

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

DISSERTATION

**Immunhistochemische Analyse des osteogenen Potentials
mesenchymaler Zellen von augmentierten und nicht
augmentierten Extraktionsalveolen nach
12 Wochen Einheilzeit**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Nack

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung	5
3. Literaturübersicht	6
3.1. Knochen	6
3.2. Zellen des Knochens	8
3.3. Knochenentstehung	10
3.4. Knochenheilung	10
3.5. Transkriptionsfaktoren und Knochenmarkergene der Osteoblastenlinie	11
3.5.1. CBFA1	11
3.5.2. Osteonectin	12
3.5.3. Osteocalcin	13
3.6. Aufbau des Zahnhalteapparats	13
3.7. Dimensionsveränderungen des Alveolarkamms nach Zahnextraktion	13
3.8. Die Extraktionsalveole	14
3.8.1. Heilung in tierischen Extraktionsalveolen	15
3.8.2. Heilung in humanen Extraktionsalveolen	16
3.9. Knochenersatzmaterialien	21
3.10. Wirkmechanismus	22
3.11. Bio-Oss	23
3.12. Bio-Oss Collagen	23
3.13. Ziel der vorliegenden Studie	25
4. Fragestellungen	26
5. Material und Methode	27
5.1. Probengewinnung	27
5.2. Probenaufbereitung im Labor	30
5.3. Immunhistochemische Färbung	34
5.4. Bilderstellung	37
5.5. Auswertung der aufgenommenen Präparate	40
5.6. Statistische Auswertung	43

6. Ergebnisse	44
6.1. Darstellung ausgewählter histologischer Aufnahmen	44
6.2. Probenverteilung im Zahnschema:.....	47
6.3. Anzahl und Gliederung der Proben	48
6.4. Proben ohne Bio-Oss Collagen:.....	48
6.4.1. Probenverteilung	48
6.4.2. Zelldichte	48
6.4.3. Vergleich der einzelnen Antikörperfärbungen	49
6.5. Auswertung ohne Bio-Oss Collagen	51
6.6. Proben mit Bio-Oss Collagen:.....	52
6.6.1. Probenverteilung	52
6.6.2. Zelldichte	52
6.6.3. Vergleich der einzelnen Antikörperfärbungen	52
6.7. Auswertung mit Bio-Oss Collagen.....	54
6.8. Vergleich zwischen dem coronalen und apicalen Bereich	55
6.9. Vergleich zwischen ungefüllten und gefüllten Alveolen.....	55
7. Diskussion	56
8. Zusammenfassung	63
9. Summary	65
10. Literaturverzeichnis	67
11. Abkürzungsverzeichnis	76
12. Lebenslauf	77
13. Publikationsliste	78
14. Danksagung	79
15. Selbständigkeitserklärung	80

2. Einleitung

Erkenntnisse über den Heilungsprozess humaner Extraktionsalveolen sind notwendig, um funktionelle und ästhetische Anforderungen in der dentalen Implantattherapie zu verbessern.

Nach dem Verlust eines Zahnes durch Extraktion verheilt die Alveole kaskadenartig. Zuerst bildet sich am Extraktionstag ein Blutkoagulum, welches in den folgenden Tagen zunehmend von Bindegewebszellen und Blutgefäßen infiltriert wird. Es entsteht eine provisorische Matrix, die durch mesenchymale Zellen, eingebettet in einer faserartigen Bindegewebeformation, gekennzeichnet ist.

Die Zusammensetzung und Identität der mesenchymalen Zellen innerhalb der provisorischen Matrix gilt es zu untersuchen, um Stadien der Heilungsverläufe und damit der Knochenneubildung evaluieren zu können. Der Extraktion von Zähnen folgt immer ein physiologischer Remodellierungsprozess des Alveolarkammes. Wissenschaftlichen Studien zu Folge konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der ersten Monate post extraktionem zu resorptiven Veränderungen - sowohl in vertikaler als auch horizontaler Dimension - kommt. Um diesen Veränderungen entgegenwirken zu können, wird in den letzten Jahren vermehrt der Einsatz von Knochenersatzmaterialien diskutiert. Gerade bei prothetischen Rehabilitationen mit enossalen Implantaten ist ein suffizientes stabiles Implantatbett eine Voraussetzung für einen langfristigen Erhalt der Ästhetik und Funktion.

Inwieweit xenogene Knochenersatzmaterialien das osteogene Potential der Bindegewebematrix bei der alveolären Heilung nach Zahnextraktion beeinflussen, ist bis dato noch nicht untersucht worden, aber von Interesse, um etwaige implantatprothetische Therapieansätze etablieren zu können.

In der vorliegenden in - vivo - Studie wird die postextraktionelle Wundheilung mit und ohne Anwendung von Bio-Oss Collagen nach einer Einheilzeit von 12 Wochen untersucht und verglichen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungsmethoden soll das osteogene Potential mesenchymaler Zellen in der Extraktionsalveole quantitativ erfasst und analysiert werden.

3. Literaturübersicht

3.1. Knochen

Um die Vorgänge bei der Heilung von Extraktionsalveolen zu verstehen, ist es notwendig, sich den strukturellen Knochenaufbau und seine physiologischen Mechanismen zu veranschaulichen. Die mit 80% überwiegend anorganische Knochensubstanz setzt sich zu etwa 70% aus Mineralien (Calciumphosphaten), zu 10% aus Wasser und zu weiteren 20% aus organischen Bestandteilen zusammen. Knochen ist als hochdifferenziertes Stützgewebe für die Motorik und den Schutz der Organe essentiell. Er dient als Speicher für Calcium- und Phosphationen (Raisz 1999, Grabowski 2009).

Knochen gehört zu den dynamischen Geweben. Er befindet sich je nach Knochenzellaktivität und Belastung im An-, Um- oder Abbau (Hock et al. 2001). Durch den dauernden Umbau werden täglich ungefähr 0,7% des menschlichen Skeletts resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt (Marx & Garg 1998, Garg 2006).

Makroskopisch betrachtet besteht die äußere Knochenhülle aus der Substantia compacta, einer homogen erscheinenden Rindenschicht. Darin eingeschlossen ist die Substantia spongiosa, ein Gitterwerk aus trajektorieell angeordneten Trabekeln, in deren Zwischenräumen sich der Knochenmarkraum befindet (Steele & Bramblette 1988).

Mikroskopisch gesehen werden mehrere Knochentypen unterschieden. Zum einen der Geflechtknochen, der aufgrund seiner schnellen Bildung bedeutend bei der Knochenentwicklung und Frakturheilung ist. Im Vergleich zum anderen, dem Lamellenknochen, hat er eine ungeordnete Struktur, einen niedrigen Mineralgehalt und daraus folgend eine geringe mechanische Belastbarkeit (Jerosch et al. 2002, Junqueira & Carneiro 2005). Nach seiner Bildung wird er rasch resorbiert und durch den sogenannten Lamellenknochen ersetzt (Garg 2006). Geflechtknochen findet man im adulten Skelett nur noch im Bereich des Schädels (z. B. Suturen, Pars petrosa des Os temporale) und der Sehnenansätze. Lamellenknochen ist widerstandsfähiger gegenüber mechanischer Belastung als Geflechtknochen, da ihm eine strukturierte Kollagen-Protein-Mineralstruktur, die in multiplen orientierten Schichten angeordnet ist, zugrunde liegt (Marx & Garg 1998).

Ein weiterer Knochentyp ist der Bündelknochen. Er ist Teil des Alveolarknochens und für die Verankerung der Zähne im Bereich der Alveole verantwortlich. Der Bündelknochen leitet sich phylogenetisch - wie der Zahnhalteapparat - vom mesenchymalen Zahnsäckchen ab und ist nicht - wie der restliche Alveolarknochen - periostalen, sondern ektodermalen Ursprungs (Lüllmann-Rauch 2003). In ihm inserieren die Kollagenfibrillen des Sharpey'schen Faserapparats (Kuroiwa et al. 1994).

Die **histologische Architektur** des Knochens beruht auf dem Bauprinzip des Osteons. Es handelt sich hierbei um ein System (Havers-System) von ca. 5 - 20 konzentrisch angeordneten Knochenlamellen, die um einen Havers-Kanal herumgeschichtet sind (Lüllmann-Rauch 2003). In ihm verlaufen Blutgefäße und Nervenfasern. Die Havers'schen Kanäle stehen untereinander benachbart, als auch mit der Knochenoberfläche und dem Markraum über seitliche Volkmann-Kanäle in Verbindung. Dadurch wird die Blutversorgung und Reizleitung im Knochen über Gefäß- und Nervengeflechte gewährleistet. Osteone befinden sich in der Substantia compacta des lamellären Knochens parallel zur Oberfläche und in der Spongiosa in unregelmäßiger Anordnung (Hees 2000, Lüllmann-Rauch 2003). Die konzentrisch angeordneten Knochenlamellen bestehen aus einer Schicht (Dicke 3 - 5 μm) parallel angeordneter Kollagenfibrillen, die in eine mineralische Grundmatrix eingebettet sind. Zwischen zwei Knochenlamellen wechselt die Verlaufsrichtung und es befindet sich dort eine Lage von Osteozyten. Die mineralische Grundsubstanz besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen ähnlicher Zusammensetzung. Die Kollagenfaserausrichtung wird durch das Mineralisierungsschema festgelegt und ermöglicht dadurch die funktionelle Anpassung des Knochens an seine Belastung. Innerhalb der Substantia compacta kommen die Lamellen als Spezial-, Schalt- oder Generallamellen vor. Weiterhin enthält der Knochen auch Nicht-Kollagen-Proteine wie Bone Morphogenetic Proteins (BMP's). Diese spielen als Wachstumsfaktoren bei der postnatalen Knochenentwicklung eine wichtige Rolle und wirken regulierend auf die Knochenzellen (Mundy 1995, Lind 1996, Marx & Garg 1998, Chen et al. 2004).

3.2. Zellen des Knochens

Die knochenspezifischen Zellen sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab.

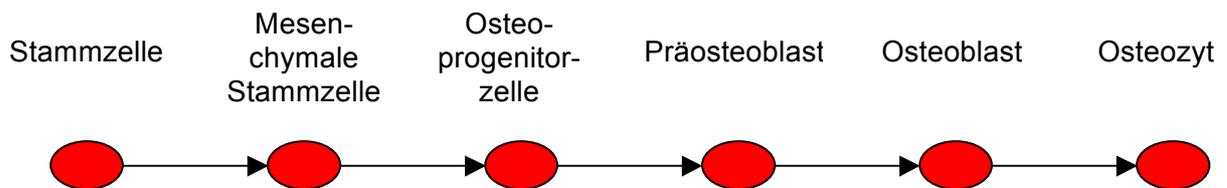


Abb. 1: Schematische Darstellung der Osteoblastenreifungslinie

Diese Knochenvorläuferzellen entwickeln sich nach Festlegung für die osteoblastäre Reifungslinie zu Osteoprogenitor-Zellen. Daraus entstehen die noch teilungsfähigen Präosteoblasten, aus denen dann die reifen Osteoblasten hervorgehen.

Stammzellen sind Körperzellen, die sich selbst replizieren und in verschiedene Zelltypen differenzieren können. Man unterscheidet embryonale von adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und haben somit das Potential sich während der Embryogenese in alle drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) zu differenzieren (Solter 2006, Lengner 2010).

Adulte Stammzellen hingegen sind multipotent und haben nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential innerhalb ihres Ursprungsgewebes. Ihre Aufgabe ist es, Gewebe zu reparieren, indem sie sich in Zellen des entsprechenden Gewebes differenzieren. Adulte Stammzellen lassen sich im Knochenmark, in den Organen, aber auch der Nabelschnur nachweisen (Bieback & Kluter 2007, Giordano et al. 2007, Aranguren et al. 2009).

Mesenchymale Stammzellen sind eine Untergruppe der adulten Stammzellen im mesenchymalen Gewebe. Sie haben das Potential sich zu replizieren und in Zellen zur Bildung von Knochen, Knorpel, Fett, Sehnen, Muskeln und Knochenmark zu differenzieren (Pittenger et al. 1999, Kemp et al. 2005).

Mesenchymale Stammzellen sind an endostalen und periostalen Knochenoberflächen sowie im adulten Knochenmark lokalisiert. Aus diesem Stammzellvorrat können zeitlebens neue Osteoblasten nachgebildet werden. Dafür verantwortlich sind lokal entstehende Wachstumsfaktoren (BMP's) sowie verschiedene Hormone.

Hormone, die positiv regulierend auf den Osteoblasten-Haushalt Einfluss nehmen, sind Sexualhormone wie Androgene und Östrogene (Spelsberg et al. 1999).

Hormone können auch negativ auf die Osteoblastenproliferation wirken. Glukokortikoide hemmen die Vermehrung von Osteoblasten und steigern ihre Apoptose, so dass die Osteoblastenzahl sinkt (Weinstein et al. 1998).

Zu den Aufgaben der Osteoblasten gehören neben der Kollagensynthese die Regulierung der Mineralisierung des Knochens und die Einstellung des Osteoklastenhaushalts.

Überall dort, wo Knochen wächst, an- oder umgebaut wird, befinden sich Osteoblasten. Sie synthetisieren und sezernieren Kollagen-Typ-1, den organischen Teil der Knochensubstanz. Des Weiteren produzieren sie Prostaglandine und Zytokine wie Interleukine, TGF- β_{1-5} , BMP₁₋₁₂ und ILGF_{1,2} als Botenstoffe. Diese stimulieren die Vermehrung, Differenzierung und Funktion der Knochenzelle (Mundy 1995, Lind 1996). In Osteonen - Schichten nicht verkalkter Matrix - werden anschließend Mineralien eingebettet. Osteoblasten lagern, an die Innerfläche des Hohlraums in den sie sezernieren, schichtweise neuen Knochen übereinander. Nach kompletter Ummauerung formen sie sich in kleinen Lakunen zu spindelförmigen Osteozyten um. Osteozyten sind für die Ernährung und Signalvermittlung des Knochens verantwortlich (Junqueira & Carneiro 2005, Garg 2006).

Osteoklasten sind große, mehrkernige Zellen. Sie gehen aus der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe der Blutzellen hervor (Vaananen & Laitala-Leinonen 2008). Sie sind aktiv am Calciumhaushalt und am Umbau des Knochens beteiligt. Histologisch findet man sie in sogenannten Howship-Lakunen entlang der mineralisierten, zu resorbierenden Knochenoberfläche.

Ein weiterer Zelltyp sind die **Bone-Lining-Zellen**. Hierbei handelt es sich um inaktive, flache Knochenbelegzellen der Osteoblastenreihe. Sie bilden die innere zellreiche Schicht des Periosts und können über Gap-junctions mit Osteoblasten, Osteozyten als auch Osteoklasten kommunizieren (Robling et al. 2006). Wissenschaftliche

Untersuchungen haben gezeigt, dass sie Einfluss auf den Knochen-Remodellierungsprozess haben (Everts et al. 2002, Eriksen et al. 2007). Ihre genaue pathophysiologische Funktion ist bis dato nicht bekannt.

3.3. Knochenentstehung

Knochen kann durch zwei verschiedene Mechanismen entstehen: die desmale Ossifikation und die enchondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation, auch direkte oder intramembranöse Ossifikation genannt, wird der Knochen direkt ohne Vorstufe von Osteoblasten, die sich aus mesenchymalen Zellen der Neuralleiste differenziert haben, gebildet (Scott 2000). Der auf diese Weise entstandene Knochen heißt Deck- oder Belegknochen und ist auf Schädelknochen, Teile der Mandibula und Clavicula begrenzt.

Der andere Teil des Knochengerüsts verknöchert aus einer knorpelförmigen Vorstufe (Marks & Hermey 1996, Lüllmann-Rauch 2003). Bei der enchondralen Ossifikation entsteht aus dem mesenchymalen Bindegewebe zunächst ein Primordialskelett aus hyalinem Knorpel. Nach der Mineralisierung der Knorpelmatrix durch Chondrozyten dringen Blutgefäße vom Periost in den kalzifizierten Knorpel mit Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten ein, und der Knorpel wird durch Knochen ersetzt. Der so entstehende Knochen heißt Ersatzknochen (Marks & Hermey 1996, Lüllmann-Rauch 2003). Der enchondrale Ossifikationsmechanismus findet bei der Frakturheilung von Röhrenknochen statt (Ignatius et al. 2011).

3.4. Knochenheilung

Die primäre Knochenheilung kann nur erfolgen, wenn bei einer Fraktur die Bruchenden eng adaptiert werden, dieses ist meist nur mittels Osteosynthese möglich.

Die natürliche - auch sekundäre - Knochenheilung genannt, verläuft über eine Heilungskaskade (Lindner 1977). Zuerst bildet sich im Bruchspalt ein Blutkoagulum, welches dann über Granulations- und Bindegewebe organisiert wird. Periostale und endostale Osteoprogenitorzellen differenzieren sich zu Osteoblasten, die eine dünne knöcherne Manschette bilden (Greenbaum & Kanat 1993). Es entsteht Knorpel, der in

einem Umwandlungsprozess dann durch Geflechtknochen (Kallus) und anschließend Lamellenknochen ersetzt wird (Lüllmann-Rauch 2003).

Einen Knochenheilungsmechanismus ohne Knorpelvorstufe stellt die Knochenregeneration eines Alveolardefektes nach Zahnverlust dar.

Aufgrund des ektomesodermalen Ursprungs des Alveolarknochens kann dessen Heilung ohne eine Beteiligung des Periosts geschehen (Schmid et al. 1994, Hammerle & Karring 1998, Pittenger et al. 1999).

3.5. Transkriptionsfaktoren und Knochenmarkergene der Osteoblastenlinie

Die Osteoblastendifferenzierung von multipotenten, mesenchymalen Stammzellen zu reifen Osteoblasten ist von einigen Transkriptionsfaktoren und Matrixproteinen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge abhängig (Francheschi et al. 2007).

Die Expressionszeiträume dieser Einflussfaktoren werden in der folgenden Abbildung veranschaulicht:

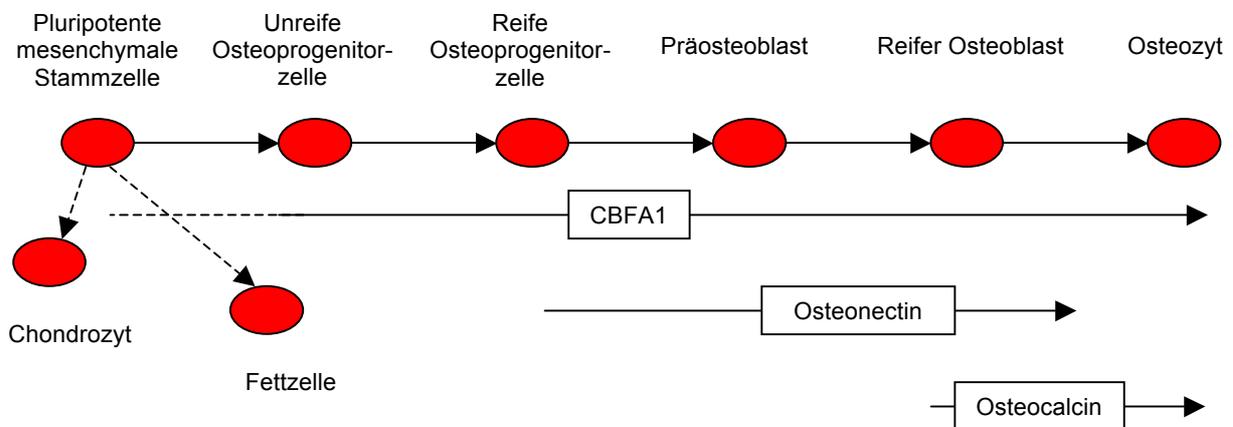


Abb. 2: Osteoblastenreifungslinie mit Transkriptionfaktoren und Knochenmarkergenen (modifiziert nach Aubin et al. 1993)

3.5.1. CBFA1

CBFA1 (Core Binding Factor Alpha subunit 1) bzw. Runx2 (Runt-related transcription factor 2) oder Pebp2alphaA (Polyoma enhancer binding protein) ist ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Osteoblastendifferenzierung und bei der

Knochenentstehung schon früh nachweisbar (Komori & Kishimoto 1998). CBFA1 wird erstmals in den Zellen der mesenchymalen Reihe exprimiert, wenn determiniert ist, dass sich aus ihnen Osteoblasten differenzieren (Ducy 2000). Die Bildung von CBFA1 wird von Wachstumsfaktoren und Hormonen (z.B. Östrogen und Parathormon), die in die Osteoblastendifferenzierung involviert sind, beeinflusst (Karsenty et al. 1999, Komori 2008).

