

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der  
Universität Freiburg  
eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die  
Knochenregeneration im Sinuslift beim Schaf**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Kerstin Stubbe**  
Tierärztin  
aus Walsrode

Berlin 2009  
Journal Nr.: 3348

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Leo Brunnberg  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Gutwald  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

sheep, experimental animals, animal models, stem cells, bone marrow, bone formation, bone regeneration [MeSH], alveolar ridge augmentation [MeSH], Bio-Oss [MeSH], Bone substitutes [MeSH]

Tag der Promotion: 05.02.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-762-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

**Meinen Eltern**



**Inhalt**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Knochen</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Zusammensetzung und Aufbau des Knochengewebes .....	3
2.1.1.1	Der Geflecht- oder Faserknochen .....	3
2.1.1.2	Der Lamellenknochen .....	4
2.1.2	Knochenqualität und Knochenquantität im Oberkieferknochen.....	5
<b>2.2</b>	<b>Anatomie des Schafschädels im Bereich der Kieferhöhle</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Methoden zum Knochenaufbau mit autologem Knochenmaterial</b> .....	<b>7</b>
2.3.1	Knochenauflagerung .....	7
2.3.2	Distractionsosteogenese .....	8
2.3.3	Sinusaugmentation .....	8
2.3.3.1	Goldstandard .....	8
<b>2.4</b>	<b>Methoden zum Knochenaufbau mit Ersatzmaterialien</b> .....	<b>9</b>
2.4.1	Tissue Engineering .....	9
2.4.1.1	Scaffolds .....	10
2.4.1.1.1	Bio-Oss® .....	10
<b>2.5</b>	<b>Mesenchymale Stammzellen</b> .....	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Studiendesign und Gruppeneinteilung</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Operation</b> .....	<b>14</b>
3.3.1	Narkoseregime.....	15
3.3.2	Sinusbodenelevation .....	16
<b>3.4</b>	<b>Augmentationsmaterialien</b> .....	<b>17</b>
3.4.1	Bovines Knochenersatzmaterial .....	18
3.4.2	Mesenchymale Stammzellen.....	19
3.4.2.1	Gewinnung des Knochenmarksaspirates .....	19
3.4.2.2	Isolierung der mononukleären Zellen .....	19
3.4.2.3	Isolierung mesenchymaler Stammzellen .....	21

<b>3.5</b>	<b>Postoperativer Verlauf</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Polychrome Fluoreszenzmarkierung</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7</b>	<b>Computertomographische Volumenbestimmung</b> .....	<b>25</b>
<b>3.8</b>	<b>Entnahme und Aufbereitung der Prüfkörper</b> .....	<b>27</b>
3.8.1	Herstellung der histologischen Präparate .....	28
3.8.2	Mikroskopische Auswertung .....	30
<b>3.9</b>	<b>Histomorphometrische Auswertung</b> .....	<b>30</b>
<b>3.10</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1	Versuchsverlauf .....	35
4.2	Mesenchymale Stammzellen .....	36
4.3	Computertomographische Volumenbestimmung .....	39
4.4	Histomorphometrische Resultate .....	41
4.5	Histologische Beobachtungen .....	46
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
	Anmerkungen zum Tiermodell .....	48
	Tissue Engineering .....	49
	Bovines Knochenersatzmaterial .....	50
	Mesenchymale Stammzellen .....	52
	Histomorphometrische und histologische Ergebnisse .....	55
	Computertomographische Volumenbestimmung .....	57
<b>5.1</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Zitierte Literatur</b> .....	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>74</b>

### 1. Einleitung

Die Lebensqualität eines Menschen ist in hohem Maße abhängig von seinem Gesundheitszustand. Neben vielen weiteren Anteilen des Organismus, die hierbei wichtig sind, kommt dem der Zahngesundheit altersübergreifend eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu. Die Erhaltung beziehungsweise Wiederherstellung der Zahngesundheit ist somit von entscheidender Bedeutung. Hierzu zählt auch der festsitzende Zahnersatz. Er ist, abhängig vom Patientenalter, häufig implantatgetragen und trägt entscheidend zur Wiederherstellung oder auch Steigerung der Lebensqualität eines Menschen bei (JOHN et al. 2004a; JOHN et al. 2004b; KARLSSON et al. 1995).

Weil im Oberkiefer im Vergleich zum Unterkiefer eine herabgesetzte Knochenqualität und Knochenquantität bestehen, treten dort häufiger Probleme hinsichtlich der Stabilität und Integration eines Implantats auf (ESPOSITO et al. 1999; FRIBERG et al. 1995; TRUHLAR et al. 1997). In dieser Studie soll daher eine Ergänzung zu bereits bestehenden Methoden zum Knochenaufbau in diesem Bereich getestet werden, mit dem Ziel, die Entnahmemorbidität zu senken und die Behandlungsdauer zu verkürzen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Knochenaufbau im Bereich des posterioren Oberkiefers. Es wurde das Schaf als Tiermodell gewählt. Im Splitmouthverfahren wurden zwei verschiedene Methoden des Knochenaufbaus verglichen. Das bedeutet, dass auf der einen Seite eine Sinusbodenaugmentation mit einer bovinen Knochenersatzmatrix (Bio-Oss<sup>®</sup>) durchgeführt wurde. Hierbei handelt es sich um die Kontrollseite. Auf der anderen Seite, der Testseite, wurde das Knochenersatzmaterial eingesetzt, nachdem es mit mesenchymalen Stammzellen angereichert wurde.

Verschiedene Studien belegen bereits sowohl die positiven, osteoinduktiven Effekte mesenchymaler Stammzellen als auch die Osteokonduktivität des bovinen Knochenersatzmaterials Bio-Oss<sup>®</sup> (HÜRZELER et al. 1997; VALENTINI et al. 2003).

Im Tierversuchsmodell wurde geprüft, inwieweit mesenchymale Stammzellen zusammen mit dem bovinen Knochenersatzmaterial einen osteoinduktiven Effekt im Sinuslift besitzen. Es wurde direkt zwischen bovinem Knochenersatzmaterial allein und in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen verglichen.

Dabei wurden test- und kontrollseitig röntgenologisch, histologisch und histomorphometrisch vergleichend Befunde erhoben. Die Resultate sollten Rückschlüsse zulassen zur eventuell erforderlichen Anwendung mesenchymaler Stammzellen bei der Sinusbodenelevation mit bovinem Knochenersatz im Tiermodell.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Der Knochen**

Der ausdifferenzierte Knochen ist, zusammen mit dem Zahnbein, nach dem Zahnschmelz die härteste Substanz des Körpers. Wird er trotz seiner hohen Druck- und Zugfestigkeit plötzlich überbeansprucht, bricht er. Bei mäßig veränderter Belastung passt er sich der veränderten Statik durch Umbauvorgänge an. Die besonders im Rahmen seiner Funktion als Stützgewebe notwendige physikalische Härte erlangt der Knochen durch in die fibrilläre Grundsubstanz eingelagerte Kalksalze. Außerdem ist der Knochen als bedeutendes Stoffwechselorgan enorm vaskularisiert, was zu seiner biologischen Plastizität beiträgt.

Der Knochen ist vom Periost umgeben. Es ermöglicht über seine Fortsetzung bis in die Gelenkkapsel die gelenkige Verbindung der Knochen untereinander. Es ist unter anderem entscheidend für Ernährung und Wachstum des Knochens (LEONHARDT 1990).

Der Knochen entsteht durch direkte (desmale) Ossifikation aus dem Mesenchym (Knochenstammzellen) oder indirekt (chondral) über ein Knorpelmodell (peri- oder enchondral). Der zunächst gebildete Knochen ist immer der Geflechtknochen, der durch Lamellenknochen ersetzt wird. Qualitativ weisen beide die gleiche Zusammensetzung auf, quantitativ unterscheiden sie sich in den einzelnen Bestandteilen (LEONHARDT 1990; LIEBICH 1993).

#### **2.1.1 Zusammensetzung und Aufbau des Knochengewebes**

##### **2.1.1.1 Der Geflecht- oder Faserknochen**

Der Geflecht- oder Faserknochen ist die einfachere Form des Knochens, die auch den Vorläufer des weiter differenzierten Lamellenknochens bildet. Zu diesem wird er bereits im Laufe der ersten Lebensjahre umgewandelt. Zu den Organen, in denen er zeitlebens erhalten bleibt, zählen das knöcherne Labyrinth des Ohres, der äußere Gehörgang und die Ansatzstellen größerer Sehnen an Knochen. Histologisch ist diese Knochenart zellreich, mit ungeordneten Osteozyten in der knöchernen Matrix (LIEBICH 1993).

Während der desmalen Ossifikation, die von Ossifikationspunkten ihren Ausgang nimmt und zentrifugal fortschreitet, differenzieren Mesenchymzellen zu Osteoblasten. Sie scheiden die Grundsubstanz des Knochens, das Osteoid, aus und produzieren Kollagen Typ I. Das

Kollagen aggregiert im Osteoid zu Kollagenfibrillen, in die beim Calcium-Phosphor-Stoffwechsel Kristalle eingelagert werden. Hierdurch nimmt die Härte des Knochens zu. Die Osteoblasten wandeln sich durch Umbauvorgänge zu Osteozyten. Später im Lamellenknochen stehen sie über ihre Zellfortsätze in Verbindung, die in den Haversschen und Volkmannschen Kanälen verlaufen.

Durch wachsende Beanspruchung wird der so entstandene Geflechtknochen zum Lamellenknochen umgebaut (LEONHARDT 1990).

Bei der chondralen Ossifikation entsteht aus dem Mesenchym zuerst ein Knorpelmodell des späteren Knochens, das durch ihn ersetzt wird. Auch diese Art der Ossifikation nimmt von Ossifikationspunkten ihren Ausgang. Sie verläuft dabei meistens in zwei Schritten: der perichondralen folgt die enchondrale Ossifikation. Am Beispiel der Röhrenknochen wird in der Phase der perichondralen Ossifikation zunächst ein Knorpelmodell des Knochens aus dem Perichondrium gebildet. Durch den Aufbau von Knochensubstanz, produziert von Osteoblasten, wächst der Knochen in die Länge. Chondrozyten wiederum resorbieren die Knorpelgrundsubstanz. Sie gehen anschließend zugrunde, was eine mangelhafte Versorgung der restlichen Grundsubstanz und eine Ausfällung von Kalksalzen zur Folge hat. In die sich auf diese Weise vergrößernde Knochenmanschette wächst schließlich ein Blutgefäß ein, das die Phase der enchondralen Ossifikation einleitet.

Dabei gehen aus Monozyten des Blutes Chondroklasten hervor, die in Aussehen und Tätigkeit den Osteoklasten gleichen. Mit der Produktion und Anlagerung von Osteoid und kollagenen Fibrillen wird so die Höhle des Knorpelmodells des Knochens verkleinert und die Knochenmanschette verstärkt. Der Raum im Innern des Knochens ist ausgefüllt mit Knochenbälkchen und Knorpelgrundsubstanzresten. Dazwischen befindet sich die Markhöhle.

Auch der sekundär entstandene Knochen wird später in lamellären Knochen umgewandelt (LEONHARDT 1990).

### **2.1.1.2 Der Lamellenknochen**

Der Umbau des Geflecht- zum Lamellenknochen geht mit weiterer Vaskularisation einher. So können mit dem Blut Osteoklasten in das System des Geflechtknochens gelangen, Knochensubstanz abbauen und anschließend Osteoblasten konzentrische Knochenlamellen aufbauen. Diese Lamellensysteme bauen den Geflechtknochen zum Lamellenknochen um.

Am Lamellenknochen unterscheidet man eine äußere Kortikalis und eine innere Spongiosa. Er ist gekennzeichnet durch seinen streng geordneten Aufbau. Sogenannte Osteone (Havers-Systeme) bilden seine strukturelle Grundlage. Die Osteone bestehen jeweils aus einem Zentralkanal, in welchen ein von mesenchymalem Bindegewebe umgebenes Gefäß eingebettet ist und den darin liegenden Nerven sowie aus einer unterschiedlichen Anzahl an Knochenlamellen. Zusammen mit kollagenen Fasern bilden diese Lamellen ein stabiles Netzwerk, das dem Knochen bei Zug- und Druckbelastungen Stabilität gibt. Durch das funktionelle Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile des Osteons erfüllt der Knochen neben seiner statisch- mechanischen Aufgabe auch eine bedeutende Funktion innerhalb der Stoffwechselregulation (LIEBICH 1993).

Im Alter nehmen die Spongiosastrukturen ab. Der Knochen wird insgesamt dünner. Ursachen sind zum einen die sinkende Skelettbeanspruchung und zum anderen hormonelle Alterationen (LEONHARDT 1990). Das Knochenmark degeneriert und wandelt sich in Fettgewebe um.

### **2.1.2 Knochenqualität und Knochenquantität im Oberkieferknochen**

Die Stabilität und Integration eines Implantats im Knochen ist von verschiedenen Faktoren insbesondere der Knochenqualität und -quantität abhängig. Auch die anatomische Lokalisation des Implantationsortes ist bedeutsam, aber weniger der Zeitpunkt der ersten okklusalen Belastung eines Implantates (ESPOSITO et al. 1999; FRIBERG et al. 1991; TRUHLAR et al. 1997). Eine erhöhte Implantatverlustrate ist belegt für den posterioren Bereich des Oberkiefers (BABBUSH et al. 1993; BUSER et al. 1997; DRAGO 1992; FRIBERG et al. 1991; FUGAZZOTTO et al. 1993; WEDGWOOD et al. 1992), weil verglichen zum Unterkiefer eine herabgesetzte Knochenqualität vorliegt. Sie ist bedingt durch eine dünnere Kortikalis und eine weniger dichte Spongiosa. Außerdem nimmt der Anteil des trabekulären Knochens im Oberkiefer posterior ab (FRIBERG et al. 1991; FRIBERG et al. 1995; ORENSTEIN et al. 1993; TRUHLAR et al. 1997). Die Knochenquantität wird im Oberkiefer begrenzt durch die Ausdehnung der Kieferhöhlen. Durch das altersbedingte Fortschreiten der Pneumatisation der Kieferhöhlen wird das Knochenangebot im Laufe der Zeit reduziert (SMILER et al. 1992; TRUHLAR et al. 1997). Die Stabilität eines Implantats ist nicht zuletzt abhängig von der anatomischen Lokalisation des Implantationsortes bzw. dem dort vorliegenden Knochenvolumen, in das das Implantat eingebracht werden kann. Eine

größtmögliche Implantatoberfläche ist anzustreben, weil sie direkt mit der Zeitdauer des festen Sitzes des Implantates korreliert (MEFFERT et al. 1992).

### **2.2 Anatomie des Schafschädels im Bereich der Kieferhöhle**

Der Gesichtsschädel setzt sich aus den Gesichtsschädelknochen (Ossa faciei) zusammen, die die Nasenhöhle (Cavum nasi) umschließen und die Nasennebenhöhlen (Sinus paranasales) beherbergen. Die Seitenfläche des Gesichts wird von Oberkieferbein (Maxilla), Zwischenkieferbein (Os incisivum), Jochbein (Os zygomaticum) und Tränenbein (Os lacrimale) gebildet.

Die Nebenhöhlen der Nase sind Hohlräume zwischen Außen- und Innenlamelle der Schädelknochen. Sie entstehen durch Ausstülpungen der Nasenschleimhaut bereits beim Fetus, erreichen ihre volle Ausdehnung aber erst nach dem Durchbruch der bleibenden Zähne. Es sind luftführende Höhlen, die mit der Nasenhöhle in Verbindung stehen. Durch die Pneumatisation der Schädelknochen können die Schädelknochen ihre Fläche vergrößern, während ihr Gewicht gering gehalten wird. Sie bieten so genügend Platz beispielsweise für den Ansatz von Muskeln und die Verankerung von Zähnen.

Die Schleimhaut der Nasennebenhöhlen bildet ein niedriges respiratorisches Epithel, deren Lamina propria mucosae dem Periost eng anliegt.

Die Kieferhöhle (Sinus maxillaris) pneumatisiert beim Wiederkäuer das Oberkieferbein und das Jochbein. Sie besitzt Verbindungen mit Tränenbein- (Sinus lacrimalis) und Gaumenhöhle (Sinus palatinus) sowie mit dem mittleren Nasengang der Nasenhöhle (Meatus nasi medius). Ihre orbitale Begrenzung bildet das Jochbein.

Der Körper der Maxilla trägt auf seiner Außenfläche (Facies facialis) die auf Höhe des 4. Backenzahnes vom Tuber faciale ausgehende Crista facialis. Sie zieht, wenig prominent, bogenförmig zum Jochbein. Der Jochbeinbogen (Arcus zygomaticus) ragt deutlich über die Seitenflächen des Schädeldaches hinaus. Im Bereich des Jochbogens werden die Schädelknochen von den Mm. masseter, zygomaticus und malaris sowie dem Gesichtshautmuskel M. cutaneus faciei bedeckt. Sie werden vom N. facialis bzw. dessen Ästen innerviert. Zwischen dem Gesichtshautmuskel und der Gesichtsmuskulatur befindet sich die tiefe Kopffaszie, der die größeren Kopfgefäße (Äste der A. masseterica und der V. maxillaris) aufliegen (NICKEL et al. 1992; LIEBICH 1993).

## **2.3 Methoden zum Knochenaufbau mit autologem Knochenmaterial**

Lokale Probleme bei der Osseointegration lassen sich mit Hilfe verschiedener Verfahren, wie dem der Knochenauflagerung oder dem der Osteoinduktion (NEUKAM et al. 2000) verbessern.

### **2.3.1 Knochenauflagerung**

Die Knochenauflagerung ist eine Möglichkeit, um ein sowohl vertikal als auch horizontal unzureichendes Knochenangebot zu verbessern. Ihr Ziel ist die Rekonstruktion von Kieferkammdefekten oder Knochenatrophien. Als Augmentationsmaterial werden autologe Knochenblöcke eingesetzt, die in der Regel intraoral aus dem Unterkiefer, bevorzugt von Kinn, horizontalem Unterkieferast und retromolarer Region gewonnen werden. Dabei kann allerdings in diesem Bereich der N.alveolaris inferior geschädigt werden. Außerdem kann oft nicht genügend Material gewonnen werden, so dass ein zweiter Entnahmeort gewählt werden muß (SCHLIEPHAKE et al. 1994). Kann der Bedarf an Knochenmaterial durch Entnahme im Bereich des Unterkiefers nicht gedeckt werden, stellt der Beckenkamm eine Alternative dar. Dazu muss ein zweites Operationsfeld geschaffen und der Eingriff in Inhalationsnarkose vorgenommen werden (GERNGROSS et al. 1982).

Auch methodisch kann sich dies problematisch zur Integration des Transplantats in die umgebenden Strukturen erweisen, weil der autologe Knochenblock ein zu großes Augmentationsvolumen hat. Auch der Wundverschluss gelingt oft nicht vollständig oder nur unter erhöhter Spannung. Um dies zu verhindern, muss das Weichgewebe mobilisiert werden. Im Kieferbereich wird dazu häufig das Periost geschlitzt. Eine aus Spannung resultierende Durchblutungsstörung des Wundgebietes wirkt sich auch auf das Transplantat aus, das sich deswegen infizieren kann. Im speziellen Fall der Augmentation im Bereich des Oberkiefers kommt hier die geringe Menge an zur Verfügung stehender, mobilisierbarer Schleimhaut erschwerend hinzu. Durch die anatomische Begrenzung nach palatinal durch die Aa.palatinae und die Nn. palatinae muss die Schleimhaut von vestibulär mobilisiert werden. Dies zieht sowohl den Verlust des Vestibulum, als auch der ihr anhaftenden Gingiva nach sich, so dass wiederum das Implantat nicht ungestört einheilen kann. Die Einheilzeit von Knochenauflagerungen ist meist nach sechs Monaten abgeschlossen. Erst dann können Implantate eingebracht werden, da während der Revaskularisation ablaufende Knochenresorptionsvorgänge in diesem Bereich vorher noch nicht abgeschlossen sind (NEUKAM et al. 2000).

### **2.3.2 Distraktionsosteogenese**

Zur vertikalen Knochengewinnung ist auch die Distraktionsosteogenese möglich. Erstmals beschrieben wurde diese 1971 durch Ilizarov für lange Röhrenknochen (ILIZAROV 1971). Am Oberkieferknochen werden dazu kontinuierlich Teile des Alveolarfortsatzes in Form einer vertikalen Distraktion von Alveolarfortsatzfragmenten angehoben (HIDDING et al. 1999; NEUKAM et al. 2000). Reparaturmechanismen des Knochens folgen und verschließen den Defekt. Während dieser Prozedur dehnt und vermehrt sich kontinuierlich das umgebende Weichgewebe. Die Knochenneubildung geschieht unter vertikalem Höhengewinn. Das Infektionsrisiko ist als reduziert anzusehen, da es sich um eine geschlossene Methode handelt. Nachteilig dabei sind die notwendigen engmaschigen Kontrollen postoperativ sowie die sich daraus ergebende lange Therapiedauer vor der Implantation. Sie kann etwa drei Monate nach Abschluss der Distraktionsosteogenese vorgenommen werden.

### **2.3.3 Sinusaugmentation**

Ungünstige Implantationsvoraussetzungen im posterioren Oberkieferbereich können auch durch eine Sinusaugmentation verbessert werden. Erstmals beschrieben 1980 (BOYNE et al. 1980) wurde sie seither regelmäßig erfolgreich angewendet. Die Methode erlaubt eine Kieferkammerhöhung in den Sinus und nicht in die Mundhöhle.

#### **2.3.3.1 Goldstandard**

Der „Goldstandard“ für die Sinusaugmentation im Hinblick auf das Augmentationsmaterial ist es, autologe Beckenkammpongiosa einzusetzen, weil sie Zellen mit osteogenem Potential enthält und so als Wachstumsschiene mit osteoinduktiven Eigenschaften dient (BURCHARDT 1983).

Osteoblasten überleben nachweisbar in freien Knochentransplantaten (AXHAUSEN 1962). Bis zur vollständigen Revaskularisation geht der größte Teil von ihnen jedoch zugrunde. Die Überlebensrate ist abhängig von Transplantateigenschaften und der Qualität des Transplantatlagers (AEBI et al. 1989; AXHAUSEN 1962).

Die Vorzüge von Spongiosatransplantaten gegenüber soliden Kortikalistransplantaten liegen in ihrer größeren osteogenen Potenz (DUMBACH 1987; LENTRODT et al. 1985). Da die Ernährung der Zellen durch Diffusion gewährleistet wird, bieten Spongiosatransplantate

durch bessere Vaskularisation und höhere Umbaurate günstigere Voraussetzungen für das Überleben der Osteoblasten (ROESGEN 1991).

### **2.4 Methoden zum Knochenaufbau mit Ersatzmaterialien**

#### **2.4.1 Tissue Engineering**

Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde erstmals von Vertretern der US-amerikanischen National Science Foundation (NSF) in Washington, DC, 1987 verwendet. Im folgenden Jahr wurde auf der 1. Konferenz zum Tissue Engineering in Lake Tahoe, Californien, Tissue Engineering definiert als “die Anwendung der Prinzipien und Methoden des Ingenieurs- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkungen von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktion“ (LANGER et al. 1993).

Beim Tissue Engineering werden dem Körper entnommene Zellen außerhalb des Körpers vermehrt und kultiviert. Später werden sie wieder in den Spenderorganismus eingebracht. Die Kultivierung der Zellen geschieht dabei auf so genannten Scaffolds (dt. Gerüst). Sie bestehen aus Biomaterialien, auf die die Zellen verpflanzt werden und die später, gegebenenfalls nach Hinzusetzen von Wachstumsfaktoren, wieder in den Körper eingebracht werden. In anderen Techniken ist es möglich, die Zellen zusammen mit einem Biomaterial zu verpflanzen, ohne sie vorher zu kultivieren (LANGER et al. 1993; VACANTI et al. 1993).

Der Gewebeersatz über Tissue Engineering wird heute in allen chirurgischen Disziplinen eingesetzt. In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wird damit präprothetisch das Knochenangebot im kaudalen Oberkieferbereich und damit das Implantatlager verbessert. Die dazu erforderliche Augmentation des Kieferhöhlenbodens wird von Boyne und James (1980) erstmals beschrieben. Als Augmentationsmaterial verwandten sie autologen spongiösen Knochen.

In dieser Studie wird die Sinusaugmentation mit einer als Scaffold dienenden allogenen Knochenmatrix durchgeführt. Über Tissue Engineering werden der Knochenmatrix testseitig autogene mesenchymale Stammzellen zugefügt. Aus ihnen gehen Progenitorzellen hervor, die sich zu Präosteoblasten und Osteoblasten entwickeln können. Sie sind an der Bildung

der Knochenmatrix beteiligt und leben im ausgereiften Knochen als Osteozyten weiter. Aufgabe des Scaffolds ist es, den Zellen als Leitschiene für die Wachstumsrichtung zu dienen, um so die Knochenheilung osteokonduktiv zu fördern. Man bezeichnet dies als Osteokonduktion. Wird dabei die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich Progenitorzellen osteogen weiterentwickeln, was z.B. durch Zusatz von Wachstumsfaktoren erreicht werden kann, ist dies osteoinduktiv.

