# 5 In-vivo-Untersuchungen

# 5.1 Tierexperimentelle Methodik

Die Studie wurde insgesamt an 8 Beagle-Hunden durchgeführt. Im Rahmen einer Pilotstudie wurde zunächst anhand von 2 Hunden die chirurgische Vorgehensweise nach tierschutzrechtlichen Kriterien geprüft. Diese Tiere wurden später als zusätzliche Kontrollen in der Auswertung berücksichtigt.

Die Untersuchung wurde an 6 weiblichen Beagle-Hunden durchgeführt, im Alter von 16 bis 18 Monaten und mit einem Gewicht zwischen 11 und 14 kg. Die Tiere waren systemisch gesund und zeigten initial klinisch sowie röntgenologisch keine Zeichen destruktiver Parodontalerkrankung. Das Parodontitis-simulierende Modell bei Furkationsgrad III wurde angewandt. Die klinischen Variablen und Röntgenaufnahmen der Prämolaren wurden vor Behandlung, vor rekonstruktiver Chirurgie und am Ende der Studienintervalle erhoben. Die Studie wurde der Grundsätze der GV-SOLAS entsprechend (Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society of Laboratory Animal Science) geplant und von der Kommission zur Genehmigung von Tierversuchen des Landes Berlin genehmigt (G 0003/00).

# Chirurgische Vorgehensweise

Um eine klinische Situation zu schaffen, die bei vergleichbaren Zahngrößen weitgehend fortgeschrittener Parodontitis entspricht, wurden im Unterkiefer jeweils die zweiten, dritten und vierten Prämolaren eingeschlossen, im Oberkiefer die zweiten und dritten Prämolaren (s. Abb. 28).



Abb. 28: Zahnschema eines Beagle-Hundes. Die markierten Prämolaren wurden in der Studie untersucht.

Die Tiere wurden zuerst mit 10-15 mg/kg i.v. Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup>, 2,5 % Lösung, Byk Gulden) sediert und anschließend intubiert mit einer Mischung von 1-1,5% Isofluran, 60% N<sub>2</sub>O und 40% O<sub>2</sub>. Bei den Prämolaren wurden Furkationsdefekte Grad III nach der modifizierten Technik von Lindhe et al. geschaffen [152]. Nach Präparation eines Mukoperiostlappens wurde das knöcherne Gewebe entfernt und die Furkationsdefekte mit Fräsen und Meisseln produziert. Die Knochenresektion war im Wesentlichen begrenzt auf den Furkationsbereich, um den interdentalen Knochen intakt zu halten. Ein Schlüsselloch-artiger Defekt mit 4mm Breite und 5 mm Höhe wurde jeweils an drei Prämolaren im Unterkiefer (P2, P3, P4) sowie zwei Prämolaren im Oberkiefer (P2, P3) geschaffen. Orthodontischer Ligaturendraht wurde dann um die Zähne gelegt und mit einem Applikator in die Furkationen gebogen, damit die Plaqueretention gefördert und eine chronisch entzündliche Läsion simuliert wird. Die Lappen wurden mit Matratzennähten (Supramid 4-0, Ethicon) dicht vernäht. Postoperativ erhielten die Tiere als Schmerzmittel 0,3 g Metamizol-Natrium (Hoechst Marion Roussel) für 4-5 Tage. Nach der Operation verblieben die Tiere unter Beobachtung, so dass die Nahrungsaufnahme später am Tag des Eingriffs kontrolliert wurde. In den Tagen nach der Operation wurden Zahnreinigungen mit 0,06 % Chlorhexidin-Lösung durchgeführt. Die Nähte wurden nach 7-8 Tagen entfernt. Sechs Wochen später wurden die Ligaturendrähte entfernt und die Wurzeloberflächen instrumentiert.

Eine Woche später wurde die rekonstruktive Chirurgie nach den Prinzipien einer parodontalen Lappenoperation mit marginalen Inzisionen durchgeführt. Nach Glättung der Wurzeloberfläche und Entfernung des Granulationsgewebes wurde mit einem Rosenbohrer eine Rille an der Basis des knöchernen Defekts geschaffen, die später als Orientierung in der Auswertung diente. Die Wurzeloberfläche wurde dann für 2 min. demineralisiert mit 24% EDTA-Gel, pH 6.7 (Pref-Gel<sup>®</sup>, Biora). Danach wurde das Gel mit steriler Kochsalzlösung weggespült, und die Proteinpräparationen wurden entsprechend eines Randomisierungscodes auf die Wurzeloberflächen appliziert. Die Proteine wurden analog der Vorgehensweise beim EMD in Propylen-Glycol-Alginat (PGA, Biora) gelöst und in Konzentrationen von 10 mg/Zahn (EMD, Ax, Bx, Cx), 1 mg/Zahn (Fx) bzw. 300 µg/Zahn (rHAM<sup>+</sup>) angewendet. Die Zähne von drei Quadranten wurden mit den entsprechenden Proteinpräparationen behandelt. Im verbleibenden Quadrant wurden die Kontrollzähne identisch behandelt, jedoch keine Proteine appliziert. Insgesamt wurden somit in den Oberkieferquadranten jeweils zwei Zähne und den Unterkieferquadranten jeweils drei Zähne mit den Testproteinen versorgt. Dann wurden die Lappen reponiert und vernäht. Wenn notwendig, wurde das Periost an der Lappenbasis inzidiert, um die Lappenränder nach koronal zu mobilisieren und an der Schmelzzementgrenze zu positionieren. Vor und nach Applikation des PGA-Gels sowie nach Nahtversorgung wurde photographisch dokumentiert. Postoperativ wurde wie bei der ersten Operation versorgt. Während der folgenden Wochen wurden supragingivale Plaqueentfernungen mit mechanischen Mitteln und Chlorhexidin durchgeführt. Alle Hunde konnten nach den Operationen bereits am gleichen Tag mit der Nahrungsaufnahme beginnen und ihren Tagesrhythmus fortführen. Es zeigten sich keine postoperativen Komplikationen, so dass alle Tiere ihr Gewicht im Beobachtungszeitraum beibehielten.