CBFA1 reguliert die Expression von Knochenmatrixproteingenen und aktiviert Promotoren bei der Osteoblastendifferenzierung (Komori 2010). Des Weiteren spielt CBFA1 - über die Entwicklung und Differenzierung von Osteoblasten hinaus - auch eine Rolle bei der Regulierung der Knochenmatrixablagerungsrate von differenzierten Osteoblasten (Ducy 2000).

Es wird vermutet, dass CBFA1 die Expression von Osteocalcin, Osteopontin und alpha1(I) Kollagen reguliert (Karsenty et al. 1999, Ducy 2000, Karsenty 2000).

3.5.2. Osteonectin

Osteonectin (OSN) bzw. SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein) oder BM-40, ist ein matrixzelluläres Glykoprotein, das in einer Vielzahl von Körpergeweben wie Muskeln, Gehirn, Knochen und Knorpel zu finden ist (Sage et al. 1989, Lane & Sage 1994). OSN wird von verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen sekretiert (Reed & Sage 1996). Von Zellen der Osteoblastenlinie wird es während der Differenzierung von reifen Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten exprimiert (Baldini et al. 2008). Im Knochen ist Osteonectin das stärkste nichtkollagene, extrazelluläre Matrixprotein (Robey & Boskey 2006). OSN ist entscheidend für eine Knochenumwandlung und den Erhalt der Knochenmasse. Dieses Glykoprotein unterstützt das Überleben der Osteoblasten (Delany et al. 2003). OSN wird unter anderem von Osteoblasten während der Knochenbildung sezerniert und bindet mit hoher Affinität an Calcium, Hydroxylapatit und Kollagen. OSN induziert dadurch die Mineralisation des Knochens (Termine et al. 1981).

3.5.3. Osteocalcin

Osteocalcin (OC) bzw. Gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (BGP) ist ein nicht kollagenes Knochenmatrixprotein, welches vorwiegend postproliferativ in Osteoblasten, Präosteozyten und reifen Osteozyten, aber auch in Odontoblasten gebildet werden kann (Hauschka et al. 1989, Lian et al. 1998). Osteocalcin hat eine starke Affinität zu Hydroxylapatit, jedoch nicht zu amorphem Calcium und Phosphat (Price et al. 1976). Es handelt sich hierbei um einen knochenspezifischen Marker, der die Osteoblastenaktivität in Bezug auf Osteoidbildung und Knochenumwandlung widerspiegelt (Price et al. 1980, Paccione et al. 2001). Bei Osteocalcin handelt es sich um einen Marker der späten Knochenbildung (Ivanovski et al. 2000).

3.6. Aufbau des Zahnhalteapparats

Die Zähne bestehen aus Zahnschmelz, Dentin, Zement und der Zahnpulpa.

Das Parodontium - ein spezieller Halteapparat - setzt sich aus der Gingiva, dem Wurzelzement, dem Desmodont (parodontales Ligament) und dem Alveolarfortsatz zusammen. Es dient der Verankerung des Zahnes im Knochen (Hellwig et al. 2007).

Viele Faktoren führen im Laufe des Lebens zum Verlust von Zähnen. Zu den häufigsten Ursachen gehören Karies und Parodontitis sowie ihre Folgeerkrankungen. Wenn die Erhaltungswürdigkeit eines Zahnes nicht mehr gegeben ist, folgt meist unumgänglich die Extraktion, um somit die Gesundheit des umliegenden Gewebes nicht zu gefährden.

3.7. Dimensionsveränderungen des Alveolarkamms nach Zahnextraktion

Der Alveolarknochen unterliegt unmittelbar nach Zahnverlust einem stetigen Dimensionsverlust (Schropp et al. 2003). Der crestale Teil des alveolären Knochens zeigte im Tierversuch schon ab der ersten Woche nach Extraktion eine erhöhte Osteoklastenaktivität (Araujo & Lindhe 2005). Es kommt dadurch vor allem zu einem Abbau der bukkalen Knochenlamelle des crestalen Alveolarrandes, da dieser aus resorptionsanfälligerem Bündelknochen besteht, im Gegensatz zu den palatinalen oder lingualen Knochenanteilen, die auch von Kompakta bedeckt sind (Araujo et al. 2005, Araujo et al. 2008). Die vertikale Knochenresorption geht mit einem zentralen

Knochenabbau durch Osteoklasten sowohl von bukkaler als auch von lingualer Seite einher (Fickl et al. 2008). Daraus resultieren zum einen eine Reduktion der Alveolarkammbreite und zum anderen eine Senkung des crestalen Knochenniveaus mit einer Abnahme des Hartgewebeanteils im Bereich der früheren Extraktionsalveole (Schropp et al. 2003).

Mit zunehmender Zahnlosigkeit verändert sich das Profil des Kieferknochens fortwährend (Atwood 1963). Kofaktoren, die die Kieferkammatrophy beschleunigen, sind mechanischen, biologischen und anatomischen Ursprungs (Atwood 1971). Dem „Wolffsches Gesetz“ nach passen sich die äußere Form und die innere Struktur des Knochens ständig an die mechanische Beanspruchung an (Julius Wolff: Das Gesetz der Transformation der Knochen. 1892). Der Abbau des Alveolarknochens verläuft nach fortschreitendem Zahnverlust im Oberkiefer zentripetal während er sich im Unterkiefer zentrifugal reduziert (Pietrokovski et al. 2007). In einer humanen Studie von Schropp et al. (2003) wurden die Resorptionsvorgänge im Bereich der Alveole nach Extraktion quantitativ untersucht. Es zeigte sich innerhalb von zwölf Monaten eine Reduktion der Kieferkammbreite um bis zu 50 Prozent. Zwei Drittel dieser Resorption entfielen auf den bukkalen Bereich und fanden in den ersten drei Monaten nach der Extraktion statt.

3.8. Die Extraktionsalveole

Zur implantatprothetischen Rehabilitation nach Zahnextraktion existieren derzeit verschiedene Therapiekonzepte (Botticelli et al. 2004, Fugazotto 2005, Quirynen et al. 2007). 2008 klassifizierte die ITI Consensus Conference dazu vier mögliche Implantationszeitpunkte: die Sofortimplantation Typ 1 am selben Tag nach Zahnextraktion, die Frühimplantationen Typ 2 nach 4 - 6 Wochen und Typ 3 nach 12 - 16 Wochen, sowie die Spätimplantation Typ 4 nach über 6 Monaten (Chen & Buser 2008). Um einen möglichst idealen Zeitpunkt für implantatprothetische Versorgungen zu finden, sind neben Analysen über das Dimensionsverhalten des Alveolarkamms nach Zahnextraktion auch detaillierte Informationen über die Heilungsphasen und -zeiträume innerhalb der Extraktionsalveole entscheidend. Diese werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

3.8.1. Heilung in tierischen Extraktionsalveolen

Der Heilungsprozess in Extraktionsalveolen ist in verschiedenen Tiermodellen untersucht worden (Claflin 1936 an Hunden, Simpson 1960 an Rhesusaffen, Kuboki et al. 1988 an Kaninchen, Lin et al. 1994 an Ratten). Die meisten Studien beschreiben den phasenartigen Heilungsverlauf in der Alveole ohne nähere Qualifizierung und Quantifizierung der Zellen. Aus diesen Studien ist bekannt, dass sich nach der Zahntfernung als erstes ein Blutkoagulum bildet, welches von Fibroblasten infiltriert wird. Es entsteht eine Bindegewebematrix, die eine Knochengewebsformation erlaubt.

Je nach Versuchstier unterschied sich jedoch - aufgrund unterschiedlicher physiologischer Knochenumbauraten - die Geschwindigkeit innerhalb der Heilungskaskade. Der Knochenaufbau und Knochenmetabolismus unterscheiden sich nicht nur zwischen den einzelnen Tierarten, sondern auch zum Menschen. Tiere weisen im Vergleich zum Menschen eine höhere physiologische Knochenstoffwechselrate auf (Pearce et al. 2007). In Hinblick darauf ist die Wahl des Versuchstieres bei Studien, die die Knochenheilung untersuchen, entscheidend. In Bezug auf die Knochenzusammensetzung ähnelt Hunde- bzw. Schweineknochen am meisten dem humanen Knochen (Pearce et al. 2007). Huftiere wie Schafe und Ziegen zeigen nur makrostrukturelle Ähnlichkeit zum menschlichen Knochen.

Cardaropoli und Mitarbeiter nutzten zur Untersuchung von heilenden Extraktionsalveolen den Hund als Versuchstier (Cardaropoli et al. 2003, 2005, 2012). Der Knochen des Hundes ähnelt sowohl makro- und mikrostrukturell als auch in der Knochenzusammensetzung dem menschlichen Knochen. Er hat eine 1,5-fach schnellere Knochenstoffwechselrate im Vergleich zum humanem Knochen (Pearce et al. 2007).

Cardaropoli et al. (2003) untersuchten in einer experimentellen Studie an neun Mischlingshunden den alveolären Heilungsprozess über eine Zeitspanne von einem halben Jahr. Dazu wurden die Unterkieferprämolaren entfernt. Nach 1, 3, 7, 14, 30, 60, 90, 120 und 180 Tagen wurden Biopsien aus den Alveolen gewonnen und histologisch aufbereitet. Zur Bestimmung des Gewebevolumens in den marginalen, zentralen und apicalen Abschnitten der Extraktionsalveole wurden zu den genannten Zeitpunkten histomorphometrische Messungen durchgeführt. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Heilung eine Reihe von Ereignissen einschließt. Es bildet sich in den ersten Tagen ein Koagulum, welches durch eine bindegewebige Matrix innerhalb von sieben Tagen

ersetzt wird. Dieses regenerierende Gewebe ist durch mesenchymale Zellen - eingebettet in einer faserartigen Matrix - gekennzeichnet. Von Cardaropoli und Mitarbeitern (2003) wurden diese mesenchymalen Zellen in faserartigem Bindegewebe erstmals als „provisorische Matrix“ beschrieben. Die provisorische Matrix setzt sich seiner Beschreibung nach neben Mesenchymzellen aus neugebildeten Blutgefäßen, verschiedenen Typen von Leukozyten und Kollagenfasern zusammen. Ein Nachweis über die Quantifizierung und Qualifizierung der mesenchymalen Zellen fehlt in dieser Untersuchung.

In weiteren tierexperimentellen Studien an Hunden untersuchten Araujo und Mitarbeiter - als eine der Ersten - sowohl die Heilungsvorgänge in Alveolen mit und ohne Verwendung von Knochenersatzmaterialien, als auch die Alveolarkammformung nach Zahnextraktion (Araujo et al. 2008, 2009, 2010). Eine Studie über die Dynamik der Genexpression (verwendete Antikörper: u.a. Runx2, Osteocalcin) während der Alveolarknochenheilung von Ratten führten Lin et al. 2010 über einen 14-tägigen Zeitraum durch. Sie verglichen dabei die alveoläre Knochenheilung nach Zahnextraktion im Vergleich zur knöchernen Heilung während der Osseointegration von Implantaten (Lin et al. 2010).

3.8.2. Heilung in humanen Extraktionsalveolen

Die Weich- und Hartgewebsbildung nach Zahnextraktion wurde in verschiedenen humanen Studien untersucht. So analysierte Mangos (1941) histologisch die Heilungsverläufe in Biopsien aus Leichen von erkrankten Patienten. Diese hatten Vorerkrankungen, wie Purpura, Lungentuberkulose, Rheumatisches Fieber und Prostatahyperplasie. Bei der Untersuchung zeigte sich ein phasenartiger Wundheilungsverlauf. So bildete sich in den ersten drei Tagen ein Blutkoagulum, das sich innerhalb von sieben Tagen organisierte. Es folgte die epitheliale Deckung der Wunde, die nach 21 Tagen vollständig über Granulationsgewebe stattfand. Zu diesem Zeitpunkt befand sich im zentralen Bereich der Alveolen noch ein Blutkoagulum. 40 Tage nach Zahnextraktion konnte faserartiges Bindegewebe im oberen Bereich nachgewiesen werden und nach 72 Tagen zeigte sich eine intakte epitheliale Deckschicht ohne Granulationsgewebe (Mangos 1941).

In einer weiteren Studie erforschten Amler et al. (1960) das Heilungsgeschehen an gesunden Patienten über eine Zeitspanne von 50 Tagen. Im Intervall von 2 bis 3 Tagen wurden ungefähr 75 Biopsien mittels Skalpell und Kürette genommen und mit verschiedenen histologischen Färbungen (Hotchkiss-McMannus Färbung, Alkalische Phosphatase, Gomori-Färbung und von Kossa-Färbung, usw.) aufbereitet und ausgewertet. Der phasenartige Heilungsverlauf konnte beim Menschen nachgewiesen werden (Amler et al. 1960). Zur Erforschung der zeitlichen Abfolge im Heilungsverlauf untersuchte Amler (1969) erneut an einer Patientengruppe die Gewebsneubildung in frischen Extraktionsalveolen. In der Studie wurden ebenfalls nach verschiedenen Zeitintervallen zwischen 48 Stunden und 50 Tagen ungefähr 185 Weichgewebsbiopsien von Extraktionsstellen entnommen. Amler stellte fest, dass zunächst ein Blutgerinnsel die Extraktionsalveole nach Zahnextraktion initial ausfüllt. Dieses Gerinnsel wird nachfolgend durch Granulationsgewebe ersetzt und nach einer Woche Gewebsbildung beginnt die Osteoidbildung (Amler 1969). Amler verwendet zum Nachweis der osteogenen Aktivität die Alkalische Phosphatase. Die Alkalische Phosphatase ist eines der frühesten Marker-Proteine, welches in der Plasmamembran von osteogenen Zellen zu finden ist (Lynch et al. 1995, Aubin & Turksen 1996). Sie leitet den Verkalkungsprozess des Osteoids ein (Cowles et al. 1998) und ihre Aktivität spiegelt die unterschiedlichen Differenzierungsstufen von Osteoblasten wider (Wlodarski 1990). Amler führte jedoch keine Färbungen zur Bestimmung und Quantifizierung der osteogenen Zellen durch.

Eine Zusammenfassung der zeitlichen Abfolge in heilenden Extraktionsalveolen basierend auf Amlers Studie veranschaulicht folgende Abbildung (Amler 1969).

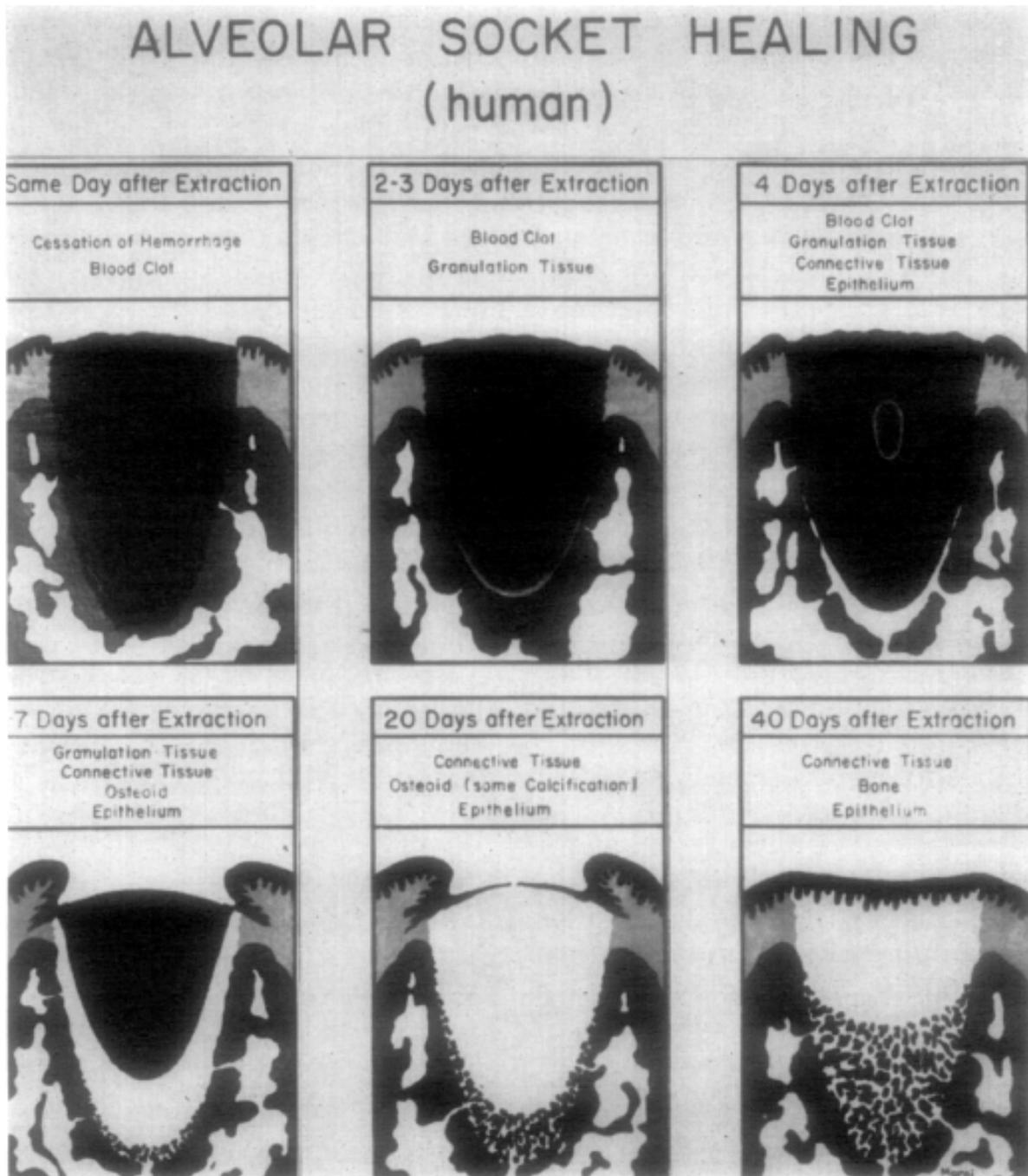


Abb. 3: Die zeitliche Abfolge der Geweberegeneration in menschlichen Extraktionswunden (Amler 1969)

In einer Studie untersuchte Boyne (1966) den Heilungsverlauf an Extraktionsalveolen bei 12 Patienten. Boyne fand erste Beweise für eine Knochenneufornation 10 Tage nach Zahnextraktion. Detaillierte Beschreibungen der Bindegewebematrix und zelluläre Ereignisse wurden jedoch nicht dokumentiert (Boyne 1966).