### **2.4.1.1 Scaffolds**

Zum Tissue Engineering werden Trägermaterialien, sogenannte Scaffolds, benötigt. Sie sollen Zellhaftung und Zellwachstum ermöglichen. Zusätzlich können Zellmigration und Zellproliferation durch induktive Wachstums- und Differenzierungsfaktoren unterstützt werden. Anforderungen an ein Scaffold sind eine gute Biokompatibilität und eine hochporöse Oberflächenstruktur (BURG et al. 2000; HUTMACHER 2000). Sie bestehen aus unterschiedlichsten Trägermaterialien. Scaffolds können von Geweben (Knochen, Haut, Schleimhaut) entstammen oder als biologische Polymere (Kollagen, Alginat, Hyaluronsäure, Fibrin), mineralische Substanzen (Hydroxylapatit), Metalle (Titan) und auch synthetische Polymere (Polylaktone, Polyglycolite) konstruiert sein. Die Matrix des Scaffolds dient als Platzhalter und verhindert, dass Gewebe aus der Umgebung in das Transplantatlager eindringt. Durch die Biokompatibilität soll sich das Material ins Gewebe integrieren, ohne immunologische Reaktionen hervorzurufen (HUTMACHER 2000). Die poröse Oberfläche soll bei einem Porendurchmesser von 200-900 µm (BURG et al. 2000; MAQUET et al. 2004) gewährleisten, dass Zellen leichter einsprossen und einwachsen können. Außerdem ist sie zur Sicherstellung der Vaskularisation nötig, damit die Nährstoffversorgung der Zellen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten aus den Zellen gewährleistet sind (FREED et al. 1998). Die Oberflächeneigenschaften eines Scaffolds beeinflussen so im Rahmen der Knochengewebsbildung entscheidend das Ausmaß der Osteokonduktivität.

#### **2.4.1.1.1 Bio-OSS® ( Geistlich; Wolhusen, Schweiz)**

Bio-Oss® ist ein xenogenes Knochenmaterial boviner Herkunft. Es ist ein bewährtes Knochenersatzmaterial mit hohem osteokonduktivem Potential (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) (HÜRZELER et al. 1997; VALENTINI et al. 1997; YILDIRIM et al. 2000).

Es wird durch Hitze deproteinisiert, so dass alle organischen und möglichen antigenen Bestandteile eliminiert werden, während sein osteokonduktives Potential jedoch erhalten bleibt. Seine natürliche Knochenmatrix hat eine ähnliche makro- und mikroporöse Struktur wie die menschliche Spongiosa (REHMAN et al. 1995). Zu seinen Bestandteilen gehört Hydroxylapatit. Kalzium- und Phosphorgruppen der Knochenmatrix liegen im Verhältnis 2:1 vor.

Die hochporöse Struktur des Bio-Oss<sup>®</sup> verschafft ihm eine innere Oberfläche von etwa 100 m<sup>2</sup>/g. Gepaart mit seiner natürlichen Zusammensetzung ist das Material befähigt, sowohl die Bildung als auch das Einwachsen von neuem Knochen und Blutgefäßen am Implantationsort zu fördern. Die Spongiosabälkchen des bovinen Knochenersatzmaterials dienen den Osteoblasten als Leitschiene. Sie lagern sich ihnen an, bilden Osteoid und entwickeln sich weiter zu Osteozyten, wodurch letztlich neuer Knochen entsteht.

Es konnte gezeigt werden, dass Bio-Oss<sup>®</sup> ein Gerüst für osteogene Zellen darstellt und die Osteoblastendifferenzierung und Matrixsynthese fördert (TAPETY et al. 2004). Neben seiner Osteokonduktivität wird dem bovinen Knochenersatzmaterial ein qualitativ und quantitativ hohes Maß an Osseointegration zugeschrieben (BERGLUNDH et al. 1997).

Im Rahmen der Sinusbodenaugmentation wird Bio-Oss<sup>®</sup> bereits seit langem erfolgreich eingesetzt, um die Knochenneubildung zu fördern und ein an der Implantatsüberlebensrate gemessenes, positives Langzeitergebnis zu erhalten (ARTZI et al. 2003; HALLMAN et al. 2002; PIATTELLI et al. 1999; SCHLEGEL et al. 2003; VALENTINI 2003). Es wird dabei sowohl in Kombination als auch ohne autologen Knochen eingesetzt. Nach einem Zeitraum von sechs Monaten kann in beiden Fällen nachfolgend eine hohe Osteointegrationsrate ermittelt werden (VALENTINI et al. 2003).

### **2.5 Mesenchymale Stammzellen**

Bereits vor etwa 140 Jahren wurden durch den deutschen Pathologen Cohnheim erstmalig mesenchymale Stammzellen in nicht hämatopoetischem Gewebe postuliert (MAULITZ 1978). Ihre Isolation gelang erstmalig Friedenstein 1976, weitere Arbeitsgruppen folgten (BERESFORD et al. 1992; CAPLAN 1991; HOWLETT et al. 1986; MARDON et al. 1987; OWEN et al. 1987; PIERSMA et al. 1983; RICKARD et al. 1994).

Der Begriff der „Mesenchymalen Stammzelle“ wurde 1994 von Caplan definiert. Er beschrieb die ersten Vorläuferzellen mesenchymalen Gewebes im Knochenmark. Sie dienen

zeitlebens der Regeneration mesenchymaler Gewebe. Dazu gehören zum Beispiel Knochen-Knorpel-, Muskel- und Fettgewebe. Als Vorläuferzellen dieser Gewebe befinden sie sich solange im Zyklusarrest bis ein Nachschub an spezifisch differenzierten Zellen erforderlich ist, woraufhin ihre Zellteilung einsetzt.

Auch Osteoblasten stammen von derartigen (humanen) mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ab (BRUDER et al. 1994; CAPLAN 1991; FRIEDENSTEIN et al. 1976). Ihr Differenzierungsort ist primär das (humane) Knochenmark, wo Präosteoblasten nachgewiesen werden konnten (BERESFORD et al. 1992; CAPLAN 1991; HAYNESWORTH et al. 1992; KASSEM et al. 1991; PROCKOP et al. 2001; RICKARD et al. 1996).

Die Zellgewinnung aus dem Knochenmark ist in zahlreichen Versuchsprotokollen dokumentiert worden. Sie geschieht aus Aspiraten von antikoaguliertem humanem Knochenmark von mindestens 10 ml Volumen. Die Isolierung der mononukleären Zellen gelingt durch Dichtezentrifugation (BARRY et al. 1999; PITTENGER et al. 1999).

In den letzten Jahren kommt den mesenchymalen Stammzellen aufgrund ihrer osteogenen Potenz im Hartgewebs-Tissue-Engineering besonders große Aufmerksamkeit zu. So dienen sie beispielsweise als wesentlicher Bestandteil von injizierbarem Knochen (YAMADA et al. 2004).

### 3. Material und Methode

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Experimentellen Chirurgie des BioMed Zentrums am Universitätsklinikum Freiburg i. Br. nach vorheriger Genehmigung des Tierversuchsantrages durch das Regierungspräsidium Freiburg i. Br. (Aktenzeichen G-05/18) durchgeführt.

#### 3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden adulte drei- bis vierjährige weibliche Schafe der Rasse Merino ausgewählt.

Die Tiere wurden sechs Wochen vor Versuchsbeginn bei Einstellung tierärztlich untersucht, gewogen, entwurmt und zunächst im Rahmen einer zweiwöchigen Quarantäne kontrolliert. Ernährt wurden sie mit Heu ad libitum und 200 g Kraftfutter pro Tier und Tag. Mit Ausnahme der präoperativen Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz standen jedem Schaf Wasser, Heu und Mineralleckstein ad libitum sowie täglich 200 g Kraftfutter zur Verfügung. Die Schafe wurden täglich, insbesondere postoperativ, hinsichtlich ihres Fressverhaltens beobachtet. Das Gewicht wurde wöchentlich gemessen.

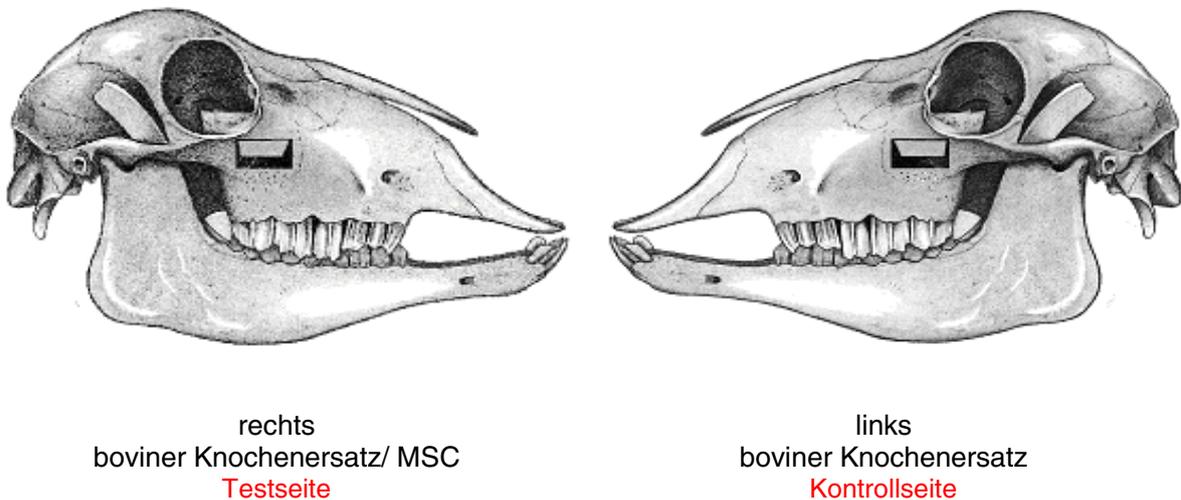
Die Nummerierung der Tiere mittels Ohrmarke erfolgte in aufsteigender Reihenfolge am jeweiligen Tag des operativen Eingriffs. Das erste Tier wurde mit der Markennummer 40, das letzte von 6 operierten Tieren entsprechend mit der Markennummer 45 versehen. Es wurden jeweils drei Schafe an in kurzem zeitlichen Abstand zueinander liegenden Terminen operiert. Diese bildeten nachfolgend die Gruppe des gleichen postoperativen Überlebenszeitraumes. Für die Schafe mit den Nummern 40, 41 und 42 betrug die Beobachtungszeit 16 Wochen, die Tiere 43, 44 und 45 wurden 8 Wochen postoperativ getötet (Abb. 3-1).

Schaf Nr.	Datum der Operation	postoperativer Überlebenszeitraum	Datum der Tötung
40	26.07.2005	16 Wochen	15.11.2005
41	11.08.2005	16 Wochen	01.12.2005
42	12.08.2005	16 Wochen	02.12.2005
43	16.08.2005	8 Wochen	11.10.2005
44	17.08.2005	8 Wochen	12.10.2005
45	18.08.2005	8 Wochen	13.10.2005

**Abb. 3-1:** Nummerierung der Schafe und Einteilung der Überlebenszeiträume.

### 3.2 Studiendesign und Gruppeneinteilung

Als Überlebenszeiten wurden 8 und 16 Wochen post operationem gewählt. Es sollten drei Tiere pro Beobachtungszeitraum zur Verfügung stehen. Bei jedem Schaf wurden in der selben operativen Sitzung zunächst eine Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm und anschließend eine beidseitige Sinusbodenelevation über einen extraoralen Zugang vorgenommen. Dabei wurde die linke Seite mit dem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss® Geistlich, Wohlhusen, Schweiz) und die rechte mit Knochenersatzmaterial plus den zuvor aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen augmentiert (Abb. 3-2).



**Abb. 3-2:** Beidseitige Sinusbodenelevation mit extraoral gewählttem Zugang.

### 3.3 Operation

Für den Versuch wurden 6 Schafe verwendet. Die Tiere blieben 24 Stunden (Futter) bzw. 8 Stunden (Wasser) prae operationem nüchtern. Die Operation der Tiere erfolgte in Inhalationsnarkose und Bauchlagerung.

### 3.3.1 Narkoseregime

Die anticholinerge und sedative Prämedikation bestand in der intramuskulären Gabe von 0,01 mg/kgKGW Atropin (Atropinsulfat Braun<sup>®</sup>, Braun MelsungenAG, Melsungen), 0,1mg/kgKGW Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen) und 10,0 mg/kg/KGW Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Essex, München). Es wurde den Tieren ein Venenverweilkatheter in die V.cephalica gelegt.

Nach Präoxygenierung der Tiere mit pernasal verabreichtem Sauerstoff (7l/min) wurde die Narkose mit 6,0 mg/kgKGW Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>, AstraZeneca GmbH, Wedel) intravenös eingeleitet. Unter laryngoskopischer Kontrolle wurden die Tiere endotracheal intubiert. Außerdem erhielten sie eine peroral eingeführte Pansensonde.

Die Aufrechterhaltung der Narkose geschah über die Inhalation von 1,6-2,0% Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH, Wiesbaden) in O<sub>2</sub>/Air, FiO<sub>2</sub>≥0,3 sowie die intravenöse Gabe von 0,05-0,10 µg/kgKGW/min Fentanyl (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss). Dosierte wurde bedarfsgesteuert. Als perioperative Flüssigkeitssubstitution erhielten die Tiere 10,0 ml/kgKGW/h einer Vollelektrolytlösung per Dauertropfinfusion.

Die Tiere wurden während der Operation mittels intermittierender positiver Druckbeatmung (IPPV) beatmet. Der Plateaudruck lag dabei bei 10-15 cm H<sub>2</sub>O. Das Atemzugvolumen wurde auf 10-12 ml/kgKGW, die Atemfrequenz auf etwa 10-12/min eingestellt. Ausgerichtet wurden die Beatmungsparameter an der Aufrechterhaltung physiologischer Blutgaswerte:

paO<sub>2</sub> -100 mmHg, paCO<sub>2</sub> 32-36 mmHg, SaO<sub>2</sub> 96-99%.

Als Narkosegerät wurde ein Servo 900C-Ventilator (Fa. Siemens-Elma, Stockholm, Schweden) verwendet, der auch das Beatmungsmonitoring (Atemminutenvolumen) übernahm. Das Narkosemonitoring bestand aus EKG, Pulsoxymetrie und Kapnographie. Als Pulsoxymeter und EKG kam der Satlite Plus<sup>™</sup>-Monitor (Fa. Hoyer Medizintechnik, Bremen) zum Einsatz. Das Atemgasmonitoring lief über den Capnomac Ultima (Fa. Datex-Ohmeda, Duisburg).

Ausgeleitet wurde die Narkose durch Abstellen der Anästhetikazufuhr bei weiterer Sauerstoffbeatmung für etwa 5 Minuten. Durch die Reduzierung des Atemminutenvolumens unter synchronisierter intermittierender Beatmung (SIMV) wurde eine langsame Entwöhnung von der Beatmung erreicht. Die Extubation erfolgte mit dem Erreichen einer suffizienten Spontanatmung und wiedererlangten Schutzreflexen.

### 3.3.2 Sinusbodenelevation

Zur Gewährleistung der intraoperativen Sterilität wurde die Haut rasiert und mit 70% Ethanol entfettet. Nach Desinfektion der drei Operationsfelder mit Povidon-Jod (Betasisodona Lösung, Mindipharma, Limburg) wurde sie steril mit OP-Tüchern in üblicher Weise abgedeckt. Die Augen der Tiere wurden mit Salbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Wyhlen) vor Austrocknung geschützt.

Der Zugang zur Kieferhöhle erfolgte infraorbital über eine 10 cm lange Inzision von Haut, Unterhaut und subkutaner Faszie (Abb.3-4). Die dem Knochen aufliegende Muskulatur und das Periost wurden stumpf vom Knochen gelöst (Abb.3-5). Etwaige Blutungen wurden teils kauterisch, teils durch Aufbringung von Knochenwachs (ETHICON GmbH, Norderstedt, D) gestillt. Die Fenestration des Sinus maxillaris wurde unter Schonung der Kieferhöhlenschleimhaut extraoral auf einer Fläche von etwa 1 cm x 2 cm unterhalb des Margo infraorbitalis vorgenommen.



**Abb.3-4:** Schnittinzision



**Abb.3-5:** stumpfe Durchtrennung tieferer Gewebeschichten

Nach der Fensterung mit Hilfe diamantierter Fräsen unter ständiger Kühlung durch sterile Ringer Lösung (Abb.3-6), konnte beim Einklappen des Knochendeckels nach innen und gleichzeitiger vorsichtiger Ablösung der Schneiderschen Membran vom Kieferhöhlenboden ein Hohlraum zur Augmentation geschaffen werden (Abb. 3-7).



**Abb.3-6:** Fensterung des Knochens

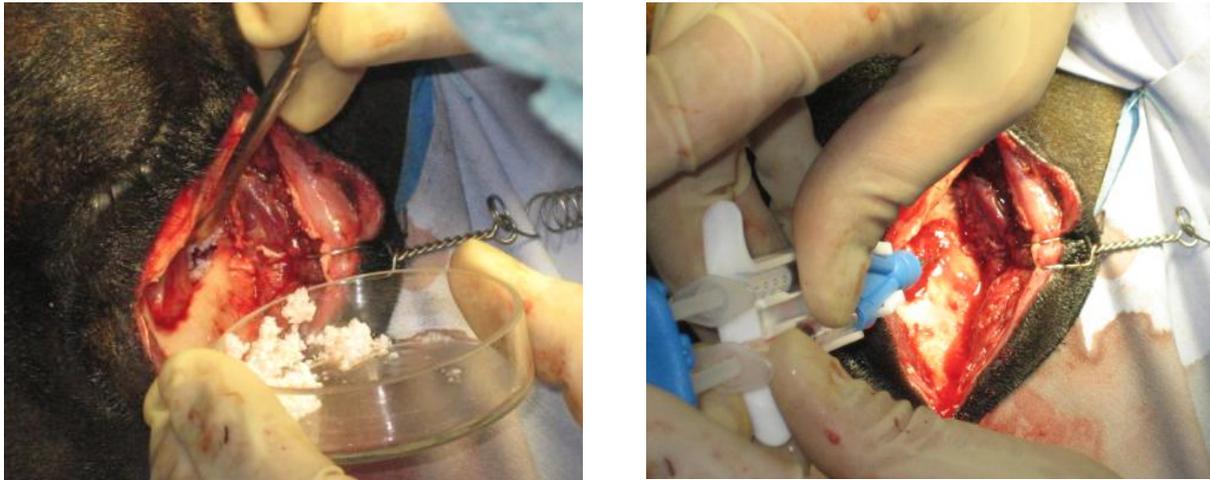


**Abb.3-7:** Ablösung der Schneiderschen Membran

Nach dem Einbringen des jeweiligen Augmentationsmaterials wurde der Musculus masseter zurückgelagert und die Wunde dreischichtig mit resorbierbarem Nahtmaterial [Vicryl® (ETHICON GmbH, Norderstedt, D)] verschlossen. Die Hautnaht wurde ebenfalls mit resorbierbarem Material vorgenommen, um eine zusätzliche Nahtmaterialentfernung zu umgehen.

### 3.4 Augmentationsmaterialien

Der angelegte Hohlraum der linken Seite wurde mit bovinem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss®, Geistlich, Wolhusen, Schweiz), dem der Fibrinkleber Tissucol® Duo S (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D) hinzugefügt wurde, aufgefüllt. In dem der rechten Seite wurde eine Mischung aus bovinem Knochenersatzmaterial (Bio-Oss®, Geistlich, Wolhusen, Schweiz) und mononukleären Zellen des Knochenmarks, die mit der Thrombinkomponente des Fibrinklebers ergänzt wurden, eingelagert (Abb.3-8a,b). Die Augmentationsvolumina der jeweils eingebrachten Materialien betragen auf beiden Seiten jeweils 3,5 ml.



**Abb.3-8 a, b:** Einbringen des Bio-Oss<sup>®</sup> und des Fibrinklebers

### **3.4.1 Bovines Knochenersatzmaterial**

Zum Einsatz kam Bio-Oss<sup>®</sup> Spongiosa-Granulat der Granulatgrösse 1-2 mm, das nach den Anwendungshinweisen des Herstellers vor der Implantation mit physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle) sowie, gemäß unserer Versuchsanordnung, mit mononukleären Zellen vermischt wurde (Test).

### 3.4.2 Mesenchymale Stammzellen

#### 3.4.2.1 Gewinnung des Knochenmarksaspirates

Einer etwa 1 cm langen Schnittinzision durch Haut und Unterhaut über den rechten kranialen Bereich des Beckenkammes und Abpräparation des subkutanen Gewebes und des Periosts folgte das Eindrehen der Knochenmark-Biopsienadel (Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, D) in circa 1-2 cm Tiefe (Abb.3-9, 3-10). Über diese wurde sodann in 3 x 20 ml Einmalspritzen, in denen sich jeweils bereits 2 ml Heparin (Heparin-Na Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D) befanden, Knochenmark aspiriert (Abb. 3-11). Nach Beendigung der Entnahme wurde das Weichgewebe reponiert und mit resorbierbarem Nahtmaterial fixiert.



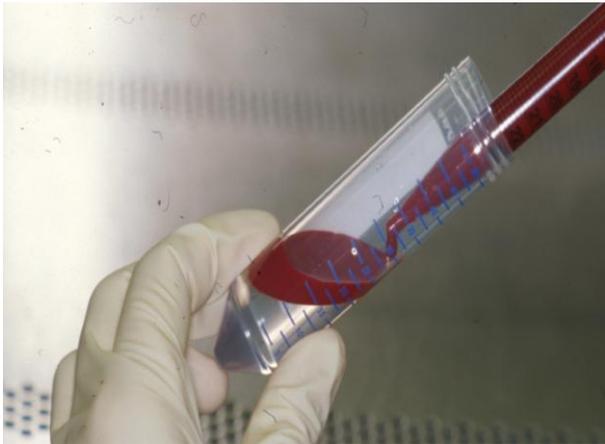
Abb. 3-9, 3-10, 3-11: Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm

#### 3.4.2.2 Isolierung mononukleärer Zellen

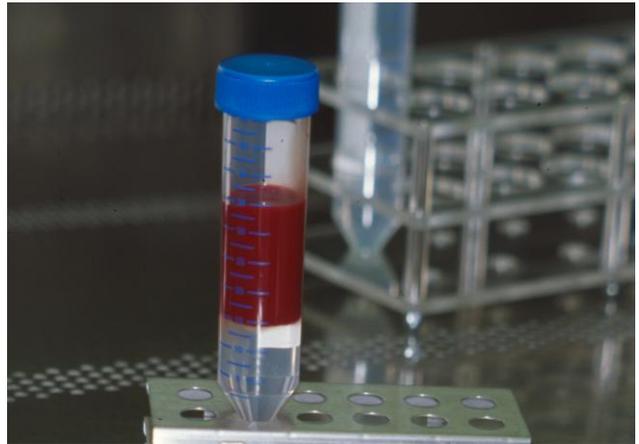
Durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichtegradienten (Ficoll, Sigma, St.Louis, MO, USA) wurden mononukleäre Zellen (Progenitorzellen, Stammzellen, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten) von den übrigen hämatopoetischen oder von abgestorbenen Zellen isoliert. Die Dichte von Ficoll ist mit 1,077 g/ml jener von mononukleären Zellen identisch, so dass diese nach Zentrifugation ohne Abbremsung in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar werden. Knochenstückchen, Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens.

In einem 40 ml Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (Blue Max, Falcon, BD, Franklin Lake, NJ, USA) wurde im Verhältnis 1:2 auf 10 ml Ficoll vorsichtig 20 ml Knochenmarksaspirat überschichtet (Abb.3-12a,b). Nach Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute für 20

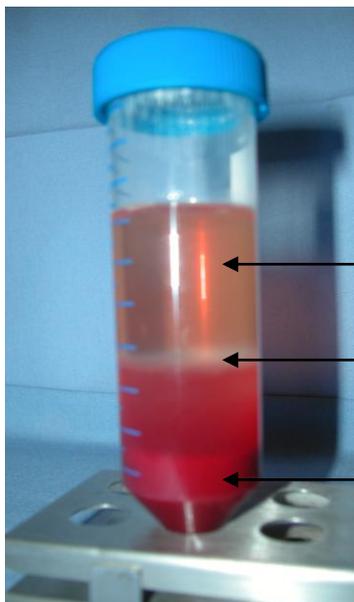
Minuten ohne Abbremsung der Zentrifuge, war die Bandenbildung erfolgt (Abb.3-13). Die mononukleäre Zellen enthaltende Interphase wurde mit einer 10 ml Pipette abgenommen und in 30 ml PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,4) durch erneute Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, um das für die Zellen schädliche Ficoll auszuwaschen. Das verbliebene Zellpellet wurde daraufhin in 10 ml PBS aufgelöst (Abb.3-14).



**Abb.3-12a:** Aufpipettieren des Knochenmarkspirates auf Ficoll.

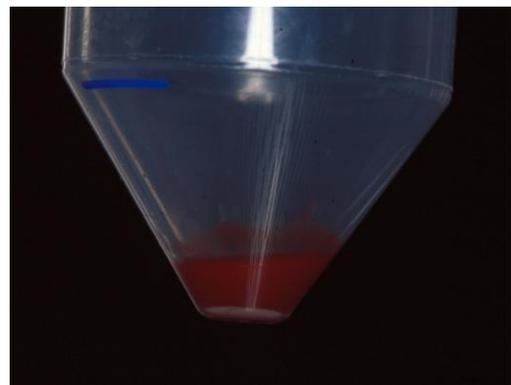


**Abb.3-12b:** Aufpipettiertes Knochenmarkspirat ohne Vermischung der Phasen.



Serum  
Interphase mit mononukleären Zellen  
Sedimentierte Knochenstückchen, Erythrozyten und Granulozyten

**Abb.3-13:** Bandenbildung nach Zentrifugation.



**Abb. 3-14:** Verbliebenes Zellpellet in PBS aufgelöst.

Die aus 20 ml Knochenmarksaspirat gewonnene Menge an mononukleären Zellen wurde dem bovinen Knochenersatzmaterial zur Kieferhöhlenugmentation der rechten Seite zugeführt. Die absolute Zellzahl mononukleärer Zellen wurde zuvor unter Verwendung von Trypanblau-Färbelösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (zur Ermittlung des Anteils vitaler Zellen).

Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Zellzahl (4 Großquadrate)}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10\,000$$

### 3.4.2.3 Isolierung mesenchymaler Stammzellen

Da 60 ml Knochenmarksaspirat pro Tier gewonnen werden konnten, war es möglich, aus 40 ml Aspirat die Zahl der mesenchymalen Stammzellen pro kernhaltige Zellen zu ermitteln. Hierzu wurden für jedes Tier die isolierten mononukleären Zellen, deren Gesamtzahl je Milliliter in der Neubauer-Zählkammer ermittelt worden war, in unterschiedlichen Verdünnungen auf Plastikwells ausgesät.

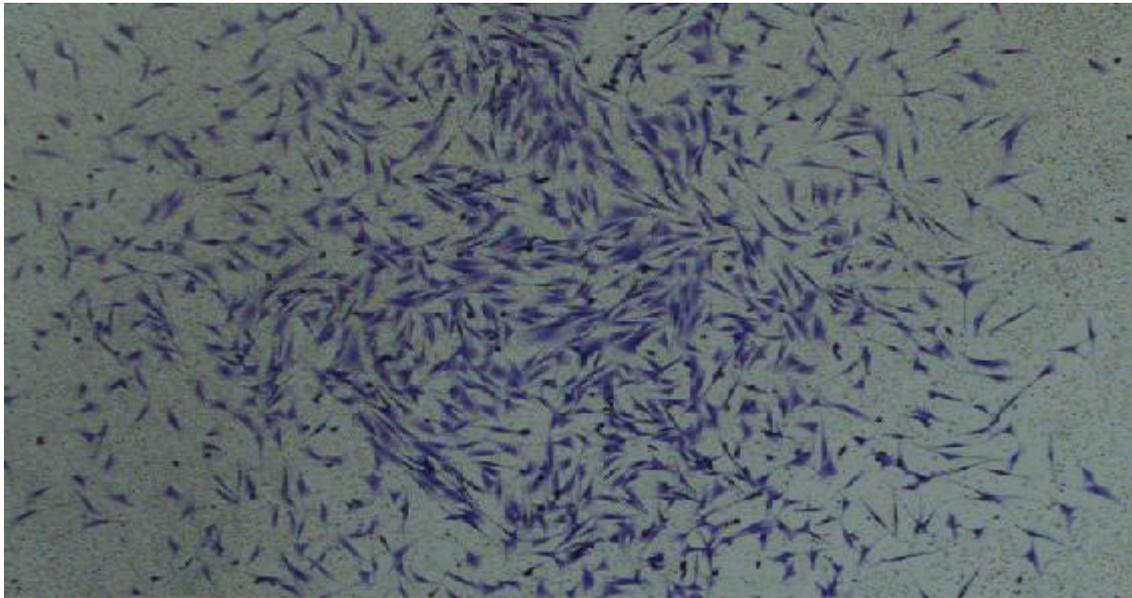
Folgende Verdünnungsreihen wurden erstellt:

Mononukleäre Zellen pro Well	Wells pro Verdünnungsreihe	Gesamtzellzahl der Verdünnung
25 000	96	2 400 000
50 000	96	4 800 000

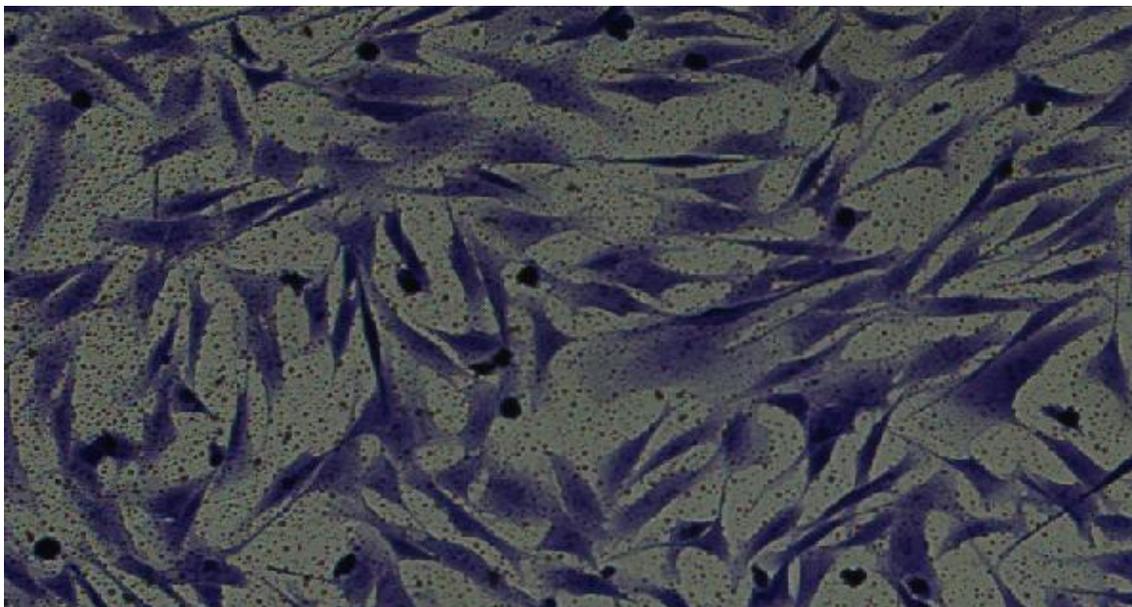
Die Isolation mesenchymaler Stammzellen (MSC) beruhte auf der Selektion durch Plastikadhärenz in einem für MSC selektiven Expansionsmedium (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium + Supplemente = Mesenchymal Stem Cell Growth Medium: MSCGM; Poetics BioWhittaker, Walkersville, MD). Dieses Medium ermöglicht die Expansion der Zellen unter Bedingungen, die keine Differenzierung der Zellen induziert.

Zweimal wöchentlich erfolgte ein kompletter Mediumwechsel, durch den alle nicht adhärenen Zellen schrittweise herausgespült wurden. Nach zwei bis drei Wochen wurden so homogene

konfluente Monolayer von MSC erhalten, die sich von einer Zelle ausgehend vermehren und als koloniebildende Einheiten (kbE) bezeichnet werden. Nach Färbung mit Toloidinblau wurden die adhärenenten mesenchymalen Stammzellen als koloniebildende Einheit (kbE) pro Well lichtmikroskopisch ausgezählt (Abb. 3-15a und b).



**Abb.3-15a:** Adhärenente MSCs als koloniebildende Einheit (kbE). Färbung Toloidinblau. 10fache Vergrößerung lichtmikroskopisch.



**Abb.3-15 b:** MSCs bei höherer Auflösung. Färbung Toloidinblau. 400fache Vergrößerung lichtmikroskopisch.

Die Zahl der Stammzellen pro Gesamtzellzahl der mononukleären Zellen wurde wie folgt berechnet:

$\frac{\text{Gesamtzellzahl der Verdünnung}}{\text{Summe der MSCs aller 96 Wells}} = \text{Anzahl der MSCs innerhalb der mononukleären Zellen}$
---

### 3.5 Postoperativer Verlauf

Die Tiere wurden nach der Operation für 3 Tage in Einzelboxen untergebracht und anschließend wieder in die Gruppenhaltung überführt. Täglich wurden die Tiere nach Infektzeichen und Fressverhalten kontrolliert. Das Gewicht wurde wöchentlich bestimmt.

Am Ende des Versuchszeitraumes nach 8 bzw. 16 Wochen wurden die Schafe durch die intravenöse Injektion (V. jugularis externa) von 100 mg/kgKGW Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Merial GmbH, Halbergmoos) gefolgt von 2 mmol/kgKGW Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45 % Braun<sup>®</sup>, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) getötet. Der Kopf wurde vom Körper getrennt und bis zu den weiteren Untersuchungen in einer Kühltruhe bei - 20° Celsius eingefroren.

### 3.6 Polychrome Fluoreszenzmarkierung

Zur Verlaufsbeurteilung der Knocheninduktion wurden Vitalfarbstoffmarkierungen vorgenommen. Die Applikation der Farbstoffe erfolgte als steril filtrierte Lösungen durch subkutane Injektionen im Bereich der Kniefalte. Das Markierungsschema und die Dosierung wurden vorher mit Herrn Prof. Dr. Rahn (AO Research Institute, Davos, Schweiz. Rahn und Perren 1970, 1971, 1972, Rahn 1976) besprochen und aufgestellt. Für die beiden Überlebenszeiträume (8 und 16 Wochen) wurden unterschiedliche Schemata erstellt (Abb.3-16).

Die Fluoreszenzmarkierungen wurden in den postoperativen Wochen am Wochentag des operativen Eingriffs durchgeführt. Die Applikation erfolgte bei Tieren der Versuchstiergruppe A in der zweiten und dritten Woche mit Calcein 10 mg/kgKG ( $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ , Calcein, Artikel Nr. C 0875, Fa. Sigma-Aldrich), in der sechsten und siebten Woche mit Xylenolorange 90 mg/kgKG ( $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$ , Xylenol Orange, Artikel Nr. X 0127, Fa. Sigma-Aldrich). Versuchstiergruppe B wurde in der zehnten und elften Woche mit Calcein, in der vierzehnten und fünfzehnten Woche mit Xylenolorange markiert. Während der Knochenneubildung wurden die

entsprechenden Substanzen an der Mineralisationsfront in den Knochen eingebaut. Die sequenzielle Applikation erlaubt es, die Knochenneubildung zu verfolgen (Abb. 3-17).

Versuchstiergruppe A ( 3 Tiere: Nummer 43, 44, 45 )

	Calcein	Calcein			Xylenol-orange	Xylenol-orange	†
1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche

Versuchstiergruppe B ( 3 Tiere: Nummer 40, 41, 42 )

										Calcein	Calcein			Xylenol-orange	Xylenol-Orange	†		
1. – 9. Woche										10. Woche		11. Woche		14. Woche		15. Woche		16. Woche

Abb. 3-16: Zeittafeln der Fluoreszenzmarkierungen

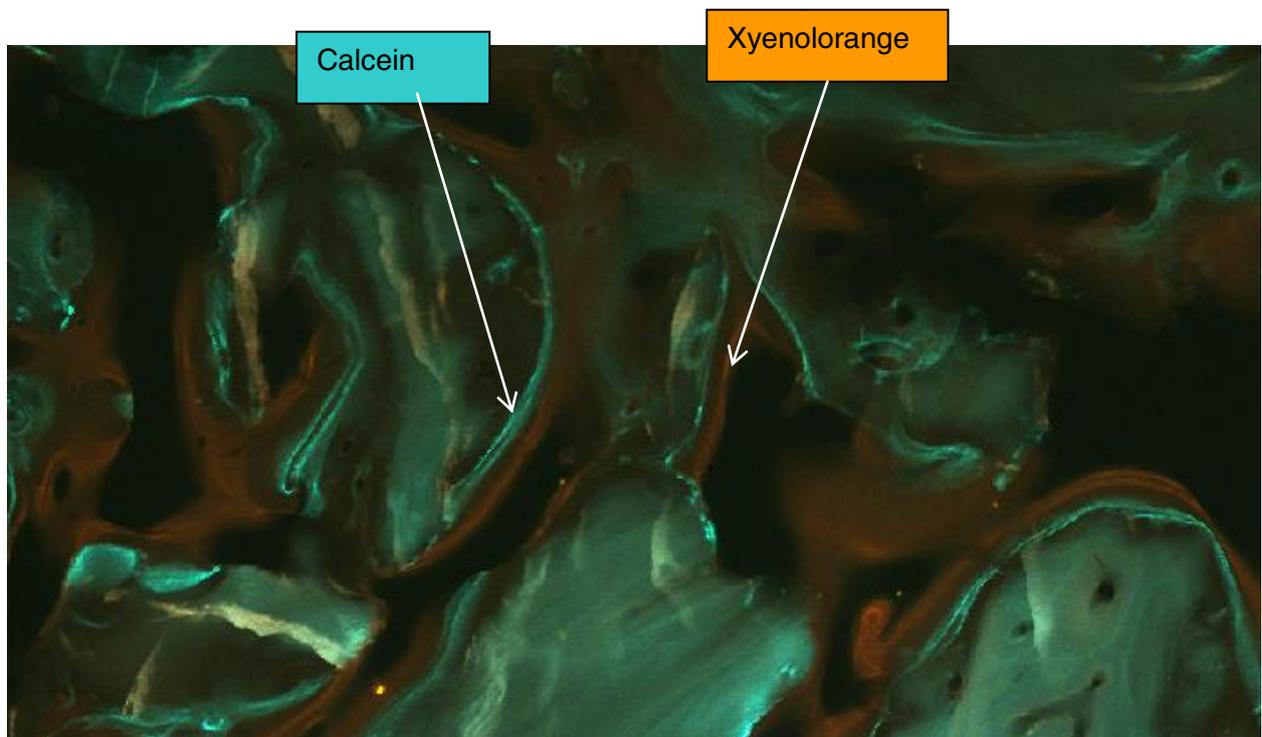


Abb.3-17: Farbdarstellung nach sequenzieller Applikation von Calcein und Xylenolorange, die in die Mineralisationsfronten des neu gebildeten Knochens eingebaut wurden. 10.-11- Woche: Calcein = Blau; 14.-15. Woche: Xylenolorange = Orange. 360fache Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch.

### 3.7 Computertomographische Volumenbestimmung

Jeder Tierschädel wurde computertomographisch (CT) untersucht, so dass bei einer Schnittschichtstärke von 0,5 mm etwa zweihundert Schnitte vorlagen. Die Auswertung der Schichten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms VoXim 4,3 (© IVS Solutions AG, Chemnitz) in koronaler, sagittaler und transversaler Ebene (Abb.3-18a, b und c). Dabei wurden jeweils die Umrisse der Augmentation umfahren und farblich markiert, das Programm errechnete daraus die jeweiligen Volumina und stellte sie plastisch dar (Abb.3-19).

Bei den Werten für die errechneten Volumina musste beachtet werden, dass sie nicht mit Knochenvolumen gleichzusetzen sind, da eine insgesamt inhomogene wolkige Struktur eher Hinweise auf den räumlichen Umfang der Augmentation gibt als auf deren inhaltliche Qualität. Qualitative Aussagen über die Konsistenz des Knochens, also Messung und Vergleich der Knochendichte, konnten aufgrund der starken Opazität boviner Partikel nicht getroffen werden. Qualitative Aussagen über die röntgenologisch evaluierten Volumina der Augmentationen wurden daher der histomorphometrischen Auswertung überlassen (Kapitel 3.9).



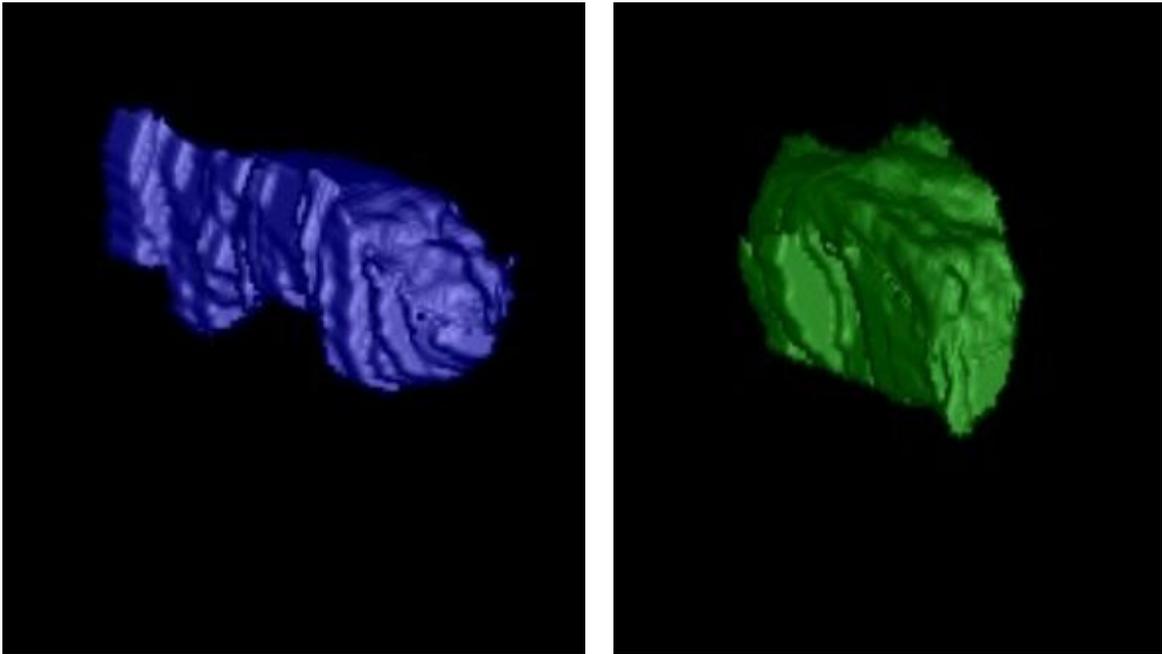
**Abb.3-18a:** Computertomographische Darstellung: sagittaler Schnitt durch den Schädel auf Höhe der Kieferhöhle. Mittels VOXIM<sup>®</sup> farblich (grün) markiertes Augmentat innerhalb der rechten Kieferhöhle.



**Abb.3-18b:** Computertomographische Darstellung: koronaler Schnitt durch die Kieferhöhlen. Augmentate farblich markiert mittels VOXIM<sup>®</sup>: rechts = grün, links = blau.



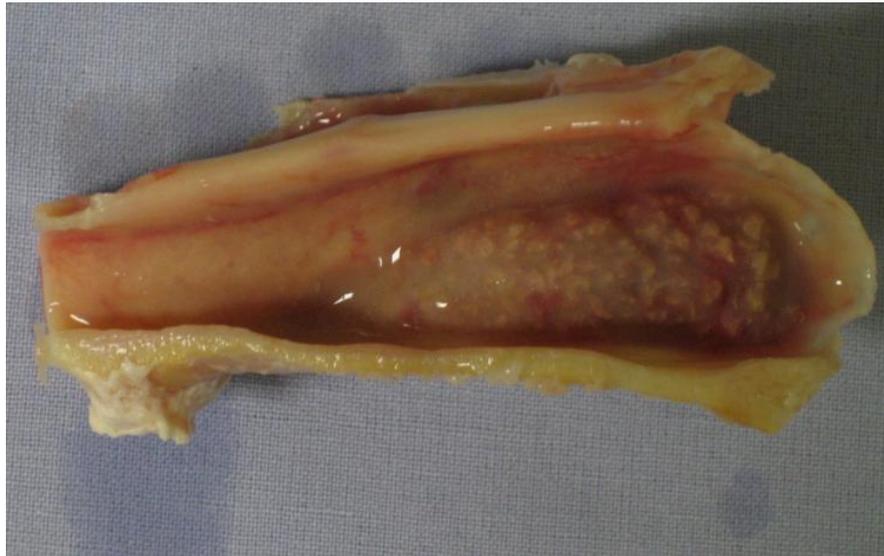
**Abb. 3-18c:** Computertomographische Darstellung: transversaler Schnitt durch die Kieferhöhlen. Augmentate farblich markiert mittels VOXIM<sup>®</sup>: rechts =grün, links = blau.



**Abb. 3-19:** Mittels VOXIM<sup>®</sup> ermittelte, dreidimensionale Darstellung der Augmentate der rechten (grün) und linken (blau) Kieferhöhle.

### **3.8 Entnahme und Aufbereitung der Prüfkörper**

Nach Anfertigung der CTs wurden die Kieferhöhlen mit einem kranialen und kaudalen Sicherheitsabstand von ca. 1 cm aus dem Schädel separiert und für die Dauer von 2 Wochen in 4%-iger Formaldehydlösung (Fa. Merck, Darmstadt, D) fixiert (Abb.3-20). Die weitere unentkalkte Aufarbeitung und Herstellung der histologischen Präparate erfolgte nach der Trenn- und Dünnschlifftechnik nach Schenk, die in mehreren Arbeitsschritten modifiziert wurde.



**Abb.3-20:** Aus dem Schädel separierte Kieferhöhle mit Augmentat.

### **3.8.1 Herstellung der histologischen Präparate**

Die unentkalkten histologischen Schliffpräparate wurden im Klinisch-Chemischen und Histologischen Labor der Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Freiburg hergestellt.

Nach der Fixierung in 4 %-iger Formaldehydlösung (Fa. Merck, Darmstadt, D) über einen Zeitraum von 2 Wochen wurde das Formaldehyd unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Die Präparate wurden anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol, Fa. Baker, Holland) in den Konzentrationsstufen 70 %, 80 %, 90 %, 100 % und erneut 100 %, dehydriert. Dabei wurden die Präparate pro Konzentrationsstufe für 3 Tage eingelegt. Der Beginn und Abschluss der Entwässerung erfolgte im Exsikkator unter Vakuum.

Zur weiteren Entfettung wurde eine Xylollösung (Fa. Merck, Darmstadt, D) verwendet, in der die Präparate für 3 Tage eingelegt wurden. Die Xylollösung wurde in diesem Zeitraum täglich gewechselt.

Die Kunststoffinfiltration erfolgte dreistufig. In einer ersten Stufe wurden die Präparate für 2 Wochen mit Methylmethacrylat (Fa. Merck, Darmstadt, D) und 15 % Dibuthyphthalat (Fa. Fulka, Deisenhofen, D) infiltriert. Die erste Stunde der Infiltration erfolgte unter Vakuum im Exsikkator.

In einer zweiten Stufe wurden die Präparate für einen Tag in Methylmethacrylat mit 15 % Dibuthyphthalat und 1,5 % getrocknetem Benzoylperoxid eingelegt. Die Trocknung des Benzoylperoxides erfolgte bei 60° Celsius über mehrere Stunden im Wärmeschrank.

In der dritten Stufe wurden die Präparate in ein Polymerisationsgemisch, bestehend aus Methylmethacrylat (Fa. Merck, Darmstadt, D), 15 % Dibuthylphthalat (Fa. Fluka, Deisenhofen, D) und 3 % getrocknetes Benzoylperoxid überführt und in einem luftdicht verschlossenen Glasgefäß über einen Zeitraum von zwei Wochen bei 6°C gelagert und infiltriert. Wie bereits in der ersten Stufe, wurde die erste Stunde der Infiltration unter Vakuum im Exsikkator vorgenommen.

Die Polymerisation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Bis zur vollständigen Aushärtung des Kunststoffs verblieben die Glasgefäße in einem Wasserbad, um die entstandene Polymerisationswärme abzuleiten.

Nachdem die Kunststoffblöcke aus den Gläsern herausgelöst waren, wurde überschüssiger Kunststoff mit einer Bandsäge entfernt (Fa. Proxxon, Niersbach, D). Danach wurden die Präparate mittels einer Präzisionsinnenlochsäge (Fa. Microslice, IBS, Santa Clara, USA) mit einem Diamantsägeblatt von 0,1 mm Stärke in ca. 500 µm dicke Sägeschnitte getrennt.

Die Sägeschnitte wurden mit Cyanoacrylat-Klebstoff (Loctite 401<sup>®</sup>, Fa. Loctite, München, D) auf weiße Acrylglasobjektträger (Fa. Maertin, Freiburg, D) fixiert, mit Parafilm<sup>®</sup> (Fa. American National Can, Greenwich, USA) abgedeckt und durch ein Gewicht für einige Sekunden angepresst. Vor der weiteren Bearbeitung wurden sie mindestens 24 Stunden luftgetrocknet.

Die Sägeschnitte wurden mit einem rotierenden Schleifteller (Fa. Struers, Willich, D) mit Nassschleifpapier der Körnung 180 (Fa. Struers, Willich, D) planparallel auf eine Dicke von 140 µm geschliffen und mit Nassschleifpapier der Körnung 1200 (Fa. Struers, Willich, D) bis auf 80 µm reduziert. Abschließend wurden sie mit Nasspolierpapier der Körnungen 2400 und 4000 (Fa. Struers, Willich, D) poliert.

### **3.8.2 Mikroskopische Auswertung**

Um eine Überlagerung durch die endgültige Oberflächenfärbung zu vermeiden, wurden die Präparate zunächst fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und die Bilddaten gespeichert. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde auf einem Axioscope Mikroskop (Fa. Carl Zeiss, Kochern, D) mit einer Fluoreszenzlampe HBO 50 (Fa. Carl Zeiss, Kochern, D) und einer digitalen Farbkamera (CC-12, Soft Imaging System, Fa. Olympus Europa GmbH, Hamburg, D) durchgeführt.

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die Schliffpräparate nach Richardson-Levai-Laczko gefärbt. Um Weichteilgewebe darzustellen, wurde eine Oberflächenfärbung mit Azur II vorgenommen (Fa. Merck, Darmstadt, D). Zur Differenzierung zwischen originärem und neu gebildetem Knochen wurde die Oberfläche mit Pararosanilin (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D) nochmals gefärbt. Die Farbeindringtiefe betrug ca. 5 µm. Dadurch färbte sich der originäre Knochen magenta-violett und konnte so gut gegen den hellrot gefärbten, neu gebildeten Knochen abgegrenzt werden. Die angefärbten Präparate wurden im Durchlicht in denselben Vergrößerungen wie bei der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

Die Bilddatensammlung, Optimierung und Auswertung wurde mit dem Bildauswertungsprogramm AnalySIS<sup>D</sup> (Soft Imaging System, Fa. Olympus Europa GmbH, Hamburg, D) erstellt. Durch die Eingabe der verwendeten Vergrößerungen wurden die ermittelten Daten in Absolutwerten angegeben.