Nach 2, 4 oder 8 Wochen wurden jeweils zwei Hunde durch eine Überdosis Thiopental-Natrium eingeschläfert und die Zähne mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe im Block reseziert. Ein klinisches Beispiel der Vorgehensweise ist in Abb. 29 a-h dargestellt.



Abb. 29a: Unterkiefer-Prämolaren P2, P3 und P4 vor Behandlung.



Abb. 29b: Chirurgische Intervention zur Schaffung der Furkationsdefekte und Platzierung der orthodontischen Drähte.



Abb. 29c : Nahtversorgung nach erster Operation.



Abb. 29d: Heilung nach 6 Wochen. Ausgangssituation für die zweite, rekonstruktive Chirurgie.



Abb. 29e: Applikation der SMP in PGA-Gel auf die Wurzeloberflächen.



Abb. 29f: Klinisches Bild nach 4 Wochen Heilungszeit.



Abb. 29g: Situation im Röntgenbild vor rekonstruktiver Operation.



Abb. 29h: Abschlusskontrolle 4 Wochen nach rekonstruktiver OP mit Verdichtung der knöchernen Strukturen bei P3 und P4  $(\rightarrow)$ .

# 5.2 Gewebepräparation

Für die Lichtmikroskopie wurden die Biopsate nach Entnahme zunächst gereinigt und für 1 h in 4% Paraformaldehyd vorfixiert. Dann wurden die Gewebeblöcke 3 Tage lang in 4% neutral gepufferter Formalinlösung und anschließend 2 Tage in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach Fixierung und kompletter Demineralisierung in Essigsäure-Formaldehydlösung [179] wurden die Gewebeproben in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. In mesio-distaler Richtung wurden 7 µm dicke Serienschnitte mit dem Mikrotom (Cool Cut HM 355, Microm, Walldorf) erstellt. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit einer modifizierten Azan-Färbung nach Heidenhain-Geidies.

# Azan-Färbung

Nach dem Deparaffinieren wurden die Schnitte in Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (5,2 g gelöst in 95 ml Aqua dest.) 30 min. lang gefärbt. Danach wurde sorgfältig mit Wasser gespült. Dann wurden die Schnitte in Phosphorwolframsäure (5 g in 95 ml Aqua dest.) 15 min. lang gebeizt und anschließend wieder mit Wasser gespült. Die letzte Gegenfärbung erfolgte mit Anilinblau-Orange-Eisessig für 5 min. Nach erneutem Spülen wurden die Schnitte mit Isopropylalkohol differenziert und entwässert. Nach Aufhellen in Xylol erfolgte die Einbettung in Malinol. Die Färbungsvorgänge wurden mit Hilfe eines Färbeautomats (HMS 760, Microm, Walldorf) durchgeführt.

# Reagenzien:

- 4% Paraformaldehyd: 40g PFA (Sigma) in 500 ml Aqua dest. erhitzen und tropfenweise NaOH zusetzen bis zum Neutralpunkt. 10 g CaCl<sub>2</sub> in 500 ml Aqua lösen. Beide Lösungen mischen, erkalten lassen und mit 0,5 g Aktivkohle aufschütteln. Filtrieren und bei 4°C aufbewahren.
- 4% neutral gepuffertes Formalin: 100 ml 37% Formaldehyd in 900 ml Aqua dest. mit 4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> lösen (pH =7). Bei 4°C lagern.
- Bouin'sche Lösung: 750 ml gesättigte Pikrinsäure mit 250 ml 37% Formaldehyd und 50 ml Essigsäure mischen.

- Essigsäure-Formaldehydlösung: 8,5 g NaCl in 800 ml Aqua dest. lösen und mit 100 ml 37% Formaldehyd und 100 ml Essigsäure mischen.