Evian und Mitarbeiter (1982) stellten in ihrer histologischen Studie an 10 Patienten fest, dass sich in den ersten vier Wochen nach Zahnentfernung eine faserige Bindegewebematrix in der Extraktionsalveole organisiert. Histologisch beobachtete er neugebildete Knocheninseln umsäumt von Osteoid und Osteoblasten. Zwischen der 4. und 6. Woche nach Extraktion beschreibt er eine allgemeine Zunahme des Knochenvolumens, allerdings ohne eine metrische Auswertung. Er vermutete eine größer werdende Osteoblastenzahl, die sich nach 8 Wochen beginnt zu reduzieren. 10 Wochen nach Zahnextraktion zeigte sich trabekulär geformter Knochen. Um den neugebildeten Knochen ist ein Osteoidsaum mit Osteoblasten erkennbar. Das Knochenvolumen im Verhältnis zum Bindegewebe vergrößerte sich zunehmend. Ab der 12. bis zur 16. Woche folgte dann ein Knochenreifungsprozess (Evian et al. 1982). Einen vergleichenden Überblick über diese vier Studien stellten Chen et al. (2004) in einem Review dar (Chen et al. 2004):

Studie	Zeit- raum Tage	Patienten- anzahl	Bereich	Erstes Osteoid- auftreten	Initiale Kalzifikation	Knochen- füllung der Alveole
Amler et al. 1960	50	Nicht angegeben	Unter- schiedlich	7 Tage	18 Tag	38 Tage (2/3 gefüllt)
Boyne 1966	19	12	OK-Zähne	10 Tage	-	-
Amler 1969	50	Nicht angegeben	Unter- schiedlich	7 Tage	20 Tage	40 Tage (2/3 gefüllt)
Evian et al. 1982	112	10	Unter- schiedlich	-	28 - 42 Tage	70 Tage (komplett gefüllt)

Tabelle 1: Studien an menschlichen Extraktionsalveolen im Überblick

In vorangegangenen humanen Studien lag das Augenmerk hauptsächlich auf der Beschreibung der einzelnen Heilungsstadien innerhalb der Alveole zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Zeitpunkt große

Anteile von provisorischer Bindegewebematrix mit mesenchymalen Zellen innerhalb der Extraktionsalveole zu finden sind (Boyne 1966, Evian et al. 1982).

Allerdings existieren derzeit nur einige wenige Studien in der Literatur, die sich mit der Qualifizierung und Quantifizierung dieser Zellen mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren befassen (Devlin & Sloan 2002, Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2012).

In der Untersuchung von Devlin und Sloan wurden die monoklonalen Antikörper CBFA1 und SB-10 und SB-20 zur immunhistologischen Analyse bei drei Alveolen von Tumorpatienten verwandt. Es zeigte sich bereits nach 2 Wochen eine starke Exprimierung von CBFA1 vor allem im Randbereich der Alveole. Die Aussagekraft dieser Untersuchung ist allerdings, aufgrund der geringen Probenanzahl und der möglichen Einflussfaktoren durch die Vorerkrankung, als nur bedingt einzustufen.

Eine weitere Studie am Menschen zur Untersuchung des alveolären Heilungsprozesses über ein halbes Jahr und eine Analyse verschiedener Zellpopulationen führten Trombelli et al. (2008) durch. Es wurden 27 Proben von gesunden Patienten genommen. 10 Proben repräsentierten die frühe (2 - 4 Wochen), 6 Biopsien die mittlere (6 - 8 Wochen) und 11 Biopsien die späte Phase der Heilung nach Zahnextraktion. Nach einer bestimmten Heilzeit (Einteilung: siehe oben) erfolgte dann die Probenentnahme mittels Trepanbohrer. Die entnommenen Biopsien wurden histologisch aufbereitet und danach histomorphometrisch und immunhistologisch ausgewertet. Bei der immunhistologischen Untersuchung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Heilungsphase anhand von Protein BMP-7 und Osteocalcin das Vorhandensein osteogener Aktivität in den Proben evaluiert. BMP-7 - aus der TGF- β Superfamilie - ist auch unter OP-1 bekannt und dient zum Nachweis von osteogenen Zellen (Itho et al. 2001, Chen et al. 2004). Es induziert die Differenzierung innerhalb der osteogenen Zelllinie und wird schon in osteoblastären Vorstufen exprimiert (Yamaguchi et al. 2000, Spector et al. 2001). Trombelli beobachtete - bei beiden Transkriptionsfaktoren - eine Zunahme der markierten Zellen bis zur 8. Woche nach Zahnextraktion und eine Abnahme anschließend bis zur 24. Woche. Diesen Verlauf deutete die Arbeitsgruppe als eine erhöhte Osteoblastenaktivität in der mittleren Heilungsphase. Ein nicht außer Acht zu lassender Punkt ist, dass in dieser Studie nur der Bereich in der Nähe des neugebildeten Knochens untersucht wurde. Eine Analyse der osteogenen Zellen in der übrigen provisorischen Matrix wurde nicht durchgeführt, ist aber von entscheidender Bedeutung, um Kenntnis des osteogenen Potentials der gesamten Alveolen zu gewinnen (Abbildung 4) (Trombelli et al. 2008).

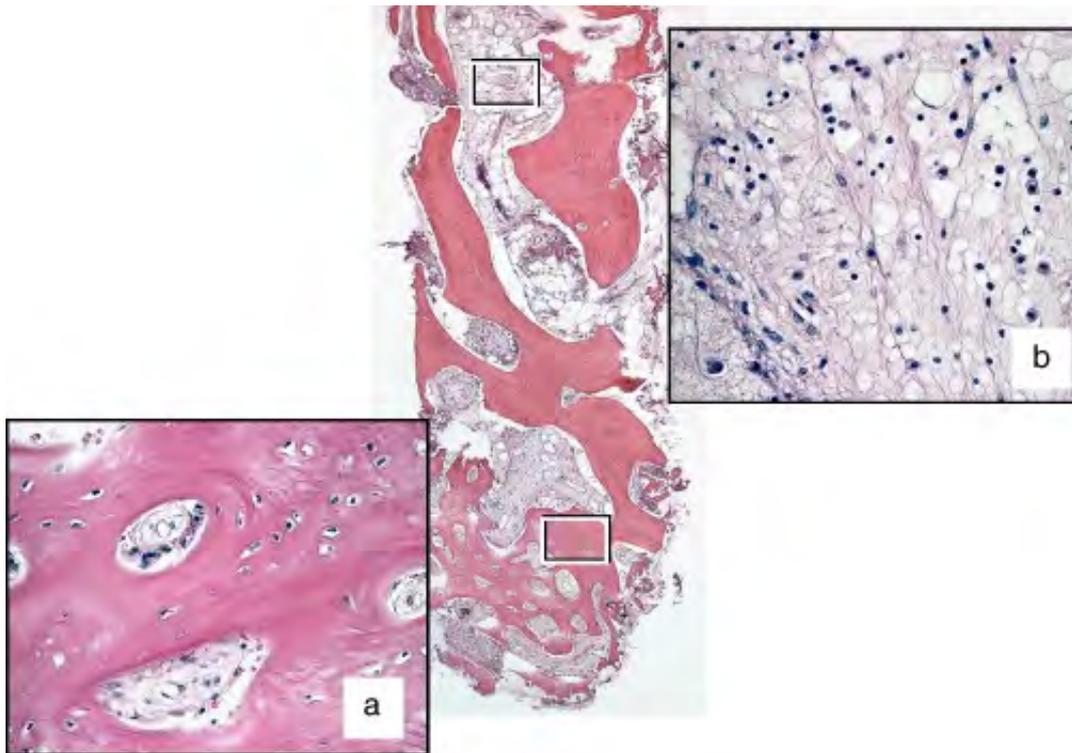


Abb. 4: Biopsie einer 12 Wochen alten Extraktionsalveole: Geflecht- und Lamellenknochen eingebettet in nicht mineralisierter Matrix (Trombelli et al. 2008) x2.5 (Ausschnitte a und b: x40)

3.9. Knochenersatzmaterialien

Für einen langfristigen, ästhetischen und funktionellen Erhalt von dentalen Implantaten ist ein suffizientes und stabiles Implantatbett Voraussetzung (Botticelli et al. 2004, Fugazotto 2005, Quirynen et al. 2007). Nach Zahnextraktion kommt es im Zuge des Knochenremodelling unweigerlich zu einer vertikalen als auch horizontalen Dimensionsreduktion. Um dieser physiologischen Alveolarkammatrophy entgegen zu wirken, wird in den letzten Jahren vermehrt der Einsatz von Knochenersatzmaterialien in Studien untersucht und diskutiert. Es gibt heutzutage mehrere Knochenersatzmaterialien auf dem Markt, die sich in ihrer Herkunft und in ihren Eigenschaften unterscheiden. Bei der Herkunft werden fünf Gruppen unterschieden (siehe Tabelle 2).

Klasse	Herkunft	Vertreter
Autogen	Vom Individuum selbst	z.B. Beckenkamm
Isogen	Vom genetischen Zwilling	-
Allogen	Vom Individuum der selben Spezies	z.B. „Antigene extracted, Autolysed, Allogenic Bone“
Xenogen	Vom Individuum einer anderen Spezies	z.B. Bio-Oss
Alloplastisch	Synthetisch hergestellt	z.B. b-Trikalziumphosphat

Tabelle 2: Einteilung der Knochenersatzmaterialien

3.10. Wirkmechanismus

Drei Eigenschaften bestimmen die Wirkungsweise von Knochenaufbaumaterialien: die Osteogenese, die Osteoinduktion und Osteokonduktion.

Die **Osteogenese** ist die Bildung und Entwicklung von Knochen.

Albrektsson und Johansson definierten 2001 die **Osteoinduktion** als „einen Prozess, bei dem Osteogenese induziert wird“. Osteoinduktion impliziert die Rekrutierung von unreifen Zellen und die Stimulation dieser Zellen sich in Präosteoblasten zu differenzieren (Albrektsson & Johansson 2001).

Die **Osteokonduktion** hingegen bietet ein passendes Leitgerüst zum Anbau von neuem Knochen. Osteokonduktive Substanzen leiten das Knochenwachstum ausgehend vom bestehenden Gewebe und ermöglichen eine Knochenapposition und das Einwachsen von Gefäßen (Garg 2006). Rein osteokonduktive Knochenersatzmaterialien induzieren dabei keine Knochenneubildung. Ein osteokonduktives Material benötigt die Anwesenheit von bereits bestehendem Knochen, um Knochenwachstum entlang seiner Oberfläche zu fördern. Alle Knochenaufbaumaterialien sollten wenigstens eine der vorgenannten drei Eigenschaften besitzen (Garg 2006). Nur autogene Transplantate verfügen über alle drei Wirkungsweisen.

3.11. Bio-Oss

Das bovine Knochenersatzmaterial Bio-Oss[®] (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) besteht aus einer deproteinisierten, hitzesterilisierten, anorganischen Knochenmatrix. Seine osteokonduktive Wirkung soll laut Herstellerangaben auf einer weitmaschigen, interkonnektierenden Porenstruktur bei einer durchschnittlichen Porengröße von 3 nm bis 1,5 mm beruhen. Zwei Bio-Oss Produkte die sich in ihrer Materialeigenschaft und Anwendbarkeit unterscheiden, sind im Handel unter der Bezeichnung Bio-Oss Spongiosa Granulat und Bio-Oss Spongiosa Block erhältlich.

Eines der ersten Einsatzgebiete von Bio-Oss war die Sinusbodenelevation. Bei dieser wird aufgrund mangelnder Knochenhöhe im Seitenzahnbereich des Oberkiefers Knochenersatzmaterial in die Kieferhöhle eingebracht, um ausreichend Knochenhöhe zum Implantieren zu schaffen. Die Wirksamkeit von Bio-Oss auf diesem Gebiet wurde in einer Vielzahl von Tierexperimenten und klinischen Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen erforscht (Hurzeler et al. 1997, Piattelli et al. 1999, Terheyden et al. 1999, Artzi et al. 2002). Andere untersuchte Einsatzbereiche für Bio-Oss sind die Ridge-Preservation (Berghlundh & Lindhe 1997, Artzi et al. 2000, Norton et al. 2003, Gholami et al. 2012) und Socket-Preservation (Carmagnola et al. 2003, Lee et al. 2009) bei denen der Alveolarknochendefekte mit Bio-Oss aufgefüllt werden. Das xenogene Knochenersatzmaterial ist auch noch nach 9 Monaten Einheilzeit in der Extraktionalveole ohne Resorption zu finden (Artzi et al. 2000).

3.12. Bio-Oss Collagen

Das in der Studie der vorliegenden Arbeit verwendete Knochenersatzmaterial Bio-Oss Collagen[®] (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) ist eine Kombination aus bovinem Bio-Oss und 10% porcinem Kollagen. Der Kollagenanteil ist resorbierbar. Dem granulatartigen Bio-Oss wird im Herstellungsverfahren sekundär Kollagen zugefügt. Das Kollagen soll den Zellen laut Herstellerinformation eine bessere Zelladhäsion ermöglichen und eine bessere Formbarkeit gewährleisten. Durch den Kollagenzusatz lässt sich Bio-Oss Collagen leicht in die gewünschte Form schneiden und mit einer Pinzette applizieren.

Der Abbau des 10%-igen Kollagenanteils soll nach Herstellerangaben über das Enzym Kollagenase nach 4 bis 6 Wochen erfolgen.

In tierexperimentellen Studien wurde das Geweberemodelling in frischen Extraktionsalveolen unter Verwendung von Bio-Oss Collagen untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Anwesenheit von Bio-Oss Collagen den Remodellingsprozess an den Alveolarwänden nicht verhindern kann, aber die Hartgewebsbildung fördern und die Profildimension des Alveolarkamms verbessern kann (Araujo et al. 2008, 2009). Aussagen über die Wirkungsweise hinsichtlich der Dimensionsstabilität nach Augmentation mit Bio-Oss Collagen in humanen Alveolen können derzeit nicht gemacht werden, dazu fehlen wissenschaftlich fundierte Untersuchungen.

Bis dato existieren nur wenige humane Studien, die sich mit dem Einfluss von Bio-Oss Collagen auf die osteogene Aktivität befassen.

In zwei humanen Studien wurde die Heilung in humanen Extraktionsalveolen unter der Verwendung von Bio-Oss Collagen nach 6 und 12 Wochen histomorphometrisch analysiert (Heberer et al. 2008, 2011). 6 Wochen nach Zahnextraktion wiesen die augmentierten Proben eine große prozentuale Variation im Anteil des neugebildeten Knochens auf, vor allem bestand ein signifikanter Unterschied zwischen dem coronalen und apicalen Bereich der Biopsien (Heberer et al. 2008).

Nach 12 Wochen Heilzeit wurden Schnitte von augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen verglichen. Alle Proben waren frei von Entzündungszellen. Es zeigte sich ein großer Bindegewebeanteil von durchschnittlich 44% in den ungefüllten und von 60% in den mit Bio-Oss Collagen gefüllten Alveolen. Die mittlere Knochenneuformationsrate in den augmentierten Alveolen war vergleichsweise geringer als in den nicht augmentierten Alveolen. Innerhalb der Alveole wurde im apikalen Bereich eine höhere Knochenneuformationsrate dokumentiert. (Heberer et al. 2011).

Die einzig derzeit existierende Studie mit immunhistochemischen Analysen wurde an 6 Wochen alten humanen Extraktionsalveolen durchgeführt (Heberer et al. 2012). Mittels mit drei monoklonalen Antikörpern: CBFA1, OSN und OC wurde das osteogene Potential der Zellen bestimmt. In keiner der Proben konnte ein Hinweis auf Entzündungszeichen gefunden werden. Nach 6 Wochen Einheilzeit konnte innerhalb der provisorischen Matrix eine große Menge an osteogenen Zellen nachgewiesen werden, die sich in einem Reifungsprozess von reifen Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten befanden. Es gab keinen signifikanten Unterschied im Anteil der positiven Zellen zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen. Die Analyse zu

einem Zeitpunkt ist dennoch nicht ausreichend, um allgemeine Aussagen über das osteogene Potential der mesenchymalen Zellen mit und ohne augmentative Verfahren während des Heilungsverlaufes in der Alveole zu treffen oder Therapieansätze zu formulieren.

3.13. Ziel der vorliegenden Studie

Zielstellung der vorliegenden klinischen Studie war die immunhistologische Beurteilung des osteogenen Potentials mesenchymaler Zellen eingebettet in die provisorische Matrix von gefüllten und ungefüllten Extraktionsalveolen nach einer Einheitszeit von 12 Wochen.

4. Fragestellungen

Bei der alveolären Heilung 12 Wochen nach Zahnextraktion mit und ohne Verwendung von Bio-Oss Collagen interessieren besonders folgende Fragen:

1. Besitzen die mesenchymalen Zellen der provisorischen Matrix der Extraktionsalveole ein osteogenes Potential?
2. Welches osteogene Entwicklungsstadium der Zellen ist anhand der Antikörperfärbungen in der provisorischen Matrix nachweisbar?
3. Gibt es Unterschiede in der Anzahl und Zusammensetzung osteogener Zellen zwischen dem coronalen und apicalen Bereich der Extraktionsalveole nach 12 Wochen?
4. Inwiefern beeinflusst Bio-Oss Collagen die Extraktionsalveole speziell im Hinblick auf die Anzahl und Zusammensetzung osteogener Zellen?
5. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl und den immunhistologisch positiv angefärbten Zellen?

5. Material und Methode

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charite Universitätsmedizin Berlin, Deutschland freigegeben.

Ethikvotum: EA2/142/06

5.1. Probengewinnung

Patienten und chirurgisches Prozedere

An der prospektiven, (randomisierten) Studie nahmen 23 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren (33 - 73 Jahre) teil. Davon waren 9 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 50 Jahren (37 - 66 Jahre) und 14 Männer im Durchschnittsalter von 57 Jahren (33 - 73 Jahre) beteiligt.

Alle Teilnehmer waren gesund und wiesen keine systemischen Vorerkrankungen auf. Des Weiteren waren alle Patienten Nichtraucher und standen unter keiner Dauermedikation. Nach erfolgter Extraktion der nicht erhaltungswürdigen Zähne war bei allen Patienten die Implantation geplant. Gründe für die Extraktion der Zähne waren zum einen endodontische Probleme und zum anderen massive Substanzverluste meist verursacht durch ausgedehnte kariöse Läsionen. Ausschlusskriterien der Studie waren stark parodontal geschädigte Zähne, Zähne mit periapikalen Läsionen, sowie der Zustand nach dentogenem Abszess.

Die Entfernung der Zähne erfolgte in allen Fällen unter Lokalanästhesie (Ultracain DS forte 1:100000, Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main, Deutschland). Der Eingriff wurde mittels initialen Einsatzes eines Periotoms zur Schonung der umgebenden Strukturen durchgeführt, gefolgt von einer Zangenextraktion. Alle Zähne wurden ohne zusätzliche Präparation eines Mukoperiost-Lappens entfernt.

Einschlusskriterien für die Studie waren nur intakte Extraktionsalveolen mit vier erhaltenen Knochenwänden. Nach der Extraktion erfolgte die Entfernung von desmodontalem Gewebe durch eine gründliche Kürettage des Alveolarfaches, die gleichzeitig das Vollbluten vom knöchernen Grund der Alveole her förderte. Danach wurde mit Hilfe einer Randomisierungsliste in 22 von 40 Extraktionsalveolen Bio-Oss

Collagen appliziert. Dafür wurde das Material zuerst mit einer chirurgischen Schere (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) für die Alveole passend zurecht geschnitten und dann knapp bis über die Grenze des crestalen Alveolarrands hinausreichend drucklos eingebracht, so dass eine Durchtränkung mit Blut gewährleistet werden konnte. In 18 von 40 Extraktionsalveolen wurde kein xenogenes Material eingebracht. Sie wurden der Selbstheilung überlassen. Nach der Zahnextraktion erfolgte keine antibiotische Therapie.

Die Patienten wurden bei beiden Gruppen 1, 7, 30 und 60 Tage post extractionem anhand eines Routineprotokolls nachkontrolliert, um mögliche Komplikationen wie Entzündungen, Schleimhautrötungen, Wunddehiszenzen oder Bio-Oss Collagen Verlust zu dokumentieren.