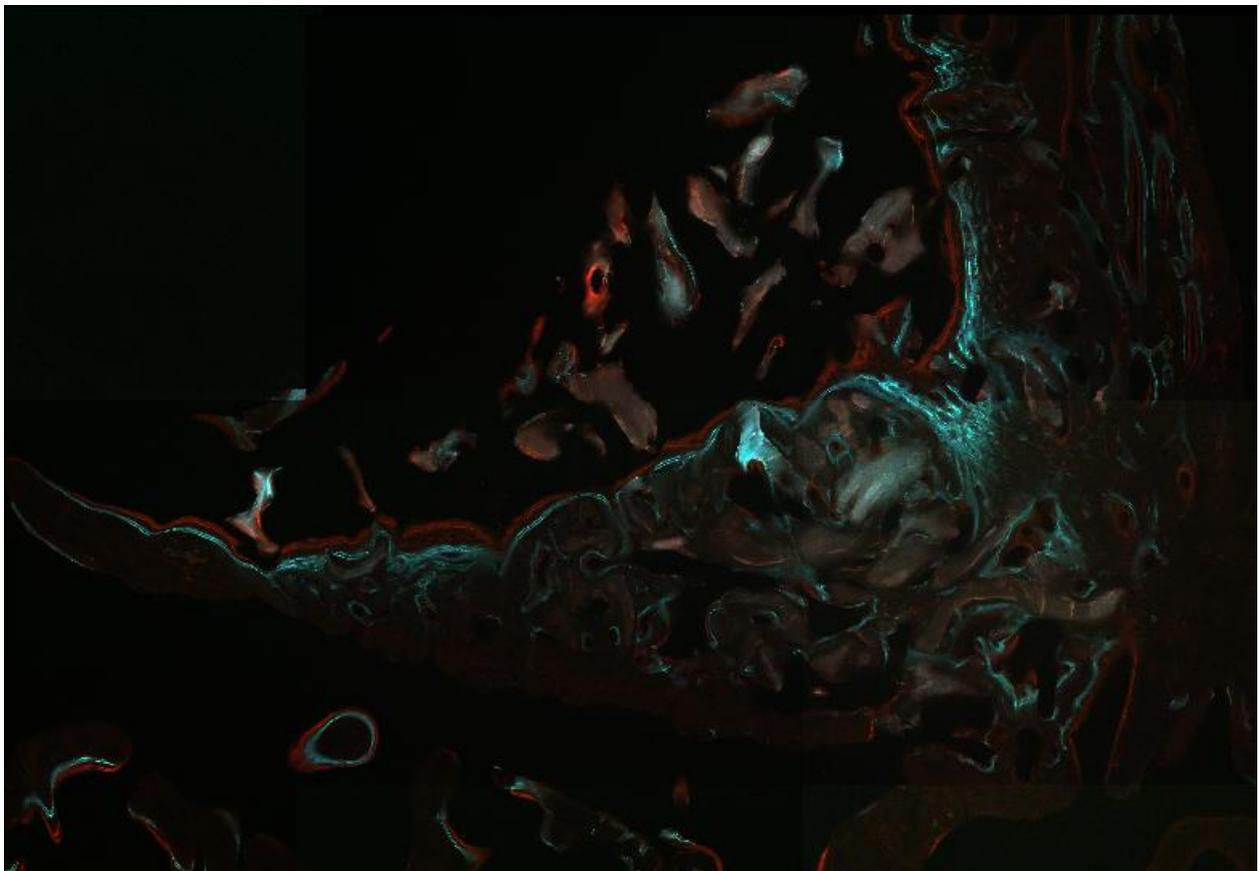
### **3.9 Histomorphometrische Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen**

Je nach Anzahl der Schriffe, die durch die Länge des Augmentates in der jeweiligen Kieferhöhle vorgegeben wurde, wurden je sechs bis zehn repräsentative Proben der Schnittreihe ausgewählt, die auf einen Plexiglasträger fixiert wurden.

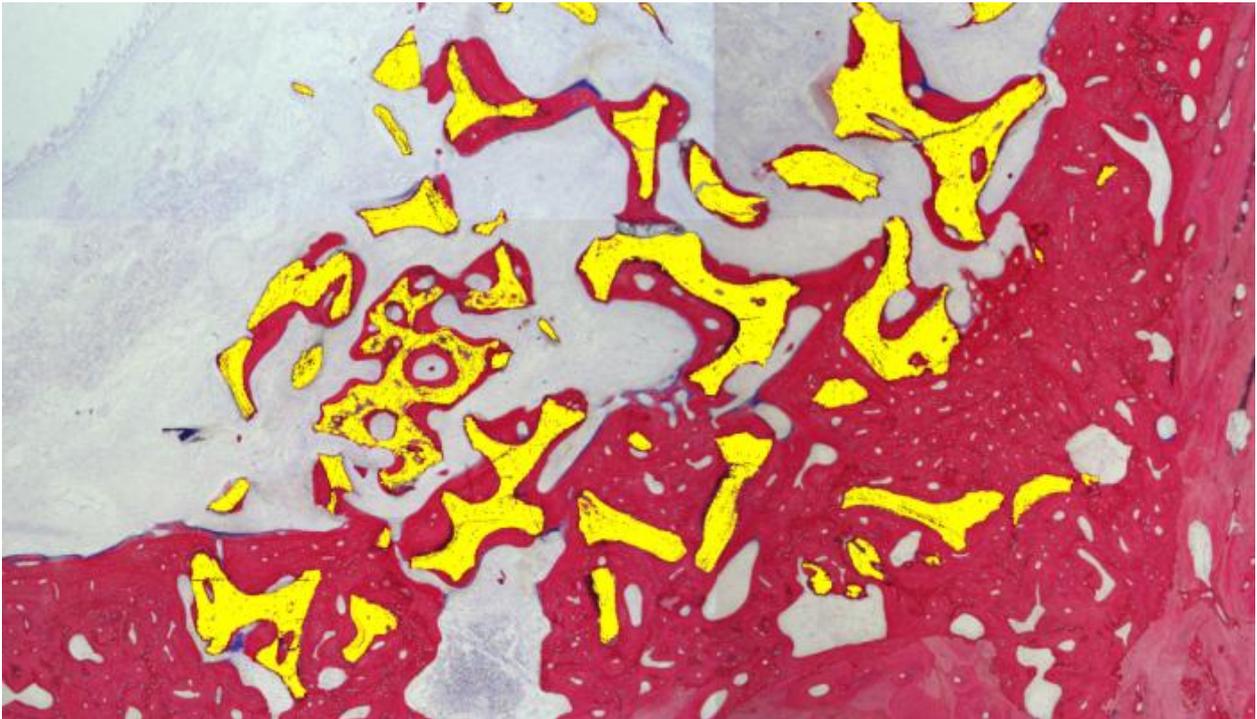
Ziel der histomorphometrischen Auswertung war es, die prozentualen Flächenanteile an neu gebildetem Knochen, eingebrachtem Augmentationsmaterial (boviner Knochenersatz) und Weichgewebe („soft tissue“) zu ermitteln. Dazu wurden die Schliffpräparate sowohl vor (Fluoreszenzaufnahmen) als auch nach histologischer Färbung betrachtet.

Mit Hilfe des Bildauswertungsprogramms AnalySIS<sup>D</sup> (Soft Imaging System, Fa. Olympus Europa GmbH, Hamburg, D) wurde zur Berechnung der Fläche jedes Kieferhöhlengaugmentat umfahren und als so genannte ROI („Region of interest“) festgelegt. Abhängig von dieser Fläche wurden die prozentualen Anteile ermittelt.

Da in den Fluoreszenzaufnahmen der Kieferhöhlen nur unklare Abgrenzungen zwischen den Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln und neu gebildetem Knochen der Fluoreszenzmarkierung Calcein möglich waren, sollte zur Vermeidung von Ungenauigkeiten in der Beurteilung des flächenmäßigen Anteils der Knochenneubildung der Anteil der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel an der Gesamtfläche aufgrund seiner besseren Abgrenzbarkeit in der histologischen Färbung wiederum durch Umfahren jedes einzelnen Partikels ermittelt werden (Abb.3-21, Abb.3-22, Abb.3-23, 3-24). Es konnte, abhängig von der Fluoreszenzmarkierung (Calcein/ Xylenolorange), der zeitliche Ablauf der Knochenanlagerungen ermittelt werden.

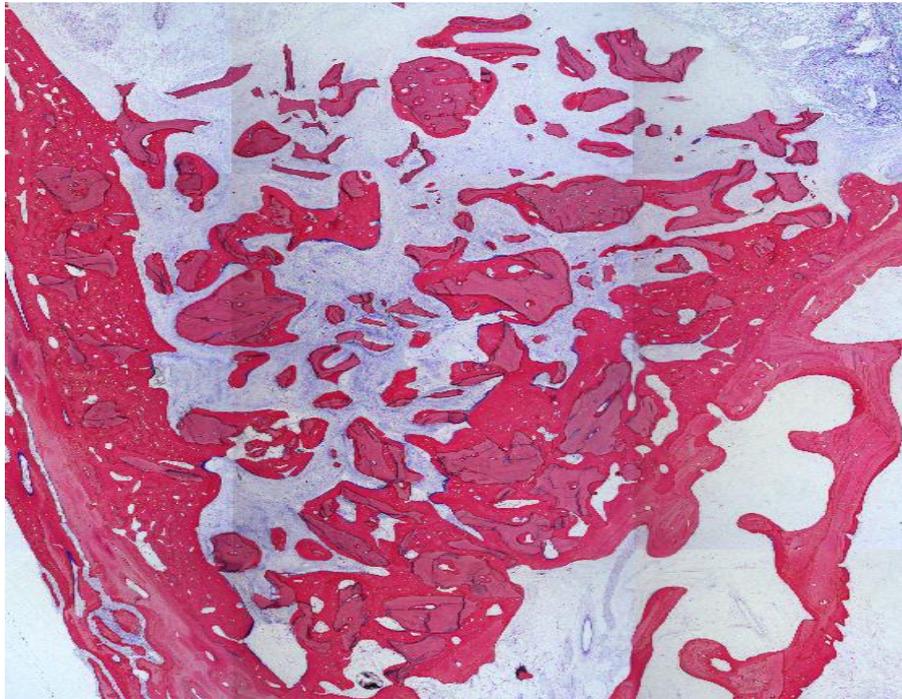


**Abb. 3-21:** Fluoreszenzaufnahme einer mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten Kieferhöhle (Kontrollseite). 50fache Vergrößerung.

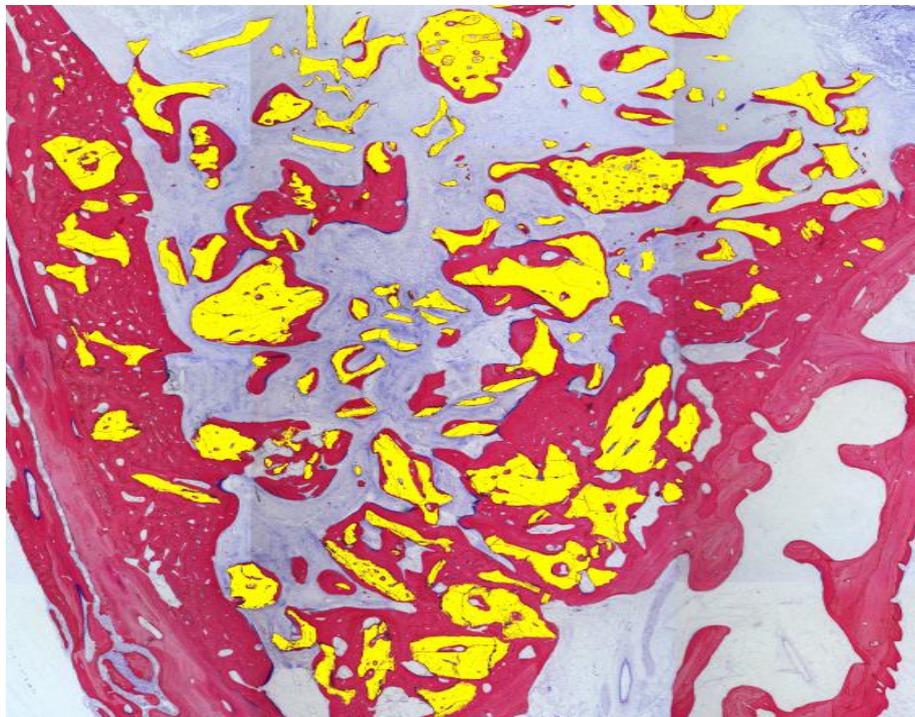


**Abb.3-22:** Farblich (gelb) markierte Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel auf der Kontrollseite. Weichgewebefärbung Azur II (blau); Oberflächenfärbung Pararosanilin (neu gebildeter Knochen = hellrot, originärer Knochen = magenta-violett). 50fache Vergrößerung.

In einem weiteren Schritt errechnete sich die Fläche des neu gebildeten Knochens bis zur 5. Woche in der 8 Wochen- Gruppe, bzw. bis zur 13. Woche in der 16 Wochen- Gruppe aus der Fläche der gesamten Knochenneubildung abzüglich der Fläche des mit Xylenolorange gefärbten Knochens.



**Abb. 3-23:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten Kieferhöhle. Weichgewebefärbung Azur II (blau); Oberflächenfärbung Pararosanilin (neu gebildeter Knochen = hellrot, originärer Knochen = magenta-violett). 50fache Vergrößerung.



**Abb. 3-24:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten Kieferhöhle. Weichgewebefärbung Azur II (blau); Oberflächenfärbung Pararosanilin (neu gebildeter Knochen = hellrot, originärer Knochen = magenta-violett). Farblich (gelb) markierte Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel. 50fache Vergrößerung.

### 3.10 Statistik

Die Analyse der Daten wurde durch einen Biometriker der Firma Menne Biomed Consulting (Tübingen) vorgenommen.

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken erfolgte mit dem Statistikprogramm R (Foundation for Statistical Computing, Wien, AUT, 2005).

Bei den Daten handelt es sich um verallgemeinerte Wachstumskurven. Bei den Versuchstieren wurden jeweils Kontrolle und Test parallel registriert: man benötigt also einen „within subject“ Vergleich (Vergleich innerhalb eines Tieres). Da die Tiere aber erst nach Tötung histologisch untersucht werden konnten, also nicht mehrfach an einem Tier gemessen wurde, ist der quasi-kontinuierliche Zeitverlauf bei verschiedenen Tieren gemessen worden, also „between subject“ (Vergleich zwischen verschiedenen Tieren). Diese Mischung zwischen „within“ und „between“, in der Kombination einer kontinuierlichen Variablen „Zeit“ und einem zweistufigen Faktor „Treatment“ wurde mit einem Mixed-Model statistisch untersucht.

Da die Streuung der Daten mit zunehmender Überlebenszeit zunimmt, wird hiermit eine Grundvoraussetzung linearer Modelle verletzt. Daher wurde dies durch eine Logarithmustransformation der Messwerte korrigiert. Dazu wurde das Programmpaket nlme (Pinheiro und Bates 2000) verwendet. Dieses kann die nicht lineare Verteilung durch eine adaptive Gewichtung auf elegantere Weise berücksichtigen, so dass eine Transformation unnötig ist.

Um zu testen, ob die Anzahl Stammzellen einen Einfluss auf die Knochenbildung hat, wurde ebenfalls das oben genannte statistische Verfahren angewendet. Im Unterschied dazu wurden koloniebildende Einheiten (KbE) und mononukleäre Zellen (MNZ) des Schafes als explanatorische Variablen hinzugefügt. Zusätzlich wurde der Korrelationskoeffizient zwischen KbE und MNZ bestimmt.

Die 95%-Konfidenzintervalle der augmentierten Volumina wurden mit einem gepaarten t-Test verglichen.

### 4. Ergebnisse

Die Einzelergebnisse sind im Anhang in Kapitel 9 tabellarisch zusammengestellt.

#### 4.1 Versuchsverlauf

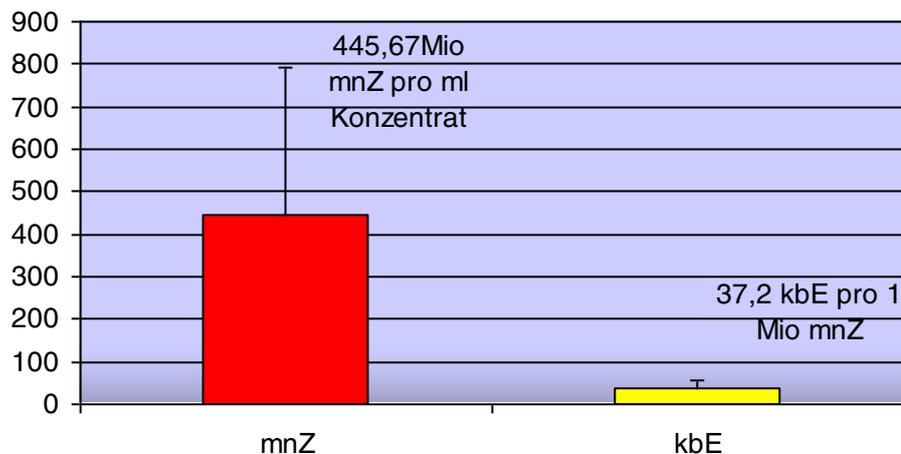
Operation und Narkose wurden von allen Tieren gut vertragen. Das Freßverhalten war ungestört und sie erreichten oder übertrafen ihr Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der Operation nach etwa einer Woche. Die Sinusbodenelevation wurde entsprechend dem festgelegten Operationsprotokoll durchgeführt. Postoperativ erhielten die Tiere ein NSAID (mg/kgKGW Caprofen, Rimadyl® Pfizer, Karlsruhe, D) zur Entzündungshemmung.

Bei den Tieren 40, 41 und 45 war die Wundheilung unauffällig und per primam. Zur Infektion kam es nicht. Geringgradige Wundheilungsstörungen im Sinne von Wundschwellung und geringgradiger, seröser Wundsekretion wurde bei den Tieren 43 und 44 beobachtet. Diese konnten durch lokale Behandlung mit Braunovidon® Salbe (Braun Melsungen AG, Melsungen, D) erfolgreich therapiert werden. Das Tier 42 wies bei ungestörtem Allgemeinbefinden Wundschwellung mit geringgradiger Wundsekretion im Bereich der rechten Operationswunde auf. Zusätzlich zur lokalen Wundbehandlung mit Braunovidon® Salbe erhielt dieses Tier für mehrere Tage eine antibiotische Therapie mit Baytril® (Bayer AG). Die anhaltende Sekretion erforderte eine Wundrevision in Narkose, bei der die Wunde mit einer PVP-Jodlösung (Betaisodona-Lösung, Braun Melsungen AG, Melsungen, D) gespült und eine Drainage eingelegt wurde. Die Wundspülung wurde vier Tage lang fortgeführt, bis die Drainage gezogen und die Wunde in den folgenden Tagen lokal mit Braunovidon® Salbe behandelt werden konnte.

Das Allgemeinbefinden der Tiere war während des 16-wöchigen Beobachtungszeitraumes ungestört.

## 4.2 Mesenchymale Stammzellen

Durch Auszählung des Zellpellets in der Neubauer Zählkammer wurde eine durchschnittliche Zahl von 446 Mio ( $\pm 348$ ) kernhaltigen Zellen (mononukleäre Zellen – mnZ) pro Milliliter Knochenmarksaspiratskonzentrat ermittelt (Abb. 4-1). Die Einzelergebnisse der Versuchstiere reichten dabei von 54 bis 900 Mio Zellen pro Milliliter (Abb. 4-2a).



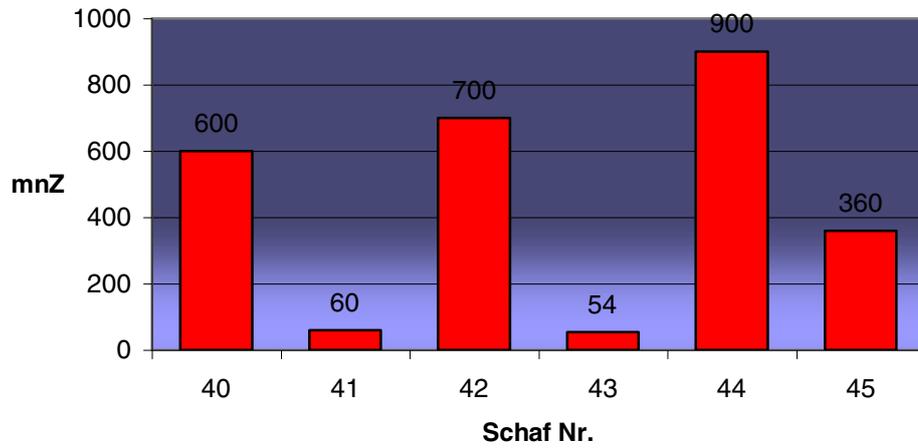
**Abb.4-1:** Durchschnittlicher Wert kernhaltiger Zellen (mnZ) und die aus einer Million kernhaltiger Zellen durchschnittlich isolierte Anzahl an mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und die jeweilige Standardabweichung.

Die Auszählung der mesenchymalen Stammzellen, die (Kapitel 3.4.2.3) aus der Gesamtmasse an kernhaltigen Zellen isoliert wurden, ergab eine durchschnittliche Zahl von 37 ( $\pm 20$ ) mesenchymalen Stammzellen (koloniebildende Einheiten – kbE) pro eine Millionen ausgesäeter kernhaltiger Zellen (mononukleäre Zellen – mnZ) (Abb. 4-1) mit individuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren (Abb. 4-2b).

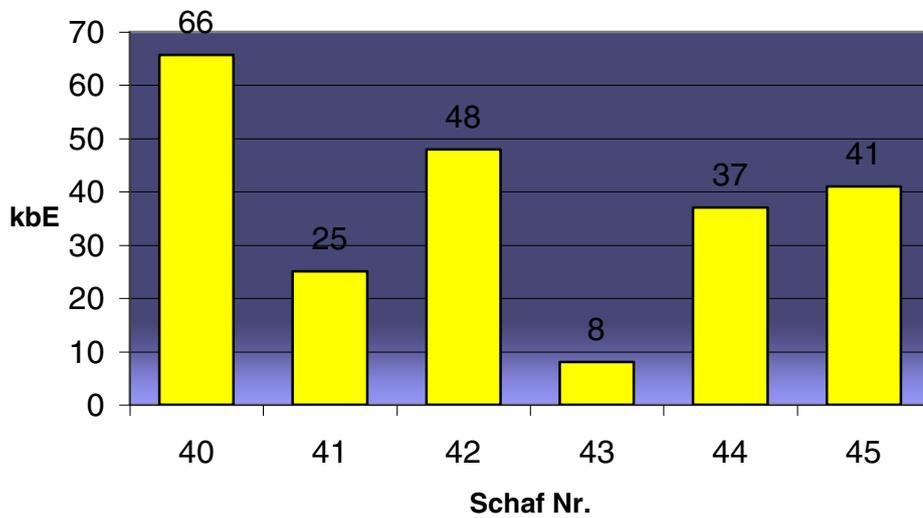
Aus den Durchschnittswerten der Verdünnungsstufen 25.000 und 50.000 ergaben sich sowohl innerhalb der Verdünnungsstufen als auch innerhalb der einzelnen Tiere identische Ergebnisse. Hierbei wurden 37,2 ( $\pm 20$ ) kbE ermittelt (Abb.4-1).

## Ergebnisse

---

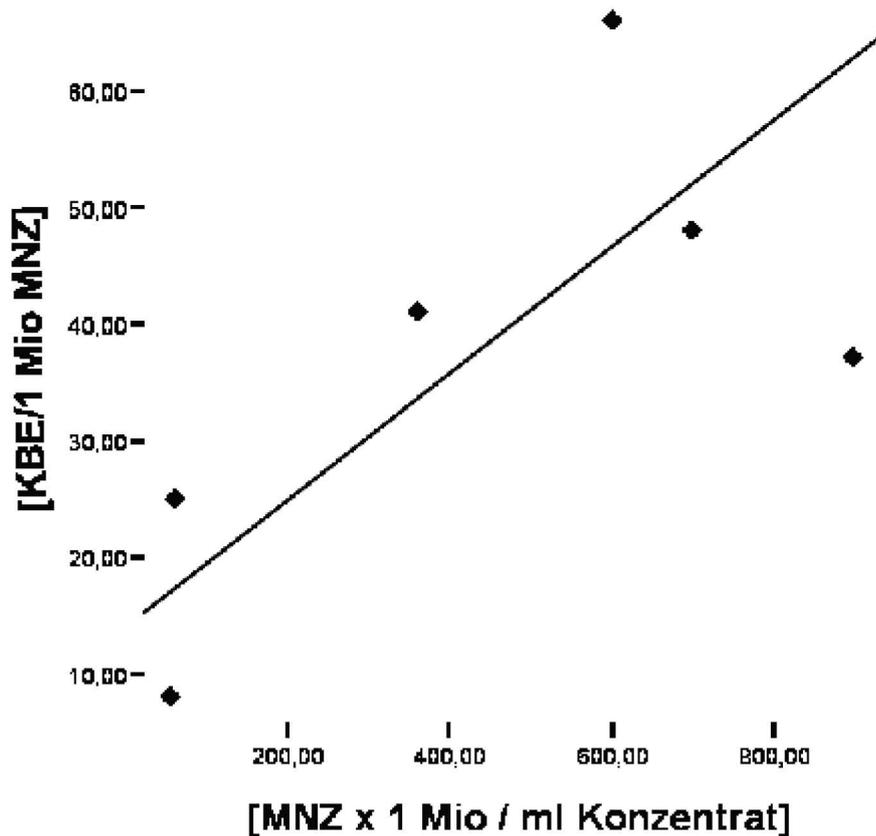


**Abb.4-2a:** Zahl kernhaltiger Zellen (mnZ) pro ml Knochenmarksaspiratskonzentrat ( $\times 10^6$ ) pro Schaf.



**Abb.4-2b:** Zahl isolierter MSCs (kbE) pro 1 Mio Zellen (mnZ) pro Schaf.

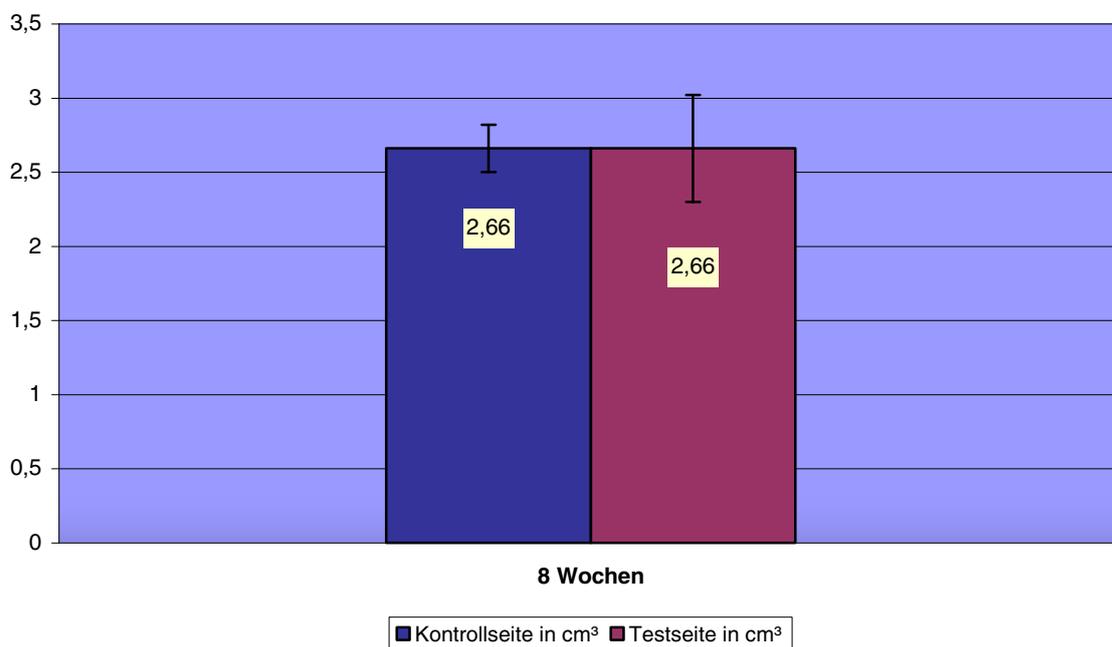
Innerhalb des jeweiligen Tieres konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen Anzahl der kernhaltigen Zellen und den darin enthaltenen mesenchymalen Stammzellen festgestellt werden: Aus einer höheren Zahl kernhaltiger Zellen konnte immer auch eine höhere Zahl mesenchymaler Stammzellen isoliert werden (Abb. 4-3). Der Korrelationskoeffizient betrug  $R = 0,67$ .