# Histometrische Analyse

Mindestens zehn Schnitte im Abstand von etwa 30 µm, die die zentralen Anteile der Furkationen repräsentierten, wurden für die histologischen Messungen ausgewählt. Die Schnitte waren kodiert, so dass zwei geblindete Untersucher ohne Kenntnis der Behandlungsmodalitäten die Analysen ausführen konnten. Die mikroskopische Beurteilung der Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen), das mit einer hochauflösenden Videocamera (3 CCD, Sony Electronics, Tokyo, Japan) und einem PC mit histometrischer Software (Scion Image 1.62, Scion Corp., Frederick, MD, USA) verbunden war. Dieses digitale Bildanalyse-System wurde für die Messung von Flächen und linearen Parametern verwendet. Die folgenden Variablen wurden evaluiert:

- TDA (total defect area): gesamte Defektfläche zwischen den apikalen Extensionen der gescalten Wurzeloberfläche (Rille) und dem Furkationsdach.
- MTA (mineralized tissue area): Defektfläche, die in der Heilung durch mineralisiertes Gewebe charakterisiert ist.
- STA (soft tissue area): Defektfläche, die primär weichgewebig (mit Bindegewebe und Epithel) ausheilt.
- 4) ES (empty space): Anteil der Defektfläche, die ohne Gewebe ausheilt.
- TLD (total linear defect): Gesamte lineare Extension auf der Wurzeloberfläche zwischen der apikalen Begrenzung der Wurzelglättung und dem Furkationsdach.
- 6) BONE (bone): Vertikale Höhe des neuen Knochens, d.h. die Distanz zwischen der apikalen Begrenzungslinie der Wurzelglättung und der koronalen Extension des neugebildeten Alveolarknochens.
- CEM (cementum): Lineare Extension auf der Wurzeloberfläche mit neugebildetem Zement-ähnlichem Gewebe.
- CT (connective tissue): Lineare Extension auf der Wurzeloberfläche mit Bindegewebefasern, jedoch ohne Zement-ähnliches Gewebe.

 EP (epithelium): Linear Extension des Epithels auf der Wurzeloberfläche, plus die Extension des epithelialen Gewebes in der Läsion (wahrscheinlich abgelöst von der Wurzeloberfläche während des Gewebeprozessings).





Abb. 30a: Flächenparameter

Abb. 30b: Lineare Parameter

#### Datenanalyse

Um den Einfluss der unterschiedlichen Größen der Prämolaren zu normieren, wurden alle gemessenen Werte als Prozentwerte der gesamten Fläche des Furkationsbereichs bzw. als Prozentwerte der linearen Extension des Defekts dargestellt. Aufgrund der Stichprobengrösse wurde die Datenanalyse zu den einzelnen Proteinapplikationen auf deskriptive Statistik reduziert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### 5.3 Elektronenmikroskopische Analysen

Jeweils der zweite Prämolar Unterkiefer für im wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitet. Dazu wurden die Zähne direkt nach der Entnahme mittels einer Diamantscheibe in ca. 1 mm dünne Scheiben geschnitten und gleich in 2% Glutaraldehydlösung fixiert. Die weitere Fixierung erfolgte in 1 % Tannin in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur. Nach Spülen mit NaCI-Lösung wurde in 1% Osmium-Tetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer für eine Stunde bei 4°C postfixiert. Die Gewebe wurden dann dehydriert, eingebettet in Epon und Dünnschnitte wurden mit einer Schneidemaschine Ultracut (Reichert-Jung, Bensheim) angefertigt. Nach Färbung mit Uranylacetat und Bleizitrat wurden die Schnitte mittels eines

Elektronenmikroskops (Elmiskop 101, Siemens, München) morphologisch beurteilt.

# 5.4 In-vivo-Ergebnisse

# 5.4.1 Klinische Resultate

Die Defekte heilten in allen Gruppen ohne Komplikationen, und die Tiere konnten während der gesamten Versuchszeit ihre Zähne wie gewohnt benutzen. Der durchschnittliche Attachmentlevel bei Baseline (vor rekonstruktiver Chirurgie), gemessen zur Schmelzzementgrenze im Furkationsbereich, betrug 4,99 mm  $\pm$  1,19 mm. Nach acht Wochen postoperativ wurde ein Attachmentlevel von 4,11 mm  $\pm$  0,72 mm gemessen, wobei der Gewinn an klinischem Attachment statistisch signifikant war (p<0,01; ANOVA). Die Sondierungstiefen waren statistisch signifikant reduziert nach acht Wochen Heilungszeit im Vergleich zu Baseline (p<0,001). Im Vergleich zwischen Ober- und Unterkieferdefekten zeigten sich weder beim Attachmentgewinn noch bei den Sondierungstiefenreduktionen signifikante Unterschiede. Für eine statistische Analyse der klinischen Parameter zwischen den Behandlungsgruppen war der Stichprobenumfang zu gering.

# 5.4.2 Histologische Ergebnisse

Es zeigten sich keine ungewöhnlichen zellulären Reaktionen wie hyperplastische oder neoplastische Proliferationen, Nekrosen bzw. Fremdkörperreaktionen in einer der Testgruppen, d.h. die Anwendung der Proteine rief keine lokal toxischen oder onkogenen Reaktionen in den acht Wochen Beobachtungszeit hervor.

# 2 Wochen Heilungsperiode

Insgesamt war die Heilung nach zwei Wochen durch Epithelproliferation und lockeres epitheliales bzw. bindegewebiges Attachment an der Wurzeloberfläche charakterisiert. Die Furkationsdefekte waren im mittleren Drittel weitestgehend durch Weichgewebe ausgefüllt, mit moderaten bis schweren Anzeichen von inflammatorischen Reaktionen. Das Weichgewebe im apikalen Drittel zeigte ein eher dichteres Bindegewebe als integraler Bestandteil der extrazellulären Matrix. Das Bindegewebe erschien in Relation zur Wurzeloberfläche auf zwei Arten; zum Kollagen-ähnlichen einen mit Strängen von Fasern senkrecht zur Wurzeloberfläche, zum anderen in eher paralleler Richtung zur Oberfläche (Abb. 31, 32). Im koronalen Drittel befand sich ein deutlicher Bereich, der nicht von Gewebe ausgefüllt war. Im apikalsten Teil der Furkation wurden bisweilen kleine Areale von Geflechtknochen und Zement-ähnlichem Gewebe beobachtet. Selten waren multinukleäre Zellen in Resorptionslakunen auf der Wurzeloberfläche sichtbar. Im Vergleich war das Heilungsmuster nach 2 Wochen insgesamt nicht unterschiedlich zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 33).