Nach 12 Wochen erfolgte dann im Rahmen der Implantation eine Probenbiopsieentnahme aus der Extraktionsalveole. Mit Hilfe einer vor der Zahnextraktion angefertigten Schiene konnte das Zentrum der Alveole lokalisiert werden. Nach der Bildung eines Mukoperiost-Lappens wurde bei der Pilotbohrung unter Verwendung eines Trepanbohrers (Durchmesser 2 mm) (Staubmann AG, Basel, Schweiz) eine Kernbiopsie mit einer Minimaltiefe von 7 mm im Zentrum des Extraktionsbereiches genommen. Die weitere Aufbereitung des Implantatbettes erfolgte durch handelsübliche Bohrer anhand des Anwenderprotokolls der verwendeten Implantatsysteme (Camlog Biotechnologie, Wimsheim, Deutschland; Straumann AG, Basel, Schweiz) Zur eigentlichen Implantation kamen Camlog RootLine Implantate (Camlog Biotechnologie, Wimsheim, Deutschland) oder Straumann ITI Implantate (Staubmann AG, Basel, Schweiz) zum Einsatz. Anschließend erfolgte der Wundverschluss durch Einzelknopfnähte (5-0 Monocryl, Ethicon, Hamburg, Deutschland).



Abb. 5: Bio-Oss Collagen zugeschnitten



Abb. 6: Kernbiopsie



Abb. 7: Bei einer 60 Jährigen Patientin wurde aufgrund karöser Läsion im Kronenrandbereich die Indikation der Nichterhaltungswürdigkeit der Zähne 34, 33, 43, und 44 gestellt. Vor der Extraktion wurden die Brücken getrennt.

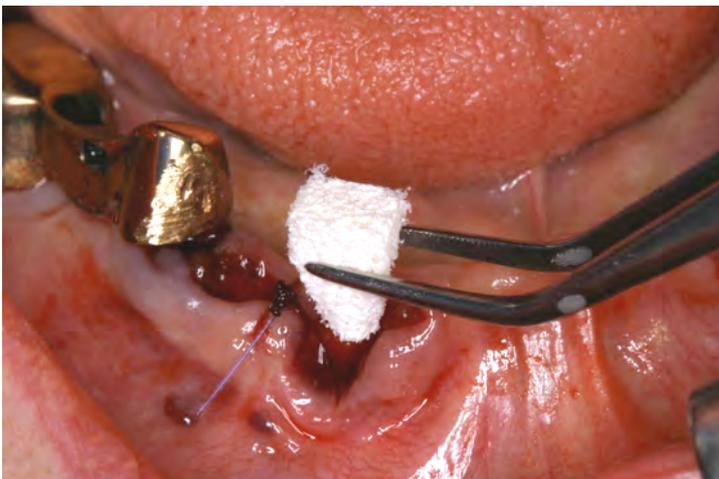


Abb. 8: Applikation von Bio-Oss Collagen nach einer Randomisierungsliste in die Alveolen 34 und 44

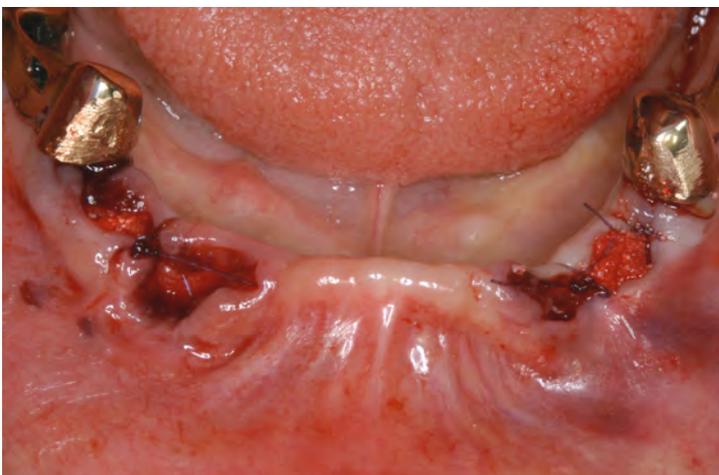


Abb. 9: Kein primärer Wundverschluss

5.2. Probenaufbereitung im Labor

Probenvorbereitung

Die Knochenbiopsate wurden coronal mit einem Stift (Marker II, Superfrost, Precision dynamics Corp. San Fernando, USA) markiert und 24 Stunden in 4-%iger gepufferter Formaldehydlösung (Herbeta, Berlin, Deutschland) fixiert.

Entkalkung

Im Anschluss wurden die Präparate zur Entkalkung in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) – Entkalkungslösung (Herbeta, Berlin, Deutschland) bei 37°C im Brutschrank eingelegt. Die Dauer (ca. 48h) wurde per Kontrolle des Entkalkungszustandes bei jeder einzelnen Probe eingestellt. Danach erfolgte eine Wässerung der Proben für eine halbe Stunde.

Einbetten in Paraffin

Die Präparate wurden mittels eines programmbetriebenen Gewebeeinbettautomaten (Thermo Shadon, Frankfurt/Main, Deutschland) mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol: Herbeta, Berlin, Deutschland) entwässert und über Xylol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) in warmes Paraffin (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebracht. Die Proben wurden dann in der Paraffingießstation in der genau festgelegten Schnittebene in flüssiges Paraffin eingebettet.

Schnittanfertigung:

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, Nussloch, Deutschland) erfolgte die Anfertigung von Serienschnitten in 3,5µm Dicke. Dazu wurden die gekühlten Blöcke bis zur gewünschten Schnittebene angeschnitten. Die Schnitte kamen dann zum Strecken in ein 50°C warmes Wasserbad. Danach wurden sie vorsichtig luftblasenfrei auf beschichtete Objektträger (Histo-Bond 75x25x1mm, Firma Superior Marienfeld) aufgezogen. Es erfolgte die Trocknung für 24 Stunden bei Zimmertemperatur.

Entparaffinierung:

Die Schnitte lagerten über 12 Stunden im Wärmeschrank bei 56°C, um dann unter einem Abzug zur Entparaffinierung in Xylol gegeben zu werden.

Anschließend wurden die Schnitte über eine absteigende Ethanolreihe in Aqua destillata (Herbeta, Berlin, Deutschland) rehydriert.

1.	Xylol	10 min
2.	Xylol	10 min
3.	Ethanol 100%	5 min
4.	Ethanol 90%	2 min
5.	Ethanol 80%	1 min
6.	Ethanol 70%	1 min
7.	Methanol	10 min
8.	Aqua dest.	5 min

Tabelle 3: Absteigende Ethanolreihe

Auswahl der Antikörper für die immunhistochemische Färbung

Mittels einer immunhistochemischen Antikörperreaktion der APAAP-Methode sollte die osteogene Potenz mesenchymaler Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurden drei Antikörper verwendet, die auf osteoblastenspezifische Antigene reagieren.

Core Binding Factor Alpha subunit 1 (CBFA1) ist als ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Osteoblastendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen von Beginn an nachweisbar. Der in dieser Studie verwendete CBFA1 Antikörper der IgG Klasse erkennt den humanen Core Binding Faktor Alpha subunit 1. Bei der CBFA1-Antikörperfärbung wird das Zytoplasma der osteogenen Zellen angefärbt. Am Ende der Antikörperreaktion zeigt sich ein rötlicher Saum um die Zellkerne herum.

Osteonectin (OSN) wird von Osteoblasten bei der Knochenbildung sekretiert.

OSN bindet mit hoher Affinität an Calcium und Hydroxylapatit und induziert dadurch die Mineralisation des Knochens. Der in der Studie verwendete OSN-Antikörper reagiert auf menschliches und bovines Osteonectin, auf humanes Plättchen Osteonectin und SPARC, welches von diversen in Kulturen gewachsenen Zellen produziert wird. Bei der OSN-Antikörperfärbung wird die Osteoblastenmembran markiert. Auch hier zeigt sich nach Antikörperreaktionsende ein rötlicher Saum um die Zellkerne herum.

Osteocalcin (OC) ist ein Protein, welches vorwiegend im Knochen durch Osteoblasten, Präosteozyten und reife Osteozyten gebildet wird. Es handelt sich hierbei um einen späten Marker der Knochenbildung. Der IgG Osteocalcin-Antikörper erkennt humanes Osteocalcin und markiert osteogene Zellen.

Immunhistochemische Färbung mittels der APAAP-Methode

Mit Hilfe der Immunhistologie lassen sich zelluläre Antigene selektiv nachweisen. Die immunhistologischen Färbungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit mit der APAAP-Methode durchgeführt. Die Abkürzung APAAP steht für Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase und ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers.

Für diese immunhistologische Färbereaktion werden drei Antikörper benötigt:

1. Der Primärantikörper, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet ist.
2. Der sogenannte Brückenantikörper, welcher sowohl den primären als auch den dritten benötigten Antikörper - den Immunkomplexantikörper - bindet.
3. Der Immunkomplexantikörper, der vom Brückenantikörper gebunden wird und die anschließend hinzu gegebene alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes bindet.

Der Primärantikörper sowie der Immunkomplexantikörper sollten aus der gleichen Spezies stammen, damit der Sekundärantikörper diese beiden miteinander koppeln kann. Als Primär- und Immunkomplexantikörper dienen in diesem Versuch monoklonale Maus-Antikörper. Als Brückenantikörper werden polyklonale Kaninchen-Anti-Maus IgG verwendet.

Bei polyklonalen Kaninchen Primärantikörpern - wie CBFA1 - muss ein zusätzlicher Schritt mit einem zweiten Brückenantikörper (Maus-Anti-Kaninchen IgG) nach dem Primärantikörper eingeführt werden.

Setzt man nach der Bindung des letzten Antikörpers, Naphthol-As-Biphosphat (das Substrat der alkalischen Phosphatase) hinzu, ergibt sich ein Spaltprodukt, welches mit Neufuchsin einen roten Farbniederschlag zeigt.

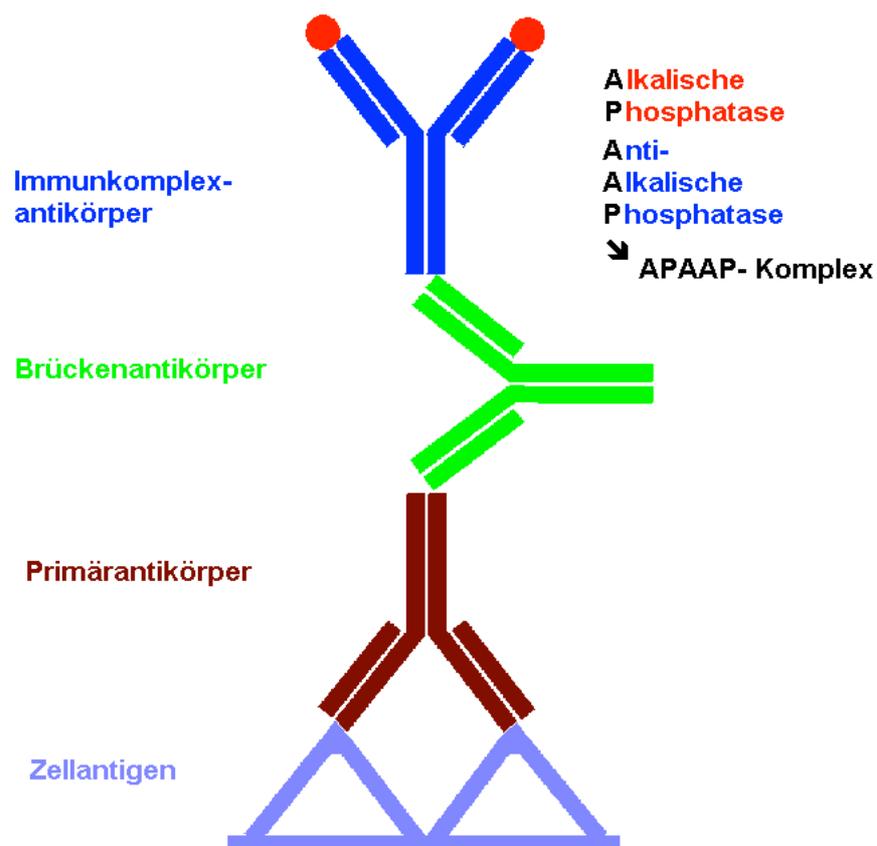


Abb. 10: Schema der Antikörper - Verbindung bei der APPAP-Methode

5.3. Immunhistochemische Färbung

Vorbehandlung für CBFA1 und OSN-AK-Färbung

Die Schnitte wurden mittels Dampfgeräts für 30 min in Target Retrieval Solution pH 6,1 erhitzt (1:10 Verdünnung DAKO, Hamburg, Deutschland). Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Spülung mit TBS-Puffer (TRIS-Waschpuffer, DAKO, Hamburg, Deutschland).

Vorbehandlung Osteocalcin-AK-Färbung

Die Schnitte wurden zur Permeabelisierung für 10 min in 0,1% Tritonx100 (100µl) bei Raumtemperatur gebracht. Im Anschluss erfolgte ebenfalls eine dreimalige Spülung mit TBS-Puffer (TRIS-Waschpuffer, DAKO, Hamburg, Deutschland).

Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen

Die Schnitte wurden nun in eine feuchte Färbekammer gelegt und mit Blockierungspuffer (DAKO, Hamburg, Deutschland) für 20 min geblockt und danach mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert.

Das Färbeverfahren von CBFA1, OSN und Osteocalcin siehe Tabelle 4

Zur Auswertung der Schnitte erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hematoxylin (DAKO, Hamburg, Deutschland).

Bei jeder Versuchsreihe liefen Serumproben ohne Antikörper als Negativkontrollen mit. Kontrollschnitte mit Knochenmark vom Beckenkamm dienten als Positivkontrolle zur Bestätigung der Antikörperspezifität bei jeder Versuchsreihe.

CBFA1	OSN	Osteocalcin
<p>1a. Primärer polyklonaler Rabbit anti Human Core Binding Factor Alpha subunit 1</p> <ul style="list-style-type: none"> - United States Biological, Massachusetts, USA - Catalog No C7900-71 - Lot No L8050168 - Konzentration 100 µg / 100 µl - in Antikörper-Verdünner (AK) - Verdünnung 1:400 - Inkubationszeit 120 min bei 37°C 	<p>1. Primärer monoklonaler Mouse anti Human Osteonectin</p> <ul style="list-style-type: none"> - United States Biological, Massachusetts, USA - Catalog No 08063-14 - Lot No L8022150 - Konzentration 50 µg / 100 µl - in AK-Verdünner - Verdünnung 1:2000 - Inkubationszeit 120 min bei 37°C 	<p>1. Primärer monoklonaler Mouse anti Human Osteocalcin</p> <ul style="list-style-type: none"> - R&D SYSTEMS / Wiesbaden, Deutschland - Catalog No MAB1419 - Lot No 00036389 - Konzentration 100 µg / 1 ml - in AK-Verdünner - Verdünnung 1:10 - Inkubationszeit 120 min bei ZT
<p>1b. Maus Anti Kaninchen (DAKO M0737)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:40 in AK- Verdünner + 5% AB-Serum 30 min Zimmertemperatur - 3x mit TBS- Spülpuffer spülen 		
<p>2. Brückenantikörper: Kaninchen-Anti-Maus (DAKO Z0259)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:40 in AK-Verdünner + 5% AB-Serum Inkubationszeit 30 min bei Zimmertemperatur (ZT) - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen 	<p>2. Brückenantikörper: Kaninchen-Anti-Maus (DAKO Z0259)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:40 in AK-Verdünner + 5% AB-Serum Inkubationszeit 30 min bei Zimmertemperatur - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen 	<p>2. Brückenantikörper: Kaninchen-Anti-Maus (DAKO Z0259)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Verdünnung 1:40 in AK-Verdünner + 5% AB-Serum Inkubationszeit 30 min bei Zimmertemperatur - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen

<p>3. APAAP- Komplex (Maus) (DAKO D0651)</p> <ul style="list-style-type: none"> - AK-Verdünner + 5% inaktiviertes Fetales Kälberserum - Inkubation für 40 Minuten ZT 1:100 - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen 	<p>3. APAAP- Komplex (Maus) (DAKO D0651)</p> <ul style="list-style-type: none"> - AK-Verdünner + 5% inaktiviertes Fetales Kälberserum - Inkubation für 40 Minuten ZT 1:100 - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen 	<p>3. APAAP- Komplex (Maus) (DAKO D0651)</p> <ul style="list-style-type: none"> - AK-Verdünner + 5% inaktiviertes Fetales Kälberserum - Inkubation für 45 Minuten ZT 1:100 - 3x mit TBS-Spülpuffer spülen
<p>4. Entwicklung mit Fuchsin-Substrat-Chromogen-System</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ansatz Fuchsin-Substat-Chromogen für 2 ml (DAKO, Hamburg, Deutschland) - 120 µl Chromogen (Lösung A) - 120 µl Activating (Lösung B) - Lösung A und B gut mischen - 1760 µl Buffered auffüllen und mischen - 1 Tropfen Levamisol K5000 Bottle G zu mischen - 10 min bei ZT inkubieren lassen - 5 min in TBS- Spülpuffer spülen 		
<p>5. 2 min Gegenfärbung mit Hämatoxylin (DAKO, Hamburg, Deutschland)</p>		
<p>6. 10 min in Leitungswasser bläuen</p>		
<p>7. 2x in Aqua destillata spülen</p>		
<p>8. eindecken mit erwärmter Kaisers Glyceringelantine</p>		
<p>9. trocknen lassen bei ZT</p>		

5.4. Bilderstellung

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte mittels Computeranalyse.

Dazu wurden alle Schnitte mit einem Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Deutschland) über eine Digitalkamera (AxioCam MRc5, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen.

Jedes Präparat wurde am Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung eingestellt, um zwei Bereiche (Region of interest = ROI) - einen im coronalen und einen im apicalen Areal des Präparats - auszuwählen. Es wurden nur Ausschnitte mit über 50% Bindegewebeanteil in die Studie mit einbezogen. Zum Vergleich der unterschiedlichen Färbungen wurde bei allen drei Präparaten der gleiche Bereich gewählt und im Anschluss aufgenommen.

Der auf den Monitor übertragene Ausschnitt wurde mit einer speziellen Bildanalysesoftware für Mikroskopie (AxioVision 4.6.3, Zeiss, Jena, Deutschland) bearbeitet. Für eine optimale Bildqualität kamen folgenden Parameter am Mikroskop und Computer zur Einstellung:

- Lichtintensität am Mikroskop: Stellrad zwischen 3 und 4
- Objektiv: 40-fache Vergrößerung
- Belichtungszeit: 30 ms und 110%
- „Bestfit“ für besseren Kontrast
- Weißabgleich:
 - Cyano 1,53 Rot
 - Magenta 1,17 Grün
 - Gelb 0,32 Blau
- Shading-Korrektur: aktiviert (Korrektur von unregelmäßiger Beleuchtung)

Nach erfolgreicher Bearbeitung wurde je nach Lage und Form der ROI entweder ein horizontales Bild der Größe 8000 x 6000 μm^2 oder ein vertikales Bild mit den Maßen 6000 x 8000 μm^2 im Panoramamodus erstellt. Der Panoramamodus ist ein spezielles Aufnahmeverfahren der oben genannten Bildanalysesoftware.

In diesem Modus wurde der eben genannte Ausschnitt geöffnet, aufgenommen und als erstes Bild gespeichert. Um einen weiteren Bildausschnitt kachelartig ansetzen zu können, musste das Präparat im Mikroskop um die entsprechend definierte Distanz des ersten Bildes in eine Richtung verschoben werden. Der nun aktuelle Ausschnitt wurde eingestellt, dann neben das erste Bild leicht überlappend gelegt und vom Computer passend angesetzt (Stitching). Nach erneutem Speichern des zweiten Bildes musste diese Abfolge 16 Mal beim horizontalen und 15 Mal beim vertikalen Bild wiederholt werden (siehe Abbildung 11). Nach erfolgreicher Zusammenstellung der Ausschnitte entstand ein Kachelbild, welches gegebenenfalls größer als $8000 \times 6000 \mu\text{m}^2$ oder $6000 \times 8000 \mu\text{m}^2$ war. Dieses musste zunächst in ein zusammenhängendes Bild (jpg-Format) konvertiert werden.