**Abb.4-3:** Anzahl MNZ ( $\times 10^6$ ) pro ml Konzentrat gegenüber Anzahl MSCs (in kbE) pro 1 Mio MNZ pro Schaf. Es besteht eine schwache Korrelation ( $r = 0,67$ ) zwischen der Anzahl der KbE und der Konzentration der MNZ im Knochenmarkaspirat.

## 5.2 Ergebnisse computertomographischer Volumenbestimmung

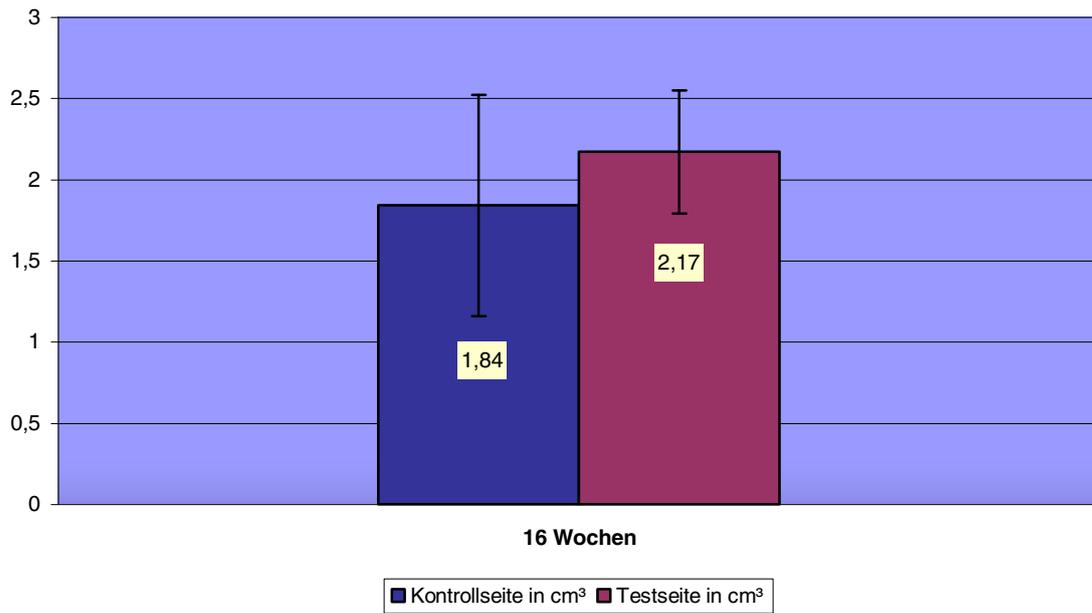
Das durchschnittliche Augmentationsvolumen auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> und mesenchymalen Stammzellen augmentierten Testseite lag in der Tierversuchsgruppe mit einem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen bei 2,66 cm<sup>3</sup> ( $\pm$  0,36). Ebenso brachte das auf der Kontrollseite eingebrachte Biomaterial (Bio-Oss<sup>®</sup>) ein durchschnittliches Volumen von 2,66 cm<sup>3</sup> ( $\pm$  0,17) hervor (Abb. 4-5a).



**Abb.4-5a:** Durchschnittliche Augmentationsvolumina (in cm<sup>3</sup>) auf Test- und Kontrollseite in der 8-Wochen-Gruppe.

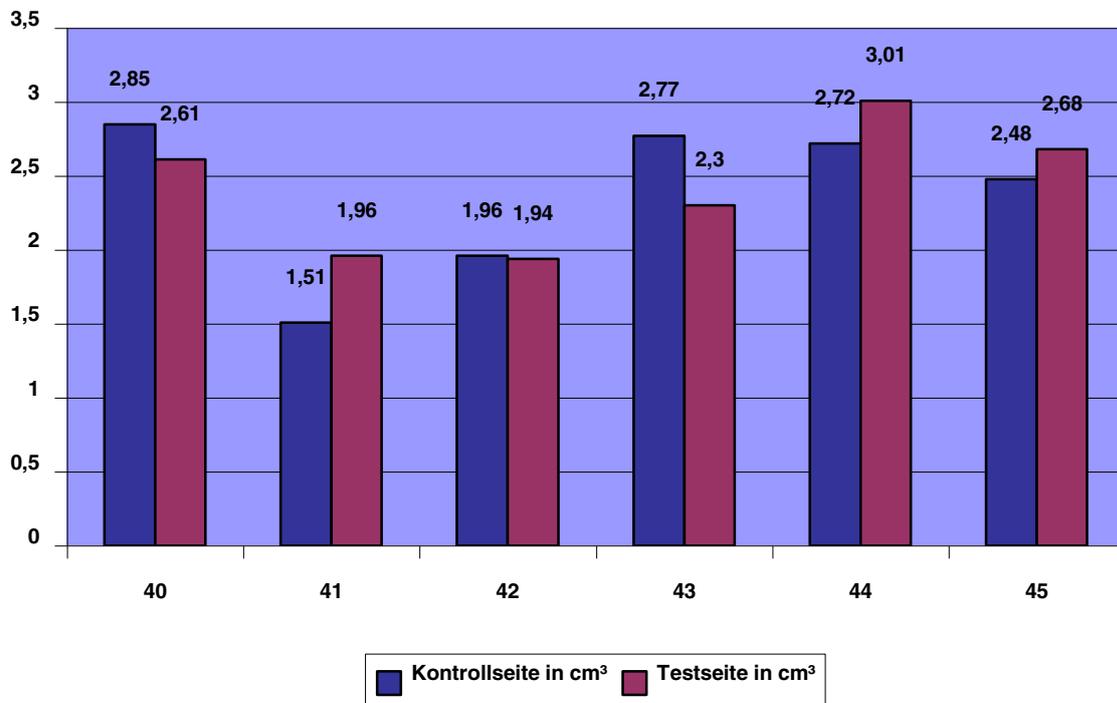
In der Versuchsgruppe mit einem Beobachtungszeitraum von 16 Wochen lag auf der Testseite ein durchschnittliches Volumen von 2,17 cm<sup>3</sup> ( $\pm$  0,38) vor, während auf der Kontrollseite durchschnittlich 2,11 cm<sup>3</sup> ( $\pm$  0,68) bestimmt werden konnten (Abb. 4-5b).

## Ergebnisse



**Abb. 4-5b:** Durchschnittliche Augmentationsvolumina (in cm<sup>3</sup>) auf Test- und Kontrollseite in der 16-Wochen-Gruppe.

In Abbildung 4-6 sind die Einzelergebnisse innerhalb der Gruppen mit 8-wöchiger und 16-wöchiger Überlebenszeit vergleichend aufgelistet.



**Abb. 4-6:** Augmentationsvolumina (in cm<sup>3</sup>) auf Test- und Kontrollseite der Einzeltiere.  
8 Wochen: Tier Nr. 43, 44, 45; 16 Wochen: Tier Nr. 40, 41, 42.

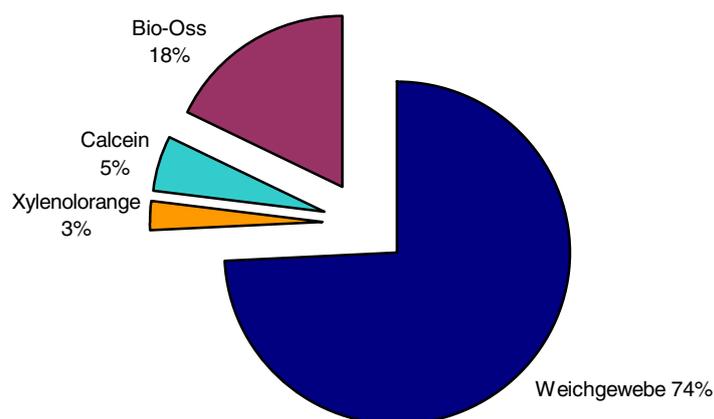
Der Mittelwert der Füllvolumina war 2,38 kontrollseitig und 2,42 testseitig. Das 95%-Konfidenzintervall der Differenz in einem gepaarten t-Test war 0,4 bis 0,33. Es bestand keine Evidenz für ein Ungleichgewicht zwischen den Seiten.

#### 4.4 Histomorphometrische Resultate

Es wurde je eine repräsentative Anzahl von histologischen Schnitten (6-10) pro Kieferhöhle pro Tier in der histomorphometrischen Analyse ausgewertet. Folgende Ergebnisse wurden dabei ermittelt:

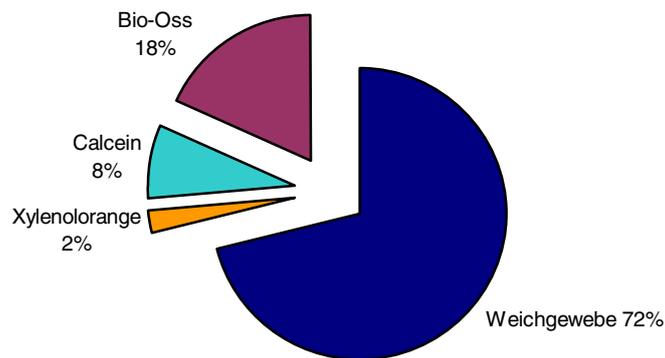
Die durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung des in der Kieferhöhle befindlichen Augmentats stellte sich nach einem Beobachtungszeitraum von *8 Wochen* durchschnittlich wie folgt dar:

Den größten Teil nahm **testseitig** mit 74% ( $\pm 1$ ) das aus fibrösem, vaskulärem Gewebe und darin enthaltenen Zellen bestehende Weichgewebe ein. Die Bio-Oss<sup>®</sup> Partikel erreichten einen flächenmäßigen Anteil von 18% ( $\pm 4$ ). Insgesamt 8% ( $\pm 3$ ) der Fläche wurden von neu gebildetem Knochen bedeckt, dabei wurden 5% ( $\pm 2$ ) bis zur vierten und 3% ( $\pm 2$ ) zwischen vierter und achter Woche gebildet (Abb. 4-7).



**Abb.4-7:** Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung des Kieferhöhlengaugmentats auf der Testseite 8 Wochen post OP.

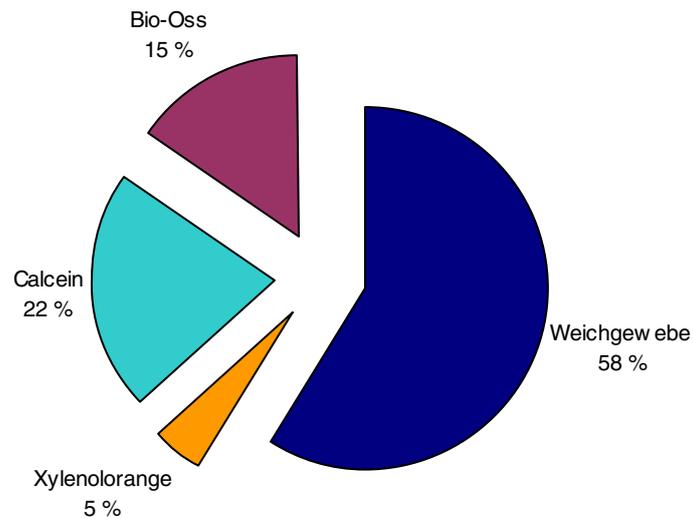
Auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten **Kontrollseite** konnte im gleichen Beobachtungszeitraum 71% ( $\pm 2$ ) Weichgewebe, 18% ( $\pm 5$ ) Bio-Oss<sup>®</sup> und 10% ( $\pm 4$ ) der Gesamtfläche eines Schnittes neu gebildetes Knochengewebe ermittelt werden. Die Knochenneubildung lag dabei in den ersten 4 Wochen bei 8% ( $\pm 3$ ) und in den darauf folgenden Wochen bis zur Tötung bei 2% ( $\pm 2$ ) (Abb. 4-8).



**Abb.4-8:** Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung des Kieferhöhlenaugmentats auf der Kontrollseite 8 Wochen post OP.

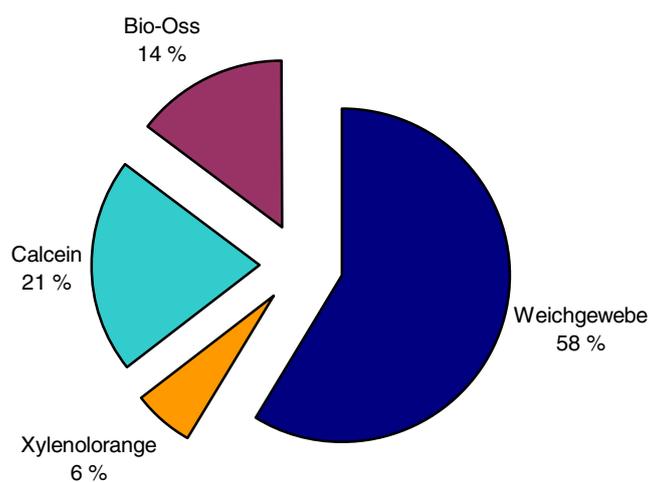
Nach einem Beobachtungszeitraum von *16 Wochen* stellten sich die Flächenverhältnisse auf den beiden Augmentationsseiten folgendermaßen dar:

Auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> und MSCs augmentierten **Testseite** konnte für die Größe der durchschnittlichen Fläche des Weichgewebes ein Wert von 58% ( $\pm 10$ ) ermittelt werden, die Bio-Oss<sup>®</sup> Partikel lagen bei 15% ( $\pm 4$ ) und der neu gebildete Knochen insgesamt bei 26% ( $\pm 11$ ). Dabei wurden 22% ( $\pm 11$ ) des Knochens in den ersten acht sowie weitere 5% ( $\pm 2$ ) in den folgenden Wochen bis zur Tötung der Tiere in der 16. Woche gebildet (Abb. 4-9).



**Abb.4-9:** Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung des Kieferhöhlenaugmentats auf der Testseite 16 Wochen post OP.

Im Vergleich dazu lag der flächenmäßige Anteil der Knochenneubildung auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten **Kontrollseite** bei durchschnittlich insgesamt 28% ( $\pm 11$ ), mit jeweils 21% ( $\pm 11$ ) Knochenneubildung bis zur 8. Woche und 6% ( $\pm 2$ ) bis zur 16. Woche. Der Anteil an Weichgewebe belief sich auf 58% ( $\pm 5$ ), der an Bio-Oss<sup>®</sup> Partikeln auf 14% ( $\pm 3$ ) (Abb. 4-10).



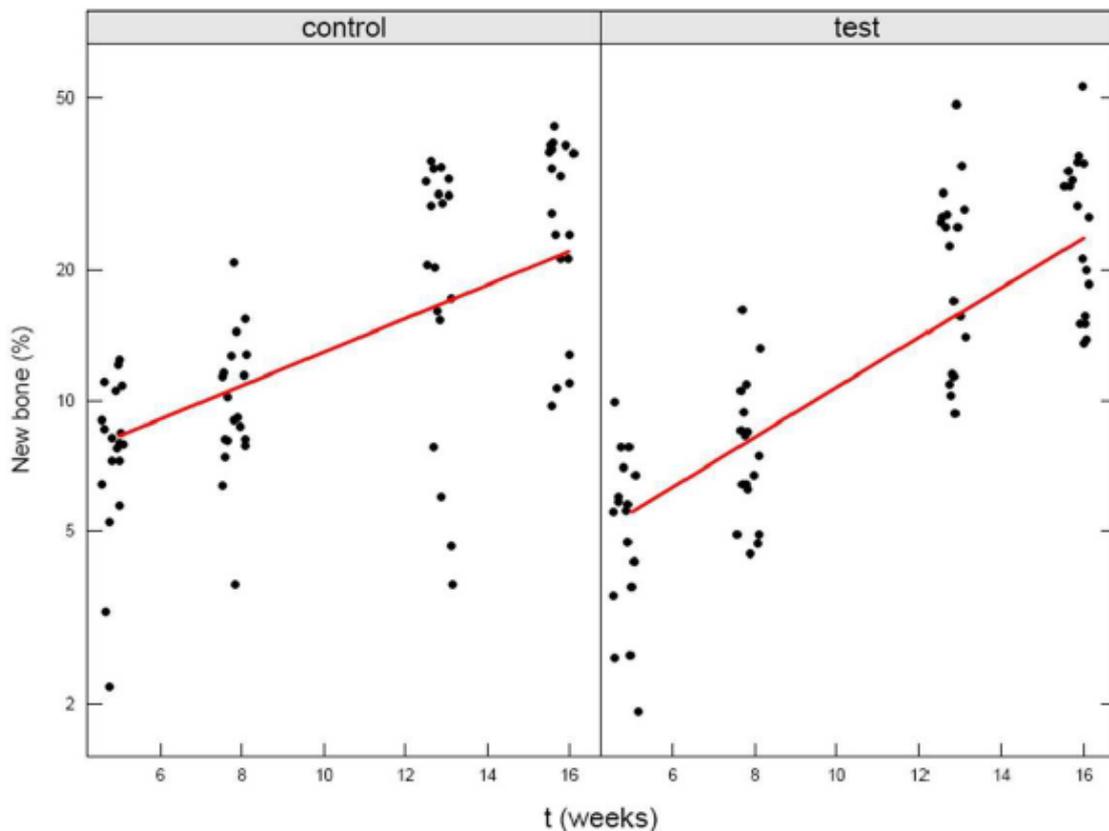
**Abb.4-10:** Durchschnittliche prozentuale Zusammensetzung des Kieferhöhlenaugmentats auf der Kontrollseite 16 Wochen post OP.

Im Vergleich beider Gruppen unterschiedlicher postoperativer Überlebenszeiträume konnte eine durchschnittliche prozentuale Abnahme des Anteils an Bio-Oss<sup>®</sup> Partikeln an der Gesamtfläche festgestellt werden. Im Durchschnitt wiesen die Tiere der 16-Wochen-Gruppe sowohl auf der Kontroll- als auch auf der Testseite einen geringeren prozentualen Anteil an Bio-Oss<sup>®</sup> Partikeln auf als die Tiere der 8-Wochen-Gruppe. Im Detail belief sich dies auf der Kontrollseite auf 4% und auf der Testseite 3%. Sowohl die Abnahme des Biomaterialanteils über die Zeit als auch der Unterschied zwischen Test und Kontrolle waren nicht signifikant ( $p=0,282$ ,  $p=0,273$ ).

Ebenso konnte im Vergleich der Gruppen eine Abnahme am Anteil des Weichgewebes um etwa 15% festgestellt werden. Es war bei den Tieren des 16wöchigen Überlebenszeitraumes niedriger als bei denen des achtwöchigen (Abb. 4-7 bis 4-10). Sowohl die Abnahme des Weichgewebeanteils über die Zeit als auch der Unterschied zwischen Test und Kontrolle waren nicht signifikant ( $p=0,271$ ,  $p=0,439$ ).

Das Fortschreiten der Knochenneubildung war sowohl auf der Testseite als auch auf der Kontrollseite signifikant ( $p=0,0003$ ). Der Anfangswert testseitig war um 2,8 % signifikant kleiner als kontrollseitig ( $p<0,0001$ ). Die Steigung der Geraden, die für die Zunahme des neugebildeten Knochens steht, betrug kontrollseitig 0,72 und testseitig 1,07. Die Gerade auf der Seite, die mit Biomaterial und Stammzellen augmentiert wurde, war um eine Steigung von 0,35, das sind 49 %, signifikant steiler ( $p=0,027$ ). Auf der Testseite wurde somit eine schnellere Knochenneubildung festgestellt (Abb. 4-11).

Um zu testen, ob die Anzahl Stammzellen einen Einfluss auf die Knochenbildung hat, wurden KbE und MNZ als explanatorische Variablen hinzugefügt. Die beiden Variablen leisten keinerlei Beitrag zur Modellvoraussage. Die p-Werte lagen bei 0,996 und 0,806. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Wachstum und Stammzellendichte nachgewiesen werden.



**Abb.4-11:** Knochenneubildung am Implantat nach Zeit, histomorphometrisch gemessen. Die vertikale Achse trägt eine logarithmische Skalierung. Zur deutlichen Trennung überlappender Zeitwerte wurden jeweils 6 Datenpunkte von jedem Sinus ausgewählt und nach einer Zufallsverteilung verschoben („time-jittered“). Die durchgezogene Linie wurde aus der Schätzung des Mixed-Model gewonnen. Die Steigung der Geraden zeigt die Zunahme neugebildeten Knochens. Die Knochenneubildungsrate ist auf der Testseite 49% schneller als auf der Kontrollseite.

#### 4.5 Histologische Beobachtungen

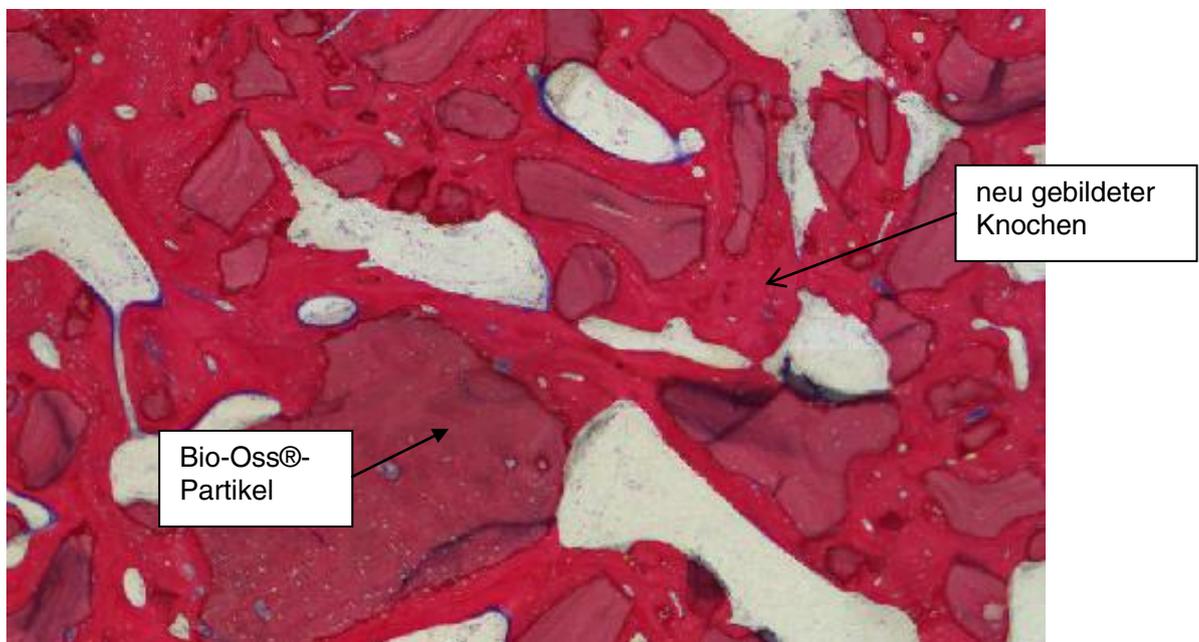
Keines der Tiere beider Beobachtungszeiträume wies in den aus Bio-Oss<sup>®</sup> und mesenchymalen Stammzellen gebildeten Augmentaten Zellen auf, die auf entzündliche Prozesse schließen ließen.

Sowohl bei den Tieren des acht- als auch bei denen des 16-wöchigen Überlebenszeitraumes konnten die Bio-Oss<sup>®</sup> Partikel noch gut von ortständigem Knochen und neu gebildetem Knochen unterschieden werden. Die Partikel wurden entweder von Knochensubstanz umlagert oder sie bildeten mit der neu gebildeten, bereits gereiften Knochensubstanz eine zusammenhängende Struktur (Abb. 4-12). Dies konnte besonders bei den Tieren des längeren Beobachtungszeitraumes gesehen werden.