Abb. 31: Heilung nach 2 Wochen. Es dominieren lockere Bindegewebe, teilweise mit parallelen oder bereits adhärierenden Kollagenfasern, und Epithelzellproliferation.

x 40; Balken: 50  $\mu$ m; apikale Begrenzung der Markierungsrille:  $\rightarrow$ 



Abb. 32 : In höherer Vergrößerung werden die apikale Begrenzung der Rille ( $\rightarrow$ ) und die initiale Anheftung der Kollagenfasern koronal dieser Begrenzung deutlich.

x 100; Balken: 50 µm



a: Kontrolle.



b: Behandlung mit Emdogain<sup>®</sup>.



d: Behandlung mit Bx.



f: Behandlung mit rHAM.

Vergr. x 10 Markierungsrille: → Balken: 250 µm



c: Behandlung mit Ax.



e : Behandlung mit Cx



g: Behandlung mit Fx.

Abb. 33 a-g: Heilung im Furkationsbereich nach 2 Wochen.

#### 4 Wochen Heilungsperiode

Das Gewebe im Furkationsbereich beinhaltete große Areale von Bindegewebe und kleinere Areale von Granulationsgewebe. Der oberste Teil der Furkation war durch Epithel und das angrenzende Bindegewebe mit moderater Entzündungsreaktion charakterisiert. Anteile an gewebefreiem Raum wurden im koronalen Drittel des Furkationsbereichs noch beobachtet, jedoch in geringerem Ausmaß. Im apikalen Bereich zeigte sich das Bindegewebe dichter und umfasste eine hohe Anzahl von Zellen und Fasern (Abb. 34). In diesem Teil der Furkation fanden sich regelmäßig begrenzte Bereiche neuen Knochens und neuen Zementes. Insgesamt zeigte sich in den mit rHAM behandelten Defekten mehr Gewebeneubildung als in den Kontrolldefekten (Abb. 35). Die rHAM-Gruppe wies nach vier Wochen Heilungszeit mehr mineralisiertes Gewebe auf, d.h. eine gesteigerte Knochen- und Zementneubildung. Die Höhe neuen Zementes betrug 28,2 % gegenüber 6,2 % bei den Kontrollen. Auch die Evaluierung der Höhe des neuen Knochens ergab in der rHAM-Gruppe eine deutliche Steigerung gegenüber der Kontrolle. Wurzelresorptionen wurden nicht beobachtet.





Abb. 34: Verdichtete kollagene Strukturen bei allgemeiner Gewebereifung und verstärkte Bildung von adhärierenden, senkrecht einstrahlenden Fasern.

x 100; apikale Begrenzung der Markierungsrille:  $\rightarrow$ ; Balken: 50 µm



a: Kontrolle.



b: Behandlung mit Emdogain<sup>®</sup>.



d: Behandlung mit Bx.



f: Behandlung mit rHAM.

Vergr. x 10 Markierungsrille: → Balken: 250 µm



c: Behandlung mit Ax.



e : Behandlung mit Cx.



Abb. 35 a-g: Heilung im Furkationsbereich nach 4 Wochen.