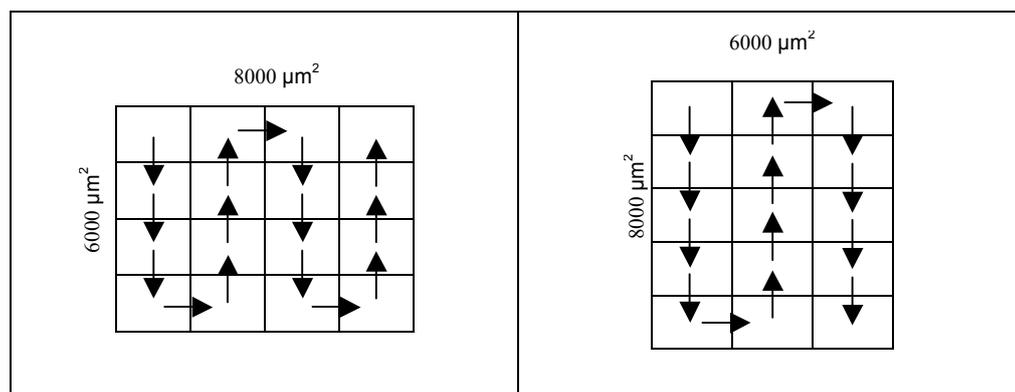


Abb. 11: Erfassungsschema

Das endgültige Bild wurde anschließend aus dem Rohbild entsprechend des gewählten Formats (horizontal oder vertikal) ausgeschnitten und unter der Präparatenummer abgespeichert.

Überblick über die Wahl des coronalen und apicalen Bereichs in einem Präparat:



Abb. 12: Biopsie einer unaugmentierten Extraktionsalveole (x10)

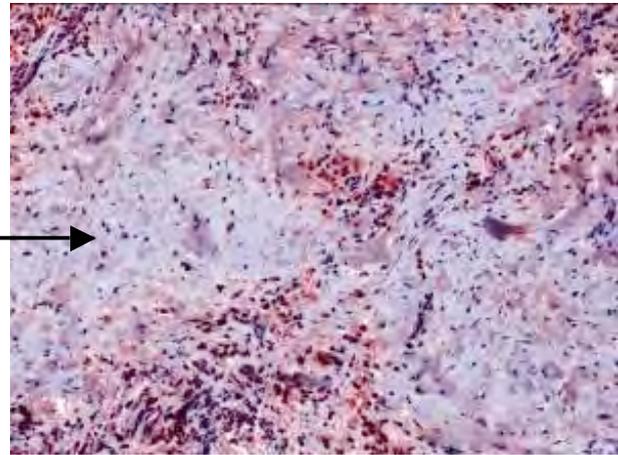


Abb. 13: coronaler Ausschnitt (x40)

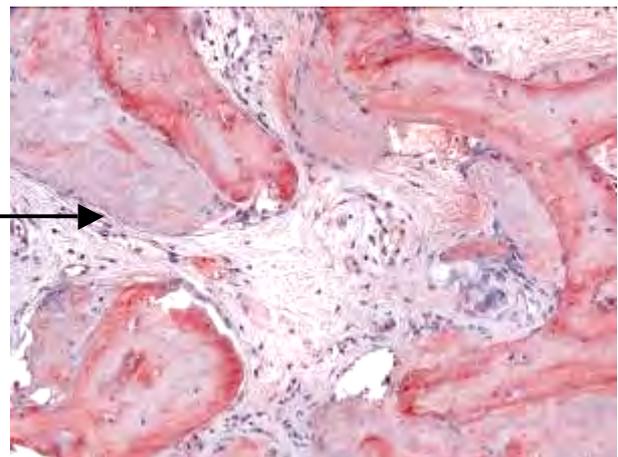


Abb. 14: apicaler Ausschnitt (x40)

5.5. Auswertung der aufgenommenen Präparate

Das Programm AxioVision erkennt gleiche Farben und kann diese zu Flächen zusammenfügen. Diese Flächen können dann gezählt werden.

Die Anzahl der Zellkerne und die immunhistochemisch angefärbten Bereiche um die Zellkerne herum wurden programmgestützt gezählt.

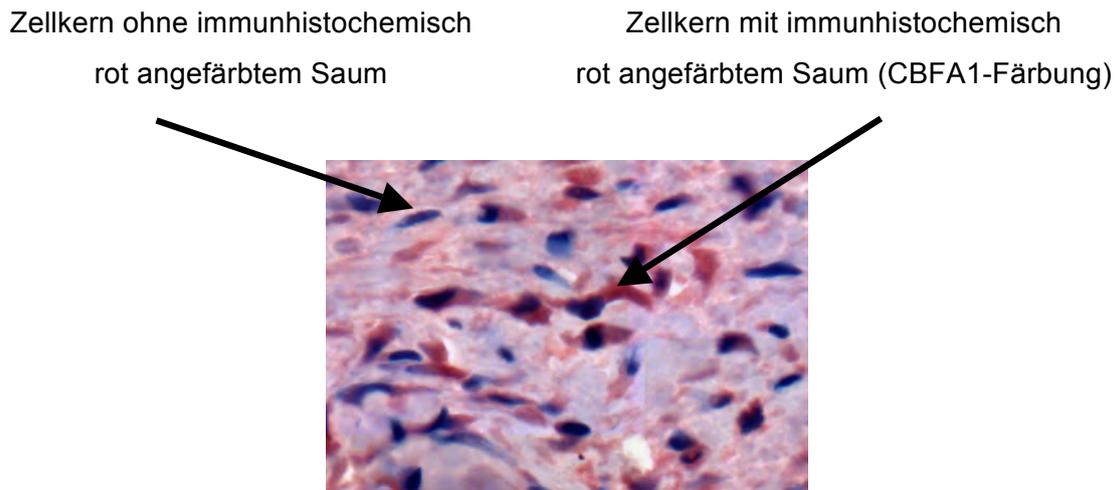


Abb. 15: Ausschnitt mit Zellkernen eingebettet in provisorische Matrix (x40)

- Die Zellkerne heben sich im Schnittbild aufgrund der Hämatoxylin-Eosin-Färbung schwarz-blau vom umliegenden Bindegewebe ab.

Um eine möglichst genaue Zählung durchführen zu können, wurden im Messprogramm-Assistenten folgende Parameter eingestellt. Anhand von Probebildern (Auswahl von idealen Schnittpräparaten) wurden bestimmte Farbtöne festgelegt, die das Programm in allen Bildern wieder finden sollte. Ähnliche Farben sollten markiert und zu Flächen zusammengefügt werden. Die minimale und maximale Größe der Fläche wurde anhand der Zellkerngröße im Mittel festgelegt. Die immunhistochemischen Zellbereiche wurden ebenfalls in Farbe und Größe definiert. Mittels dieser Voreinstellungen, die als ein Programm gespeichert wurden, sollte eine objektive Auszählung gewährleistet werden. Für die Auswertung im Vordergrund standen die Bindegewebsbereiche. Da jedoch Knochen, Bio-Oss Collagen als auch Artefakte ein Teil der Bildfläche füllen, wurden die Bindegewebsareale ausgeschnitten und die gemessene Flächengröße als 100% gesetzt.

Im Messmodus wurde dann jedes Bild einzeln vermessen.

1. Messung durch Messprogramm:

Das gespeicherte Messprogramm markierte die definierten Farbflächen für Zellkerne bzw. immunhistochemische Zellbereiche und zählte diese (Abb. 16,17).

2. manuelle Korrektur von:

- Bereichen mit sehr hoher Zellkerndichte (da mehrere Zellkerne zu einem Zellkern zusammengezogen wurden)
 - immunhistochemischen Zellbereichen, die nicht klar um den Zellkern markiert waren (z.B. Vereinigung mehrerer getrennter Flächen zu einer)
- ⇒ Überzählige und falsch markierte Bereiche wurden gelöscht oder fehlende nachmarkiert, um das Ergebnis nicht zu verfälschen

Die Zuverlässigkeit der Messung wurde durch dreimaliges Wiederholen der Messung von einer Person (C.N.) zu verschiedenen Zeitpunkten gewährleistet.

Die Anzahl der osteogenen Zellen wurde gezählt und anschließend folgende Zelldichten klassifiziert:

ZN = 0 - 499 Zellen= niedrige Zelldichte

ZM = 500 - 999 Zellen= mittlere Zelldichte

ZH = 1000 - 2500 Zellen= hohe Zelldichte

Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil der immunhistochemisch abgefärbten Zellen berechnet und in Kategorien unterteilt:

P1 = 0 - 29%

P2 = 30 - 49%

P3 = 50 - 79%

P4 = 80 -100%

Die Anzahl der Zellkerne, die immunhistochemischen Zellbereiche und die Bindegewebsfläche wurden gemittelt und in einer Microsoft® Excel-Tabelle unter der Präparatenummer archiviert.

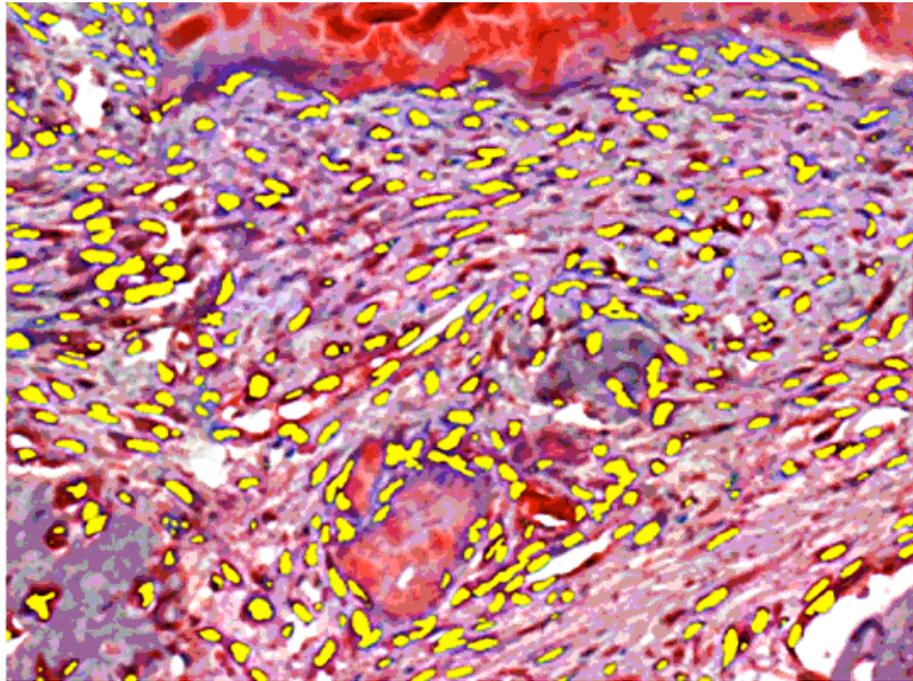


Abb. 16: Zellkerne gelb markiert (x40)

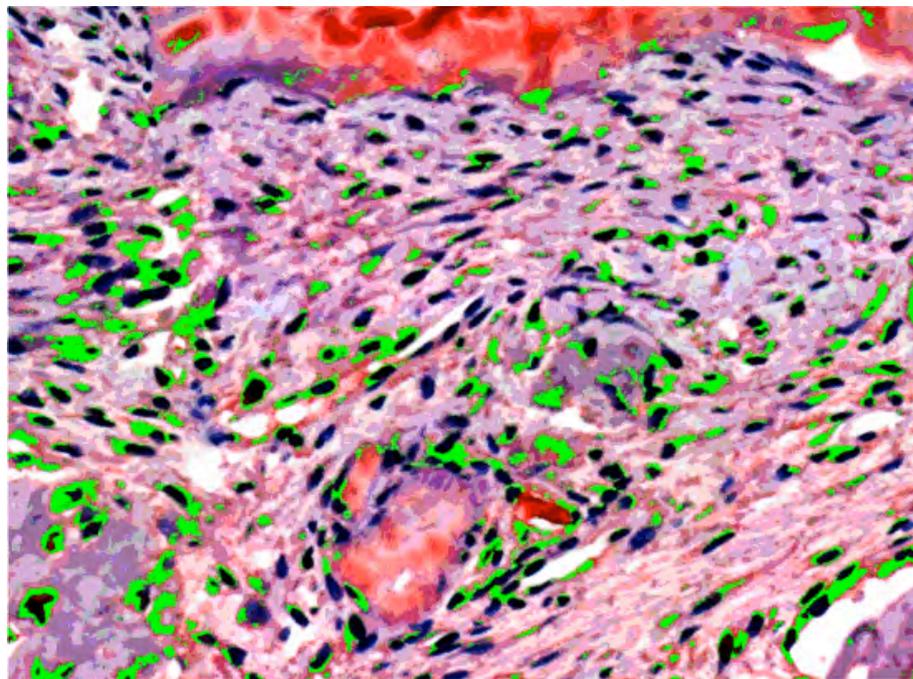


Abb. 17: Immunhistochemischer Zellbereich grün markiert (x40)

5.6. Statistische Auswertung

Die Anwendung von Bio-Oss Collagen basierte auf einer Randomisierungsliste, erstellt von nQuery Advisor 6.0 (Statistical solutions, Saugus, MA, USA).

Die histomorphometrischen Daten wurden deskriptiv ausgewertet.

Die Korrelation zwischen Zellzahl und positiv (CBFA1, OSN, OC) angefärbten Zellen wurde mit dem Spearman's rank order coefficient durchgeführt. Der Spearman's rank order coefficient ist ein verteilungsfreies (non-parametrisches) Korrelationsmaß für Daten auf Rangskalenniveau. Mit Hilfe dieses Koeffizienten lässt sich der monotone Zusammenhang zwischen zwei Variablen (Zellen zu positiv angefärbten Zellen) bestimmen.

Mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach Brunner (Brunner et al. 2003) wurde statistisch ermittelt, ob es Unterschiede zwischen den coronalen und apicalen Bereichen in Bezug auf die Anzahl positiv markierter Zellen (CBFA1, OSN, OC) gibt.

Des Weiteren wurde mit demselben Test der Einfluss von Bio-Oss Collagen auf die Anzahl der positiv markierten Zellen untersucht. Die Analyse der Daten erfolgte mittels SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Ein P-Wert < 0.05 wurde als signifikant betrachtet.

6. Ergebnisse

6.1. Darstellung ausgewählter histologischer Aufnahmen

Bevor im Einzelnen auf die Ergebnisse der histologischen Untersuchung eingegangen wird, werden nachfolgend am Beispiel der augmentierten Alveole einige lichtmikroskopische Aufnahmen zur Veranschaulichung dargestellt.

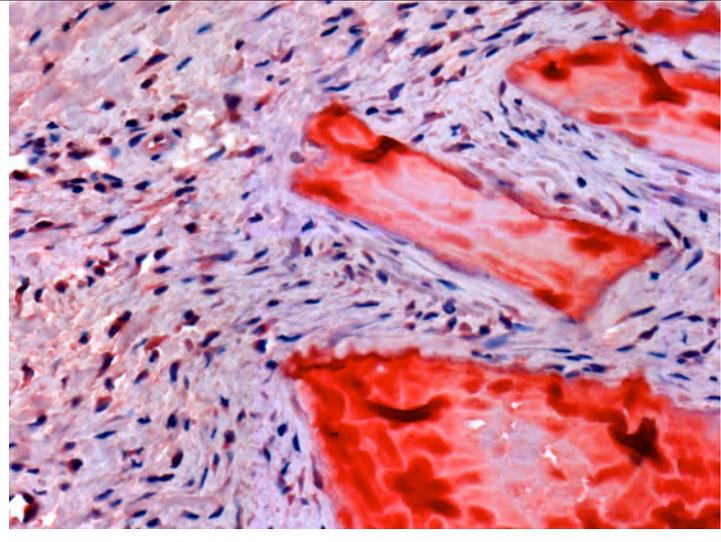
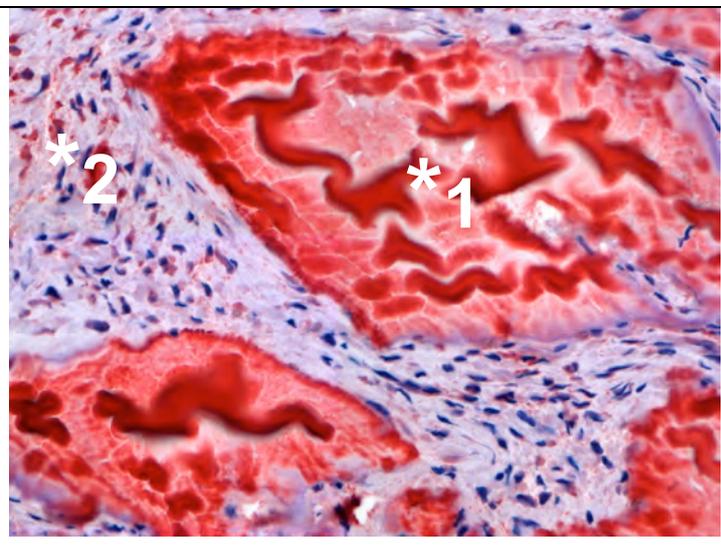
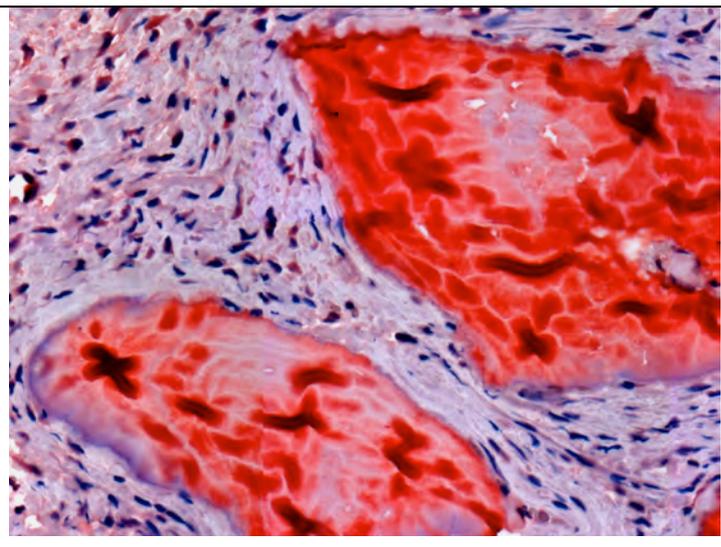
	<p>CBFA1</p>
	<p>OSN</p>
	<p>Osteocalcin</p>

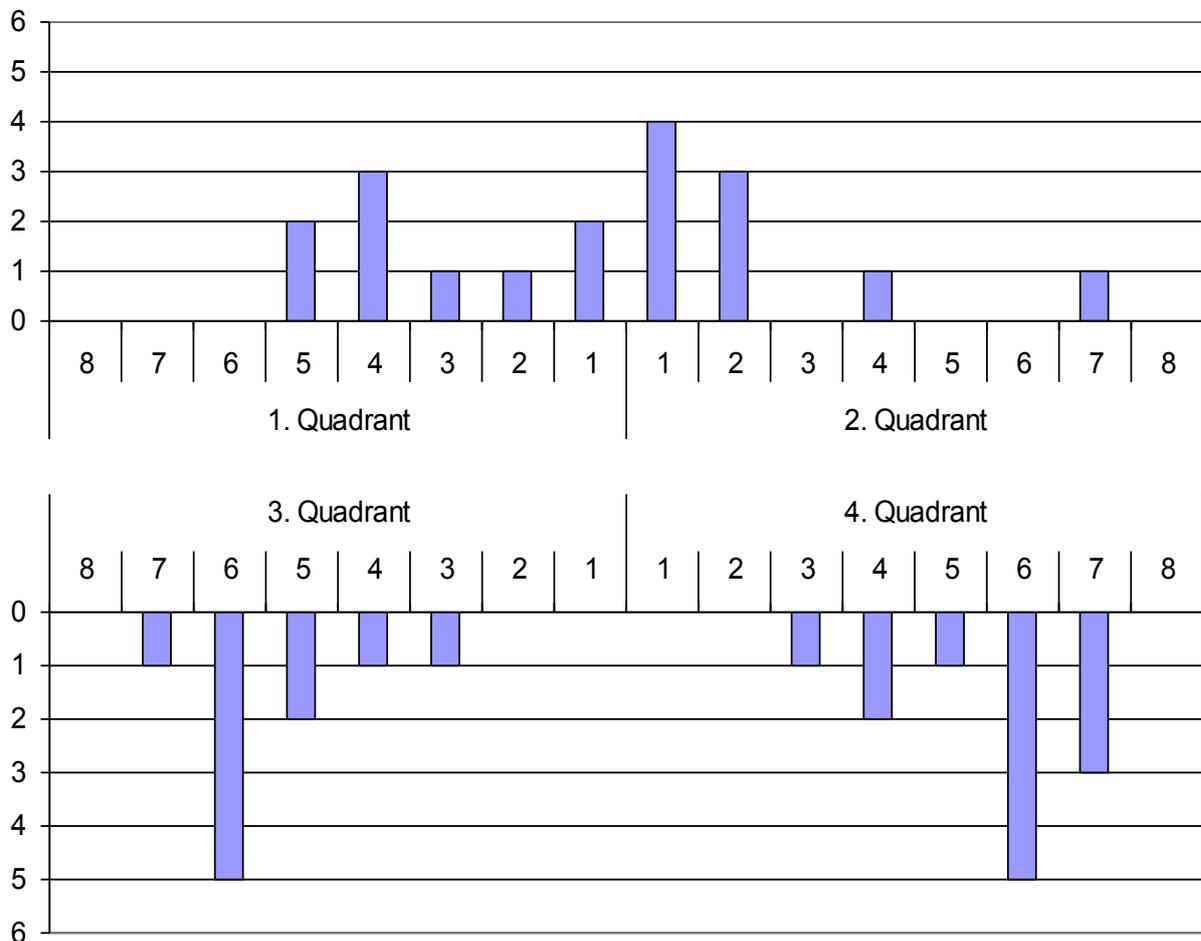
Abb. 18: Coronale Ausschnitte der drei Färbungen von augmentierten Alveolen (x40)

*1 Bio-Oss Partikel eingebettet in *2 provisorischer Matrix

	<p>CBFA1</p>
	<p>OSN</p>
	<p>Osteocalcin</p>

Abb. 19: Apicale Ausschnitte der drei Färbungen von augmentierten Alveolen (x40)

6.2. Probenverteilung im Zahnschema:



Grafik 1: Probenverteilung im Zahnschema

- Bei 23 Patienten (♀=9 / ♂=14) wurden im Rahmen der Studie 40 Zähne extrahiert.
- Von den 40 Alveolen wurden 22 mit Bio-Oss Collagen augmentiert.
- 18 extrahierte Zähne waren im Oberkiefer und 22 im Unterkiefer lokalisiert.
- 13 Front- und 27 Seitenzahnalveolen wurden untersucht.