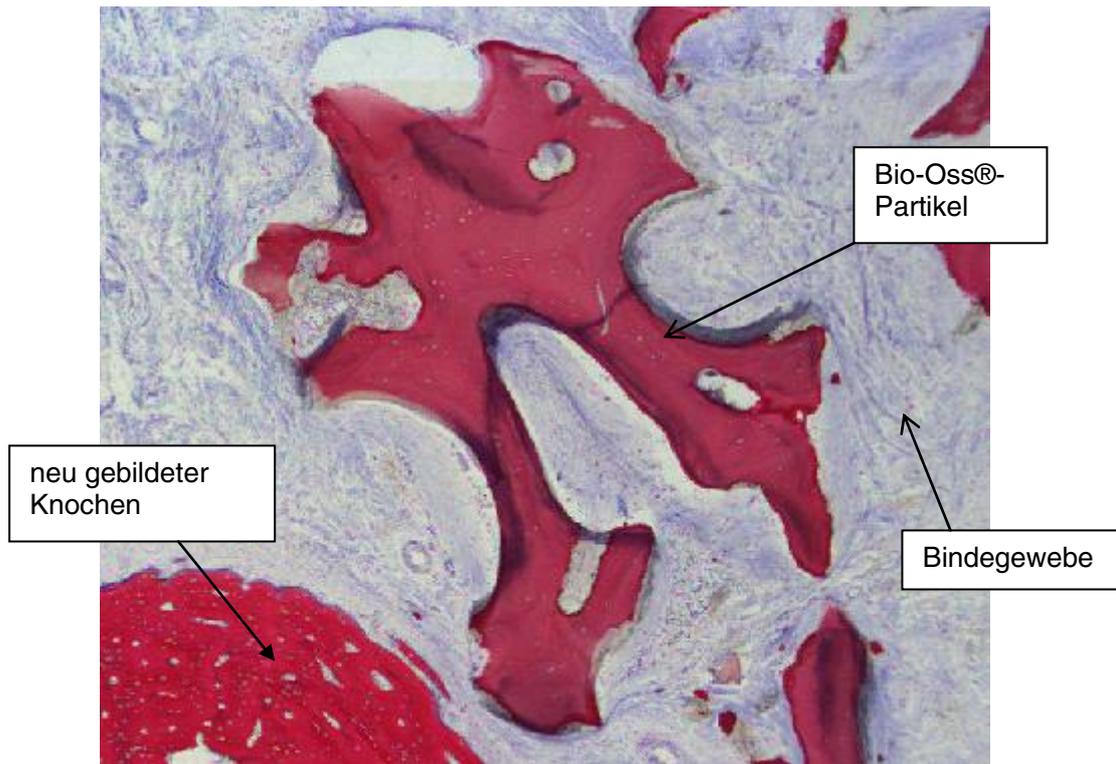
Die gute ossäre Integration ließ sich zum einen anhand der Auffüllung größerer Bio-Oss<sup>®</sup>-Poren mit Knochen und zum anderen am nahtlosen Verbund zwischen neuem Knochen und Partikeloberfläche belegen. Einzelne Partikel hatten noch keine Knochenanlagerung. Sie waren von extrazellulärer Matrix und fibrösem Gewebe umgeben (Abb.4-13).

Vaskularisationszeichen der Bio-Oss<sup>®</sup>/MSC-Komplexe konnten in den Augmentaten bereits nach acht Wochen beobachtet werden.

Der neugebildete Knochen wies sowohl im Bereich zwischen den Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln liegend als auch außerhalb dieser die gleiche Struktur und eine gleichmäßige Verteilung der Osteozyten auf.



**Abb.4-12:** Knöcherner Verbund zwischen Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln und neu gebildetem Knochen. Lichtmikroskopische Aufnahme, 50fache Vergrößerung. Weichgewebefärbung Azur II (blau); Oberflächenfärbung Pararosanilin (neu gebildeter Knochen = hellrot, Bio-Oss<sup>®</sup> = magenta-violett).



**Abb. 4-13:** Extrazelluläre Matrix um Bio-Oss®-Partikel. Lichtmikroskopische Aufnahme, 50fache Vergrößerung. Weichgewebefärbung Azur II (blau); Oberflächenfärbung Pararosanilin (neu gebildeter Knochen = hellrot, Bio-Oss® = magenta-violett).

## 5. Diskussion

Mit dieser Arbeit war zu prüfen, inwieweit mesenchymale Stammzellen zusammen mit dem bovinen Knochenersatzmaterial Bio-Oss® einen osteoinduktiven Effekt bei der Sinusbodenaugmentation haben. Die Untersuchungen wurden im Hinblick auf einen zukünftigen klinischen Einsatz in der Hartgewebs-Kieferchirurgie vorgenommen. Die positiven osteoinduktiven Effekte sind inzwischen sowohl für mesenchymale Stammzellen, als auch für Bio-Oss® belegt (HÜRZELER et al. 1997; SCHMITT et al. 2007; VALENTINI und ABENSUR 2003). Nicht bekannt war zu Studienbeginn, ob die Kombination beider Augmentationsmaterialien vorteilhaft ist verglichen mit ihrem separaten Einsatz. Zudem kann dieser Versuch als ein weiterer Beleg für die mögliche erfolgreiche Durchführung der Sinusbodenelevation im einzeitigen Verfahren dienen.

### Anmerkungen zum Tiermodell

Um ein hohes Maß an Übertragbarkeit der Operationsmethoden und ihrer Ergebnisse sicherzustellen sowie Reproduzierbarkeit unter gleichen Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde wie bereits in vorangegangenen Studien das Tiermodell gewählt. Die Vorteile ein standardisiertes Tiermodell zu nutzen, ergeben sich aus tierschützerischer Sicht dahingehend, dass die Ergebnisse ggf. auf den Menschen übertragen werden können, ohne weitere Tierversuche durchführen zu müssen (NUSS et al. 2006).

Für diesen Versuch wurden Schafe gewählt. Hauptkriterium dafür war, dass die Knochen hinsichtlich Größe, Struktur und Regenerationsfähigkeit mit dem des Menschen vergleichbar sind (NUSS et al. 2006; THIELEMANN et al. 1984). Häufig werden für Studien zu Knochenersatzmaterialien Kleintiere, insbesondere Nager, genutzt. Ihr Knochengewebe weist verglichen zum Menschen eine deutlich höhere Regenerationsfähigkeit und auch einen differierenden Aufbau auf. Entsprechend sind die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar (WISSING et al. 1990, KEYDEL 2002; NUSS et al. 2006). Schafe und Hunde weisen dagegen eine nur geringfügig höhere ossäre Regenerationsrate auf als der Mensch (STÜRMER et al. 1980). Besonders vom Schaf können am ehesten reproduzierbare Rückschlüsse auf die Regenerationsvorgänge beim Menschen abgeleitet werden (WISSING et al. 1990). Dies ist vor allem auch der hohen mikromorphologischen Ähnlichkeit der Knochenstruktur von Mensch und Schaf geschuldet (REHMANN et al. 1995).

Schafe zu wählen ist zudem vorteilhaft, weil es einfach ist, eine Gruppe genetisch verwandter Individuen im Hinblick auf Alter, Gewicht und Größe zu züchten, so dass standardisierte Grundlagen geschaffen sind. Tierverhalten und Tiergröße machen zudem

Haltung und Behandlung leicht (PEARCE et al. 2007). Junge Tiere zu verwenden lässt leichter eine homogene Gruppe zusammenstellen, zudem ist das Regenerationspotential junger Tiere höher als das adulter (ATKINSON et al. 1982). Ein weiterer Vorteil im Hinblick auf die Gewinnung von Knochenmark aus dem Beckenkamm ist, dass Lage und Größe der Crista iliaca dorsalis cranialis bei Schaf und Mensch sehr ähnlich sind (CORNWALL et al. 2002).

Im Bereich der Zahnmedizin wurden Schafe bereits in verschiedenen Studien als Versuchstiere eingesetzt. So wurden Resorption und Umbauvorgänge des Unterkieferknochens in verschiedenen Wachstumsphasen sowie in Abhängigkeit von Zahnverlusten untersucht, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu prüfen (ATKINSON et al. 1982). Auch die Auswirkung zahnmedizinischer Therapeutika wie Fluoride auf Knochen und Zähne wurde an Schafen erprobt (CHAVASSIEUX 1990). Weiterhin konnte am Schafmodell gezeigt werden, dass die Knochenmineralisationsdichte, die hormonellen Schwankungen unterliegt, bei Schaf und Mensch sehr ähnlich ist (GEUSENS et al. 1996). Auch wurden Schafe bereits mehrfach für Studien zu Kieferhöhlenaugmentationsverfahren eingesetzt (HAAS et al. 2003; HAAS et al. 2002a; HAAS et al. 2002b).

### **Tissue Engineering**

Mit dem Tissue Engineering ist es möglich, Gewebe zu reparieren oder gar zu ersetzen, falls der körpereigenen Gewebsneubildung infolge von Trauma, Verlust oder ähnlicher Schädigung Grenzen gesetzt sind. War lange Zeit der Ersatz bzw. die Reparatur solcher Gewebe nur mit Hilfe künstlicher avitaler Materialien möglich, kann dies inzwischen durch lebende Zellen und Strukturen verbessert werden. Gewebestrukturen können so rekonstruiert bzw. konstruiert werden. Dies soll den aktuellen Zustand verbessern oder zur Heilung ad integrum führen. Die Wiederherstellung der Funktion ist dabei vorrangig (LANGER und VACANTI 1993; VACANTI und LANGER 1999).

In der Zahnheilkunde kann dies bei Zahnlosigkeit mit Hilfe von feststehendem Zahnersatz erreicht werden. So wird es möglich, der herausnehmbaren Prothese zu entgehen. Die Implantologie kann für viele Menschen eine Lebensqualitätsverbesserung sein, da sie wieder eine normale Kaufunktion, Sprache und Ästhetik erhalten und somit das subjektive Gefühl von Wohlbefinden sichergestellt oder wiedererlangt wird (HENRY 1998).

Implantate gut zu verankern setzt ein ausreichend großes Knochenangebot im Kiefer voraus. Dazu ist besonders im kaudalen Bereich des Oberkiefers nach Zahnverlust häufig eine Kieferkammerhöhung erforderlich. Dies präimplantologisch über eine Sinusaugmentation

durch ein laterales Knochenfenster vorzunehmen, wurde erstmals von Boyne und James 1980 beschrieben. Sie setzten autologe Knochenspongiosa ein, die noch heute als Goldstandard der Augmentationsmaterialien gilt (BOYNE und JAMES 1980; CORDARO 2003).

Durch Tissue Engineering–Techniken sollen die Nachteile dieser Methode wie beschränkte Verfügbarkeit von Knochen aus dem Kieferwinkel oder zusätzlicher chirurgischer Eingriff am Becken vermieden werden. Wie in dieser Studie vorgenommen, können z.B. aus dem Knochenmark gewonnene, pluripotente Stammzellen eingesetzt werden. Sie werden nach Entnahme aus dem Knochenmarksaspirat im Labor aufbereitet und direkt reimplantiert. Im Sinus Maxillaris differenzieren die Stammzellen zu Osteoblasten. Auch die Implantation von Knochenersatzmaterial, z.B. Bio-Oss<sup>®</sup>, macht es möglich, das benötigte Knochengewebsangebot zu rekrutieren. Es kann allein oder zusammen mit anderen osteoinduktiven Substanzen, z.B. mesenchymalen Stammzellen oder Wachstumsfaktoren verwendet werden. Nicht nur die Entnahme größerer Mengen autologen Knochengewebes wird umgangen, sondern es bedarf auch keines weiteren Eingriffs, um autologen Knochen zu gewinnen. Den Kieferkamm mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu erhöhen, ist sowohl im Hinblick auf Technik als auch Material vielfach beschrieben (DRÄNERT und EISENMENGER 2007; TATUM 1986; Dental Vademaecum 9. Auflage).

### **Bovines Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup>**

Zur Anwendung des bovinen Knochenersatzmaterials Bio-Oss<sup>®</sup> in der Kieferchirurgie bei der Sinusbodenelevation konnten bereits ohne Zugabe anderer Augmentationskomponenten positive Langzeitergebnisse im Hinblick auf Knochenneubildung und Implantatüberlebensrate erarbeitet werden (HÜRZELER et al. 1996; VALENTINI und ABENSUR 2003). Die Beobachtungszeiträume betragen bis zu zehn Jahre. Unter den Knochenersatzmaterialien ist Bio-Oss<sup>®</sup> ein etablierter Werkstoff, der praktisch klinisch angewendet wird (ARTZI et al. 2003; HAAS et al. 1998; PIATELLI et al. 1999; SARTORI et al. 2003; SCHLEGEL et al. 2003). Das Material hat osteokonduktives Potential, es induziert keine Entzündungsreaktionen oder Abwehrreaktionen des Immunsystems und zeichnet sich durch eine gute Osseointegration aus (BERGLUNDH und LINDHE 1997; SARTORI et al. 2003), so dass es die Knochenneubildungsrate verbessert.

Langzeitergebnisse zu Bio-Oss<sup>®</sup> kombiniert mit osteoinduktiven Materialien, die zur Knochengewebsneubildung führen, liegen vor. So wurde die Implantation des bovinen Knochenersatzmaterials mit venösem Blut beimpft bzw. zusätzlich autologe Spongiosa aufgetragen (YILDRIM et al. 2000). Es konnte jeweils eine hohe Osteointegrationsrate

festgestellt werden (YILDRIM et al. 2001). Die Kombination von Bio-Oss<sup>®</sup> mit zahlreichen weiteren Materialien, denen Osteoinduktivität zugesprochen wird, belegt mit positiven Ergebnissen, dass Bio-Oss<sup>®</sup> mit derartigen Kombinationen osteoinduktive Faktoren erfolgreich nutzen kann (TAPETY et al. 2004).

Knochengewebe kann unabhängig vom Transplantatmaterial endostal regenerieren. In der Kieferhöhle startet die Regeneration aus dem Kieferhöhlenboden. Entscheidend ist, dass dem Knochen Raum gelassen wird, um sich zu vermehren. So kann auch das osteoinduktive Potential autologer Knochentransplantate erklärt werden. Mit den Knochenpartikeln gelangen osteogene Zellen an den Transplantationsort, sie sind in gewisser Weise unabhängig im Hinblick auf ihre Osteoinduktivität, da sie ohne diese Zellen auf Knocheinsprossung aus dem Kieferhöhlenboden angewiesen wären, um die Knochenneubildung auszulösen (JENSEN et al. 1998; LUNDGREN et al. 2004; SHULMAN und JENSEN 1998).

Weder der Knochen noch das Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> müssen demnach, falls sie entsprechend präpariert bzw. platziert sind, von osteoinduktiv wirksamen Materialien unterstützt werden, um Knochenneubildung zu induzieren. Anzustreben ist, vorgegebene Ausgangsstoffe durch den Einsatz solcher Materialien positiv zu beeinflussen, so dass daraus eine schnellere, qualitative und quantitative Steigerung der Knochenneubildung erzeugt wird. Osteoinduktive Faktoren werden dabei als entscheidende Erfolgsfaktoren, auch im Hinblick auf den Herstellungsprozess bovinen Knochenersatzmaterials, angesehen (CORDARO 2003; MERKX et al. 2003). Insgesamt tragen diese Faktoren zur Kieferkammerhöhung im Sinuslift bei, die Implantat-Überlebensrate zu erhöhen. Sie lassen sich zudem in der Chirurgie auch immer dort einsetzen, wo eine Knochengewebsneubildung stimuliert werden soll.

Die vorliegende Studie ist ein weiterer Baustein, eine optimale Materialzusammensetzung zu finden, die Osteogenese noch besser zu induzieren. Im Vergleich von Bio-Oss<sup>®</sup> allein und Bio-Oss<sup>®</sup> kombiniert mit mesenchymalen Stammzellen konnte für das bovine Knochenersatzmaterial erneut die hohe Biokompatibilität und gute Osteokonduktivität und Osseointegration bestätigt werden.

Bovines Bio-Oss<sup>®</sup> muß zunächst einmal als potentiell pathogenes und allergenes Material angesehen werden, auch wenn es bei der Herstellung denaturiert wird. Dabei werden nicht nur die allergen wirksamen Proteine und organischen Bestandteile, sondern auch die Prionen, die die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) verursachen können, zerstört. Bio-Oss<sup>®</sup> wird von australischen Rindern aus geschlossenen, BSE-freien Populationen gewonnen. Durch Hitzesterilisation werden die Knochenteile deproteinisiert, erhalten bleibt nur die anorganische Knochenmatrix und ihre osteokonduktive Potenz. Die Knochenmatrix

ähnelt in ihrer makro- und mikroporösen Struktur der menschlichen Spongiosa. Mineralanteile und mechanische Eigenschaften entsprechen dem Knochen des Menschen (SPECTOR 1994). Das im bovinen Knochenersatzmaterial enthaltene Apatit besteht aus mehr Carbonat- und weniger Hydroxylapatitgruppen. Kalzium- und Phosphatgruppen liegen im Verhältnis 2:1 vor. Sein weitmaschiges Netz aus Spongiosabälkchen erreicht eine innere Oberfläche von etwa 100 m<sup>2</sup> pro Gramm. Es dient als Leitschiene der Osteoblastenanlagerung und Osteoidbildung. Seine natürliche Zusammensetzung bietet günstige Voraussetzungen, dass neuer Knochen sich bildet und einwachsen kann und Kapillaren am Implantationsort einsprossen können.

Da bei der Herstellung von Bio-Oss<sup>®</sup> alle Proteine zugunsten der Sterilität und dem Schutz vor BSE verlorengehen, wird der Einsatz dieses Knochenersatzmaterials zusammen mit osteoinduktiven Faktoren anderer Materialien als entscheidender Erfolgsfaktor angesehen (CORDARO 2003; MERKX et al. 2003).

### **Mesenchymale Stammzellen (MSCs)**

Aus der Zahnmedizin liegen bereits vielversprechende Ergebnisse vor, mit Stammzellen Gewebe des Zahnapparates zu regenerieren, so dass der Einsatz humaner embryonaler Stammzellen denkbar ist. Sie sind fähig, sich in alle Körperzellen zu differenzieren (Pluripotenz) und theoretisch endlos zu teilen. Sie bieten eine schier unerschöpfliche Quelle, dentales und ossäres Ersatzgewebe zu bilden (COWAN et al. 2004; TROUNSON 2004). Da eine Kanzerogenität nach Transplantation nicht ausgeschlossen ist, sind sie für die Zelltherapie noch nicht geeignet (YOSHIMURA 2006). Ethisch bedenklich ist, dass um Stammzellen zu gewinnen, ungeborenes Leben getötet werden muß. Adulte Stammzellen anzuwenden, gilt als ethisch unbedenklich. In Form mesenchymaler Stammzellen sind sie lebenslang Regenerationsquelle mesenchymaler Gewebe. Sie befinden sich im Zyklusarrest, bis der Bedarf an Vorläuferzellen mesenchymaler Gewebe signalisiert wird. Sie differenzieren z.B. zu Zellen von Knochen-, Knorpel-, Muskulatur- und Fettgewebe. Es ist nachgewiesen, dass derartige Progenitorzellen vorliegen und zu Zellen mesenchymaler Gewebe differenzieren (FRIEDENSTEIN et al. 1976; FUCHS und SERGE 2000; PITTENGER et al. 1999). Vorteilhaft ist, dass die Zellen lediglich aus mehr oder weniger großen Gewebeproben eines Patienten entnommen werden müssen und sich leicht isolieren lassen. Sie induzieren als autologes Gewebe ausserdem bei der Übertragung keine Transplantatsabstoßungsreaktionen. Nachteilig ist, dass sich adulte Stammzellen nur begrenzt vermehren können. Ihre Differenzierung zu Dentalgewebe ist bisher wenig untersucht (MARIA et al. 2007; MORSCZECK et al. 2007; TROUNSON 2004).

Derzeit wird geprüft, ob dentale, ektomesenchymale Stammzellen geeignet sind, in der Zahnheilkunde eingesetzt zu werden (MORSCZECK et al. 2007; YEN und SHARPE 2006). Aus der Reihe der adulten Stammzellen sind die mesenchymalen fähig, bei der Gewebeneubildung osteoinduktiv wirksam zu sein, wie durch zahlreichen Studien des Tissue Engineerings zur Gewebedifferenzierung belegt ist (ABUKAWA et al. 2003; MANKANI et al. 2004; PETITE et al. 2000; PITTENGER et al. 1999; YAMADA et al. 2004). In der vorliegenden Studie wurden sie aufgrund dieser Potenz mit dem osteokonduktiv wirksamen Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> kombiniert. Absicht war, eine gesteigerte Knochenneubildung im Sinuslift anzuregen. Zudem beeinflussen sie auch die Wundheilung positiv (CONNOLLY 1995). Bei der Kombination von körperfremden Scaffolds mit MSCs können Stammzellen aufgrund ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten, deren Wirkungsprinzip allerdings bisher nicht geklärt ist, vorteilhaft eingesetzt werden. So kommt es beispielsweise seltener und weniger stark zu Transplantatabstoßungsreaktionen (BARTHOLOMEW et al. 2002). Zudem hemmen sie die Produktion zytotoxischer Lymphozyten in vitro und sind gegen derartige und natürliche Killerzellen resistent (LE BLANK 2006).

Als Entnahmeort für die Gewinnung mesenchymaler Stammzellen wurde in der vorliegenden Studie das Knochenmark aus dem Beckenkamm gewählt. Material und Entnahmeort hatten sich schon in anderen Versuchen als sprudelnde Quelle mesenchymaler Stammzellen erwiesen. Bei der Entnahme ist die Aspiration des Knochenmarks der Biopsie vorzuziehen, weil so die Belastung durch etwaige Folgen eines Eingriffs bei einem Knochenmarkspender sehr gering gehalten werden. Protokolle zur standardisierten Aspirationstechnik können zur weiteren Optimierung der Gewinnung der maximalen Zahl und Konzentration an MSCs beitragen (MUSCHLER et al. 1997).

So gewonnenen MSCs werden geeignete Medien zugegeben, so dass sie sich vermehren und ausdifferenzieren, um in dem Empfänger wieder implantiert zu werden. Dies wird meist, wie in diesem Versuch, auf geeignetem Trägermaterial vorgenommen. Die Trägermaterialien können aber auch schon vor der Implantation mit Osteoprogenitorzellen besiedelt werden, so dass positive Ergebnisse erwartet werden können (MUSCHLER et al. 1997). Nachteilig ist, dass zweizeitig vorzugehen ist, und damit der Patient mehr belastet wird und die Kosten durch Zweiteingriff und Laborleistungen steigen. Bisher kann auf in vitro-Maßnahmen zur präimplantologischen Präparation mesenchymaler Stammzellen noch nicht verzichtet werden. Unter anderem ist zu gewährleisten, dass die Höhe der Stammzellzahl bestimmt werden kann und so das Resultat im Vorfeld einschätzbar ist. An der Stammzellzahl kann bereits etwa die Zahl der Osteoblasten-Progenitorzellen abgelesen werden (OWEN und FRIEDENSTEIN 1988; RICKARD et al. 1996).

Der Abschätzung der Stammzellzahl kommt somit schon im Vorfeld der Implantation große Bedeutung zu. Laut Muschler et al. (1997) kann ein Zusammenhang zwischen Aspirationsvolumen, den darin enthaltenen kernhaltigen Zellen und der Zahl der mesenchymalen Stammzellen hergestellt werden. Aus einer großen Zahl kernhaltiger Zellen lässt sich immer auch eine höhere Zahl mesenchymaler Stammzellen ableiten. Eine geringe Zahl kernhaltiger Zellen kann über ein größeres Aspirationsvolumen ausgeglichen werden. Bei einem sehr großen Aspirationsvolumen nimmt die Zahl kernhaltiger Zellen pro Milliliter ab, die Gesamtzahl der Zellen steigt jedoch, wohl durch Vermischung mit peripherem Blut (MUSCHLER et al. 1997). Die Stammzellzahl selbst ist erheblichen individuellen Schwankungen unterworfen (MAJORS et al. 1997).

Die Zahl der in einem Milliliter Aspirationsvolumen enthaltenen mononukleären Zellen der menschlichen Studiengruppe schwankte individuell zwischen 26 und 180 Millionen (MUSCHLER et al. 1997). In der vorliegenden Studie wurden individuell von Schaf zu Schaf Schwankungen der in der Neubauer-Zählkammer ausgezählten Zahl kernhaltiger Zellen pro Milliliter Aspirat von 54 bis 900 Millionen ermittelt. Diese Werte liegen zum Teil deutlich über denen von Muschler et al. (1997).

Im Mittel wurden bei Muschler et al. (1997) 36 koloniebildende Einheiten pro 1 Million kernhaltiger Zellen, bei einer Schwankungsbreite von 10 bis 200 MSCs (als kbE), gefunden (MUSCHLER et al. 1997). Caplan (1994) hat das bestätigt (CAPLAN 1994). Das Mittel koloniebildender Einheiten mesenchymaler Stammzellen in der vorliegenden Studie reiht sich mit 37 pro 1 Million Zellen in diese Größenordnung ein.

Es können relativ gleichviele mesenchymale Stammzellen gefunden werden, obwohl die Zahl der mononukleären Zellen starken Schwankungen ausgesetzt ist. Da in der vorliegenden Studie kein präoperativer Blutstatus erstellt wurde, ist nicht auszuschließen, dass Einflußfaktoren auf das weiße Blutbild, wie beispielsweise ein unerkannter Infekt oder eine versteckte Blutung, die Zahl der mononukleären Zellen reduzierten.