#### 8 Wochen Heilungsperiode

Insgesamt war die Heilung nach 8 Wochen durch eine Gewebedifferenzierung und -reifung charakterisiert. Der obere Anteil der Läsion zeigte eine weniger stark ausgeprägte Epithelschicht und weniger inflammatorische Reaktionen im angrenzenden Bindegewebe. Ein großer Anteil des Furkationsbereichs war ausgefüllt mit dichtem Bindegewebe und zu einem geringeren Grad mit mineralisiertem Gewebe. Das Bindegewebe zeigte in der Regel einen dichteren zentralen Teil sowie einen weniger dichten und zellulären Anteil lateral in Richtung zur Wurzeloberfläche. Ein neues Wurzelzement wurde nicht nur innerhalb der angebrachten Rille beobachtet, sondern zum Teil auch weit koronal oberhalb der Rille. Oftmals enthielt der Zement intrinsische Kollagenfasern, die in eine Grundsubstanzmatrix eingebettet waren. Neugebildeter Knochen war ebenfalls in vielen Fällen oberhalb der Rille zu finden. Die histologischen Resultate zeigten verschiedene Ausmaße an parodontaler Regeneration, die identische Charakteristiken zu physiologischen parodontalen Strukturen in nichtoperierten Bereichen aufwiesen (Abb. 36). Im apikalen Bereich des Defekts fand sich häufig ein parodontales Ligament mit funktionell orientierten Bindegewebefasern zwischen neuem Knochen und neuem Zement. Zudem wurden in diesen Bereichen Sharpey'sche Fasern beobachtet, die in den neuen Knochen und Zement inserierten (Abb. 37). Dennoch zeigte sich häufig ein Spalt zwischen neuem und altem Zement, der vermutlich auf die Gewebepräparation zurückzuführen ist. Neuer Zement fand sich auch auf altem Zement als aufgelagerte Schicht, zum Teil apikal der Rille. In den mehr koronal gelegenen Bereichen erschienen die kollagenen Fasern, die sich vom Zement in laterale Richtung erstreckten, eingebettet in ein dichtes, nicht mineralisiertes Bindegewebe. In der Testgruppe mit rHAM waren große Teile der vorher instrumentierten Wurzeloberfläche von neugebildetem, zellulärem Zement bedeckt (Abb. 38). Die quantitative Auswertung des Knochens und des Zements den rHAM-behandelten Defekten ein höheres Ausmaß ergab in an Gewebeneubildung als in den Kontrolldefekten. Der Anteil neuen Zements bezogen auf den Gesamtdefekt betrug 45,3 % gegenüber 13,9 % bei den Kontrollen, der Anteil neuen Knochens resultierte in 45,5% gegenüber 20,8 %. Auch in der Kontrollgruppe konnte ein parodontales Ligament mit inserierenden Fasern beobachtet werden, aber zu einem geringeren Ausmaß. In dieser wie auch in der Gruppe mit Cx-Stimulierung wurde in einigen Bereichen eine bindegewebige Regeneration beobachtet, bei der sich kollagene Fasern zwischen der Dentinoberfläche und neuem Knochen erstreckten, d.h. ohne eine Neubildung von Zement (Abb. 43). Ein Zahn der Kontrollgruppe zeigte deutliche Anteile einer ankylotischen Heilung mit direktem Kontakt zwischen Knochen und Dentin.





Abb. 36: Heilung nach 8 Wochen nach Behandlung mit Fx-Protein mit Neubildung von Zement, Knochen und inserierenden Fasern. Der neue Zement, teilweise auf dem ursprünglichen Zement aufgelagert, erstreckt sich bis in Bereiche, von denen der Zement komplett entfernt worden war.

x 40; apikale Begrenzung der Markierungsrille:  $\rightarrow$ ; Balken: 50  $\mu$ m





Abb. 37: Detail der Heilung nach 8 Wochen mit parodontaler Regeneration. Der neue Zement ist teilweise mit dem darunterliegenden Dentin fest verankert, teilweise ist eine Separation zu beobachten. Die Verankerung von Sharpey'schen Fasern in den Hartgeweben ist gut erkennbar.

x 100; apikale Begrenzung der Markierungsrille:  $\rightarrow$ ; Balken: 50  $\mu$ m



a: Kontrolle.



b: Behandlung mit Emdogain<sup>®</sup>.



d : Behandlung mit Bx.



f : Behandlung mit rHAM.

Vergr. x 10 Markierungsrille: → Balken: 250 µm



c: Behandlung mit Ax.



e: Behandlung mit Cx.



g: Behandlung mit Fx.

Abb. 38 a-g: Heilung im Furkationsbereich nach 8 Wochen.

In der Abb. 39 und 40 ist die Heilung nach Behandlung mit rHAM detailliert dargestellt. Die Wundheilung umfasst hier Neubildung von Knochen, Zement und einem Faserapparat, der senkrecht zur Oberfläche orientiert ist (I). Die Form des neuen Zements entspricht der darunterliegenden Dentinoberfläche, so dass vermutlicherweise im Verlauf der Wundheilung eine direkte Auflagerung stattgefunden hat, die sich aber durch die Gewebepräparation gelöst hat. In den koronalen Anteilen zeigt sich auf der Dentinoberfläche ein verdichtetes Bindegewebe, das gerichtete Faserbündel enthält. Die Wundheilung und Mineralisierung erscheint in diesen Bereichen noch nicht abgeschlossen (II).







Abb. 39: Behandlung mit Abb. (Vergr. x 10).

40: Die höhere Vergrößerung zeiat die rHAM nach 8 Wochen Neubildung des Halteapparates oberhalb des alten Zements (I) sowie koronal die Verdichtung kollagener Fasern vor Mineralisierung (II).

x 40, Markierungsrille:  $\rightarrow$ ;Balken: 50 µm

Die Abb. 41 und 42 zeigen im Vergleich charakteristisch die Übereinstimmung des natürlichen Parodonts mit dem Parodont nach Behandlung mit rekombinantem humanen Amelogenin (rHAM). Die Insertion der Fasern in den neuen Knochen und neuen Zement ist deutlich zu erkennen.



Abb. 41: Natürliches parodontales Ligament mit inserierenden Fasern (x 250).



parodontales Abb. 42: Parodontales Ligament acht Fasern Wochen nach Behandlung mit rHAM (x 250).

Demgegenüber wurde in einigen Defekten, die ohne Amelogenin behandelt wurden, eine bindegewebige Heilung mit Faserbildung zwischen neugebildetem Knochen und der Dentinoberfläche beobachtet, d.h. histologisch konnte keine parodontale Regeneration nachgewiesen werden.