Die Implantatinsertion mit paralleler Probenentnahme erfolgte bei allen Patienten nach einer Einheilzeit von 12 Wochen. Die klinische Untersuchung ergab zum Implantationszeitpunkt keine Zeichen für eine Entzündung; alle Extraktionsstellen waren ohne Komplikationen verheilt. In allen Fällen zeigte sich ein Weichgewebeverschluss.

6.3. Anzahl und Gliederung der Proben

Bei der Bildausschnittauswertung wurde der prozentuale Bindegewebeanteil an der Gesamtfläche berechnet. 20% der Proben hatten einen hohen Bindegewebeanteil mit über 75% Flächeninhalt. Da nur Ausschnitte mit einem Bindegewebeanteil über 50% in die Studie einbezogen wurden, entfielen elf Präparate (3 ungefüllte, 8 gefüllte Proben).

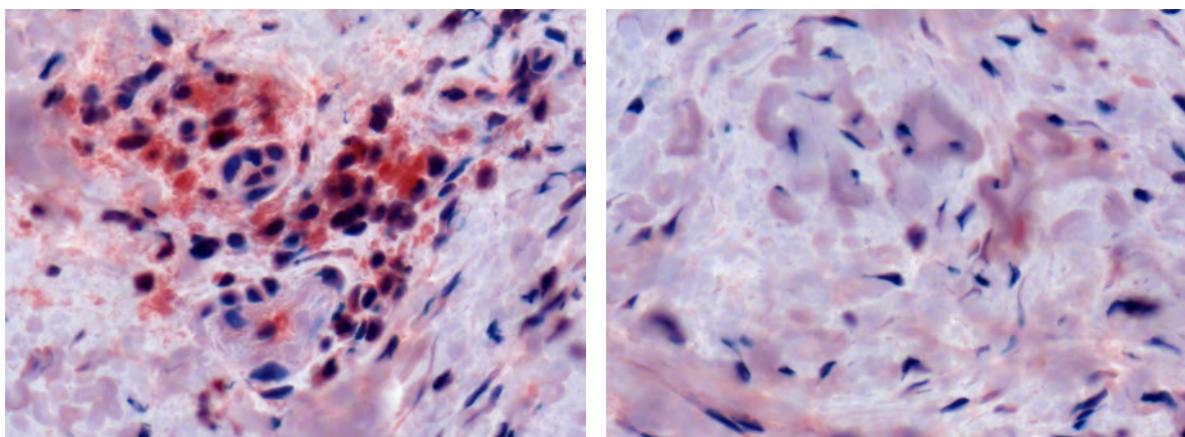
6.4. Proben ohne Bio-Oss Collagen:

6.4.1. Probenverteilung

Von 6 Patienten (3 Frauen, 3 Männer) wurden 15 Biopsien analysiert. Bei 4 Proben konnte nur der coronale Bereich ausgewertet werden, da der apicale Bereich schon zu über 80% verknöchert war. Daraus folgte, dass 15 coronale und 11 apicale Abschnitte in die Auswertung einbezogen werden konnten. In den Biopsien waren keine Entzündungszellen vorhanden.

6.4.2. Zelldichte

In zwei Auswertungsbereichen zeigte sich eine hohe Zelldichte (1500 - 2000 Zellkerne). 11 Areale wiesen eine mittlere Zelldichte (500 - 999 Zellkerne) und 13 eine niedrige Zelldichte (0 – 499 Zellkerne) auf (siehe Tabelle 5).

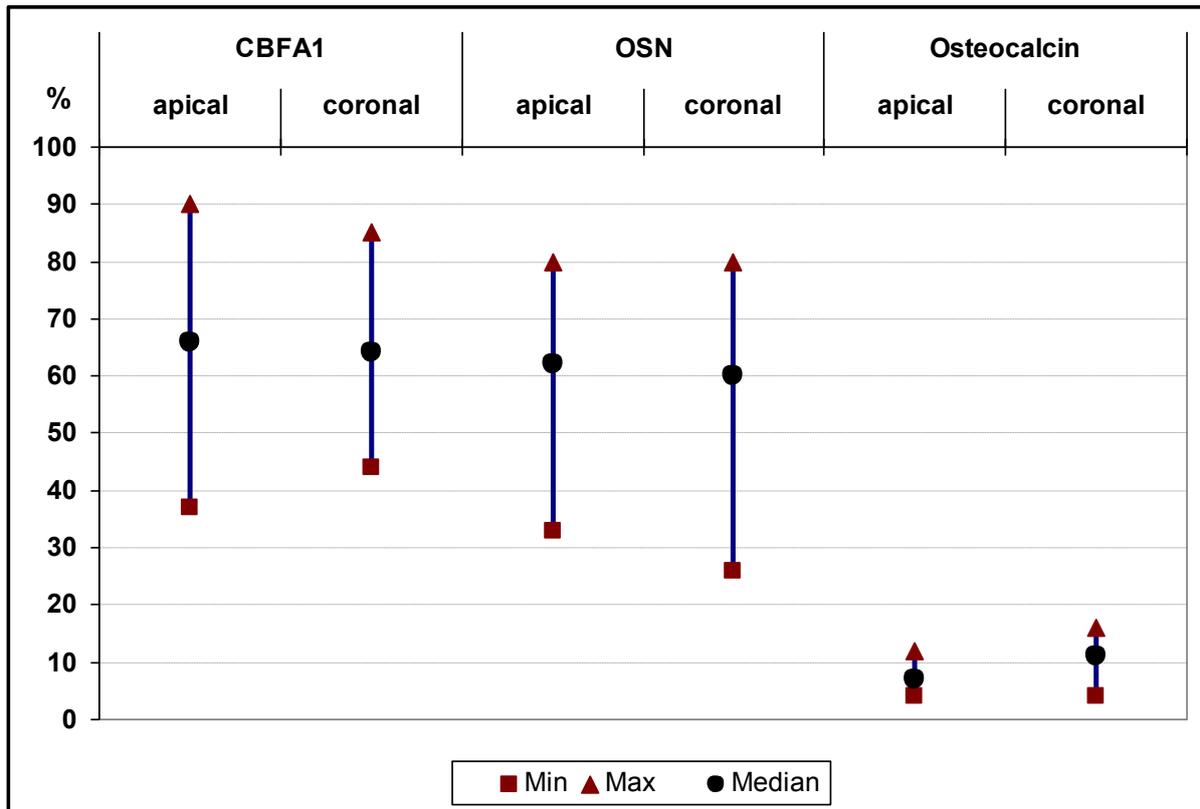


hohe Zelldichte

niedrige Zelldichte

Abb. 20: Ausschnitte von nicht augmentierten Proben CBFA1-Färbung (x40)

6.4.3. Vergleich der einzelnen Antikörperfärbungen



Grafik 2: Vergleich der drei Antikörperfärbungen ohne Bio-Oss Collagen unterteilt nach Bereich

CBFA1

Bei der CBFA1 Antikörperfärbung waren durchschnittlich 65% (37 - 90%) der Zellen positiv markiert. Im apicalen Bereich lag der Durchschnittswert bei 66% (37 - 90%) und im coronalen Bereich bei 64% (44 - 85%). Bei der statistischen Auswertung ergab der Spearmans Rank Test, dass es ($r_s = -0.577$, $P = 0.02$) einen Zusammenhang zwischen der Zellanzahl und den immunhistologisch positiv angefärbten Zellen im coronalen Bereich gibt. Daher werden in Proben mit einer geringeren Anzahl von mesenchymalen Zellen, mehr positiv markierte Zellen beobachtet. Im apicalen Bereich konnte ($r_s = -0.601$, $P = 0.6$) kein Zusammenhang festgestellt werden.

OSN

Der Durchschnittswert bei der OSN-Färbung lag bei 61% (26 - 80%). Im apicalen Abschnitt waren durchschnittlich 62% (33 - 80%) und im coronalen Abschnitt 60% (26 - 80%) angefärbt. Weder coronal ($r_s=0.807$, $P=0.8$) noch apical ($r_s=-0.115$, $P=0.7$) konnte ein Zusammenhang zwischen Zellanzahl und positiv markierten Zellen ermittelt werden.

Osteocalcin

Bei der Osteocalcinfärbung hingegen waren 9% (4 - 16%) der Zellen positiv angefärbt. Im apicalen Probenbereich lag der Durchschnittswert bei 7% (4 - 12%) und im coronalen Bereich bei 11% (4 - 16%). Eine Korrelation zwischen Zellanzahl und positiv angefärbten Zellen konnte apical ($r_s=0.074$, $P=0.8$) und coronal ($r_s=0.104$, $P=0.7$) nicht nachgewiesen werden.

6.5. Auswertung ohne Bio-Oss Collagen

Alter	Ex-Ort	Be-reich	♀/♂	CBFA1		OSN		OC	
				Z	P	Z	P	Z	P
57	27	c	♂	N	3	M	4	N	1
		a		M	2	M	4	N	1
57	37	c	♂	H	2	H	2	M	1
		a		N	3	N	3	N	1
60	35	c	♀	M	3	M	4	M	1
		a		ausgeschlossen					
39	36	c	♂	M	3	M	3	M	1
		a		N	3	N	3	N	1
39	36	c	♂	M	2	M	2	N	1
		a		ausgeschlossen					
39	11	c	♂	M	3	M	3	N	1
		a		N	4	N	4	M	1
39	12	c	♂	N	3	N	3	N	1
		a		N	2	N	3	N	1
39	21	c	♂	M	3	M	1	M	1
		a		N	3	M	2	N	1
39	22	c	♂	N	3	N	3	N	1
		a		N	3	M	3	M	1
39	22	c	♀	N	3	N	3	N	1
		a		M	3	M	3	N	1
52	13	c	♀	M	3	M	2	M	1
		a		ausgeschlossen					
52	14	c	♀	M	3	M	3	M	1
		a		H	3	H	3	H	1
52	15	c	♀	N	3	N	3	N	1
		a		ausgeschlossen					
67	36	c	♂	N	3	N	3	N	1
		a		N	3	N	3	N	1
67	37	c	♂	N	4	N	4	N	1
		a		M	4	M	4	N	1

Tabelle 5: Verteilung der Zelldichte und der durchschnittlichen prozentualen Anzahl immunpositiver Zellen in ungefüllten Alveolen

ZN = niedrige Zelldichte	0 - 500 Zellen	P1 = 0 - 29 %
ZM = mittlere Zelldichte	500 - 1000 Zellen	P2 = 30 - 49 %
ZH = hohe Zelldichte	1000 - 2500 Zellen	P3 = 50 - 79 %
		P4 = 80 - 100 %

Bereich: c = coronal; a = apical

6.6. Proben mit Bio-Oss Collagen:

6.6.1. Probenverteilung

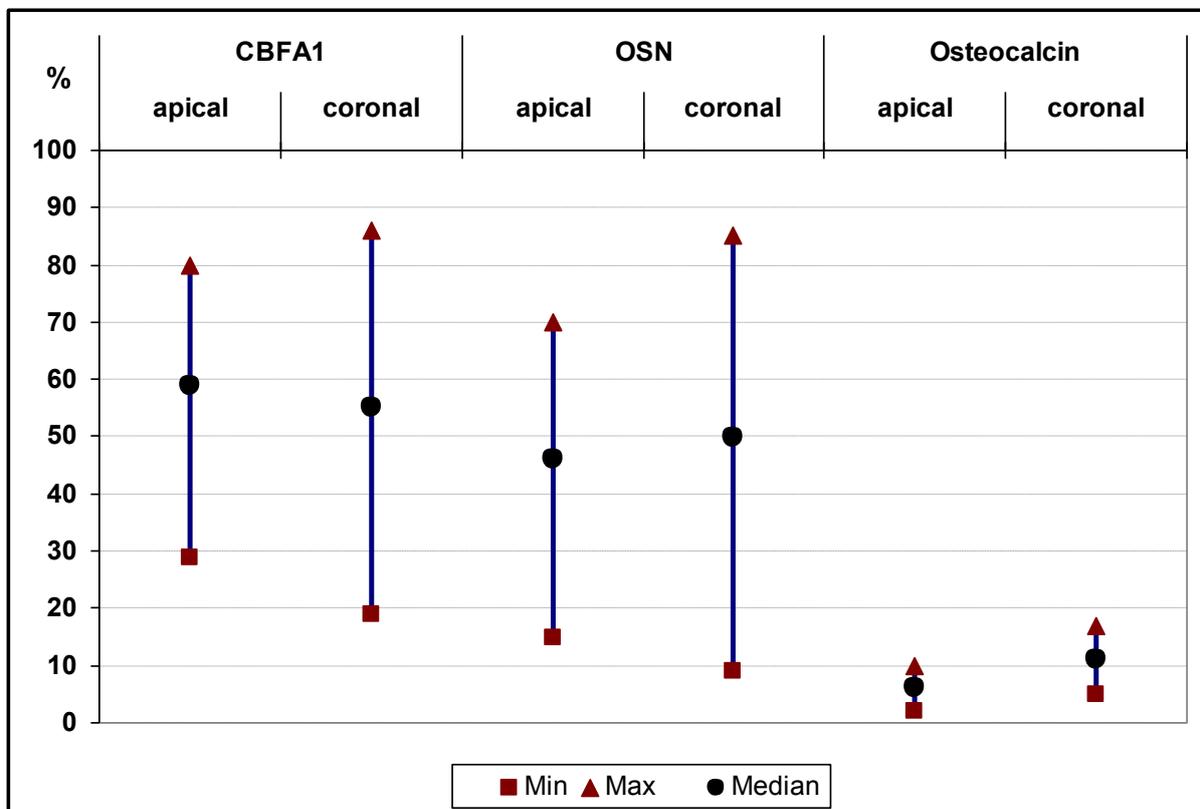
Es wurden 14 augmentierte Proben von 11 Patienten (6 Frauen, 5 Männer) untersucht. Davon konnten 14 coronale und nur 9 apicale Bereiche ausgewertet werden, da bei 5 Biopsien der apicale Abschnitt einen Knochenanteil von über 80% zeigte. Die bindegewebige Matrix aller Biopsien war frei von Entzündungszellen.

6.6.2. Zelldichte

Ein Abschnitt zeigte eine hohe Zelldichte (1500 - 2000 Zellkerne).

15 Auswertungsbereiche wiesen eine mittlere Zelldichte (500 - 999 Zellkerne) und 7 eine niedrige Zelldichte (0 - 499 Zellkerne) auf (siehe Tabelle 6).

6.6.3. Vergleich der einzelnen Antikörperfärbungen



Grafik 3: Vergleich der drei Antikörperfärbungen mit Bio-Oss Collagen unterteilt nach Bereich

CBFA1

Bei der CBFA1 Antikörperfärbung waren durchschnittlich 57% (19 - 86%) der Zellen positiv markiert. Im apicalen Bereich lag der Durchschnittswert bei 59% (29 - 80%) und im coronalen Bereich bei 55% (19 - 86%). Weder coronal ($r_s=-0.437$, $P=0.1$) noch apical ($r_s=-0.567$, $P=0.1$) konnte ein Zusammenhang zwischen Zellanzahl und positiv markierten Zellen ermittelt werden.

OSN

Der Durchschnittswert bei der OSN Färbung lag bei 48% (9 - 85%). Im apicalen Abschnitt waren durchschnittlich 46% (15 - 70%) und im coronalen Abschnitt 50% (9 - 85%) der Zellen positiv angefärbt. Bei der statistischen Auswertung ergab der Spearmans Rank Test, dass es einen Zusammenhang zwischen der Zellanzahl und den immunhistologisch positiv angefärbten Zellen im apicalen Bereich gibt ($r_s=-0.683$, $P=0.04$). In Proben mit einer geringeren Anzahl von mesenchymalen Zellen können mehr positiv markierte Zellen beobachtet werden. Im coronalen Bereich konnte kein Zusammenhang festgestellt werden ($r_s=-0.029$, $P=0.9$).

Osteocalcin

Bei der Osteocalcinfärbung hingegen waren 9% (2 - 17%) der Zellen positiv angefärbt. Im apicalen Probenbereich lag der Durchschnittswert bei 6% (2 - 10%) und im coronalen Bereich bei 11% (5 - 17%). Eine Korrelation zwischen Zellanzahl und positiv angefärbten Zellen konnte apical ($r_s=-0.346$, $P=0.3$) und coronal ($r_s=-0.447$, $P=0.1$) nicht nachgewiesen werden.