Dennoch wurde ein Zusammenhang zwischen der Zahl der mononukleären Zellen und der Zahl der koloniebildenden Einheiten festgestellt: War die Zahl kernhaltiger Zellen hoch, war auch eine höhere Zahl mesenchymaler Stammzellen zu isolieren. Dieser Zusammenhang konnte mit einem Korrelationskoeffizient von 0,67 allerdings nur tendenziell nachgewiesen werden.

Zwar sind die Ergebnisse aus dem Tierversuch nur unter Vorbehalt auf den Menschen übertragbar. Sie sind aber ein weiterer Beleg einer erfolgreichen Kieferhöhlenaugmentation mit mesenchymalen Stammzellen. Wie bereits in anderen Studien bestätigt (OHYA et al. 2005; GUTWALD et al. 2008) konnten auch wir keine Reizerscheinungen oder andere

Unverträglichkeitsreaktionen feststellen. Die Praktikabilität der Methode zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus dem Beckenkammaspirat und die Aufbereitung des Aspirats konnte in einer klinischen Pilotstudie bestätigt werden (STRICKER et al. 2003).

### **Histomorphometrische und histologische Ergebnisse**

Die histomorphometrische Auswertung der Gewebeschliffe wurde computergestützt analysiert. So lassen sich Gewebemerkmale quantitativ bestimmen und objektiv reproduzierbar auswerten werden. Gutwald et al. (2008) sind so erstmals vorgegangen und konnten vergleichbare Ergebnisse aufzeigen. Damit wurden Grundlagen geschaffen, eine von menschlichen Fehlbeurteilungen weitgehend unabhängige Analyse durchzuführen; das war insbesondere hinsichtlich der Bewertung von Farbton und Farbintensität sicherzustellen. Fehlerquellen können sich dort ergeben, wo subjektive Entscheidungen getroffen werden müssen: Dies sind die Definition der „region of interest“ sowie das zeichnerische Umfahren der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel zur Festlegung der Grenzzonen. Werden die Messungen von einem einzelnen Untersucher durchgeführt, wie in der vorliegenden Studie geschehen, wird von einer Kontinuität innerhalb der Studie ausgegangen. Insgesamt hat der Versuch aufgrund niedriger Probandenzahl eher deskriptiven Charakter.

Histologisch wiesen in den Schliffpräparaten der Tiere alle eine gute ossäre Integration der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel innerhalb des Knochengewebes auf. Nach ZITZMANN et al. (1998) wird dieses Phänomen der Geflechtknochenbildung als „bridging“ bezeichnet (ZITZMANN und SCHÄRER 1998). Es besteht ein nahtloser Verbund zwischen neu gebildetem Knochengewebe und der Oberfläche der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel. Sowohl nach 8, als auch nach 16 Wochen erwies sich das bovine Knochenersatzmaterial als Matrix der Knochenneubildung. Die Oberflächen des Ersatzmaterials waren größtenteils direkt, d.h. ohne Spaltbildung von neu gebildetem Knochen umlagert. Im Rahmen der Knochenneubildung ist dies entscheidend für die suffiziente Reifung des Knochens durch langsames Remodelling (ZITZMANN und SCHÄRER 1998). Dies wird auch durch die Resorption des implantierten Materials beeinflusst. Nicht in jedem Fall lässt sich aus einer hohen Resorptionsrate eine suffiziente Mineralisation neu gebildeten Knochens schlussfolgern (ZIZELMANN et al. 2007). Für Bio-Oss<sup>®</sup> wurde bereits in anderen Studien eine unvollständige Resorption der Partikel auch nach längerer Liegezeit belegt (BERGLUNDH und LINDHE 1997; WETZEL et al. 1995). BERGLUNDH et al. (1997) konnten im Beaglehundmodell an orthodontischen Zahnbewegungen zeigen, dass im Verlauf des physiologischen Remodelling des Knochens Bio-Oss<sup>®</sup> resorbiert wird. Der neu aufgebaute Knochen enthält keine Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel

(BERGLUNDH und LINDHE 1997). Im vorliegenden Versuch wurden die prozentualen Flächenanteile der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel an der Gesamtfläche bestimmt. Es wurde ein nicht signifikanter Rückgang des Bio-Oss<sup>®</sup>-Anteils über die Zeit festgestellt. Der Durchschnittswert des prozentualen Flächenanteils der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel lag mit 18 % testseitig und 18 % kontrollseitig nach 8 Wochen höher als mit 15% testseitig und 14 % kontrollseitig nach 16 Wochen.

Die Einzeltielergebnisse bezüglich der Flächenanteile der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel und der Höhe der Zahl der mesenchymalen Stammzellen wurden test- und kontrollseitig verglichen. Dabei konnten keine Rückschlüsse auf eine direkte Abhängigkeit der Größe des Bio-Oss<sup>®</sup> - Flächenanteils von der Höhe der Stammzellzahl gezogen werden. Nach 8 Wochen wurde bei Nr. 45 ein niedrigerer Flächenanteil des Bio-Oss<sup>®</sup> testseitig als kontrollseitig festgestellt. Es muß ein resorptiv bedingter Rückgang des Bio-Oss<sup>®</sup> vermutet werden. Nach 16 Wochen stellten sich die Flächenanteile des Bio-Oss<sup>®</sup> im Größenvergleich homogen dar. Ein resorptiv bedingter Rückgang der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel war bei keinem der Tiere dieses Zeitraumes zu erkennen.

Den Einzelergebnissen nach bestand kein Zusammenhang zwischen der Stammzellzahl und einer resorptiv bedingten Flächenanteilsverkleinerung der Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel. Sowohl die Abnahme des Biomaterials über die Zeit als auch der Unterschied zwischen Test- und Kontrollseite waren nicht signifikant. Es wurde eine von der Höhe der Stammzellzahl unabhängige Knochenneubildung festgestellt. Inwieweit sich der langsame Prozess des Remodelling im Falle dieses Knochenersatzmaterials positiv auf die Bildung suffizienten neuen Knochengewebes auswirkt (ZITZMANN und SCHÄRER 1998), ist Folgestudien vorbehalten.

Um den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenneubildung in dieser Studie zu ermitteln und somit eine Einschätzung ihres osteoinduktiven Potentials bei ihrer Kombination mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> treffen zu können, werden die prozentualen Flächenanteile des neu gebildeten Knochens in Beziehung zur Zahl der Stammzellen gesetzt. Entsprechend wurde bei den einzelnen Tieren jeweils zwischen Kontroll- und Testseite verglichen. Die fortschreitende Knochenneubildung sowohl test- als auch kontrollseitig war in beiden Gruppen signifikant.

Der geringe Anfall neu gebildeten Knochens bei Nr. 43 und 44 könnte von der geringgradigen postoperativen Wundheilungsstörung beeinflusst sein. Dies ist auch für Nr. 42 testseitig mit Schwellung und geringgradiger Wundsekretion wohl die Ursache der hier

festgestellten geringen Knochenneubildung. Bei den verbleibenden drei übrigen Tieren ohne Wundkomplikationen war die Knochenneubildung homogen.

Vergleicht man die Durchschnittsergebnisse test- und kontrollseitig, ist von einer höheren Dichte des Augmentats und somit des Implantationslagers nach 8-Wochen auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> augmentierten Seite als der Kontrollseite auszugehen. Dasselbe ergibt sich nach 16 Wochen auf der mit Bio-Oss<sup>®</sup> und mesenchymalen Stammzellen augmentierten Testseite.

Der positive Einfluss der Stammzellen auf die Knochenregeneration mit Hilfe von Knochenersatzmaterialien konnte auch in einer Studie von Jafarian et al. (2008) an Unterkieferknochen von Hunden nach sechs Wochen nachgewiesen werden. Es wurden dabei eine biphasische Calciummatrix mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> allein und unter dem Einfluß von mesenchymalen Stammzellen verglichen. Bei den mit Bio-Oss<sup>®</sup> und Stammzellen gefüllten Knochendefekten konnte eine größere Knochenneubildung festgestellt werden als mit Bio-Oss<sup>®</sup> allein (JAFARIAN et al. 2008). Auch Khojasteh et al. (2008) fanden eine verbesserte Knochenregeneration unter Zugabe von mesenchymalen Stammzellen in einer Studie an Ratten. Sie setzten das Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> unter Zusatz von mesenchymalen Stammzellen auf der einen und unter Zusatz von Platelet rich plasma ( PRP) auf der anderen in Knochendefekte ein. Die mit MSCs kombinierte Seite erbrachte vergleichend eine größere Knochenneubildung als die mit PRP (KHOJASTEH et al. 2008).

In der vorliegenden Studie wurde die Knochenneubildungsrate über die Zeit verglichen und eine signifikant schnellere Knochenneubildung test- als kontrollseitig festgestellt. Das im zeitlichen Vergleich größere Knochenwachstum der Testseite war unabhängig von der Dichte der zugefügten mesenchymalen Stammzellen. Eine verbesserte Knochenneubildung fanden auch Pieri et al. (2008) beim Zusatz von mesenchymalen Stammzellen zu Fluorhydroxyapatit in der Sinusbodenaugmentation gegenüber dem Biomaterial allein. In der Studie an acht Schweinen konnte innerhalb von 12 Wochen ein deutlicher Anstieg der Knochenneubildung auf der Testseite festgestellt werden (PIERI et al. 2008).

### **Computertomographische Volumenbestimmung**

Der computertomographische Vergleich des rechten und linken Augmentationsvolumens bei dem jeweiligen Tier wurde vorgenommen, um über Volumenab- oder -zunahme bzw. ein gleich bleibendes Volumen gegenüber den eingebrachten 3,5 cm<sup>3</sup> Rückschlüsse auf die im Organismus abgelaufenen Umbauvorgänge ziehen zu können.

Im Gruppenvergleich ist das durchschnittliche Augmentationsvolumen nach 16 Wochen sowohl test- als auch kontrollseitig niedriger als das nach 8 Wochen, welches insgesamt eine geringere Volumenabnahme aufweist als das implantierte.

Dabei hat das Tier Nr. 44 sowohl test- als auch kontrollseitig mit 3,01 cm<sup>3</sup> und 2,72 cm<sup>3</sup> ein größeres Volumen als der Gruppendurchschnitt. Bei dem Tier wurde vergleichend die höchste Anzahl mesenchymaler Stammzellen ermittelt. Es hatte zudem im Vergleich den größten Flächenanteil an Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln bezogen zur Gesamtfläche. Inwieweit aus diesen Einzelkomponenten die Volumenzunahme des Augmentats resultiert, kann nicht klar beantwortet werden. Die beiden anderen Tiere (Nr. 43, Nr. 45) hatten beidseitig durchschnittliche Volumina. Nach 16 Wochen betragen die Volumina bei Nr. 40 mit 2,85 cm<sup>3</sup> kontroll- und 2,61 cm<sup>3</sup> testseitig von ursprünglich eingebrachten 3,5 cm<sup>3</sup>. Noch niedrigere Volumina verglichen mit dem Ausgangsbefund wiesen Nr. 41 und 42 sowohl test- als auch kontrollseitig auf. Bei Tier Nr. 41 betrug der Wert 1,51 cm<sup>3</sup> zu 1,96 cm<sup>3</sup> und bei Tier Nr. 42 1,96 cm<sup>3</sup> zu 1,94 cm<sup>3</sup>. Ob die Wundinfektion testseitig bei Tier Nr. 42 über eine verminderte Knochenneubildung zu einer Reduktion des Augmentationsvolumens geführt haben könnte, kann nicht bewiesen werden, zumal kontrollseitig ein gegenüber dem Anfangsvolumen kleineres Augmentationsvolumen bestand.

Die direkte Beeinflussung des jeweils erreichten Augmentationsvolumens durch die Höhe der Zahl der mesenchymalen Stammzellen konnte nicht nachgewiesen werden.

### 5.1 Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnte dargestellt werden, inwieweit mesenchymale Stammzellen einen positiven Einfluss auf die Knochenneubildung im kombinierten Einsatz mit dem bovinen Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> ausüben. Es wurde die komplikationslose Anwendbarkeit der mesenchymalen Stammzellen hinsichtlich ihres Einsatzes im Knochengewebsaufbau bestätigt. Sie resultiert insbesondere aus ihrer guten Biokompatibilität, durch die MSCs eine wichtige Voraussetzung des idealen Gewebeersatzes erfüllen. Diese Eigenschaft konnte auch erneut für das Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> belegt werden.

Die Kombination der beiden Komponenten führt den Ergebnissen der histomorphometrischen Analyse nach im Beobachtungszeitraum, der hier mit 16 Wochen vorgegeben war, zu einem verbesserten Ergebnis hinsichtlich einer schnelleren Knochenneubildungsrate und daraus resultierender Knochendichte des Augmentats. Die osteoinduktive Eigenschaft der MSCs bleibt dabei unabhängig von ihrer Zahl. Vorausgegangen Untersuchungen zufolge kann bei diesem scheinbar langsameren Prozess des Remodelling von der Bildung suffizienten neuen Knochengewebes ausgegangen werden. Im kürzeren Beobachtungszeitraum konnte das bovine Knochenersatzmaterial den größeren Flächenanteil neu gebildeten Knochens erreichen, was ihm hier den Faktor der wahrscheinlich höheren Knochendichte zuspricht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der histologischen Beurteilung erscheint eine belastbare Knochenstruktur, resultierend aus einer hohen Integrität der Augmentationsmaterialien erst nach 16 Wochen erreicht. Das ist bei der Insertion von Implantaten zu berücksichtigen.

Ausgehend von der Suche nach Alternativen zum Goldstandard unter den Augmentationsmaterialien, der autologen Spongiosa, führen die positiven Eigenschaften hinsichtlich Osteokonduktivität und Osteoinduktivität von Bio-Oss<sup>®</sup> und mesenchymalen Stammzellen durch Kombination dieser Materialien in dieser Studie zu einer nachweislichen Verbesserung des Ergebnisses der Knochenneubildung. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass Knochenmarksaspirat aus dem Beckenkamm komplikationslos anwendbar ist. So ist es möglich, bei der Wahl der geeigneten Methode der für den Patienten weniger belastenden Methode den Vorzug zu geben.

Eine Abhängigkeit des Augmentationsvolumens von der Zahl der mesenchymalen Stammzellen und damit auch auf die Knochenneubildungsrate kann nicht festgestellt werden. Inwieweit sich der langsame Prozess des Remodelling im Falle dieses Knochenersatzmaterials positiv auf die Bildung suffizienten neuen Knochengewebes

auswirkt (ZITZMANN und SCHÄRER 1998), müsste in nachfolgenden Studien beispielsweise anhand der Implantatüberlebensrate oder anhand von Dichtebestimmungen des neu gebildeten Knochengewebes ermittelt werden.

Diese Studie belegt die positiven Eigenschaften von MSCs bezüglich ihrer Biokompatibilität. MSCs erfüllen die Voraussetzungen, um Knochenersatz zu vitalisieren: sie sind biokompatibel, werden vollständig von neu gebildetem Knochen ersetzt und besitzen osteoinduktive Eigenschaften (JENSEN et al. 1996).

Die Studie ist als ein weiterer Schritt auf der Suche nach der optimalen Materialzusammensetzung hinsichtlich der möglichen zu induzierenden Osteogenese zu verstehen. Im Vergleich zwischen Bio-Oss<sup>®</sup> auf der einen Seite und Bio-Oss<sup>®</sup> kombiniert mit mesenchymalen Stammzellen auf der anderen, konnte das bovine Knochenersatzmaterial erneut seine hohe Biokompatibilität, gute Osteokonduktivität und Osseointegration bestätigen. Durch den Zusatz von mesenchymalen Stammzellen können diese Eigenschaften positiv unterstützt werden.

### 6. Zusammenfassung

Ziel der vorgestellten Studie war der direkte Vergleich zweier unterschiedlicher Augmentationsverfahren hinsichtlich ihres osteoinduktiven Potentials im Sinuslift beim Schaf. Im Splitmouth-Modell wurde das bovine Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup> ohne Zusätze auf der Kontrollseite eingesetzt und auf der Testseite das Bio-Oss<sup>®</sup> mit autogenen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) kombiniert.

Es wurden drei Schafe für einen 8-wöchigen und drei weitere für einen 16-wöchigen Überlebenszeitraum eingesetzt. Die MSCs wurden in der gleichen Sitzung per Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm gewonnen, im Labor aufbereitet und dem Augmentat der Testseite hinzugefügt. Nach Ablauf der Beobachtungszeiträume wurden die Kieferhöhlenaugmentate computertomographisch, histologisch und histomorphometrisch ausgewertet.

Mit Hilfe der computertomographischen Daten konnten die Volumina der Kieferhöhlenaugmentate bestimmt und miteinander verglichen werden. Auf beiden Seiten konnten ähnliche Volumina, die etwa dem ursprünglich eingebrachten Volumen entsprachen, gemessen werden. Nach 16 Wochen war eine nicht signifikante Verringerung des Volumens des eingebrachten Materials zu verzeichnen.

Histologisch zeigte sich bei allen Tieren ein geschlossener Verbund zwischen Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln und neu gebildetem Knochengewebe, das als Zeichen guter ossärer Integration gewertet werden kann. Bei keinem Tier wurden innerhalb des Augmentats Zellen gefunden, die auf eine Entzündung schließen ließen. Dies kann als Hinweis auf eine gute Biokompatibilität sowohl von Bio-Oss<sup>®</sup> als auch MSCs gedeutet werden.

Zur Einschätzung des osteoinduktiven Potentials der Stammzellen bei der Kombination mit dem osteokonduktiv wirksamen Knochenersatzmaterial wurden die prozentualen Flächenanteile neu gebildeten Knochens auf beiden Seiten und in Gegenüberstellung der Überlebenszeiträume verglichen. Es konnte eine um 49 % schnellere Knochenneubildung auf der mit Stammzellen augmentierten Seite gefunden werden.

Die Kombination von Bio-Oss<sup>®</sup> mit mesenchymalen Stammzellen ist eine effektive Alternative zur Augmentation mit dem bovinen Knochenersatzmaterial Bio-Oss<sup>®</sup>.

## 7. Summary

Stubbe, Kerstin

### **Influence of mesenchymal stem cells on bone regeneration of sinus lift procedures in sheep.**

The aim of this splitmouth study was the comparison of bovine biomaterial (BBM) in combination with mesenchymal stem cells and BBM alone, regarding their osteoinductive potential in a sinus augmentation procedure in sheep.

There were two groups of different survival rates, each consisting of three animals: an 8 weeks group and a 16 weeks group. The MSCs that were added to the Bio-Oss<sup>®</sup> were taken from the iliac crest by bone marrow aspiration and processed in the laboratory at the same time as the sinus augmentation. The number of stem cells was measured by a colony forming units (cfu) experiment. The augmentation volume was evaluated computertomographically, histologically and histomorphometrically regarding a possible connection between the results and the presence of MSCs.

Because of individual differences, there was no obvious connection between the addition of MSCs and the achieved volume. The volumes of both sides were similar compared with the implanted volume of the 8-weeks group, while there was a diminution in the average volume of the material after 16 weeks it however was not significant.

Histologically in all of the animals a tight connection between the particules of Bio-Oss<sup>®</sup> and the new built bone material has been observed which is a sign of successful osseointegration. None of the animals showed any special cells which would indicate a sign of inflammation in the material. This proves a good biocompatibility of Bio-Oss<sup>®</sup> and the MSCs.

The area of newly formed bone on each side of the head after the different survival times was compared to assess the osteoinductive potential of MSCs in combination with Bio-Oss<sup>®</sup>. There was a significantly 49%-faster growth of newly formed bone at the test side compared to the control side.

This study showed that the combination of Bio-Oss<sup>®</sup> with mesenchymal stem cells can offer an effective alternative to the use of Bio-Oss<sup>®</sup> alone in sinus augmentation procedures.

## 8. Zitierte Literatur

ABUKAWA, H., H. TERAJ, D. HANNOUCHE, J.P. VACANTI, L.B. KABAN u. M.J. TROULIS (2003)

Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering.  
J Oral Maxillofac Surg 61, 94-100

AEBI, M., P. REGAZZONI u. O. SCHWARZENBACH (1989)

Segmental bone grafting. Comparison of different types of graft in dogs.  
Int Orthop 13, 101-111

ARTZI, Z., N. GIVOL, M.D. ROHRER, C.E. NEMCOVSKY, H.S. PRASAD u. H. TAL (2003)  
Qualitative and quantitative expression of bovine mineral in experimental bone defects. Part 1: Description of a dog model and histological observations.

J Periodontol 74, 1143-1152

ATKINSON, P.J., J.A. Spence, G. AITCHISON u. A.R. SYKES (1982)

Mandibular bone in ageing sheep.

J Comp Pathol 92, 51-67

AXHAUSEN, W. (1962)

Open treatment of chronic osteomyelitic bone cavities.

Chirurg 33, 70-74

BABBUSH, C.A., u. M.SHIMURA (1993)

Five-year statistical and clinical observations with the IMZ two-stage osteointegrated implant system.

Int J Oral Maxillofac Implants 8, 245-253

BARRY, F.P., R.E. BOYNTON, S. HAYNESWORTH, J.M. MURPHY u. J. ZAIA (1999)

The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105).

Biochem Biophys Res Commun 265, 134-139

BARTHOLOMEW, A., C. STURGEON, M. SIATSKAS, K. FERRER, K. MCINTOSH, S. PATIL, W. HARDY, S. DEVINE, D. UCKER, R. DEANS, A. MOSELEY u. R. HOFFMAN (2002)

Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.

Exp Hematol 30, 42-48

BERESFORD, J.N., J.H. BENNETT, C. DEVLIN, P.S. LEBOY u. M.E. OWEN (1992)

Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures.

J Cell Sci 102 (Pt 2), 341-351

BERGLUNDH, T., u. J. LINDHE (1997)

Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog.

Clin Oral Implants Res 8, 117-124

BOYNE, P.J., u. R.A. JAMES (1980)

Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone.

J Oral Surg 38, 613-616

- BRUDER, S.P., D.J. FINK u. A.I. CAPLAN (1994)  
Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy.  
J Cell Biochem 56, 283-294
- BURCHARDT, H. (1983)  
The biology of bone graft repair.  
Clin Orthop Relat Res, 28-42
- BURG, K.J., C.R. CULBERSON, K.G. GREENE, A.B. LOEBSACK, W.R. ROLAND, W.D. HOLDER, C.R. HALBERSTADT u. R.J. BEILER (2000)  
Absorbable mesh aids in development of discrete, tissue-engineered constructs.  
Crit Rev Biomed Eng 28, 383-387
- BUSER, D.A., u. M. TONETTI (1997)  
Clinical trials on implants in regenerated bone.  
Ann Periodontol 2, 329-342
- CAPLAN, A.I. (1991)  
Mesenchymal stem cells.  
J Orthop Res 9, 641-650
- CHAVASSIEUX, P. (1990)  
Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study.  
J Bone Miner Res 5 Suppl 1, S95-99
- CONNOLLY, J.F. (1995)  
Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair.  
Clin Orthop Relat Res, 8-18
- CORDARO, L. (2003)  
Bilateral simultaneous augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible.  
Report of a technique and preliminary results.  
Clin Oral Implants Res 14, 201-206
- CORNWALL, G.B., K.A. THOMAS, A.S. TURNER, D.L. WHEELER u. W.R. TAYLOR (2002)  
Use of a resorbable sheet in iliac crest reconstruction in a sheep model.  
Orthopedics 25, s1167-1171
- COWAN, C.A., I. KILIMANSKAYA, J. MCMAHON, J. ATIENZA, J. WITMYER, J.P. ZUCKER, S. WANG, C.C. MORTON, A.P. MCMAHON, D. POWERS u. D.A. MELTON (2004)  
Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts.  
N Engl J Med 350, 1353-1356
- DENTAL-VADEMEKUM (2006)  
Knochenersatzmaterial  
Dt. Zahnärzte Verlag Köln, 9. Auflage, 598-601
- DRAENERT, G.F., u. W. EISENMENGER (2007)  
A new technique for the transcrestal sinus floor elevation and alveolar ridge augmentation with press-fit bone cylinders: a technical note.  
J Craniomaxillofac Surg 35, 201-106

- DRAGO, C.J. (1992)  
Rates of Osseointegration of dental implants with regard to anatomical location.  
J Prosthodont 1, 29-31
- DUMBACH, J. (1987)  
Mandibular reconstruction with a new titanium framework, autogenous cancellous bone and hydroxylapatite. Initial results.  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 11, 52-58
- ESPOSITO, M., J. HIRSCH, U. LEKHOLM u. P. THOMSEN (1999)  
Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature.  
Int J Oral Maxillofac Implants 14, 473-490
- FREED, L. E., A.P. HOLLANDER, I. MARTIN, J.R. BARRY, R. LANGER u. G. VUNJAK-NOVAKOVIC (1998)  
Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system.  
Exp Cell Res 240, 58-65
- FRIBERG, B., T. JEMT u. U. LEKHOLM (1995)  
Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 to the connection of completed prostheses.  
Int J Oral Maxillofac Implants 6, 142-146
- FRIBERG, B., L. SENNERBY, J. ROOS u. U. LEKHOLM (1995)  
Identification of bonequality in conjunction with insertion of titanium implants. A pilot study in jaw autopsy specimens.  
Clin Oral Implants Res 6, 213-219
- FRIEDENSTEIN, A.J., J.F. GORSKAJA u. N.N. KULAGINA (1976)  
Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoetic organs.  
Exp Hematol 4, 267-274
- FUCHS, E., u. J.A. SERGE (2000)  
Stem cells: a new lease on life.  
Cell 100, 143-155
- FUGAZZOTTO, P.A., S.L. WHEELER u. J.A. LINDSAY (1993)  
Success and failure rates of cylinder implants in type IV bone.  
J Periodontol 64, 1085-1087
- GERNGROSS, H., C. BURRI, L. KINZL, J. MERK u. G.W. MULLER (1982)  
Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants.  
Aktuelle Traumatol 12, 146-152
- GEUSENS, P., S. BOONEN, J. NIJS, Y. JIANG, G. LOWET, R. VAN AUDERKERCKE, C. HUYGHE, F. CAULIN, J.M. VERY, J. DEQUEKER u. G. VAN PERRE (1996)  
Effect of salmon calcitonin on femoral bone quality in adult ovariectomized ewes.  
Calcif Tissue Int 59, 315-320

GUTWALD, R., J. HABERSTROH, J. KUSCHNIERZ, C. KISTER, D. LYSEK, M. MAGLIONE, R. SCHMELZEISEN u. S. SAUERBIER (2009)

Mesenchymal Stem Cells and inorganic Bovine Bone Material used in Sinus Augmentation Procedures: A Comparison to Autologous Bone Augmentations in an Animal Model.  
Br J oral maxillofac surg, 2009 Aug 6 [ahead of print]

HAAS, R., M. BARON, W. ZECHNER u. G. MAILATH-POKORNY (2003)

Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus in sheep: comparative pullout study of dental implants.

