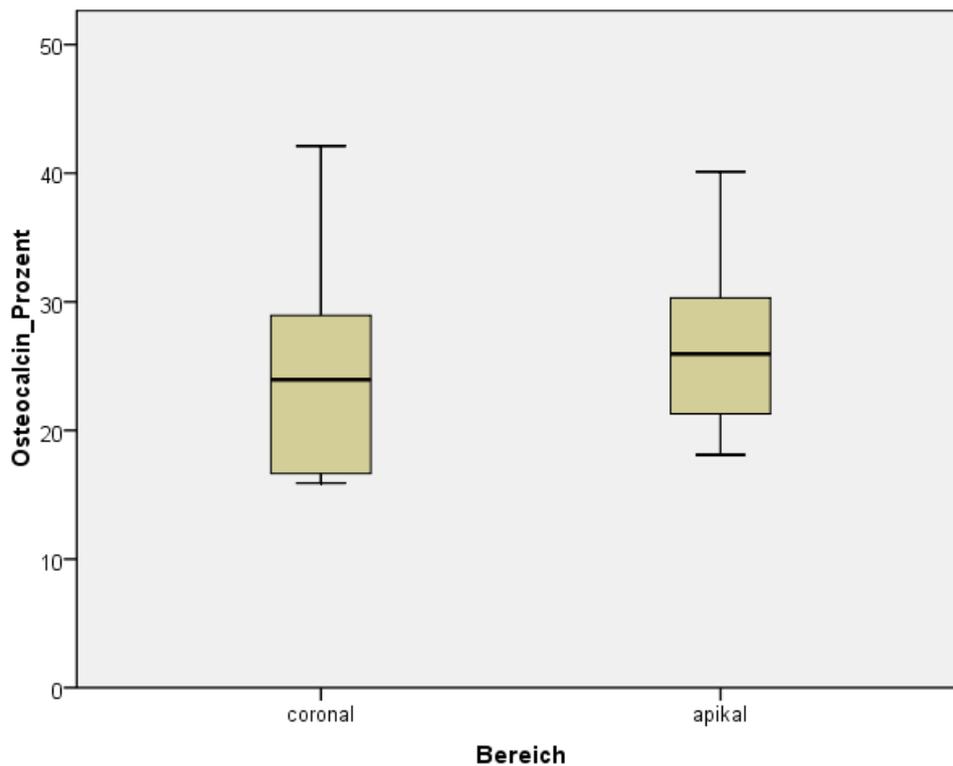


Abb. 21: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung von Osteocalcin-positiven Zellen im coronalen und apikalen Bereich der augmentierten Alveolen

7.3.3. Zweifaktorielle parameterfreie Varianzanalyse der immunhistologischen Messungen (Cbfa1, OSN, OC)

7.3.3.1. Vergleich immunreaktiver Zellen der coronalen und apikalen Bereiche

Die statistische Auswertung der ermittelten Werte ergab, dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen den coronalen und apikalen Bereichen bei Cbfa1 ($P < 0.01$), Osteonectin ($P < 0.01$) und Osteocalcin ($P < 0.01$) existierten. Es zeigte sich jeweils eine höhere Anzahl an positiv expressierenden Zellen in den apikalen Bereichen als in den coronalen Bereichen, was sich in den einzelnen Boxplotdiagrammen wieder spiegelt (Abb. 16 - 18).

7.3.3.2. Vergleich immunreaktiver Zellen zwischen augmentierten und nicht augmentierten Alveolen

Beim Vergleich der augmentierten und nicht augmentierten Alveolen, verdeutlichte die statistische Auswertung einen signifikanten Unterschied zwischen augmentierten und nicht augmentierten Alveolen bei Osteonectin ($P = 0.015$) und Osteocalcin ($P < 0.01$) positiven Zellen. Während die nicht augmentierten Alveolen einen höheren Anteil an Osteonectin positiven Zellen aufwiesen, zeigten die mit Bio-Oss augmentierten Alveolen einen höheren Anteil an Osteocalcin positiv expressierenden Zellen als nicht augmentierte Alveolen. Die Ergebnisse der Cbfa1 positiven Zellen zeigten keine Signifikanz ($P = 0.82$). Die Verteilungen der immunreaktiven Zellen von Cbfa1, Osteonectin und Osteocalcin der augmentierten und nicht augmentierten Alveolen sind im folgenden Boxplotdiagramm dargestellt (Abb.22).

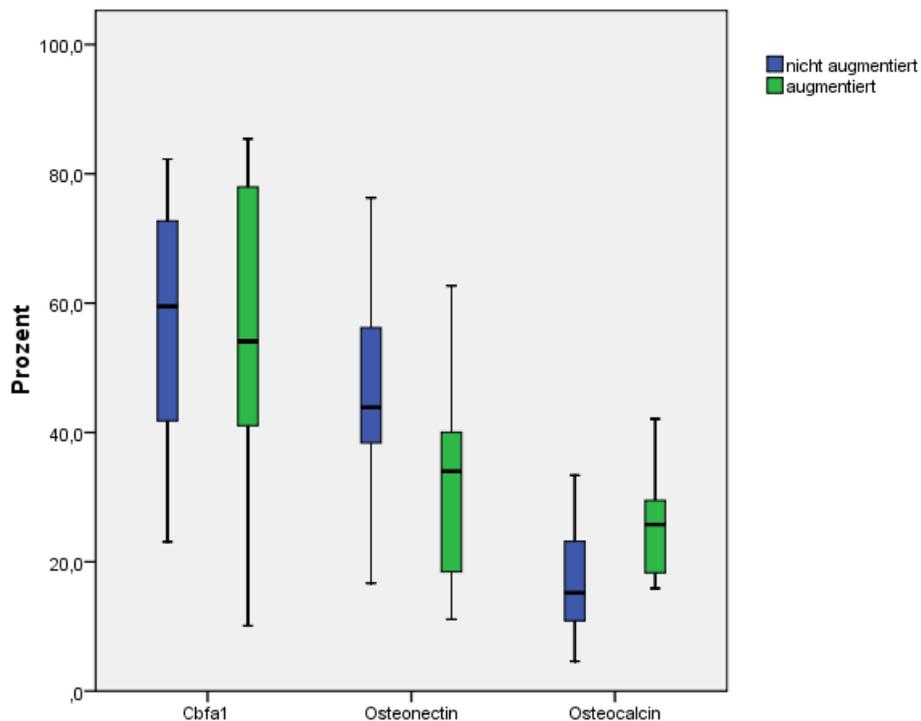


Abb. 22: Boxplotdiagramm zur Darstellung des Medians und der Werteverteilung immunreaktiver Zellen in nicht augmentierten und augmentierten Alveolen nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode

7.3.4. Ergebnisse der CD 31 - Expression durch Endothelzellen

Die immunhistochemische Färbung der entnommenen Gewebeproben mit dem Antikörper CD 31 zeigte insgesamt eine mäßig starke Expression in den Endothelzellen. Dabei lag die immunhistochemische Farbtintensität nach dem zur Beurteilung verwendeten Immunreaktiven Score nach Remmele & Stegner in den **nicht augmentierten Alveolen** im Mittel bei einem Score von 6. Hierbei fand sich im coronalen Bereich ein Score von 4 und im apikalen Bereich ein Score von 7.

In den **augmentierten Alveolen** zeigten die Ergebnisse coronal ebenfalls einen Score von 4 und apikal einen Score von 6. Hiermit resultierte ein durchschnittlicher Score von 5 bei den augmentierten 4 Wochenproben.

Im Vergleich aller Gewebeproben ergaben die Ergebnisse des Immunreaktiven Score einen signifikanten Unterschied zwischen dem CD 31 Score in den coronalen und

apikalen Bereichen ($P < 0.001$). Die Expression von CD 31 war im apikalen Bereich höher als im coronalen Bereich.

Zwischen den nicht augmentierten und augmentierten Alveolen demonstrierte die statistische Analyse jedoch keine Signifikanzen ($P = 0.82$).

7.4. Korrelation von Knochenneuformationsrate und immunhistologisch – positiv expressierenden Zellen (Cbfa1, OSN, OC)

Die Knochenheilung in der Extraktionsalveole wurde durch zuvor histomorphometrische (Knochenneuformationsrate) und immunhistologische Messungen (positiv expressierende Mesenchymzellen) getrennt voneinander untersucht. In einer abschließend durchgeführten Korrelationsanalyse nach Spearman (Spearman's Rho Test) wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Knochenneuformationsrate und der Anzahl Cbfa1-, Osteocalcin- und Osteonectin- positiven Zellen besteht.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei den **augmentierten Alveolen** kein statistischer Zusammenhang zwischen der Knochenneuformationsrate und Cbfa1 ($P = 0.056$), Osteonectin ($P = 0.160$) und Osteocalcin ($P = 0.062$) positiven Zellen existiert.

Bei den **nicht augmentierten Alveolen** konnte hingegen ein Zusammenhang zwischen der Knochenneuformationsrate und Osteocalcin ($P = 0.029$) positiven Zellen dargestellt werden. Daher werden in den gleichen Proben mit viel Knochenneuformation weniger positiv expressierende Zellen in der provisorischen Matrix beobachtet. Cbfa1 ($P = 0.509$) und Osteonectin ($P = 0.298$) zeigten keine Signifikanzen auf.

8. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Wundheilung von nicht augmentierten und mit Bio-Oss Collagen augmentierten Extraktionsalveolen nach einer Heilungsperiode von 4 Wochen untersucht. Alle Extraktionsalveolen zeigten klinisch einen regelgerechten, komplikationslosen Heilungsverlauf mit einer teilweise geschlossenen Weichteilsituation.

8.1. Histomorphometrische Untersuchungen

Schaut man sich den derzeitigen Stand der Literatur an, sind nur wenige humane Studien mit metrischen Angaben zur Knochenneuf ormation für den Zeitraum von 4 Wochen postextractionem zu finden (Ahn & Shin 2008, Trombelli et al. 2008). Meist handelt es sich um beschreibende histologische Untersuchungen ohne quantitative Angaben des sich neuf ormierenden Knochengewebes (Amler et al. 1960, Amler 1969, Boyne 1966, Evian et al. 1982). Tierexperimentelle Hundestudien dokumentieren nach einer Woche den Beginn von sich bildendem Geflechtknochen. Bereits nach 2 - 4 Wochen weisen canine Studien eine Füllung der heilenden Extraktionsalveolen von bis zu 90 % mit Geflechtknochen nach (Cardaropoli et al. 2003, Araújo et al. 2009). Diese Ergebnisse müssen vorsichtig auf die Verhältnisse am Menschen übertragen werden. Aufgrund unterschiedlicher physiologischer Knochenumbauraten der einzelnen Spezies unterscheidet sich die Geschwindigkeit der Heilungskaskade zwischen Mensch und Hund. Der Knochenturnover beim Hund ist im Gegensatz zum Menschen erhöht, er beträgt beim Hund das 1,5 - fache vom Menschen (Pearce et al. 2007, Cardaropoli et al. 2003). Somit lässt sich der Zeitraum von 2 - 4 Wochen bei einer humanen Extraktionsalveole mit dem Zeitraum von zirka 1 - 3 Wochen beim Hund vergleichen.

Die hier vorliegende Studie konzentrierte sich unter anderem auf die histomorphometrische Vermessung des sich neu bildenden Gewebes in der initialen Alveolenheilung. Nach histomorphometrischer Analyse der entnommenen Proben ergab sich in dieser Untersuchung eine mittlere Knochenneuf ormationsrate von 9 % nach 4 Wochen Heilung. Neben dominierender provisorischer Matrix von durchschnittlich 91 %, zeigten sich in den Gewebeproben Knochenneuf ormationen aus Geflechtknochen. Es war die Bildung von primären Osteonen zu erkennen, was für den weiteren Umbau des Geflechtknochens spricht. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Trombelli und seinen Mitarbeitern im gleichen Zeitraum. Mittels Planimetrie wurde im

Querschnitt der prozentuale Anteil an Granulationsgewebe, provisorischer Matrix, Geflechtknochen und Lamelleknochen in den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten bestimmt. Im Zeitraum von 2 - 4 Wochen wurden 10 Proben untersucht, welche insgesamt eine mittlere Knochenneuformationsrate von 7 % hatten. Erst nach einer Periode von 6 - 8 Wochen stellte sich bei Trombelli ein Zuwachs an neu geformten Knochen von 34 % dar. (Trombelli et al. 2008). Eine höhere Knochenneuformation beschreiben Ahn & Shin in einer anderen Untersuchung im Zeitraum von 2 - 4 Wochen (Ahn & Shin 2008). Beim Vergleich von parodontal vorgeschädigten und intakten Alveolen zeigte die histomorphometrische Untersuchung der gesunden Alveolen eine Knochenneuformation von etwa 15 %. Hierbei ist jedoch kritisch anzumerken, dass lediglich drei intakte Alveolen als Kontrollgruppe zur Untersuchung heran gezogen wurden (Ahn & Shin 2008). Da individuelle Schwankungen der einzelnen Gewebetypen beobachtet wurden (Heberer et al. 2008 & 2011, Trombelli et al. 2008), sind die Ergebnisse der Studie von Ahn & Shin nur bedingt zu bewerten.

Wie bereits erwähnt, konnten Autoren deutliche Variationen in den Gewebeproben bei den einzelnen Individuen feststellen (Heberer et al. 2008 & 2011, Trombelli et al. 2008). Auch im Rahmen der hier vorliegenden Studie waren unterschiedliche Reifegrade bei der Evaluation zwischen den einzelnen Proben zu erkennen. Während bei einer 4 Wochenprobe bereits 44 % der apikalen Alveole von Knochenneuformation gekennzeichnet war, zeigte sich daneben eine andere Probe aus dem gleichen Zeitraum mit noch 100 % provisorischer Matrix, sowohl im apikalen als auch im coronalen Bereich. Histologisch waren in 2 Proben Knochenmarksformationen als Zeichen von bereits beginnendem Remodelling zu beobachten. Die unterschiedliche Qualität und Quantität des Knochengewebes in den untersuchten Alveolen stellten sich unabhängig von der Augmentation dar. Der Grund für den unterschiedlichen Entwicklungsgrad der Gewebeproben ist derzeit noch nicht wirklich verstanden, wird aber mit unterschiedlichen Faktoren in Verbindung gebracht welche die Knochenphysiologie beeinflussen (Amler 1993, Saldanha et al. 2006).

In einer retrospektiven Studie wurde das Alter der Patienten als möglicher Einflussfaktor untersucht. Amler stellte fest, dass die Hartgewebsbildung in der frühen Heilungsphase bei Patienten die jünger als 20 Jahre alt waren deutlich schneller voran schritt als bei Patienten mit einem Lebensalter von über 60 Jahren. Erst nach 4 - 6 Wochen war das Heilungsmuster der jungen und alten Patienten wieder vergleichbar (Amler 1993). Heberer et al. und Trombelli beobachteten die Differenzen in der Geschwindigkeit der

Hartgewebsbildung bei den einzelnen Patienten jedoch auch nach einem Zeitraum von 4 - 6 Wochen (Heberer et al. 2008, 2010, Trombelli et al. 2008). Somit müssen weitere Faktoren Einfluss auf die Wundheilung innerhalb der Alveole haben.

Einige Studien bestätigen den negativen Effekt von Nikotin auf die Knochenheilung (Rapuri et al. 2000, Saldanha et al. 2006). Saldanha beobachtete nach einer 6-monatigen Heilungsperiode von humanen Extraktionsalveolen einen signifikant höheren Dimensionsverlust des Alveolarkamms, sowie eine verzögerte Wundheilung der Alveolen bei Patienten die rauchten, als bei nicht rauchenden Patienten. Auch Jones et al. zeigten in einer Studie mit 15 Patienten, dass 80 % der Patienten mit verzögerter Wundheilung Raucher waren (Jones & Triplett 1992).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurden nur gesunde, nicht rauchende Patienten mit unauffälliger Anamnese ausgewählt und Zähne mit parodontalen und apikalen Auffälligkeiten aus den Untersuchungen dieser Studie ausgeschlossen. Die beachtlichen Schwankungen der Knochenneufornationen in den evaluierten Alveolen kann mit dieser Studie nicht geklärt werden. Einflussfaktoren wie Nikotin, parodontal-vorgeschädigte Zähne, aber auch Knochendefekte durch unsachgemäße Extraktionen können in dieser Studie ausgeschlossen werden.

Beim Vergleich der coronalen und apikalen Bereiche konnte ein Unterschied in der Knochenneufornation unabhängig von augmentativen Maßnahmen beobachtet werden. Die histomorphometrische Analyse zeigte, dass die Formation an neuem Knochen im apikalen Bereich zu 2/3 höher war als im coronalen Bereich. Auch andere Autoren beschreiben in ihren Studien ein ähnliches Heilungsmuster (Amler 1969, Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2008, 2011). Amlers Studie zeichnet den zeitlichen Verlauf der Geweberegeneration von Extraktionsalveolen auf und beschreibt nach 10 Tagen die erste Osteoidbildung im apikalen und lateralen Bereich. Sie dokumentiert jedoch nicht die Knochenneufornationsrate der einzelnen Bereiche in der Alveole und es werden keine metrischen Angaben gemacht (Amler 1969). Histomorphometrische Analysen der Teilbereiche innerhalb der Alveole existieren von Heberer et al. erst ab einem Zeitraum von 6 Wochen post extractionem. Nach histologischer Begutachtung und histomorphometrischer Vermessung dokumentierte Heberer et al. an humanen, mit Bio-Oss Collagen augmentierten Alveolen, einen Anteil von 40 % an neugeformten Knochen im apikalen Bereich, welcher doppelt so hoch war wie im coronalen Bereich mit 20 % (Heberer et al. 2008). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch wieder in einer

Studie mit Extraktionsalveolen nach einer 12-wöchigen Heilungsperiode (Heberer et al. 2011). Hierbei wurden mit Bio-Oss Collagen augmentierte und nicht augmentierte Alveolen histomorphometrisch miteinander verglichen. Unabhängig von der Augmentation, war der Anteil an Knochen auch hier im apikalen Bereich mit 50 % höher als im coronalen Bereich (Heberer et al. 2011). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Formation von neuem Knochen aus dem apikalen Bereich der Extraktionsalveole initiiert wird, wie es bereits in vorangegangenen humanen und tierexperimentellen Studien belegt werden konnte (Ahn & Shin 2008, Heberer et al. 2008, Araújo & Lindhe 2005).

In dieser Studie heilten alle Alveolen ohne chirurgischen Wundverschluss. Der marginale Verschluss der Alveole erfolgte lediglich durch die Überwucherung des lateralen Epithels. Die langsame, aber beginnende Knochenneuf ormation im coronalen Bereich der hier entnommenen Biopsien, bestärken die Tatsache, dass das Periost nicht an der Matrixbildung beteiligt ist und die Knochenformation von apikal induziert wird. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus früheren Studien überein, welche ebenfalls keinen chirurgischen Weichgewebsverschluss durchführten (Amler 1969, Boyne 1966, Dies et al. 1996). Eine Aussage, ob die Formation des Knochens auch von lateral angeregt wird, kann mit dieser Studie nicht getätigt werden. Die Biopsien demonstrieren einen Teilbereich der heilenden Extraktionsalveole und erlauben somit nur eine Einschätzung über den coronalen und apikalen Bereich. Veröffentlichte Studien diskutierten jedoch, ob das periodontale Ligament für die knöchernde Regeneration verantwortlich gemacht werden kann. Sie vermuten, dass die Fibroblasten im verbleibenden periodontalen Ligament die Knochenbildung beeinflusst (Todo 1968, Devlin & Sloan 2002). Da in dieser Studie jedoch alle Alveolen gründlich kürettiert und das periodontale Ligament damit vollständig entfernt wurde, kann diese Vermutung ausgeschlossen werden und steht im Einklang mit anderen humanen Studien (Heberer et al. 2008, 2011, 2012, Trombelli et al. 2008).

Ein weiterer Fokus dieser Studie war der Vergleich von Bio-Oss Collagen augmentierten Alveolen mit nicht augmentierten Alveolen. Studien zufolge ist Bio-Oss ein osteokonduktives und biokompatibles Knochenersatzmaterial, welches ein passendes Gerüst zum Anbau von neuem Knochen bietet (Hislop et al. 1993, Jensen et al. 1996). Die Partikel des xenogenem Knochenersatzmaterials werden langsam in den umgebenden Knochen eingebaut und mit der Zeit in den physiologischen

Remodellierungsprozess involviert (Traini et al. 2008, Berglundh & Lindhe 1997, Araújo et al. 2010). Die frühe initiale Wundheilung von gefüllten Alveolen wurde bis dato jedoch nur in tierexperimentellen Untersuchungen evaluiert (Araújo et al. 2009, 2010). Humane Studien untersuchten die augmentierte Alveole erst zu einem späteren Zeitpunkt ab 6 Wochen (Scheyer et al. 2012, Heberer et al. 2008). So evaluierte Scheyer et al. in einer aktuellen Studie Extraktionsalveolen, welche mit einem allogenen Material augmentiert wurden. Er demonstrierte nach 6 Wochen Bereiche von Geflechtknochen, ohne jedoch quantitative Angaben zu machen (Scheyer et al. 2012). Die Bildung von neuem Knochen entlang von Bio Oss-Partikeln konnte auch in früheren Studien beobachtet werden (Heberer et al. 2008, Araújo et al. 2009, Carmagnola et al. 2003). Die histologischen Bilder der vorliegenden Studie bestätigen das osteokonduktive Verhalten der Bio Oss-Partikel. Nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode zeigten sich die Bio-Oss Partikel umgeben von provisorischer Matrix und entlang ihrer Oberfläche war die Apposition von neuem Knochen zu erkennen. Histomorphometrisch stellte sich eine durchschnittliche Knochenneuformationsrate von 11 % dar.

Tierstudien zeigten, dass Bio-Oss augmentiert in eine frische Extraktionsalveole, eine hemmende Wirkung auf den Modelling- und Remodellierungsprozess hat (Araújo et al. 2008, Jensen et al. 2006). Im frühen Stadium der alveolären Wundheilung beobachtete Araújo, in einer tierexperimentellen Studie, eine verzögerte Knochenheilung. Araújo mutmaßte eine Beeinträchtigung auf die Hartgewebsdisposition durch mehrkernige Riesenzellen. Er vermutete eine körpereigene Abwehrreaktion mit entzündlichen Prozessen auf das Bio-Oss als Fremdkörpermaterial (Araújo et al. 2009). Die Ergebnisse in dieser Studie können eine Beeinflussung durch Bio-Oss Collagen auf die frühe Wundheilung nicht bestätigen. In keiner der Biopsien wurden mehrkernige Riesenzellen gefunden. Die histomorphometrischen Untersuchungen in dieser Studie lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen den augmentierten (11 %) und nicht augmentierten (9 %) Alveolen erkennen. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die Augmentation humaner Extraktionsalveolen mit Bio-Oss Collagen, nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode keinen Einfluss auf das prozentuale Knochenvolumen hat.

Die Anwesenheit von mehrkernigen Riesenzellen entlang von Bio-Oss Material wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Piattelli et al. 1999, Merckx 2000, Jensen et al. 2006) und unterschiedlich diskutiert. Während einige Autoren mehrkernige Riesenzellen für die allmähliche Elimination und Resorption von Knochenersatzmaterial verantwortlich machen (Berglundh & Lindhe 1997; Cardaropoli et al. 2005), beschreibt

Jensen zwar die Anwesenheit von mehrkernigen Riesenzellen entlang der Oberfläche von Bio-Oss, weist aber keine quantitative Reduktion der Partikel nach (Jensen et al. 2006).

8.2. Immunhistologische Untersuchungen

Nach histomorphometrischer Analyse der Knochenneuf ormation, lag ein weiteres Hauptaugenmerk in der hier vorliegenden Studie auf der Bestimmung des osteogenen Potentials der provisorischen Matrix. Hierzu wurden 3 spezifische Proteine herangezogen, welche als Marker für die osteoblastäre Differenzierungskaskade genutzt werden (Jeon et al. 2003, Bielby et al. 2007). Der Unterschied zwischen diesen Proteinen liegt im Zeitpunkt ihrer Expression während der Differenzierung von Osteoblasten (Komori & Kishimoto 1998).

Die Expression des Transkriptionsfaktor **Cbfa1** erfolgt zu einem frühen Zeitpunkt der Osteoblastendifferenzierung und wird von jedem zukünftigen Osteoblasten, unabhängig von seinem Reifestadium und seinem embryonalen Ursprung exprimiert (Ducy 2000, Karsenty 2000). Die provisorische Matrix der in dieser Studie entnommenen Gewebeproben, zeigte einen Anteil von 56 % Cbfa1 - positiv exprimierenden Zellen. Mit dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass mehr als die Hälfte der Zellen in der provisorischen Matrix nach einer 4-wöchigen Heilungsperiode ein osteogenetisches Potential haben. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Augmentation der Alveolen und der Lokalisation der Zellen im coronalen oder apikalen Bereich. Übereinstimmende Daten ergaben sich auch bei der quantitativen Analyse von humanen Extraktionsalveolen nach einer 6-wöchigen Heilungsperiode von Heberer et al.. Auch hier waren 2/3 der Zellen immunreaktiv für Cbfa1 (Heberer et al. 2011). Neben dem Einfluss auf die osteoblastäre Reifung, ist das Protein jedoch auch essentiell für die Differenzierung hypertropher Chondrozyten (Franceschi et al. 2007).

Da die Formation von Knochen bei der Heilung sowohl durch desmale/intramembranöse Ossifikation als auch durch enchondrale Ossifikation erfolgen kann (Nakata et al. 2002), stellt sich hierbei die Frage, ob es sich bei den Cbfa1 - positiven Zellen um Zellen osteoblastären Ursprungs handelt. In einer Studie von Kanyama wurde an einem Rattenmodell die Knochenheilung nach Extraktion der oberen rechten Molaren untersucht. Nach immunhistochemischen Analysen dominierte eine starke Migration und Proliferation von osteogenetischen und angiogenetischen

Zellen in der Alveole. Eine Differenzierung von Chondrozyten aus den mesenchymalen Stammzellen wie bei der enchondralen Verknöcherung war jedoch nicht zu beobachten. Diese Beobachtung ließ Kanyama schlussfolgern, dass die enchondrale Ossifikation nicht an der Wundheilung im Alveolarknochen beteiligt ist (Kanyama et al. 2003). Auch die Untersuchungen von Chao & Inoue bestätigen, dass es bei der Heilung des Alveolarknochens ausschließlich zu einer intramembranösen Ossifikation kommt (Chao & Inoue 2003). Cbfa1 kann somit als Indikator für das osteogenetische Potential der Zellen in der heilenden Extraktionsalveole benutzt werden, gibt jedoch keine Auskunft über den Reifegrad des sich bildenden Knochens.

Mit der Differenzierung zu reifen Osteoprogenitorzellen kommt es in der osteogenetischen Zelllinie zur Expression des nicht-kollagenen Proteins **Osteonectin** (Komori & Kishimoto 1998). Die immunhistologischen Ergebnisse zeigten 45 % Osteonectin-positive Zellen verteilt im gesamten Bereich der provisorischen Matrix. Es lässt sich suggerieren, dass fast die Hälfte der Zellen reife Osteoprogenitorzellen sind, wobei die Reifung von apikal nach coronal voran schreitet. Die Expression von Osteonectin wurde aber auch bei Fibroblasten beobachtet, Zellen welche sich ebenfalls aus den mesenchymalen Stammzellen ableiten, und auch bei Megakaryoblasten und Blutplättchen, welche sich aus den hämatopoetischen Stammzellen differenzieren (Valenti et al. 2008). Aus diesem Grund ist die Bestimmung des osteogenetischen Potentials in der provisorischen Matrix begrenzt und die immunhistologische Untersuchung mit Osteonectin in Kombination mit anderen osteoblastischen Transkriptionsfaktoren oder Proteinen unerlässlich.

Ein weiteres Protein, welches zur Untersuchung des osteogenetischen Potentials der heranreifenden Zellen herangezogen wurde, ist das Osteocalcin. **Osteocalcin** gilt als hochspezifischer Marker, welcher während der Knochenneubildung gebildet wird (Hauschka et al. 1989). Die Expression des Proteins erfolgt zu einem späten Zeitpunkt durch aktive Osteoblasten, mit Beginn der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (Hauschka et al. 1989, Lian et al. 1998).

Innerhalb dieser Studie präsentierte die provisorische Matrix nach 4 Wochen alle Reifegrade der osteogenetischen Linie, wobei bereits 1/5 der Zellen immunreaktiv für aktive Osteoblasten mit einem höheren Wert im apikalen Bereich waren. Auch Trombelli et al. untersuchte die Anwesenheit von Knochenzellen mit Hilfe von BMP-7 und Osteocalcin (Trombelli et al. 2008). BMP-1, auch bekannt als Osteogenic Protein-1, wird von osteogenetischen Zellen exprimiert und gilt ebenfalls als Marker von

Osteoblasten (Itho et al. 2001). Trombelli beschreibt eine hohe Zelldichte von Osteocalcin und BMP-7 positiven Zellen entlang der Oberfläche von neugeformten Geflechtknochen. Diese Aussage deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Studie. Trombelli beschreibt jedoch nur die Oberfläche des neugeformten Knochens, welche die aktive Zone der Knochenneuf ormation darstellt, gibt aber keinerlei Information über das osteogenetische Potential der Zellen innerhalb der verbleibenden provisorischen Matrix.

Zieht man zum Vergleich Studien von Heberer et al. heran, welche das osteogenetische Potential zu einem späteren Zeitpunkt von 6 und 12 Wochen immunhistologisch untersuchten, wird deutlich, dass die Anzahl an aktiven Osteoblasten (6 Wochen: 11,8 %, 12 Wochen: 9,4 %) mit fortschreitender Heilung abnimmt (Heberer et al. 2012, Nahles et al. 2013). In den Ergebnissen der vorliegenden Studie wird eine Korrelation der Knochenneuf ormationrate mit Osteocalcin – positiv expressierenden Zellen deutlich. Je mehr Knochenneuf ormation in den einzelnen Proben zu erkennen war, desto geringer wurde die Anzahl an Osteocalcin – positiv expressierenden Zellen, also an aktiven Osteoblasten. Osteoblasten gehen vermutlich in einen inaktiven Zustand über und werden zu sogenannten Bone-Lining-Cells. Dabei spielen sie eine entscheidende Rolle beim Remodelling-Prozess des Knochens und präsentieren eine Ansammlung von Zellen, welche befähigt sind auf osteoinduktive Signale zu reagieren (Hauge et al. 2001, Eriksen 2010). Aus diesem Vergleich lässt sich schließen, dass die initiale Knochenneuf ormation, welche in unterschiedlichen humanen Studien beschrieben wird (Amler 1969, Boyne 1966, Heberer et al. 2008), ihren Höhepunkt an aktiven Osteoblasten in der frühen Phase der Heilung von 4 Wochen nach Extraktion erreicht hat.

Die Proben dieser Studie zeigten, dass sich Osteocalcin-positive Zellen verteilt in der gesamten provisorischen Matrix befinden, jedoch auch mit einer besonders hohen Dichte im Bereich von vaskulären Strukturen, welche in allen Proben histologisch zu erkennen waren. Neben der Expression von Osteocalcin durch reife Osteoblasten beschreibt Watson in seiner Untersuchung von kalzifizierenden vaskulären Zellen in Bezug auf die Arteriosklerose, auch die Synthese von Osteocalcin durch glatte Muskelzellen in Gefäßen (Watson et al. 1994). Schaut man sich jedoch den charakteristischen Aufbau von Gefäßen an, fehlt den Kapillaren die, im Gegensatz zum arteriellen- und venösen System, vorhandene Muskelschicht aus glatten Muskelzellen (Wheater et al. 1987). Daraus lässt sich für diese Studie schlussfolgern, dass es sich bei

den Osteocalcin-positiv expressierenden Zellen entlang der Kapillaren um Osteoblasten handelt.

Verschiedene Publikationen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Angiogenese und Knochenneuf ormation (Trueta 1963, Saur et al. 1978, Lienau et al. 2009, Götz et al. 2012). Demnach geht die Angiogenese, der Osteogenese voraus und stellt die Grundlage für die nachfolgende Knochenneubildung dar (Kleinheinz et al. 2002, Saur et al. 1978). Einsprießende Kapillare sind verantwortlich für den Transport von Zellen und Nährstoffen, welche die Bildung von neuem Knochen beeinflussen (Hankenson et al. 2011). Die Untersuchung des angiogenen Potentials in dieser Studie lässt eine Korrelation des angiogenen Potentials mit dem osteogenen Potential erkennen. Das Bild der Expression für CD 31 - positive Zellen zeigte nach 4 Wochen insgesamt eine mäßig starke Expression. Vergleichend mit den Ergebnissen der osteoblastären Marker war auch bei den endothelialen Zellen ein signifikant höherer Wert im apikalen als im coronalen Bereich zu beobachten. Ähnliche Ergebnisse bestätigen sich in der Studie von Nahles et al. über einen zeitlichen Verlauf von 4 bis 12 Wochen. Bei der Reifung von Osteoblasten, welche ihren Höhepunkt in der frühen Heilungsphase von 4 Wochen erreicht haben, zeigt CD 31 ebenfalls ein höheres Level an CD 31 positiven Zellen nach 4 Wochen als nach 12 Wochen (Nahles et al. 2013).

Die Aufmerksamkeit der immunhistologischen Auswertung, richtete sich ebenfalls auf den Vergleich der augmentierten und nicht augmentierten Alveolen. Bisher existieren nur wenige Studien, die den Einfluss von Bio-Oss Collagen auf das osteogene und angiogene Potential während der Alveolenheilung untersuchten.

In einer Studie von Carinci und seinen Mitarbeitern wurde der genetische Effekt von Bio-Oss auf osteogenetische Zellen in vitro mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungssystemen untersucht und demonstriert, dass Bio-Oss transkriptionelle Aktivitäten beeinflusst. Dieses Ergebnis könnte eine Erklärung, auf die biologische Affinität von Bio-Oss zu osteogenetischen Zellen und die Fähigkeit osteoblastische Differenzierung zu stimulieren, sein (Carinci et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Untersuchung an einem Rattenmodell von Tapety et al. (Tapety et al. 2004). Um die Antwort von Knochenzellen auf ein deproteinisiertes bovines Knochenmaterial (Bio-Oss) zu untersuchen, wurden mit Hilfe von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und EDI, eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Diese zeigte ALPase-positive Osteoblasten auf der Oberfläche der Bio-Oss Partikel, sowie Anteile an neu gebildetem Knochen, immunreaktiv für Osteocalcin, entlang der Partikel (Tapety et al. 2004). In der

immunhistologischen Auswertung der hier präsentierten Studie, stellte sich ebenfalls ein enger Kontakt zwischen den Knochenzellen und der Oberfläche der Bio-Oss Partikel dar. Es zeigte sich eine hohe Anzahl an Cbfa1- und Osteonectin- positiven Zellen entlang der Oberfläche. Ein Einfluss des Augmentationsmaterials auf die Anzahl und Zusammensetzung der osteogenen Zellen, konnte nicht festgestellt werden. Beim Vergleich der Gewebeproben zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen wurden keine signifikanten Unterschiede der immunreaktiven Zellen für Cbfa1, Osteonectin und Osteocalcin gefunden. Vergleichbare Beobachtungen konnten in einer Studie mit Bio-Oss Collagen augmentierten und nicht augmentierten Alveolen nach einer 6 - wöchigen Heilungsperiode dokumentiert werden (Heberer et al. 2011).

In Bezug auf den Einfluss von Knochenersatzmaterialien auf die Angiogenese demonstrierten veröffentlichte Studien, dass Trägermaterialien zur Kultivierung von körpereigenen Zellen im Zuge des Bone Tissue Engineering, die Neovaskularisierung fördern. Es wird eine mechanische Unterstützung der Zellen während der Regeneration geliefert, ohne diese negativ zu beeinflussen (Fuchs et al. 2009, Xing et al. 2010). Die immunhistochemische Farbtintensität in der vorliegenden Untersuchung lag bei den ungefüllten Alveolen bei einem Score von 6 und bei den augmentierten Alveolen im Durchschnitt bei einem Score von 5. Somit stellte sich bei beiden Proben eine mäßig starke Expression dar und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass eine Augmentation mit Bio-Oss Collagen keinen hemmenden Effekt auf das angiogene Potential hat und somit keinen Einfluss auf die Angiogenese während der frühen Heilungsperiode.

8.3. Schlussfolgerung

In der frühen Phase der Heilung von Extraktionsalveolen ist die Bildung von neugeformten Knochen in unterschiedlichen Reifegraden zu erkennen, wobei sich große individuelle Variationen in den Gewebeproben darstellen. Unabhängig von Augmentationsmaßnahmen wird die Knochenreifung von apikal initiiert und schreitet nach coronal voran.

Die immunhistochemische Analyse verdeutlichte innerhalb der provisorischen Matrix ein hohes osteogenes und angiogenes Potential. Bereits 1/5 der aktiven Zellen waren zu aktiven Osteoblasten gereift. Bio-Oss Collagen als Augmentationsmaterial, zeigte zum

Zeitpunkt von 4 Wochen post extractionem keinerlei Einfluss auf die Wundheilung. Es waren keine Anzeichen von Entzündungen zu erkennen und es wirkte sich weder auf die Knochenneuf ormation noch auf das osteogene Potential negativ aus.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich Schlussfolgern, dass eine Implantation zum frühen Zeitpunkt von 4 Wochen bereits möglich ist und dass das noch vorhandene Weichgewebe, aufgrund seines hohen osteogenen Potential, im Zuge einer Implantation nicht entfernt werden sollte. Zur Evaluation von möglichen Einflußparametern auf die interindividuellen Varianzen der Knochenneuf ormationsraten und dem osteogenen Potential in der Heilung von Extraktionsalveolen, sind weiterführende Studien mit höheren Patientenzahlen sinnvoll und anzustreben.

9. Literaturverzeichnis

1. Ahn JJ, Shin HI. Bone tissue formation in extraction sockets from sites with advanced periodontal disease: a histomorphometric study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Nov-Dec;23(6):1133-8
2. Alling CC, Kerr DA. Trauma as a factor causing delayed repair of dental extraction sites. *J Oral Surg (chic)* 1957 Jan;15:3-11
3. Alt V, Kögelmaier DV, Lips KS, Witt V, Pacholke S, Heiss C, Kampschulte M, Heinemann S, Hanke T, Thormann U, Schnettler R, Lanheinrich AC. Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta Biomater*. 2011 Oct; 7(10): 3773-9
4. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Ame Dent Assoc*. 1960 (Jul);61:32-44
5. Amler MH, The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969 Mar;27(3):309-18
6. Amler MH. Age factor in human alveolar bone repair. *J Oral Implantol*.1993;19(2):138-42
7. Araújo MG, da Silva JC, de Mendonca AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Apr;26(4):407-12
8. Araújo MG, Lijenberg B, Lindhe J. Dynamics of Bio-Oss Collagen incorporation in fresh extraction wounds: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Jan;21(1):55-64
9. Araújo M, Lindner E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extracion sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):1-6
10. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005 Feb; 32(2):212-8
11. Araújo M, Lindner E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008 Apr;28(2):123-35

12. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 month. *J Periodontol.* 2000 Jun;71(6):1015-24
13. Atwood DA. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J Prosthet Dent* 1971 Sep;26(3):266-79
14. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone.* 1995 Aug;17(2 Suppl):77S-83S
15. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Apr;8(2):117-24
16. Berry JE, Zhao M, Jin Q, Foster BL, Viswanathan H, Somerman MJ. Exploring the origins of cementoblasts and their trigger factors. *Connect Tissue Res.* 2003; 44 Suppl 1:97-102
17. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S26-32
18. Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *J Clin Periodontol.* 2004 Oct;31(10):820-8
19. Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C. Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014
20. Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966 Jun;21(6):805-13
21. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res.* 2006 Feb; 21(2):183-92
22. Braun W, Rüter A. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg.* 1996 Jan;99(1):59-67
23. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997(Sep);21(3): 225-35
24. Brunner E, Dornhof S, Langer F. Non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. New York: Wiley 2003
25. Buser D. Membrangestützte Knochenregeneration in der Implantologie. Quintessenz Verlag-GmbH 2010

26. Canady JW, Zeitler DP, Thompson SA, Nicholas CD. Suitability of the iliac crest as a site for harvest of autogenous bone grafts. *Cleft Palate Craniofac J*. 1993 Nov;30(6):579-81
27. Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced – augmented and non-augmented – defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 May;32(5):435-40
28. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003 Sep; 30(9):809-18
29. Carinci F, Piattelli A, Degidi M, Palmieri A, Perrotti V, Scapoli L, Martinelli M, Laino G, Pezzetti F. Genetic effects of anorganic bovine bone (Bio-Oss) on osteoblast-like MG63 cells. *Arch Oral Biol*. 2006 Feb;51(2):154-63
30. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95
31. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):137-43
32. Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Aug;17(4):232-6
33. Chao EY, Inoue N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater*. 2003 Dec31;6:72-84
34. Chen ST, Wilson TG Jr, Hämmerle CHF. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures and, outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:12-25
35. Claflin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1936;32:945-59
36. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984 Feb;32(2):219-29
37. Covani U, Bortolaia C, Barone A, Sbordone L. Bucco-lingual crestal bone changes after immediate and delayed implant placement. *J Periodontol* 2004 Dec;75(12):1605-12

38. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000 May; 105(7):915-23
39. Delisser MH, Baldwin HS, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31): A multifunctional vascular cell adhesion molecule. *Trends Cardiovasc Med.* 1997 Aug;7(6):203-10
40. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int. J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Dec;31: 641-5
41. Dies F, Etienne D, Abboud NB, Ouhayoun JP. Bone regeneration in extraction sites after immediate placement of an e-PTFE membrane with or without a biomaterial. A report on 12 consecutive cases. *Clin Oral Implants Res.* 1996 Se;7(3):277-85
42. Ducky P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997 May 30;89(5):747-54
43. Ducky P. *Cbfa1*: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn.* 2000 Dec;219(4):461-71
44. Eames BF, de la Fuente L, Helms JA. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003 May;69(2):93-101
45. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Dec;11(4):219-27
46. Euler H. Die Heilung von Extraktionswunden. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1923;41:685
47. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002 Jan;17(1):77-90
48. Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodonto.* 1982 Feb; 53(2):81-5
49. Farmer M, Darby I. Ridge dimensional changes following single-tooth extraction in the aesthetic zone. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Feb;25(2):272-7
50. Fickl S, Zühr O, Wachtel H, Stappert CF, Stein JM, Hürzeler MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct;35(10):906-13

51. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Rocca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:196-207
52. Fretwurst T, Spanou A, Nelson K, Wein M, Steinberg T, Stricker A. Comparison of four different allogeneic bone grafts for alveolar ridge reconstruction: a preliminary histologic and biochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014 Oct;118(4): 424-31
53. Frost HM. Wolff's law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod.* 1994;64(3):175-88
54. Fuchs S, Jiang X, Schmidt H, Dohle E, Ghanaati S, Orth C, Hofmann A, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. Dynamic processes involved in the pre-vascularization of silk fibroin constructs for bone regeneration using outgrowth endothelial cells. *Biomaterials.* 2009 Mar;30(7):1329-38
55. Garg KA. Knochen-Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie. Quintessenz Verlag-GmbH 2006
56. Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Jul;17(7):1193-202
57. Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing- A brief overview. *Ann Anat.* 2012 Mar 20;194(2):171-3
58. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury.* 2011 Jun;42(6):556-61
59. Hahn W, Klotz S. Knochenaufbau in der zahnärztlichen Implantologie. Band1; Spitta-Verlag 2008
60. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1575-82
61. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Grundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989 Jul;69(3):990-1047
62. Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Dec;19(12):1219-25

63. Heberer S, Al-Chawaf B, Jablonski C, Nelson JJ, Lage H, Nelson K. Healing of ungrafted and grafted extraction sockets after 12 weeks: a prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 Mar-Apr;26(2):385-92
64. Heberer S, Wustlich A, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix after 6-week healing period in augmented and non-augmented extraction sockets: an immunohistochemical prospective pilot study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Jan;23(1):19-27
65. Hees H, Sinowatz F. *Histologie – Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.* Köln: Deutscher Ärzte-Verlag 2000
66. Hewett PW, Murray JC. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993 Nov;29A(11):823-30
67. Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Jun;31:149-53
68. Hjørting-Hansen E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschir.* 2002 Jan;6(1):6-14
69. Holtmann H, Kreft S, Wilhelm SB. *Histologie – mediscript Kurzlehrbuch.* Urban & Fischer 2013
70. Huebsch RF, Coleman RD, Frandsen AM, Becks H. The healing process following molar extraction: Normal male rats (long-evans strain). *Oral Surg Med Oral Pathol.* 1952 Aug;5(8):864-76
71. Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO* 2001 Aug 1;20(15):4132-42
72. Jensen BL. Cleidocranial dysplasia: craniofacial morphology in adult patients. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1994 Jul-Sep;14(3):163-76
73. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Jan-Feb;11(1):55-66
74. Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium

- phosphatise. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res.*2006; 17: 237-243
75. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziger E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphatase in standardized bone defects. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2007 Dec;18(6):752-60
76. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY, Shin CS. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2003 Jun;278 (26):23270-7
77. Johnson K. A study of the dimensional changes occurring in the maxilla following tooth extraction. *Aust Dent J.* 1969 Aug;14(4):241-4
78. Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Mar; 50(3):237-40
79. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie.* 4. Auflage Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag 2005
80. Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, Kubota S, Nakanishi T, Takigawa M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 2003 Oct; 48:723-30
81. Karsenty G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol.* 2000 Oct;11(5):343-6
82. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y et al. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodelling. *PLoS One* 2007 Oct 24;2(10):e1058
83. Kleinheinz J, Wiesmann HP, Stratmann U, Joos U. Evaluating angiogenesis and osteogenesis modified by vascular endothelial growth factor (VEGF). *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002 May;6(3):175-82
84. Klinker R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagel S. *Physiologie.* Thieme – Verlag 2004
85. Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Aug;8(4):494-9
86. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:898-903
87. Lane JM. Bone graft substitutes. *West J Med* 1995 Dec;163(6):565-6

88. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulated cell-matrix interactions. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):163-73
89. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* 2. Auflage Wien Springer - Verlag 2013
90. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Biochem Soc Trans.* 1998 Feb;26(1):14-21
91. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res.* 2009 Sep;27(9): 1133-40
92. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Klinische Parodontologie und Implantologie.* Quintessenz Verlags-GmbH 1999
93. Lippert H. *Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundheilung.* 3. Auflage Thieme - Verlag 2012
94. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):881-7
95. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie.* 2. Auflage, Stuttgart New York; Thieme-Verlag 2006
96. Mangos JF. The healing of extraction wounds. An experimental study based on microscopic and radiographic investigations. *New Zealand Dent J.* 1941;37:4-24
97. Mardas N, Trullenque-Eriksson A, MacBeth N, Petrie A, Donos N. Does ridge preservation following tooth extraction improve implant treatment outcomes: a systematic review: Group4 Therapeutic concepts & methods. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Jun 16.
98. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4): 267-76
99. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3Pt1):144-54
100. Merx MA, Maltha JC, Freihofer HP. Incorporation of composite bone implants in the facial skeleton. *Clin Oral Implants Res.* 2000 Oct;11(5):422-9
101. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* 1989 Sep;3(3): 953-60

102. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993 Fall;2(3):158-67
103. Mundy GR. Bone remodeling. In: Mundy, GR (ed). *Bone remodelling and its disorders*, ed 2. London: Martin Dunitz. 1999:1-11.
104. Nahles S, Nack C, Gratecap K, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Bone physiology in human grafted and non-grafted extraction sockets – an immunohistochemical study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Jul;24(7):812-9
105. Nakata E, Nakanishi T, Kawai A, Asaumi K, Yamaai T, Asano M, Nishida T, Mitani S, Inoue H, Takigawa M. Expression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) during fracture healing. *Bone* 2002 Oct;31(4):441-7
106. Nevins M, Camelo M, De Paoli S, Friedland B, Schenk RK, Parma-Benfenati S, Simion M, Tinti C, Wagenberg B. A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006 Feb;26(1):19-29
107. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100 (11 Suppl): S25-9
108. Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA² represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jul 15;90(14):6859-63
109. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220
110. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen Mj. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May;89(5):765-71
111. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodelling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994 Jul; 55(3): 273-86
112. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar;13:1-10

113. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures : a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Nov-Dec;14(6):835-40
114. Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent*. 1967 Jan;17(1): 21-7
115. Pietrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *J Prosthodont*. 2007 Mar-Apr;16(2):141-7
116. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr;284(5411):143-7
117. Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976 May;73(5): 1447-51
118. Proff P, Römer P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec;13(4):355-62
119. Qu D, Li J, Li Y, Gao Y, Zuo Y, Hsu Y, Hu J. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Mar;96(3):543-51
120. Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, Ryschon KL. Smoking and bone metabolism in elderly women. *Bone* 2000 Sep;27(3):658
121. Rath-Deschner B, Daratsianos N, Dühr S, Girmann N, Winter J, Kroll F, Reichert C, Jäger A, Götz W. The significance of Runx2 in postnatal development of the mandibular condyle. *J Orofac Orthop*. 2010 Jan;71(1):17-31
122. Reilly TM, Seldes R, Luchetti W, Brighthon CT. Similarities in the phenotypic expression of pericytes and bone cells. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Jan;(346):95-103
123. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987 May;8(3):138-40
124. Rodan GA, Harada S. The missing bone. *Cell*. 1997 May 30;89(5):677-80

125. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 1995 Jul; 9(10): 926-33
126. Rothamel D, Schwarz F, Hertel M, Chiriac G, Pakravan N, Sager M, Becker J. Kieferkammveränderungen nach Versorgung frischer Extraktionsalveolen mit polyacidvernetzten β -TCP Wurzelreplikaten – eine histomorphometrische Tierstudie. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2007 Apr;11(2):89-97
127. Saldanha JB, Casati MZ, Neto FH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking may affect the alveolar process dimensions and radiographic bone density in maxillary extraction sites: a prospective study in humans. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Sep;64(9):1359-65
128. Sanz M, Cecchinato D, Ferrus J, Pjetursson EB, Lang NP, Lindhe J. A prospective, randomized-controlled clinical trial to evaluate bone preservation using implants with different geometry placed into extraction sockets in the maxilla. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jan;21(1):13-21
129. Saur K, Dambe LT, Schweiberer L. Experimental studies of autograft with cancellous bone in the diaphysis of long bone. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1978 Aug 30;92(2-3):211-9
130. Scheyer ET, Schupbach P, McGuire MK. A histologic and clinical evaluation of ridge preservation following grafting with demineralized bone matrix, cancellous bone chips and resorbable extracellular matrix membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2012;32(5):543-52
131. Schiebler TH, Korf HW. Anatomie 10. Auflage. Steinkopff-Verlag 2007
132. Schneider R. Prosthetic concern about atrophic alveolar ridges. *Postgrad Dent.* 1999;6(2):3-7
133. Scholz D, Schaper J. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 1997 Dec;290(3):623-31
134. Schroeder HE. Orale Strukturbiologie. 4. Auflage. Stuttgart New York, Georg-Thieme Verlag 1992
135. Schropp L, Kostopoulos L, Wenzel A. Bone healing following immediate versus delayed placement of titanium implants into extraction sockets: a prospective clinical study. *Int J Oral & Maxillofac Implants.* 2003a Mar-Apr;18(2):189-99
136. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic

- 12- month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003b Aug;23(4): 313-23
137. Sculean A, Chiantella GC, Windisch P, Arweiler NB, Brex M, Gera I. Healing of intra-bony defects following treatment with a composite-derived xenograft (Bio-Oss Collagen) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide PERIO). *J Clin Periodontol* 2005 Jul;32(7):720-4
138. Shankavaram UT, DeWitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM. Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol.* 1997 Dec;173(3):327-34
139. Simpson HE. Experimental investigation into the extraction wounds in macacus rhesus monkeys. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv.* 1960 Sep;18:391-9
140. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:99-126
141. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec;34(12):1508-12
142. Takamoto M, Takechi M, Ohta K, Ninomiya Y, Ono S, Shigeishi H, Tada M, Kamata N. Risk of bacterial contamination of bone harvesting devices used for autogenous bone graft in implant surgery. *Head Face Med.* 2013 Jan 11;9:3
143. Tal H, Oelgiesser D, Moses O. Preimplant guided bone regeneration in the anterior maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997 Oct;17(5):436-47
144. Tan WL, Wong TL, Wong MC, Lang NP. A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Feb; 23 Suppl 5: 1-21
145. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):315-24
146. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981 Oct;26 /1Pt1):99-105
147. Todo H, Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats. I. Initial cellular response to tooth extraction in rats studied with 3H-thymidine. *Arch Oral Biol.* 1968 Dec;13(12):1421-7

148. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piatelli A. Histological and elemental microanalytical study of anorganic bovine bone substitution following sinus floor augmentation in humans. *J Periodontol* 2008 Jul;79(7):1232-40
149. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modeling and remodeling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008 Jul;35(7):630-9
150. Trueta J. The role of vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br*: 1963;45B: 402–18
151. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop Relat Res*. 1968 Jul-Aug;59:59-96
152. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965 Nov 12;150(3698): 893-9
153. Valenti MT, Carbonare LD, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone*. 2008 Dec;43(6):1084-92
154. Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996 Nov-Dec;39(3):229-38
155. Vedi S, Compston J. Bone histomorphometry. *Methods Mol Med*. 2003;80:283-98
156. Watson KE, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B & Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2106-13
157. Welsch U. Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer 2006
158. Wheater RP, Burkitt GH, Daniels VG. Funktionelle Histologie – Lehrbuch und Atlas. 2. Auflage. München-Wien-Baltimore. Urban& Schwarzenberg 1987
159. Wolf JH. Julius Wolff und sein Gesetz der Transformation der Knochen. Orthopäde. Springer - Verlag 1995
160. Xing Z, Xue Y, Dånmark S, Schander K, Ostvold S, Arvidson K, Hellem S, Finne-Wistrand A, Alberbertsson AC, Mustafa K. Effect of endothelial cells on bone regeneration using poly (L-lactide-co-1,5-dioxepan-2-one) scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Feb;96(2): 349-57
161. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in

- combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. Clin Oral Implants Res. 2000 Jun;11(3):217-29
162. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop. 1992 Aug;281: 275-94
163. Zille K, Tillmann BN. Anatomie. Springer - Verlag 2010

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML 3	acute myeloid leukemia 3 protein
ANG-1	Angiopoietin-1
ALP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
BG	Bindegewebe
BGP	bone gla protein
BMP	bone morphogenetic protein
BM-40	basement-membrane protein 40
BRC	bone remodeling compartment
bzw.	beziehungsweise
Cbfa1/Runx 2	Core binding factor alpha subunit 1/ Runt-related transcription factor 2
CD31 (PECAM)	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
DFDBA	demineralized freeze dried bone allograft
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-Mund- und Kieferheilkunde
DNS	Desoxiribonukleinsäure
EDI	anti rats macrophages
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDDBA	freeze dried bone allograft
FFB	fresh frozen bone
FGF 2	fibroblast growth factor-2
Gla	γ -Carboxyglutaminsäure
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IRS	immunreaktiver Score
KM	Knochenmark
KN	Knochen
M-CSF	monocyte colony stimulating factor
min	Minute
mm	Millimeter

MMP	Matrix Metalloproteinasen
µm	Mikrometer
n	Anzahl
OC	Osteocalcin
OSN	Osteonectin
PDGF	platelet-derived growth factor
PEBP2	polyomavirus enhancer binding protein 2
PTFE	Polytetrafluorethylen
RANK	Receptor for Activation of Nuclear Faktor Kappa-B
ROI	Region of interest
SPARC	secreted protein acidic and rich in cysteine
Tab.	Tabelle
TBS	tris-buffered saline
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kerrin Gratecap, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Histomorphometrische und immunhistologische Analyse von Extraktionsalveolen nach einer vierwöchigen Heilungsperiode“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frau Kerrin Gratecap hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation1:

Nahles S, Nack C, Gratecap K, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Bone physiology in human grafted and non-grafted extraction sockets – an immunochemical study. Clin Oral Implants Res 2013 Jul;24:812-819

Eigenanteil: 30%

Erläuterung im Einzelnen: Aufbereitung der Probebiopsien, Färbung der Probebiopsien, Datenanalyse und Auswertung

Datum:

Unterschrift:

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Publikationsliste

Nahles S, Nack C, Gratecap K, Lage H, Nelson JJ, Nelson K: Bone physiology in human grafted and non-grafted extraction sockets – an immunohistochemical study. Clin Oral Implants Res. 2013 Jul;24:812-19 doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02462.x.

14. Danksagung

Mein besonderer Dank im Rahmen dieser Studie gilt Frau PD Dr. Susanne Nahles, meiner Betreuerin dieser Dissertation. Sie führte die chirurgischen Eingriffe durch und unterstützte mich hilfreich und geduldig bei der Anfertigung der gesamten Doktorarbeit. Ihre Anregungen und konstruktiven Kritiken waren mir stets eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bodo Hoffmeister (Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Navigation und Robotik, Charité) danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der Forschungseinrichtung.

Frau Ute Kruse-Boitschenko gilt mein Dank für die hilfsbereite Unterstützung bei den labortechnischen Arbeiten.

Ebenfalls Danke ich Frau Gerda Siebert für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

Mein herzlichster Dank gilt meinem geliebten Freund Stefan Winitzki und meiner Schwester Lucile. Vielen Dank für die Hilfe bei den Korrekturen und die emotionale Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Bärbel und Xavier Gratecap und meinen Großeltern Elfriede und Günter Pollnow bedanken. Sie haben mir diese Ausbildung ermöglicht, mir jederzeit Mut zugesprochen und mich unermüdlich in meiner Arbeit bestärkt.