6.7. Auswertung mit Bio-Oss Collagen

Alter	Ex-Ort	Be-reich	m/w	CBFA1		OSN		OC	
				Z	P	Z	P	Z	P
42	37	c	♀	M	3	M	2	M	1
		a		M	1	H	2	M	1
72	14	c	♂	N	4	N	3	N	1
		a		M	2	M	2	M	1
72	21	c	♂	N	4	N	3	N	1
		a		M	2	M	2	M	1
59	15	c	♀	M	3	M	2	M	1
		a		ausgeschlossen					
36	11	c	♂	M	2	M	3	M	1
		a		M	3	M	3	M	1
39	24	c	♂	H	3	H	4	H	1
		a		M	3	M	3	M	1
65	47	c	♂	M	3	M	3	M	1
		a		N	3	N	3	N	1
65	14	c	♀	M	2	M	2	N	1
		a		N	3	N	3	N	1
49	21	c	♀	M	3	M	2	M	1
		a		H	3	M	1	N	1
52	34	c	♀	M	2	M	2	N	1
		a		ausgeschlossen					
71	21	c	♂	M	2	N	2	N	1
		a		N	2	N	2	N	1
71	22	c	♂	M	3	N	3	N	1
		a		ausgeschlossen					
39	36	c	♀	M	3	M	2	N	1
		a		ausgeschlossen					
39	36	c	♀	M	1	M	1	N	1
		a		ausgeschlossen					

Tabelle 6: Verteilung der Zelldichte und der durchschnittlichen prozentualen Anzahl immunpositiver Zellen in gefüllten Alveolen

ZN = niedrige Zelldichte	0 - 500 Zellen	P1 = 0 - 29 %
ZM = mittlere Zelldichte	500 - 1000 Zellen	P2 = 30 - 49 %
ZH = hohe Zelldichte	1000 - 2500 Zellen	P3 = 50 - 79 %
		P4 = 80 - 100 %

Bereich: c = coronal; a = apical

6.8. Vergleich zwischen dem coronalen und apicalen Bereich

Mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach Brunner wurde des Weiteren berechnet, dass nur bei Osteocalcin mit $P=0.001$ ein Zusammenhang bei der Anzahl der positiv angefärbten Zellen in Abhängigkeit vom Bereich vorhanden ist. Das heißt, es waren signifikant mehr Zellen im coronalen Bereich positiv markiert, als im Vergleich zum apicalen Abschnitt. Bei den anderen beiden Färbungen war mit $P=0.45$ bei CBFA1 und $P=0.99$ bei OSN keine Abhängigkeit nachweisbar.

6.9. Vergleich zwischen ungefüllten und gefüllten Alveolen

Bei der OSN-Färbung konnte mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit $P=0.042$ eine Abhängigkeit der positiv markierten Zellen in Bezug auf die Anwesenheit von Bio-Oss Collagen nachgewiesen werden.

In den nicht augmentierten Proben waren signifikant mehr Zellen positiv angefärbt als in den mit Bio-Oss Collagen augmentierten Proben. Bei CBFA1 ($P=0.21$) und Osteocalcin ($P=0.26$) konnte kein Zusammenhang dafür belegt werden.

7. Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte immunhistochemisch augmentierte und nicht augmentierte humane Extraktionsalveolen nach 12 Wochen Einheilzeit.

In vorangegangenen Studien an humanen Extraktionsalveolen lag das Augenmerk hauptsächlich auf der histomorphometrischen Ermittlung der Knochenneuformationsrate zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Es zeigte sich dabei, dass auch nach 12 Wochen Heilzeit, Alveolen mit einem großen Anteil von provisorischer Matrix mit mesenchymalen Zellen zu finden sind, unabhängig ob diese augmentiert waren oder nicht (Heberer et al. 2008, 2011, Trombelli et al. 2008). Bis dato existierten aber nur quantitative Analysen zu frühen Stadien der alveolären Heilung (Heberer et al. 2008). Hauptbestandteil der vorliegenden Untersuchung war es folglich, das osteogene Potential dieser mesenchymalen Zellen in der späten Heilungsphase zu analysieren.

Im Rahmen der Studie zeigten 20% der Biopsien einen großen Anteil an provisorischer Matrix, im Gegensatz zu 25% der Biopsien, die eine komplette Verknöcherung aufwiesen. In den jeweiligen Gewebeproben zeigten sich unterschiedliche Zelldichten. Von den histologisch ausgewerteten Biopsien zeigten 40% eine geringe, über die Hälfte eine mittlere und weniger als 10% eine hohe Zelldichte innerhalb der provisorischen Matrix. Diese Variationsbreite der Zelldichten und Mengen an provisorischer Matrix konnte auch in anderen Untersuchungen an sechs Wochen alten Biopsien aus Extraktionsalveolen gefunden werden (Heberer 2012). Die Gründe für diese Variationen innerhalb der humanen Alveolen sind derzeit noch nicht geklärt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass individuelle Faktoren die Knochenphysiologie unterschiedlich beeinflussen.

Um das osteogen Potential der Mesenchymzellen innerhalb der provisorischen Matrix ermitteln zu können, wurde der monoklonale Antikörper CBFA1 verwendet. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass zwei Drittel der in der provisorischen Matrix eingebetteten Zellen immunreaktiv für CBFA1 waren. Die Variationsbreite lag bei 19 - 90%. CBFA1 ist ein früher Marker bei der Knochenbildung und an der chondrogenen und osteogenen Reifungslinie beteiligt (Francheschi et al. 2007). Da in mehreren Studien im Alveolarknochen nur desmale Verknöcherung ohne Knorpelvorstufen nachgewiesen werden konnte, ist die CBFA1 positive Expression von Zellen ein Indikator für osteogenes Potential (Chao & Inoue 2003, Kanyama et al. 2003). Daraus lässt sich schließen, dass die provisorische Matrix ein hohes osteogenes

Potential besitzt. Heberer und Mitarbeiter fanden auch innerhalb der provisorischen Matrix von Biopsien aus sechs Wochen alten Alveolen eine große Variation in der Anzahl von CBFA1 positiven Zellen (73% Variationsbreite: 48 - 86%).

Nach 12 Wochen zeigen zwei Proben eine sehr geringe Anzahl (<30%) osteogener Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl. Ursache dafür sind wahrscheinlich individuelle Faktoren, die noch nicht ausreichend erforscht sind. Da der genaue Reifegrad der osteogenen Zellen mit CBFA1 nicht definierbar ist, wurden weitere Antikörper verwendet.

Das Protein OSN wird in den Zellen der osteogenen Zelllinie zu Beginn der Differenzierung zu reifen Knochenvorläuferzellen exprimiert (Komori & Kishimoto 1998). Mehr als die Hälfte der gemessenen Zellen (Variationsbreite: 9 - 85%) reagierten OSN positiv, was darauf hindeutet, dass nach 12 Wochen diese Zellen einen Reifegrad von reifen Osteoprogenitorzellen zu Präosteoblasten besitzen. Aufgrund der mangelnden Spezifität von OSN ist eine Kombination mit anderen osteoblastenspezifischen Faktoren unerlässlich, weshalb Osteocalcin als dritter Antikörper verwendet wurde.

Osteocalcin ist ein später Marker in der osteoblastären Reifungslinie und detektiert reife Osteoblasten. In allen Biopsien wurden Osteocalcin positive Zellen (Durchschnitt: 9%, Variationsbreite 2 - 17%) in der provisorischen Matrix gefunden. Jedoch war bei der Osteocalcin-Färbung die durchschnittliche Anzahl erheblich kleiner als bei der CBFA1- und OSN-Färbung. Dies deutet darauf hin, dass nach 12 Wochen Einheitszeit alle Reifungsphasen der osteogenen Linie in der provisorischen Matrix vorhanden sind, wobei aber weniger als ein Viertel der Zellen reife Osteoblasten sind.

Trombelli und Mitarbeiter (2008) beschreiben ähnliche Beobachtungen in Biopsien aus humanen Extraktionsalveolen. Die Dichte der BMP-7 und Osteocalcin positiven Zellen wird allerdings nur in der Nähe der Oberfläche des neu gebildeten Geflechtknochen - also in der aktiven Zone der Knochenbildung - beschrieben. Informationen über das osteogene Potential der Zellen innerhalb der provisorischen Matrix und eine Korrelation zwischen Gesamtzellzahl zu osteogener Zellzahl fehlen in Trombellis Veröffentlichung (Trombelli et al. 2008).

Innerhalb der vorliegenden Studie wurden nur Präparate mit einem provisorischen Matrixanteil von über 50% eingeschlossen. Nach der mikroskopischen Auswertung entfielen im apicalen Bereich der Alveole ein Drittel der Proben, da die Masse an provisorischer Matrix zu gering war und der knöchernen Anteil überwog. Dieses deckt

sich mit vorangegangenen Studien von Heberer und Mitarbeitern, die in 12 Wochen alten menschlichen Extraktionsalveolen signifikant mehr Knochen im apicalen Bereich im Vergleich zum coronalen Bereich gefunden haben. Vorangegangene tierexperimentelle und humane Studien haben gezeigt, dass davon auszugehen ist, dass die Knochenbildung in Extraktionsalveolen von apical her ausgeht (Amler 1969, Evian 1982, Heberer et al. 2008, Trombelli et al. 2008).

Über die Herkunft der Osteoblasten in heilenden Extraktionsalveolen gibt es unterschiedliche Vermutungen in der Literatur. Devlin & Sloan (2002) untersuchten immunhistochemisch (monoklonale Antikörper CBFA1, Sb-10 und Sb-20) die frühe strukturierte Osteoblastendifferenzierung in Alveolen. SB-10 und SB-20 reagieren zu unterschiedlichen Stadien der Osteogenese auf Oberflächenantigene humaner osteogener Zellen (Bruder et al. 1997). Immunhistologisch zeigten sich neben CBFA1 positiv markierte Zellen am Alveolarrand auch positiv angefärbte Zellen im verbliebenen parodontalen Ligament. Devlin & Sloan vermuteten daraufhin, dass die Zellen des Zahnhalteapparates zur alveolären Knochenbildung beitragen könnten. Auch in Tierstudien an Ratten wurden Bindegewebefibroblasten, die aus dem verbleibenden Parodont stammten (Todo 1968, Lin et al. 1994), für die frühe Knochenbildung in der Alveole verantwortlich gemacht. Da das Desmodont nach der Extraktion in unserer als auch in weiteren humanen Studien gründlich kürettiert wurde, deutet dieses darauf hin, dass das parodontale Ligament keinen entscheidenden Einfluss auf die Gewebereifung hat (Heberer et al. 2008, 2011, 2012, Trombelli et al. 2008). Zu dem konnte in einer tierexperimentellen Studie am Hund beim histologischen Vergleich kürettierter zu nicht kürettierter Alveolen nach 3 Monaten Einheilzeit kein signifikanter Gewebeunterschied nachgewiesen werden (Cardaropoli et al. 2005).

Die Daten von Devlin & Sloan sind mit der genannten Studie bedingt vergleichbar, da sie die Ergebnisse nicht quantifizierten und nur eine begrenzte Anzahl von Proben verwerteten. Zu dem handelte es sich bei den drei Patienten um Tumorpatienten, bei denen die alveoläre Heilung möglicherweise beeinflusst ist. Eine Studie von Ahn & Shin (2008) verglich 12 ungefüllte gesunde und 55 vorerkrankte Extraktionsalveolen. In die Gruppe mit Vorerkrankung fielen u.a. Zähne mit erhöhtem Lockerungsgrad, tiefen Taschen, chronisch parodontalen Abszessen, Granulomen und Septumdefekten bei Molaren. In der anderen Gruppe ohne Vorerkrankung wurden die Zähne aufgrund von Karies, Zahnfraktur oder endodontischer Ursache ohne apicale Beeinträchtigung extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Alveolen in beiden Gruppen nicht kürettiert.

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Heilung in den vorgeschädigten Alveolen wesentlich länger andauerte. So waren die ungefüllten gesunden Alveolen nach 8 Wochen schon zu 50% verknöchert, während die vorher erkrankten Alveolen erst nach 16 Wochen diesen Grad erreicht hatten (Ahn & Shin 2008). Alveolen, deren Zähne aus rein endodontischen Gründen ohne apicale Veränderungen oder kariesbedingt extrahiert wurden, zeigen meist gute Heilungsverläufe (Ahn & Shin 2008).

Der immunhistologische Vergleich der Lokalisationsbereiche ergab einen statistischen Unterschied in der Anzahl Osteocalcin positiv markierter Zellen. So waren signifikant mehr Zellen im coronalen (11%) Bereich Osteocalcin-positiv angefärbt als im apicalen Abschnitt (6%). Das Aktivitätszentrum der Osteoblasten liegt somit nach 12 Wochen Einheilzeit im coronalen Bereich der Extraktionsalveole. Diese Verteilung steht im Gegensatz zum Ergebnis einer Studie an 6 Wochen alten humanen Extraktionsalveolen von Heberer und Mitarbeitern, bei der apical signifikant mehr Zellen (14%) auf Osteocalcin positiv reagiert haben als coronal (9%) (Heberer et al. 2012). Zu beiden Untersuchungszeitpunkten ist die absolute Zellanzahl annähernd identisch, aber die Menge an reifen Osteoblasten verringert sich beim Vergleich apical um über 50%, während sie coronal beinahe gleich bleibt. Dieses spricht für eine Veränderung der Osteoblastenaktivität über die Zeit. Erhärten lässt sich diese Vermutung beim Vergleich mit einer Studie von Nahles und Mitarbeitern an 4 Wochen alten Extraktionsalveolen (Nahles et al. 2012). Die durchschnittliche Anzahl Osteocalcin positiver Zellen lag zu diesem frühen Heilungszeitpunkt apical bei 24% und coronal bei 19% (Nahles et al. 2012). Nach 12 Wochen Einheilzeit hat sich die Osteoblastenanzahl somit auf ein Viertel der Anzahl nach 4 Wochen Einheilzeit reduziert. Die Abnahme der Osteoblasten führt zu der Annahme, dass nach einem Aktivitätshöhepunkt in der frühen Heilungsphase möglicherweise in der späten Heilungsphase eine Osteoblasten-Inaktivierung folgt. Inaktive Osteoblasten könnten sich zu Bone-Lining Zellen umwandeln. Diese sind vermutlich befähigt, sich auf ein Signal hin wieder in aktive Osteoblasten zu differenzieren (Chow et al. 1998, Eriksen 2010). Diese Studie bestätigt, wie schon am Tiermodell und an früheren humanen Studien herausgefunden wurde, dass nach einem initialen Knochenbildungsschub innerhalb der frühen Heilungsphase nur noch eine Reifungsphase mit reduzierter Osteoblastenaktivität folgt (Evian 1982, Araujo & Lindhe 2005, Trombelli et al. 2008, Heberer et al. 2008).

Trombelli et al. (2008) stellten in ihrer Studie fest, dass ein Teil der Mesenchymzellen zu verschiedenen Zeitpunkten bei den gewählten Färbemethoden (BMP-7 und Osteocalcin) ungefärbt blieben. Sie schlussfolgerten, dass diese Zellen möglicherweise in einem nicht aktiven Knochenbildungsstadium sind oder zu einer Zellpopulation gehören, die nicht an der Knochenbildung beteiligt ist. Ein hierbei zu beachtender Aspekt ist, dass BMP-7 und Osteocalcin nicht alle Zellen der osteogenen Linie anfärben. In den Biopsien der vorliegenden Studie reagierte nur ein kleiner Teil (ca. ein Drittel) der mesenchymalen Zellen negativ auf CBFA1 und zeigt somit kein osteogenes Potential. Die Linie dieser ungefärbten Mesenchymzellen kann nur vermutet werden, da weitere Analysen hierzu nicht durchgeführt wurden. Mesenchymzellen sind multipotente Zellen. Sie können sich neben Osteoblasten auch zu anderen Bindegewebezellen, wie zum Beispiel Adipozyten und Fibroblasten differenzieren (Bruder et al. 1998).

Die vorliegende Studie konzentriert sich auch auf den Vergleich augmentierter zu nicht augmentierter Alveolen. Veröffentlichte Ergebnisse haben gezeigt, dass die Struktur von Bio-Oss mit seiner Makro- und Mikroporosität ein physikalisch, osteokonduktives Gerüst bietet. Carinci et al. (2006) untersuchten die genetischen Auswirkungen von Bio-Oss auf osteogenen Zellen in vitro. Es wurde gezeigt, dass Bio-Oss die transkriptionelle Aktivitäten beeinflusst, welche die Osteoblasten-Differenzierung erhöht (Carinci et al. 2006).

In vorangegangenen Studien lag das Hauptaugenmerk auf der Knochenneubildungsrate in augmentierten Extraktionsalveolen (Heberer et al. 2008, 2012). Histomorphometrische Auswertungen in einer Studie an 12 Wochen alten humanen Extraktionsalveolen ergaben, dass es einen signifikanten Unterschied in der Knochenneubildungsrate zwischen gefüllten und ungefüllten Extraktionsalveolen gibt (Heberer et al. 2011). Da bisher nur begrenzt Studien über Untersuchungen osteogener Zellen in mit Bio-Oss Collagen gefüllten Extraktionsalveolen im Vergleich zu ungefüllten Alveolen vorhanden sind, wurden im Rahmen dieser Studie Biopsien aus augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen in Hinblick auf das osteogenen Potential mesenchymaler Zellen innerhalb der provisorischen Matrix nach einer Einheitszeit von 12 Wochen vergleichend analysiert.

In der vorliegenden Studie nach 12 Wochen Heilzeit konnte wie auch in anderen Studien ein enger Kontakt zwischen knochenbildenden Zellen und Bio-Oss Partikeln nachgewiesen werden (Froum et al. 1998, Artzi et al. 2002, Tapety et al. 2004, Heberer et al. 2008). Anzeichen für eine Resorption der Bio-Oss Partikel konnten nicht gefunden

werden. Dieses steht in Einklang mit den Ergebnissen anderen Bio-Oss-Studien (Heberer et al. 2012, Artzi 2000).

Auf der Oberfläche der Bio-Oss Partikel zeigten sich in dieser Untersuchung CBFA1 und OSN positive osteogene Zellen. Ähnliche Beobachtungen stellten Tapety et al. (2004) fest. Sie untersuchten die Zellantwort in experimentell erzeugten Knochendefekten am Rattenfemur. Die Knochendefekte wurden mit Hilfe von Bio-Oss augmentiert und immunhistochemisch mittels alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und EDI (Anti-Ratte-Makrophagen) analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich nach drei Tagen alkalische Phosphatase positive Osteoblasten auf der oberflächlichen Schicht von Bio-Oss Partikeln befanden. Nach fünf Tagen wurde eine partielle Knochenneubildung auf der Oberfläche von Bio-Oss Teilchen gesehen sowie eine intensive Osteocalcin-Immunopositivität. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der physiologische Knochenumbau von Ratten 10 bis 20-mal höher als bei Menschen ist (Vignery & Baron 1980). Das heißt, fünf Tage im Rattenknochen entsprechen 50 bis 100 Tagen im humanen Knochen.

Bei der CBFA1-Färbung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den augmentierten und nicht augmentierten Alveolen festgestellt werden. Es waren bei CBFA1 - mit durchschnittliche 65% positiver Zellen in den ungefüllten Alveolen und 57% in den gefüllten Alveolen - annähernd gleich viele osteogenen Zellen in den Biopsien vorhanden. Dieses steht im Einklang mit der Studie von Heberer und Mitarbeitern an 6 Wochen alten Extraktionsalveolen (ungefüllt: 72%, gefüllt mit Bio-Oss Collagen: 73%) (Heberer et al. 2012). Bei der Anzahl der OC positiven Zellen, also der vorhandenen Osteoblasten, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ungefüllt: 9%, gefüllt mit Bio-Oss Collagen: 9%). Heberer et al. ermittelten auch keinen Unterschied in 6 Wochen alten Biopsien (ungefüllt: 23%, gefüllt mit Bio-Oss Collagen: 20%).

Nur bei der OSN-Färbung konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den augmentierten Biopsien waren weniger Zellen immunreaktiv für OSN als in den Proben ohne Bio-Oss Collagen (ungefüllte: 61%, gefüllt mit Bio-Oss Collagen: 48%). Dieses deutet darauf hin, dass sich in den augmentierten Alveolen möglicherweise ein Teil der Zellen in einem früheren Reifungsstadium befindet als mit OSN nachweisbar, da in der Gesamtzellzahl osteogener Zellen (Nachweis durch CBFA1) kein Unterschied verzeichnet werden konnte.