Int J Oral Maxillofac Implants 18, 691-696

HAAS, R., K. DONATH, M. FODINGER u. G. WATZEK (1998)

Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting : comparative histomorphometric findings in sheep.

Clin Oral Implants Res 9, 107-116

HAAS, R., D. HAIDVOGL, K. DONATH u. G. WATZEK (2002a)

Freeze-dried homogeneous and heterogeneous bone for sinus augmentation in sheep. Part I: histological findings.

Clin Oral Implants Res 13, 396-404

HAAS, R., D. HAIDVOGL, O. DORTBUDAK u. G. MAILATH (2002b)

Freeze-dried bone for maxillary sinus augmentation in sheep. Part II: biomechanical findings.

Clin Oral Implants Res 13, 581-586

HALLMANN, M., L. SENNERBY u. S. LUNDGREN (2002)

A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogeneous bone, bovine hydroxylapatite, or a 20:80 mixture.

Int J Oral Maxillofac Implants 17, 635-643

HAYNESWORTH, S.E., J. GOSHIMA, V.M. GOLDBERG u. A.I. CAPLAN (1992)

Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.

Bone 13, 81-88

HENRY, P.J. (1998)

Future therapeutic directions for management of edentulous predicament.

J Prosthet Dent 79, 100-106

HIDDING, J., F. LAZAR u. J.E. ZOLLER, (1999)

Initial outcome of vertical distraction osteogenesis of the atrophic alveolar ridge.

Mund Kiefer Gesichtschir 3 Suppl 1, S79-83

HOWLETT, C.R., J. CAVE, M. WILLIAMSON, J. FARMER, S.Y. ALI, I. BAB u. M.E. OWEN (1986)

Mineralization in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells.

Clin Orthop Relat Res, 251-263

HÜRZELER, M.B., A. KIRSCH, K.L. ACKERMANN, u. C.R. QUINONES (1996)

Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: a 5-year clinical investigation.

Int J Oral Maxillofac Implants 11, 466-475

- HÜRZELER, M.B., C.R. QUINONES, A. KIRSCH, C. GLOCKER, P. SCHUPBACH, J.R. STRUB u. R.G. CAFFESSE (1997)  
Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part I. Evaluation of anorganic bone matrix.  
*Clin Oral Implants Res* 8, 476-486
- HUTMACHER, D.W. (2000)  
Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.  
*Biomaterials* 21, 2529-2543
- ILIZAROV, G.A. (1971)  
Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis.  
*Ortop Traumatol Protez* 32, 7-15
- JAFARIAN, M., M.B. ESLAMINEJAD, A. KHOJASTEH, F. MASHHADI ABBAS, M.M. DEHGHAN, R. HASSANIZADEH, u. B. HOUSHMAND (2008)  
Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone material.  
*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105 (5): e14-24
- JENSEN, O.T., L.B. SHULMAN, M.S. BLOCK u. V.J. IACONO (1998)  
Report of the Sinus Consensus Conference of 1996.  
*Int J Oral Maxillofac Implants* 13 Suppl, 11-45
- JENSEN, S.S., M. AABOE, E.M. PINHOLT, E. HJORTING-HANSEN, F. MELSEN u. I.E. RUYTER (1996)  
Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes.  
*Int J Oral Maxillofac Implants* 11, 55-66
- KHOJASTEH, A., M.D. ESLAMINEJAD u. H. NAZARIAN (2008)  
Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma.  
*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106 (3), 356-362
- JOHN, M.T., P. HUJOEL, D.L. MIGLIORETTI, L. LERESCHE, T.D. KOEPESELL u. W. MICHEELIS (2004a)  
Dimensions of oral-health-related quality of life.  
*J Dent Res* 83, 956-960
- JOHN, M.T., W. MICHEELIS u. R. BIFFAR (2004b)  
Reference values in oral health-related quality of life for the abbreviated version of the Oral Health Impact Profile.  
*Schweiz Monatsschr Zahnmed* 114, 784-791
- KARLSSON, G., A. TEIWIK, A. LUNDSTRÖM u. N. RAVALD (1995)  
Costs of periodontal and postodontic treatment and evaluation of oral health in patients after treatment of advanced periodontal disease.  
*Community Dent Oral Epidemiol* 23, 159-164
- KASSEM, M., L. MOSEKILDE, J. RUNGBY, F. MELSEN u. E.F. ERIKSEN, (1991)  
Formation of osteoclasts and osteoblast-like cells in long-term human bone marrow cultures.  
*Apmis* 99, 262-268

LANGER, R., u. J.P. VACANTI (1993)

Tissue engineering  
Science 260, 920-926

LENTRODT, J., C.U. FRITZEMEIER u. I. BETHMANN (1985)

Osteoplastic reconstruction of the mandible.  
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 9, 5-19

LEONHARDT, H. (1990)

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.  
Thieme Verlag Stuttgart, New York

LIEBICH, H.G. (1993)

Funktionelle Histologie.  
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

LUNDGREN, S., S. ANDERSSON, F. GUALINI u. L. SENNERBY (2004)

Bone reformation with sinus membrane elevation: a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation.  
Clin Implant Dent Relat Res 6, 165-173

MAJORS, A .K., C.A. BOEHM, H. NITTO, R.J. MIDURA u. G.F. MUSCHLER (1997)

Characterisation of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation.  
J Orthop Res 15, 546-557

MANKANI, M.H., S.A. KUZNETSOV, N.A. AVILA, A. KINGMAN u. P.G. ROBEY (2004)

Bone formation in transplants of human bone marrow stromal cells and hydroxyapatite-tricalcium phosphate: prediction with quantitative CT in mice.  
Radiology 230, 369-376

MARQUET, V., A.R. BOCCACCINI, L. PRAVATA, I. NOTINGHER u. R. JEROME (2004)

Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation.  
Biomaterials 25, 4185-4194

MARDON, H.J., J. BEE, K. VON DER MARK u. M.E. OWEN (1987)

Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats.  
Cell Tissue Res 250, 157-165

MARIA, O.M., R. KHOSRAVI, E. MEZEY u. S.D. TRAN (2007)

Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications.  
Oral Dis 13, 11-16

MAULITZ, R.C. (1978)

Rudolf Virchow, Julius Cohnheim and the program of pathology.  
Hist Med 52, 162-182

MEFFERT, R.M., B. LANGER u. M.E. FRITZ (1992)

Dental implants: a review.  
J Periodontol 63, 859-870

- MERKX, M.A., J.C. MALTHA u. P.J. STOELINGA (2003)  
Assessment of the value of organic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports.  
Int J Oral Maxillofac Surg 32, 1-6
- MORSZECK, C., T.E. REICHERT, F. VOLLNER, T.GERLACH u. O. DRIEMEL (2007)  
The state of the art in human dental stem cell research.  
Mund Kiefer Gesichtschir
- MUSCHLER, G.F., C. BOEHM u. K. EASLEY (1997)  
Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume.  
J Bone Joint Surg Am 79, 1699-1709
- NEUKAM, F.W., u. E. ESSER (2000)  
Implantology  
Mund Kiefer Gesichtschir 4 Suppl 1, S249-256
- NICKEL, R., A. SCHUMMER u. E. SEIFERLE (1992)  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.  
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- NUSS, K.M., J.A. AUER, A. BOOS u. B. VON RECHENBERG (2006)  
An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones.  
BMC Musculoskelet Disord 7, 67
- OHYA, M., Y. YAMADA, R. OZAWA, K. ITO, M. TAKAHASHI u. M. UEDA (2005)  
Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between Mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits.  
Clin Oral Implants Res 16, 622-629
- ORENSTEIN, I.H., u. V. PETRAZZUOLO (1993)  
A new angle on restoring anterior teeth with root-form implants: clinical report.  
Implant Soc 4, 10-11, 16
- OWEN, M.E., J. CAVE u. C.J. JOYNER (1987)  
Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F.  
J Cell Sci 87 (Pt 5), 731-738
- OWEN, M., u. A. FRIEDENSTEIN (1988)  
Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.  
Ciba Found Symp 136, 42-60
- PEARCE, A.I., R.G. RICHARDS, S. MILZ, E. SCHNEIDER u. S.G. PEARCE (2007)  
Animal models for implant biomaterial research in bone: a review.  
Eur Cell Mater 13, 1-10
- PETITE, H., V. VIATEAU, W. BENSALD, A. MEUNIER, C. DE POLLAK, M. BOURGUIGNON, K. OUDINA, L. SEDEL u. G. GUILLEMIN (2000)  
Tissue-engineered bone regeneration.  
Nat Biotechnol 18, 959-963

PIATELLI, M., G.A. FAVERO, A. SCARANO, G. ORSINI u. A. PIATELLI (1999)  
Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures:  
a histologic longterm report of 20 cases in humans.  
Int J Oral Maxillofac Implants 14, 835-840

PIERI, F., E. LUCARELLI, G. CORINALDESI, G. IEZZI, A. PIAZZELLI, R. GIARDINO, M.  
BASSI, D. DONATI u. C. MARCHETTI (2008)  
Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting:  
a histomorphometric study in minipigs.  
J Clin Periodontol 35(6), 539-546

PIERSMA, A.H., R.E. PLOEMACHER u. K.G. BROCKBANK (1983)  
Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route.  
Br J Haematol 54, 285-290

PINHEIRO, J.C., u. D.M. BATES (2000)  
Mixed-E\_ects Models in S and S-Plus.  
ISBN 0-387-98957-0, Springer Verlag, S.2

PITTENGER, M.F., A.M. MACKAY, S.C. BECK, R.K. JAISWAL, R. DOUGLAS, J.D.MOSCA,  
M.A. MOORMAN, D.W. SIMONETTI, S.CRAIG u. D.R. MARSHAK (1999)  
Multilineage potential of adult human Mesenchymal stem cells.  
Science 284, 143-147

PROCKOP, D.J., I. SEKIYA u. D.C. COLTER (2001)  
Isolation and characterization of rapidly selfrenewing stem cells from cultures of human  
marrow stromal cells.  
Cytotherapy 3, 393-396

R (2005)  
R: A language and environnement for statistical computing.  
ISBN 3-900051-07-0.  
R Foundation for Statistical Computing, Wien, AUT. S.1

REHMAN, I., R. SMITH, L.L. HENCH u. W. BONFIELD (1995)  
Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic  
hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy.  
J Biomed Mater Res 29, 1287-1294

RICKARD, D.J., M. KASSEM, T.E. HEFFERAN, G. SARKAR, T.C. SPELSBERG u. B.L.  
RIGGS (1996)  
Isolation and characterisation of osteoblast precursor cells from human bone marrow.  
J Bone Miner Res 11, 312-324

RICKARD, D.J., T.A. SULLIVAN, B.J. SHENKER, P.S. LEBOY u. I KAZHDAN (1994)  
Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cultures by  
dexamethasone and BMP-2.  
Dev Biol 161, 218-228

ROESGEN, M. (1991)  
Regeneration capacity of the iliac crest after Spongiosa removal in humans—induction by  
phosphate ceramics?  
Unfallchirurgie 17, 44-59

- SARTOTI, S., M. SILVESTRI, F. FORNI, A. ICARO CORNAGLIA, P. TESEI u. V. CATTANEO (2003)  
Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation.  
Clin Oral Implants Res 14, 369-372
- SCHLEGEL, K.A., G. FICHTNER, S. SCHULTZE-MOSGAU u. J. WILTFANG (2003)  
Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute.  
Int Oral Maxillofac Implants 18, 53-58
- SCHLIEPHAKE, H., F.W. NEUKAM u. D. HUTMACHER (1994)  
Defect bridging and augmentation of the mandible by transplantation of locally cultured bone in a porous matrix.  
Fortschr Kiefer Gesichtschir 39, 190-193
- SCHMITT, S.C., M. WIEDMANN-AL-AHMAD, J. KUSCHNIERZ, A. AL-AHMAD, U. HUEBNER, R. SCHMELZEISEN u. R. GUTWALD (2007)  
Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects.  
J Mater Sci Mater Med
- SHULMAN, L.B., u. O.T. JENSEN (1998)  
Sinus Graft Consensus Conference. Introduction.  
Int J Oral Maxillofac Implants 13 Suppl, 5-6
- SMILER, D.G., P.W. JOHNSON, J.L. LOZADA, C. MISCH, J.L. ROSENLICHT, O.H. TATUM u. J.R. WAGNER (1992)  
Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla.  
Dent Clin North Am 36, 151-186
- SPECTOR, M. (1994)  
Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone material as implants to facilitate bone regeneration.  
Clin Plast Surg 21, 437-444
- STRICKER, A., R. GUTWALD, J. KUSCHNIERZ, M. VOGELER, F. BÜHLER u. S. SAUERBIER (2008)  
Sinus floor augmentation with autogenous stem cell grafts to enable placement of implants: A report from a pilot study.  
2008 [ahead of print]
- TAPETY, F.I., N. AMIZUKA, K. UOSHIMA, S. NOMURA u. T. MAEDA (2004)  
A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis.  
Clin Oral Implants Res 15, 315-324
- TATUM, H., JR. (1986)  
Maxillary and sinus implant reconstructions  
Dent Clin North Am 30, 207-229

- THIELEMANN, F.W., A.M. FELLER u. K. SCHMIDT (1984)  
Defect replacement with osteogenin containing gelatin.  
Z Orthop Ihre Grenzgeb 122, 843-847
- TROUNSON, A. (2004)  
Stem cells, plasticity and cancer – uncomfortable bed fellows.  
Development 131, 2763-2768
- TRUHLAR, R.S., I.H. ORENSTEIN, H.F. MORRIS u. S. OCHI (1997)  
Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants.  
J Oral Maxillofac Surg 55, 38-45
- VACANTI, C.A., W. KIM, J. UPTON, M.P. VACANTI, D. MOONEY, B. SCHLOO u. J.P. VACANTI (1993)  
Tissue-engineered growth of bone and cartilage.  
Transplant Proc 25, 1019-1021
- VACANTI, J.P., u. R. LANGER (1999)  
Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation.  
Lancet 354 Suppl 1, S132-34
- VALENTINI, P., u. D. ABENSUR (1997)  
Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralised freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients.  
Int J Periodontics Restorative Dent 17, 232-241
- VALENTINI, P., u. D.J. ABENSUR (2003)  
Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone : a clinical report of long-term results. Int J Oral Maxillofac Implants 18, 556-560
- WEDGWOOD, D., K.J. JENNINGS, H.A. CRITCHLOW, A.C. WATKINSON, J.P. SHEPHERD, J.W. FRAME, W.R. LAIRD u. A.A. QUAYLE (1992)  
Experience with ITI osseointegrated implants at five centres in the UK.  
Br J Oral Maxillofac Surg 30, 377-381
- WETZEL, A.C., H. STICH u. R.G. CAFFESSE (1995)  
Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs.  
Clin Oral Implants Res 6, 155-163
- YAMADA, Y., M. UEDA, T. NAIKI, M. TAKAHASHI, K. HATA, u. T. NAGASAKA (2004)  
Autogenous injectable bone for regeneration with Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration.  
Tissue Eng 10, 955-964
- YEN, A.H., u. P.T. SHARPE (2006)  
Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering.  
Expert Opin Biol Ther 6, 9-16
- YILDRIM, M., H. SPIEKERMANN, S. BIESTERFELD u. D. ENDELHOFF (2000)  
Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histological and histomorphometric study in humans.  
Clin Oral Implants Res 11, 217-229

YILDRIM, M., H. SPIEKERMANN, S. HANDT u. D. ENDELHOFF (2001)  
Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans.

Int J Oral Maxillofac Implants 16, 23-33

YOSHIMURA, Y. (2006)

Bioethical aspects of regenerative and reproductive medicine.

Hum Cell 19, 83-86

ZITZMANN, N.U., u. SCHÄRER, P. (1998)

Sinus elevation procedures in the resorbed posterior maxilla. Comparison of the crestal and lateral approaches.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85, 8-17

ZIZELMANN, C., R. SCHÖN, M.C. METZGER, R. SCHMELZEISEN, A. SCHRAMM, B. DOTT, K.H. BORMANN u. N.C. GELLRICH (2007)

Bone formation after sinus augmentation with engineered bone.

Clin Oral Implants Res 18, 69-73

## 9. Anhang

9.1 Mesenchymale Stammzellen, mononukleäre Zellen; Einzelergebnisse.

**Tab.9.1: MSCs gegenüber mnZ**

Tier Nr.	durchschnittliche Zahl isolierter mesenchymaler Stammzellen (kbE) in 1 Mio mnZ	Gesamtzahl kernhaltiger Zellen (mnZ) in 1 ml Knochenmarksaspiratskonzentrat ( $\times 10^6$ )
40	66	600
41	25	60
42	48	700
43	8	54
44	37	900
45	41	360
MW*	37,2	445,67
SD**	19,72	347,68

9.2 Computertomographische Analyse zur Bestimmung der Augmentationsvolumina, Einzelergebnisse.

**Tab.9.2: Augmentationsvolumina**

Tier Nr.	Kontrollseite in $\text{cm}^3$	Testseite in $\text{cm}^3$
40	2,85	2,61
41	1,51	1,96
42	1,96	1,94
43	2,77	2,3
44	2,72	3,01
45	2,48	2,68

\* Mittelwert

\*\* Standardabweichung

9.3 Prozentuale Flächenanteile in der histomorphometrischen Analyse, Einzelergebnisse.

Tab.9.3a: Kontrollseite, 8 Wochen-Gruppe

Tier Nr.	Fläche Xylenolorange in %	Fläche Calcein in %	Gesamtfläche neu gebildeter Knochen in %	Gesamtfläche Bio-Oss® in %
<b>Schaf 43</b>				
MIA*** 1	2,45	5,7	8,15	3,46
MIA 2	1,56	2,18	3,74	15,21
MIA 3	0,83	7,22	8,05	18,68
MIA 4	2,16	7,99	10,15	21,27
MIA 5	0,6	7,26	7,86	24,56
MIA 6	0,92	7,77	8,69	16,36
MIA 7	1,76	6,39	8,15	14,04
<b>Schaf 44</b>				
MIA 2	1,09	7,9	8,99	21,48
MIA 3	0,32	12,42	12,74	17,47
MIA 4	0,71	12,03	11,4	23,38
MIA 5	0,9	10,5	11,36	22,84
MIA 6	2,38	8,98	11,61	18,22
<b>Schaf 45</b>				
MIA 4	3,1	3,26	6,36	19,71
MIA 5	3,39	11,01	14,4	19,2
MIA 6	4,42	8,18	12,6	17,25
MIA 7	9,9	10,78	20,68	22,18
MIA 8	7,03	8,4	15,43	18,15
MIA 9	0,54	8,56	9,1	17,12
MIA 10	2,18	5,22	7,4	18,37
<b>MW total</b>	2,43	7,99	10,36	18,37
<b>SD total</b>	2,44	2,72	3,79	4,58

\*\*\* Multi image alignment

Tab.9.3b: Testseite, 8 Wochen-Gruppe

Tier Nr.	Fläche Xylenolorange in %	Fläche Calcein in %	Gesamtfläche neu gebildeter Knochen in %	Gesamtfläche Bio-Oss® in %
<b>Schaf 43</b>				
MIA 4	1,12	3,53	4,65	17,15
MIA 5	0,45	5,98	6,43	20,1
MIA 6	1,15	5,56	6,71	15,94
MIA 7	1,83	2,59	4,42	18,96
MIA 8	2,99	1,91	4,9	16,21
<b>Schaf 44</b>				
MIA 1	2,97	5,51	8,48	18,22
MIA 2	1,61	5,83	7,44	18,53
MIA 3	0,62	5,77	6,39	21,34
MIA 4	1,56	4,69	6,25	17,73
MIA 5	1,19	3,7	4,89	25,26
MIA 6	1,51	7,01	8,52	23,95
<b>Schaf 45</b>				
MIA 4	5,76	2,54	8,3	15,22
MIA 5	2,72	7,78	10,5	19,42
MIA 6	6,3	9,87	16,17	16,42
MIA 7	8,9	4,23	13,13	15,75
MIA 8	4,19	6,73	10,92	12,3
MIA 9	1,6	7,78	9,38	9,38
<b>MW total</b>	2,79	5,53	8,09	17,76
<b>SD total</b>	2,26	2,08	3,20	3,84

Tab.9.3c: Kontrollseite, 16 Wochen-Gruppe

Tier Nr.	Fläche Xylenolorange in %	Gesamtfläche neu gebildeter Knochen in %	Gesamtfläche Bio-Oss® in %	Fläche Calcein in %
<b>Schaf 40</b>				
MIA 1	5,95	21,20	12,43	15,24
MIA 2	6,4	10,99	15,14	4,59
MIA 3	4,89	12,69	13,23	7,8
MIA 4	4,68	10,69	17,25	6,01
MIA 5	5,93	9,69	17,44	3,76
MIA 6	5,2	21,2	10,59	16
<b>Schaf 41</b>				
MIA 2	3,63	24,1	10,23	20,47
MIA 3	4,78	39,22	15,41	34,44
MIA 4	3,03	37,22	17,35	34,19
MIA 5	6,85	24	10,86	17,15
MIA 6	7,26	42,87	10,97	35,61
MIA 7	9,1	38,74	17,25	29,64
<b>Schaf 42</b>				
MIA 1	7,95	37,91	17,35	29,96
MIA 2	6,2	38,68	16,11	32,48
MIA 3	6,88	27,09	12,15	20,21
MIA 4	4,44	32,98	16,07	28,54
MIA 5	5,35	37,36	14,9	32,01
MIA 6	6,13	34,34	14,25	28,21
<b>MW total</b>	5,8	27,8	14,4	20,7
<b>SD total</b>	1,50	11,36	2,62	11,13

Tab.9.3d: Testseite, 16 Wochen-Gruppe

Tier Nr.	Fläche Xylenolorange in %	Gesamtfläche neu gebildeter Knochen in %	Gesamtfläche Bio-Oss® in %	Fläche Calcein in %
<b>Schaf 40</b>				
MIA 1	4,26	13,55	7,45	9,29
MIA 2	4,06	14,97	14,23	10,91
MIA 3	3,45	14,94	13,7	11,49
MIA 4	4,29	15,62	16,87	11,33
MIA 5	5,97	19,96	14,28	13,99
MIA 6	4,2	21,1	10,33	16,93
<b>Schaf 41</b>				
MIA 1	9,06	36,73	16,25	27,67
MIA 2	5,55	28,19	19,24	22,64
MIA 3	6,9	33,8	14,82	26,9
MIA 4	6,1	31,17	15,77	25,1
MIA 5	5,28	35,38	15,08	30,1
MIA 6	4,7	52,93	9,71	48,23
<b>Schaf 42</b>				
MIA 1	0,29	35,14	13,35	34,85
MIA 2	3,53	13,78	18,71	10,25
MIA 3	2,84	18,47	21,73	15,63
MIA 4	1,42	26,48	20,04	25,06
MIA 5	5,82	32,27	18,34	26,45
MIA 6	5,34	31,1	13,48	25,76
<b>MW total</b>	4,9	26,4	17,1	23,0
<b>SD total</b>	2,02	10,68	3,70	10,40

## Danksagung

Vielen Dank sage ich Prof. Dr. Dr. Leo Brunberg für die Vertretung der Doktorarbeit im Fachbereich, für die Übernahme der damit verbundenen Arbeiten und für die freundliche Betreuung.

Sehr herzlich möchte ich mich bedanken bei Prof. Dr. Dr. Ralf Gutwald für die Überlassung des interessanten Themas, für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und für die jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg Haberstroh für die jederzeit gewährte freundliche und fachliche Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit und für die kompetente medizinische Betreuung der Schafe.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Dr. Jens Kuschnierz für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und bei Dr. Dr. Sebastian Sauerbier für die stets hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung des Manuskripts bedanken.

Mein Dank richtet sich ebenso an die Mitarbeiter der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Freiburg, im besonderen Ute Hübner und Annette Lindner, sowie Heike Jahnke und Dr. Heiner Nagursky. Außerdem danke ich Dr. Dieter Menne für seiner Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Werner Studzinski und seinem Team im Stall Landwasser möchte ich danken für die liebevolle Betreuung der Schafe und die jederzeit gewährte Hilfe.

Herzlichen Dank sage ich auch Carola Kister für ihre jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Katrin Löbnitz für ihre unermüdliche Hilfe bei Computerfragen während der Erstellung des Manuskripts und seelischen Beistand in jeder Phase der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Brigitte Klopfer, Studienrätin a.D., für die Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Kollegen Dr. Friedrich Andres, Dr. Joachim Onderka, und Dr. Ulrich Wernitz, Elisabeth Bank und Andreas Gräf für die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Uli danke ich im Besonderen dafür, mich im Fortkommen dieser Arbeit unermüdlich zu motivieren.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die mir stets Geduld und Unterstützung entgegenbrachte, und damit zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen hat.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine Hilfe Dritter in Anspruch genommen wurde.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die in der Dissertation angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ich habe die Dissertation an folgender Institution angefertigt:  
Abteilung Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Freiburg.

Wehr, den 06.02.2010

Kerstin Stubbe