Alveolarknochen

Abb. 43: Detail der Heilung nach acht Wochen mit bindegewebiger Regeneration nach Behandlung mit Cx. Das bindegewebige Attachment adhäriert am neuen Knochen und an der Dentinoberfläche, ohne dass Zementneubildung zu beobachten ist.

x 100; Balken: 50 µm

#### 5.4.3 Histomorphometrische Ergebnisse

Bei den gemessenen Flächen dominierte primär eine weichgewebige Heilung mit Bindegewebe und Epithel, die sich im Verlauf der Heilung und Ausreifung reduzierte, jedoch stets große Anteile der Defektflächen einnahm. Deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich erst nach vier bzw. acht Wochen, als die Weichgewebeanteile in den Behandlungsgruppen mit Emdogain<sup>®</sup>, Bx, rHAM und Fx abnahmen (Abb. 44).





Die Anteile der mineralisierten Defektflächen waren nach zwei Wochen in allen Gruppen sehr gering und waren nach vier Wochen erstmals deutlich erhöht bei Behandlungen mit Emdogain<sup>®</sup>, rHAM und Fx. Insgesamt stiegen die mineralisierten Anteile im Verlauf des Beobachtungszeitraumes kontinuierlich an. Nach acht Wochen zeigten sich in den Gruppen rHAM und Fx die größten mineralisierten Areale, die gegenüber den anderen Gruppen mehr als verdoppelt waren (Abb. 45). In diesen Gruppen wurden am Studienende ähnliche Ausmaße an mineralisierter Defektheilung beobachtet. Zwischen vier und acht Wochen postoperativ traten in der Emdogain<sup>®</sup>-Gruppe keine zusätzlichen mineralisierten Defektareale auf. In den koronalen Anteilen der Furkationsbereiche bestanden zu freie Defektflächen, allen Zeitpunkten die sich ohne Weichoder Hartgewebebildungen präsentierten (Tab. 10-12 im Anhang).



Abb. 45: Defektflächen mit Ausheilung durch mineralisiertes Gewebe. (MTA: Mineralized tissue area, TDA: total defect area ; Mittelwerte ± SD).

Die linearen Messparameter zeigten für das bindegewebige Attachment auf den Wurzeloberflächen in allen Behandlungsgruppen einen stetigen prozentualen Anstieg im Verlauf der Heilung nach zwei, vier und acht Wochen. Das höchste Ausmaß an bindegewebiger Heilung fand sich am Ende des Beobachtungszeitraumes in der Fx-Gruppe (Abb. 46). Die lineare Extension des epithelialen Attachments blieb im Verlauf der Heilung weitgehend konstant und unterschied sich nicht in den Behandlungsgruppen (Tab.: 10-12 im Anhang).





Bei den linearen Parametern der mineralisierten Gewebe zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen und den Beobachtungszeitpunkten. Nach zwei Wochen wurde nur wenig Zement- und Knochenneubildung nachgewiesen, während sich nach acht Wochen vor allem in den Gruppen mit rHAM und Fx große Anteile an mineralisiertem Gewebe fanden. Die Zementbildung zeigte bereits nach vier Wochen bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>, rHAM und Fx einen deutlichen Anstieg, der sich in der rHAM- und Fx-Gruppe weiter fortsetzte. Am Ende des Beobachtungszeitraumes zeigte sich in diesen Gruppen das signifikant höchste Ausmaß an Zementneubildung (Abb. 47).



Abb. 47: Lineare Extension des neugebildeten Zements auf der Wurzeloberfläche (CEM: cementum, TLD: total linear defect; Mittelwerte ± SD).

Die Neubildung von Knochen verlief weitgehend kongruent zur Neubildung von Zement, wobei sich insgesamt über den Studienzeitraum eine Zunahme in allen Gruppen zeigte. Auch bei der Knochenmessung fanden sich nach vier Wochen deutliche Steigerungen in der Emdogain<sup>®</sup>-, rHAM- und Fx-Gruppe, die sich nach acht Wochen in einem signifikanten Ausmaß bei Stimulierung mit rHAM und Fx manifestierten (Abb. 48). Die anderen Behandlungsgruppen zeigten keine Unterschiede in der vertikalen Höhe des neuen Knochens. Die linearen Mineralisationsparameter bestätigten somit in quantitativer Hinsicht die Messungen der mineralisierten Flächen. Zusammenfassend wurde nach acht Wochen das größte Ausmaß an regenerativer Heilung, d.h. histologisch verifizierter Regeneration mit gleichzeitiger Formation von Knochen, Zement und parodontalem Ligament, in der Behandlungsgruppe mit rHAM-Protein gemessen. Geringfügig weniger Regeneration zeigte sich in der Fx-Gruppe, deren

Ergebnisse ebenso eindeutig über den anderen Behandlungsgruppen sowie der Kontrolle lagen.



Abb. 48: Vertikale Höhe des neugebildeten Knochens (Bone: Knochen, TLD: total linear defect; Mittelwerte ± SD).

#### 5.4.4 Elektronenmikroskopische Darstellungen

Die elektronenmikroskopischen Darstellungen bestätigten in wesentlichen Teilen die Befunde der lichtmikroskopischen Schnitte, wobei vor allem auf die ultrastrukturelle Darstellung der Heilungsvorgänge an der mineralisierten Wurzeloberfläche Wert gelegt wurde. Die verschiedenen Heilungsphasen konnten voneinander abgegrenzt werden, und es zeigten sich unter dem Einfluss der SMP unterschiedliche Heilungsmuster. In den frühen Heilungsphasen dominierten granulomatöse Gewebe mit ersten, meist ungerichteten oder parallelen Faserbildungen und Anteilen von nekrotischen Zellen. In der weiteren Heilung zeigte sich eine Gewebereifung mit größeren Anteilen bindegewebiger Fasern, die noch uneinheitlich orientiert waren, und einer überwiegend reparativen Heilung entsprachen. Erste Mineralisationsprozesse fanden in Assoziation zu den Fasern statt. Neben proliferativen und reparativen Vorgängen wurden, vor allem zum späteren Zeitpunkt nach acht Wochen, deutliche Anzeichen einer regenerativen Heilung beobachtet. Es zeigte sich eine stärkere Orientierung der Kollagenfasern, die sich vermehrt senkrecht zur Wurzeloberfläche darstellten, und es fanden sich häufig mineralisierte Areale an den Fasern, die in Verbindung zur alten Zementoberfläche standen. Der neugebildete Zement erwies sich vornehmlich als zellulärer Zement, teilweise mit intrinsischen wie auch extrinsischen Fasern. Dieser regenerative Heilungstyp wurde vor allem bei Verwendung des rekombinanten Amelogenins evident, zeigte sich aber in einzelnen Schnitten auch bei Biopsien, die mit anderen SMP-Fraktionen behandelt wurden.

Als positive Kontrolle zur Charakterisierung des physiologischen Parodonts wurden zunächst nichtoperierte Bereiche untersucht. Dabei dominierten parallele Faserbündel, die überwiegend senkrecht in den Wurzelzement, d.h. die mineralisierte Wurzeloberfläche, inserierten und die typische Querstreifung kollagener Fasern aufwiesen. Sie setzten sich in den mineralisierten Arealen als Sharpey'sche Fasern fort, so dass die intensive Verankerung sichtbar wurde. Zwischen den längsgeschnittenen Faserbündeln zeigten sich quergeschnittene Kollagenfasern, die die Zwischenräume weitestgehend ausfüllten. An der Oberfläche der mineralisierten Areale fand sich deutlich abgegrenzt eine

mineralisierte Schicht, die aktive Mineralisationsprozesse, meist mit den Kollagenfibrillen assoziiert, aufzeigte. Bakterien, Entzündungszellen oder degenerierte Zellen wurden nicht beobachtet.



Kollagenfasern, parallel zur Oberfläche

Abb. 49: Natürliches Parodont mit Sharpey'schen Fasern, die weit im mineralisierten Gewebe (Wurzelzement) verankert sind. Die Querstreifung dieser Kollagenfasern ist maskiert. Zwischen den senkrecht zur Wurzeloberfläche inserierenden Fasern sind parallele Kollagenfasern dargestellt. (M: Mineralisiertes Gewebe (Zement); x 4.000).



Kollagenfibrillen (Schnittrichtung quer)

Kollagenfibrillen (Schnittrichtung längs) mit Querstreifung

Fasern

fasern)

Abb. 50: Natürliches Parodont mit Sharpey'schen Fasern. Kollagenfibrillen sind in Längsund Querrichtung dargestellt; die typische Querstreifung der Kollagenfibrillen ist gut erkennbar (M: Mineralisiertes Gewebe; x 10.000).

### Heilung nach zwei Wochen

In der initialen Heilungsphase nach zwei Wochen zeigten sich unterschiedliche Heilungsmuster. Neben Wurzeloberflächen ohne Zellbesiedlung wurden bakteriell kontaminierte Bereiche beobachtet, aber auch Areale mit ersten Zelladhäsionen und granulomatösem Bindegewebe, in der Regel mit paralleler Anordnung zur Wurzeloberfläche. Hierbei dominierte ein zellreiches, proliferativ aktives Bindegewebe mit kollagenen Fasern, das strukturell noch wenig organisiert und kaum mineraliert war sowie teilweise Nekrosen aufwies. Zwei Wochen nach regenerativer Chirurgie zeigte sich charakteristisch insgesamt ein reparativproliferativer Heilungstyp.



Wurzeloberfläche

Abb. 51: Zementoberfläche, die sich zwei Wochen nach Operation ohne adhärente Zellen oder Granulationsgewebe darstellt. Der Faserapparat wurde in diesem Bereich von der Oberfläche operativ entfernt; die Reste der ursprünglich vorhandenen Verankerungsfasern sind teilweise erkennbar (Z: Wurzelzement; x 2.400).



Abb. 52: Frühe Heilung nach zwei Wochen mit Bakterienansammlung im Granulationsgewebe. Auf der Wurzeloberfläche finden Resorptionsprozesse statt und nekrotische Zellen sind erkennbar. Faserbildung im Sinne eines neuen Attachments stellt sich nicht dar (x 2.400).



Fibroblasten ähnliche Zellen

Abb. 53: Heilung in einem Kontrolldefekt zwei Wochen nach Operation. Auf der mineralisierten Öberfläche haben sich kollagene Faserbündel in verschiedenen Richtungen angeordnet, die aber nicht in die Oberfläche inserieren. Zwischen den Fasern liegen Fibroblasten-ähnliche Zellen, die sich infolge der Gewebepräparation osmiumdicht darstellen (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).

### Heilung nach vier Wochen

Die frühe Phase der regenerativen Wundheilung war gekennzeichnet durch Gewebereifung mit einer dichten extrazellulären Matrix aus Kollagenfasern. Es zeigten sich erstmals Fasern, die senkrecht zur Wurzeloberfläche orientiert waren und an denen in Assoziation zum Zement Mineralisationsvorgänge evident wurden. Bakterien oder nekrotische Gewebeanteile waren nicht mehr sichtbar. Insgesamt dominierte in den Defekten weitgehend ungeordnete Faserbildung, so dass von einer bindegewebigen Reparation gesprochen werden kann.

Mineralisationsspots



Abb. 54: Neue Mineralisation der Kollagenmatrix nach Behandlung mit Cx-Protein. Es stellen sich auf der Oberfläche Bereiche mit aktiven Umbauvorgängen dar, an denen bereits mineralisierte Areale (Mineralisationsspots) zu beobachten sind (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).



Mineralisa tionsspots

Abb. 55: Detail der Abb. 54. Die Mineralisationsvorgänge sind mit den Kollagenfasern assoziiert, d.h. es beginnt die Einbettung der Kollagenfasern in mineralisiertes Gewebe (x 10.000).



Abb. 56: Vier Wochen nach Behandlung mit Cx-Protein. Kennzeichnend ist die zelluläre Heilung auf der Wurzeloberfläche ohne orientierte Fasern. Die Zellen sind in eine bindegewebige Matrix eingebettet und zeigen ein heterogenes Bild. Das gesamte Heilungsmuster erscheint ungerichtet (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).

### Heilung nach acht Wochen

Nach acht Wochen Beobachtungszeit fanden sich vermehrt Areale mit Anzeichen regenerativer Wundheilung mit orientierten Fasern, die in die Wurzeloberfläche inserierten und in neue mineralisierte Matrix eingebettet waren. Die Fasern waren dabei überwiegend senkrecht zur Oberfläche angeordnet, in einzelnen Arealen aber auch zusätzlich parallel bzw. ungeordnet. Generell waren die Fasern aber deutlicher ausgerichtet und weniger ungeordnet als zu früheren Zeitpunkten. Mineralisierte Areale waren regelmäßig erkennbar. Insgesamt zeigte sich auch ultrastrukturell, dass eine regenerative Heilung mit Neubildung eines orientierten Faserapparates möglich ist und dieser Heilungsmodus vor allem bei Anwendung des rekombinanten Amelogenins zu beobachten war.



Abb. 57: Heilung nach Behandlung mit rHAM mit partieller Regeneration und Fasern, die in eine neu mineralisierte, zementähnliche Oberfläche inserieren. Die Sharpey'schen Fasern sind teilweise noch recht kurz und es zeigen sich neben Arealen mit regelmäßiger Faserstruktur auch ungerichtete Areale, an denen noch aktive Umbauprozesse stattfinden (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).



Abb. 58: Mineralisation an den Kollagenfasern nach acht Wochen Heilungszeit im Detail. Es sind gerichtete Faserstränge zu erkennen, die in Kontakt zur Zementoberfläche weiter mineralisieren. Dazwischen existieren Kollagenfasern, die quer geschnitten sind und parallel zur Oberfläche liegen (x 10.000).



Neue Mineralisationen

Abb. 59: Die Behandlung mit rekombinantem Amelogenin zeigt Areale mit Regeneration und neuer Mineralisation. Es erscheint ein dynamisches Bild, das durch fortgesetzte Mineralisation der Kollagenfasern und ein dichtes Bindegewebe auf der Wurzeloberfläche charakterisiert wird (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).



Mineralisationsspots

Abb. 60: Darstellung des bindegewebigen Umbaus nach Anwendung des rekombinanten Amelogenin-Proteins. Die Mineralisation findet auch ohne Kontakt zur Zementoberfläche direkt an den Kollagenfasern statt und verdeutlicht die Einbettung der gerichteten Fasern (x 2.400).



Abb. 61: Die Mineralisation am Zement und die Einbettung der Fasern im Detail. Die Ausrichtung der Kollagenfasern und die fortgesetzte Mineralisation sind gut erkennbar (x 10.000).



Fibroblastenähnliche Zellen

Kollagenfaser- bündel

Abb. 62: Wurzeloberfläche mit regenerativer Heilung acht Wochen nach rekonstruktiver Chirurgie mit Amelogenin-Proteinen (Fx). Neue Kollagenfaserbündel inserieren in die Wurzeloberfläche, sind deutlich ausgerichtet und mit mineralisierten Arealen assoziiert. Neuer Zement liegt dem alten Zement geschichtet auf. Zwischen den neuen Fasern liegen Fibroblasten-ähnliche Zellen, die kontrastreich fixiert sind (M: Mineralisierte Wurzeloberfläche; x 2.400).



Abb. 63: Acht Wochen nach Behandlung mit rekombinantem Amelogenin zeigt sich überwiegend regenerative Heilung mit funktionell orientierten Fasern, die als kurze Sharpey'sche Fasern in die mineralisierte Wurzeloberfläche inserieren. Zwischen den Faserbündeln finden sich parallele Fasern sowie Fibroblasten-ähnliche Zellen, die sich nach der Gewebepräparation elektronendicht darstellen (x 2.400).