Schlussendlich ist daher davon auszugehen, dass Bio-Oss Collagen keinen großen Einfluss auf die Anzahl und Zusammensetzung der osteogenen Zellen und der vorhandenen Osteoblasten hat.

Fazit

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um in 12 Wochen alten humanen Extraktionsalveolen das osteogene Potential von mesenchymalen Zellen zu untersuchen. Im Ergebnis zeigt sich, dass durchschnittlich mehr als die Hälfte der Zellen innerhalb der provisorischen Matrix unabhängig vom Augmentationsverfahren oder vom Alveolenbereich (apical/coronal) ein hohes osteogenes Potential besitzen. Der Osteoblastenanteil lag augmentationsunabhängig bei durchschnittlich 10%, wobei mehr Zellen coronal als apical nachgewiesen wurden. Es kann davon ausgegangen werden, dass in der späten Phase der Heilung - also nach 12 Wochen - die Umbauvorgänge langsamer erfolgen und die Osteoblastenaktivität eher im coronalen Bereich der Alveole zu finden ist. Das durchgeführte Augmentationsverfahren hat keinen Einfluss auf die Anzahl der osteogenen Zellen und Osteoblasten.

Diese Studie verdeutlicht, dass das noch vorhandene Weichgewebe innerhalb der 12 Wochen alten Extraktionsalveole ein hohes osteogenes Potential mit unterschiedlichen Reifegraden besitzt und im Rahmen einer Implantatinserktion nicht aus der Implantationsalveole entfernt werden muss.

8. Zusammenfassung

Erkenntnisse über den Heilungsprozess humaner Extraktionsalveolen sind notwendig, um funktionale und ästhetische Anforderungen in der Implantattherapie zu verbessern.

Nach Zahnextraktion verheilt die Alveole kaskadenartig. Zuerst bildet sich am Extraktionstag ein Blutkoagulum, welches in den folgenden Tagen zunehmend von Bindegewebszellen und Blutgefäßen infiltriert wird. Es entsteht eine provisorische Matrix, die durch mesenchymale Zellen gekennzeichnet ist. Die Zusammensetzung und Identität dieser mesenchymalen Zellen wurde untersucht, um Stadien der Heilungsverläufe und damit der Knochenneubildung evaluieren zu können. Des Weiteren wurde analysiert, in wieweit xenogene Knochenersatzmaterialien die alveoläre Heilung nach Zahnextraktion beeinflussen.

Zielstellung der vorliegenden klinischen Studie war die immunhistologische Beurteilung des osteogenen Potentials mesenchymaler Zellen eingebettet in die provisorische Matrix von gefüllten und ungefüllten Extraktionsalveolen nach einer Einheilzeit von 12 Wochen.

Insgesamt waren 40 Extraktionsalveolen von 23 Patienten Gegenstand dieser Untersuchung. Nach der Extraktion der Zähne wurden alle Alveolen sorgfältig kürettiert und anschließend in 22 Alveolen Bio-Oss Collagen appliziert. 18 Extraktionsalveolen wurden der Selbstheilung überlassen. Es erfolgte keine primäre Deckung der Alveolen. Nach 12 Wochen Einheilzeit wurden im Rahmen der Implantation mit Hilfe eines Trepanbohrers Biopsien entnommen und immunhistologisch ausgewertet. Das osteogene Potential mesenchymaler Zellen wurde mittels der monoklonalen Antikörper CBFA1, Osteonectin (OSN) und Osteocalcin (OC) untersucht und quantitativ erfasst. Des Weiteren wurde evaluiert, ob hinsichtlich des Vorhandenseins osteogener Zellen ein Unterschied zwischen den gefüllten und ungefüllten Extraktionsalveolen sowie zwischen den coronalen und apicalen Regionen der Alveolen besteht. Die statistische Auswertung erfolgte mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse und dem Spearman´s rank order coefficient.

Innerhalb der provisorischen Matrix der nicht augmentierten Alveolen lagen die Durchschnittswerte der positiv markierten Zellen für CBFA1 bei 65%, für OSN bei 61% und für OC bei 9%. Im Vergleich dazu waren bei den mit Bio-Oss Collagen augmentierten Alveolen durchschnittlich 57% der Zellen CBFA1, 48% OSN und 9% OC positiv markiert. Der Vergleich der Messungen zeigte keinen Unterschied zwischen den

augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen, aber hinsichtlich der Region (coronal/apical). Es waren signifikant mehr Zellen im coronalen Bereich OC positiv gefärbt ($P=0.001$) als apical.

Um den osteoblastären Differenzierungsweg der mesenchymalen Zellen innerhalb der provisorischen Matrix von Extraktionsalveolen nach 12 Wochen Einheilzeit zu bestimmen, wurden in der vorliegenden immunhistochemischen Untersuchung drei Antikörper verwendet. CBFA1 ist der früheste Marker der Knochenentwicklung, lässt aber keinen Rückschluss auf den Reifegrad der osteogenen Zellen zu. OSN ist ein matrixzelluläres Glykoprotein, welches während der Differenzierung von reifen Osteoprogenitorzellen zu reifen Osteoblasten sezerniert wird. OC als später Marker der osteoblastären Reifungslinie detektiert das Stadium der unreifen bis reifen Osteoblasten.

Die Ergebnisse der CBFA1 Messungen zeigen, dass durchschnittlich mehr als die Hälfte der Zellen innerhalb der provisorischen Matrix - unabhängig vom Augmentationsverfahren oder vom Bereich (apical/coronal) - ein osteogenes Potential zeigten. Der Anteil der Osteoblasten lag augmentationsunabhängig bei durchschnittlich 10%, wobei mehr Zellen coronal als apical gemessen wurden. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass in der frühen Phase der Heilung in Extraktionsalveolen die Knochenneuformation vom apicalen Bereich der Alveole ausgeht. Anhand der vorliegenden Erkenntnisse wird deutlich, dass in der späten Phase der Heilung - also nach 12 Wochen - die Umbauvorgänge langsamer erfolgen und die Osteoblastenaktivität eher im coronalen Bereich der Alveole zu finden ist.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich das Aktivitätszentrum der osteoblastären Reifung über die Zeit der Heilung der Extraktionsalveole verändert.

9. Summary

Further knowledge about the healing process of the extraction socket is necessary to improve functional and aesthetic requirements in implant therapy. The healing of an extraction socket following tooth removal includes a series of events. After initial coagulation and maturation of the blood clot there is an infiltration of fibroblast to replace the coagulum and establish a provisional matrix with mesenchymal cells. The aim of the present clinical investigation was to evaluate the osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix of grafted and ungrafted extraction sockets after a 12-week healing period.

A total of 23 patients with 40 extraction sites participated in this study. After tooth extraction, 22 sockets were augmented with Bio-Oss collagen and 18 were non-augmented. After twelve weeks, bone biopsies were obtained at the implant placement site. An immunohistochemical analysis of the osteogenic potential of the mesenchymal cells within the provisional matrix of these specimens was performed using three monoclonal antibodies: CBFA1, Osteonectin (OSN), and Osteocalcin (OC). For the statistical analysis, the two-factorial analysis for repeated measurements and Spearman's rank-order correlation coefficient were used.

After the twelve-week healing period, the median amount of CBFA1 positive cells in the provisional matrix of the non-grafted sockets was 65 %, of OSN 61%, and of Osteocalcin 9%. In the grafted sockets the median rate of immunopositive cells staining with CBFA1 was 57%, of OSN 48%, and of OC 9%. While no difference was found between the augmented and non-augmented sockets, there was a difference between the coronal and apical regions of the socket: OC was significantly higher in the apical region ($P = 0.001$).

This study was designed to investigate the osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix of human extraction sockets. The immunohistochemical analysis showed that after a twelve-week healing period, two-thirds of the cells embedded in the provisional matrix are osteogenic cells. The provisional matrix displayed a high osteogenic potential with osteoblastic activity. CBFA1 is expressed early in every future osteoblast, but the degree of maturation is not definable with this protein. The protein OSN is expressed in cells of osteogenic cell lineage at the beginning of the differentiation to mature osteoprogenitor cells. In

contrast, OC is a late osteogenic marker and detects immature and mature osteoblasts. After a twelve-week healing period there are more osteoblasts in the coronal region than the apical region. The grafting procedure did not influence the quantity of osteogenic cells in the extraction socket.

10. Literaturverzeichnis

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.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960 Jul;61:32-44.

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969 Mar;27(3):309-18.

Aranguren XL, Verfaillie CM, Luttun A. Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease. *J Mol Med*. 2009 Jan;87(1):3-16.

Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 Feb;32(2):212-8.

Araujo MG, Sukekava F, Wennstrom JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 Jun;32(6):645-52.

Araujo M, Linder E, Wennstrom 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.

Araujo M, Linder E, Lindhe J. Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jan;20(1):1-6.

Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):433-40.

Araujo MG, Liljenberg 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.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*. 2000 Jun;71(6):1015-23.

Artzi Z, Nemcovsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological stainings in 10 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Aug;13(4):420-7.

Atwood D. Postextraction changes in the adult mandible as illustrated by microradiographs of midsagittal sections and serial cephalometric roentgenograms. *J Prosthet Dent.* 1963;13:810-24.

Atwood DA. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J Prosthet Dent.* 1971 Sep;26(3):266-79.

Aubin J, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic lineage in *Cellular and Molecular Biology of Bone*: Noda M. London: Academic Press; 1993.

Aubin JE, Turksen K. Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc Res Tech.* 1996 Feb 1;33(2):128-40.

Baldini G, Ponti C, Bortul R, Narducci P, Grill V, Martelli AM. Sparc localizes to the blebs of hobit cells and human primary osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2008 Aug 15;104(6):2310-23.

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.

Bieback K, Kluter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007 Dec;2(4):310-23.

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.

Boyne PJ. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966 Jun;21(6):805-13.

Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997 Sep;21(3):225-35.

Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct(355 Suppl):S247-56.

Brunner E, Domhof S, Langer F. *Non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments.* New York: Wiley. 2003.

Cardaropoli G, Araujo 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.

Cardaropoli G, Araujo 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.

Cardaropoli D, Tamagnone L, Roffredo A, Gaveglio L, Cardaropoli G. Socket preservation using bovine bone mineral and collagen membrane: a randomized

controlled clinical trial with histologic analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2012 Aug;32(4):421-30.

Carinci F, Piattelli A, Degidi M, Palmieri A, Perrotti V, Scapoli L, et al. Genetic effects of anorganic bovine bone (Bio-Oss) on osteoblast-like MG63 cells. *Arch Oral Biol*. 2006 Feb;51(2):154-63.

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.

Chao EY, Inoue N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur Cell Mater*. 2003 Dec 31;6:72-84; discussion -5.

Chen S, Buser D. Implants in post-extraction sites: A literature update. In: Buser D, Belser U, Wismeijer D (eds). *ITI Treatment Guide. Vol 3: Implants in extraction sockets*. Berlin: Quintessence, 2008

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.

Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res*. 1998 Nov;13(11):1760-7.

Clafin R. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1936;23:945-59.

Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int*. 1998 Jan;62(1):74-82.

Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2588-96.

Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Dec;31(6):641-5.

Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 2000 Dec;219(4):461-71.

Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res*. 2007 Jan;22(1):1-6.

Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010 Dec;11(4):219-27.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. 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.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol.* 1982 Feb;53(2):81-5.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Stappert CF, Stein JM, Hurzeler MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *J Clin Periodontol.* 2008 Oct;35(10):906-13.

Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:196-207.

Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis--Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998 Dec;18(6):528-43.

Fugazzotto PA. Treatment options following single-rooted tooth removal: a literature review and proposed hierarchy of treatment selection. *J Periodontol.* 2005 May;76(5):821-31.

Garg A. *Knochen-Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie*: Quintessenz Verlag-GmbH; 2006.

Gholami GA, Najafi B, Mashhadiabbas F, Goetz W, Najafi S. Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Oct;23(10):1198-204.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):27-35.

Grabowski P. Physiology of bone. *Endocr Dev.* 2009;16:32-48.

Greenbaum MA, Kanat IO. Current concepts in bone healing. Review of the literature. *J Am Podiatr Med Assoc.* 1993 Mar;83(3):123-9.

Hammerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:151-75.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989 Jul;69(3):990-1047.

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.

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.

- Heberer S, Wustlich A, Lage H, Nelson JJ, Nelson K. Osteogenic potential of mesenchymal cells embedded in the provisional matrix after a 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.
- Hees H. *Histologie-Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*: Deutscher Ärzte-Verlag Köln; 2000.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung*. 4. Auflage: Elsevier GmbH, München; 2007.
- Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun;16(6):975-84.
- Hurzeler MB, Quinones CR, Kirsch A, Gloker C, Schupbach P, Strub JR, et al. Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bovine-derived bone matrix. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Dec;8(6):476-86.
- Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, Kreja L, Schoengraf P, Lisson P, et al. The Anaphylatoxin Receptor C5aR Is Present During Fracture Healing in Rats and Mediates Osteoblast Migration In Vitro. *J Trauma.* 2011 Mar 31.
- 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 J.* 2001 Aug 1;20(15):4132-42.
- Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res.* 2000 Jun;35(3):115-26.
- Jerosch J, Bader A, Uhr G. *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*: Georg-Thieme Verlag; 2002.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. 4. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag 2005.
- Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 2003 Oct;48(10):723-30.
- Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, et al. Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone.* 1999 Jul;25(1):107-8.
- Karsenty G. Bone formation and factors affecting this process. *Matrix Biol.* 2000 May;19(2):85-9.
- Kemp KC, Hows J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma.* 2005 Nov;46(11):1531-44.

Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Aug;8(4):494-9.

Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 2008;13:898-903.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):189-95.

Kuboki Y, Hashimoto F, Ishibashi K. Time-dependent changes of collagen crosslinks in the socket after tooth extraction in rabbits. *Journal of Dental Research.* 1988 Jun;67(6):944-8.

Kuroiwa M, Chihara K, Higashi S. Electron microscopic studies on Sharpey's fibers in the alveolar bone of rat molars. *Kaibogaku Zasshi.* 1994 Dec;69(6):776-82.

Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):163-73.

Lee DW, Pi SH, Lee SK, Kim EC. Comparative histomorphometric analysis of extraction sockets healing implanted with bovine xenografts, irradiated cancellous allografts, and solvent-dehydrated allografts in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jul-Aug;24(4):609-15.

Lengner CJ. iPS cell technology in regenerative medicine. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1192:38-44.

Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Biochem Soc Trans.* 1998 Feb;26(1):14-21.

Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994 Dec;240(4):492-506.

Lin Z, Rios HF, Volk SL, Sugai JV, Jin Q, Giannobile WV. Gene Expression Dynamics During Bone Healing and Osseointegration. *J Periodontol.* 2010 Dec 13.

Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand.* 1996 Aug;67(4):407-17.

Lindner J. Bone healing. *Clin Plast Surg.* 1977 Jul;4(3):425-37.

Lüllmann-Rauch R. *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen*: Georg-Thieme Verlag; 2003.

Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res.* 1995 Jan;216(1):35-45.

- Mangos J. The healing of extraction wound. An experimental study based on microscopic and radiographic investigations. *N Z Dent J.* 1941;37:4-24.
- Marks S, Hermey D. The structure and development of bone. In: Bilezikian J, Rodan G, editors. *Principles of Bone Biology.* London: Academic Press; 1996. p. 9-14.
- Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4):267-76.
- Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1995 Apr(313):19-26.
- 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.* 2012 Mar 30. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02462.x.
- Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Dec;14(6):775-83.
- Paccione MF, Warren SM, Spector JA, Greenwald JA, Bouletreau PJ, Longaker MT. A mouse model of mandibular osteotomy healing. *J Craniofac Surg.* 2001 Sep;12(5):444-50.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10.
- 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.
- Petrokovski J, Starinsky R, Arensburg B, Kaffe I. Morphologic characteristics of bony edentulous jaws. *J Prosthodont.* 2007 Mar-Apr;16(2):141-7.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 May;73(5):1447-51.
- Price PA, Lothringer JW, Nishimoto SK. Absence of the vitamin K-dependent bone protein in fetal rat mineral. Evidence for another gamma-carboxyglutamic acid-containing component in bone. *J Biol Chem.* 1980 Apr 10;255(7):2938-42.
- Quirynen M, Van Assche N, Botticelli D, Berglundh T. How does the timing of implant placement to extraction affect outcome? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22 Suppl:203-23.

- Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999 Aug;45(8 Pt 2):1353-8.
- Reed MJ, Sage EH. SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;213 (Pt 1):81-94.
- Robey P, Boskey A. Extracellular matrix and biomineralization in bone. In: Favus M, editor. *Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism*. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. p. 12-9.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:455-98.
- Sage H, Vernon RB, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe ML. Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem*. 1989 Jun;37(6):819-29.
- Schmid J, Hammerle CH, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Sep;5(3):125-30.
- 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*. 2003 Aug;23(4):313-23.
- Scott F. *Developmental Biology* Swarthmore College, Sundeland: Sinauer Associates; 2000.
- Simson H. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in macacus rhesus monkeys. *J Oral Surg*. 1960;18:391-9.
- Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*. 2006 Apr;7(4):319-27.
- Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Source Plast Reconstr Surg*. 2001 Jan;107(1):124-34.
- Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol*. 1999 Jun;13(6):819-28.
- Steele D, Bramlette C. *The Anatomie and Biology of the Human Skeleton*: Texas A&M University Press; 1988.
- Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Jun;15(3):315-24.

Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Dec;10(6):510-21.

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(1 Pt 1):99-105.

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.

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.

Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):132-8.

Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 1980 Feb;196(2):191-200.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998 Jul 15;102(2):274-82.

Włodarski KH. Alkaline and acid phosphatase activity in murine femoral bone marrow following X-irradiation, or X-irradiation and repopulation with syngenic or allogeneic bone marrow or marrow stroma cells. *Folia Biol (Krakow).* 1990;38(1-4):49-56.

Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* Berlin: Verlag von August Hirschwald; 1892.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 2000 Aug;21(4):393-411.

11. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AB	Humanes AB Serum
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti- Alkalische-Phosphatase
BGP	gamma-carboxyglutamic acid-containing protein
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
CBFA1	Core Binding Factor Alpha subunit 1
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
ECTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
IgG	Immunglobulin G
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
OC	Osteocalcin
OK	Oberkiefer
OSN	Osteonectin
PD	Privatdozent/in
Pebp2alphaA	Polyoma enhancer binding protein
ROI	Region of interest
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SPARC	secreted protein acidic and rich in cystein
UK	Unterkiefer
ZT	Zimmertemperatur
µg	Mirkogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

12. Lebenslauf

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

13. Publikationsliste

Nack C, Lage H, Nelson JJ, Stricker A, Nelson K, Nahles S: Immunhistochemische Analyse des osteogenen Potentials mesenchymaler Zellen von augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen nach 12 Wochen Einheilzeit. Poster, 25. Kongress der DGI, Dresden, 2011.

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. 2012 Mar 30. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02462.x.

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. Vortrag, 27th Annual Meeting, Phoenix, Arizona, 2012.

14. Danksagung

Frau Prof. Dr. Katja Nelson danke ich sehr für die Überlassung des Promotionsthemas, sowie die hilfreiche und persönliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders erwähnen und danken möchte ich Frau Dr. Susanne Nahles, die mich kompetent und freundlich in allen Phasen der Dissertation geduldig betreut hat und damit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bodo Hoffmeister danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der Forschungseinrichtung.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Ute Kruse-Boitschenko für ihre Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der labortechnischen Arbeiten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Gerda Siebert für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Meinem Freund Christian danke ich, dass er mich wohlwollend und verständnisvoll während der gesamten Zeit unterstützt und motiviert hat.

Mein herzlichster Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und die Durchführung dieser Arbeit mit großem Interesse verfolgten.

15. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Claudia Nack, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Immunhistochemische Analyse des osteogenen Potentials mesenchymaler Zellen von augmentierten und nicht augmentierten Extraktionsalveolen nach 12 Wochen Einheilzeit* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift