

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie des
Universitätsklinikums Freiburg
eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Kollagenkonstrukte mit autologen Zellen im Sinuslift am Schaf

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

vorgelegt von

Karina Pöpperl

(geb. Joujou-Sisic)

Tierärztin aus Sarajevo, Bosnien-Herzegovina

Berlin 2009
Journal-Nr.: 3336

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ. Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ. Prof. Dr. Leo Brunnberg
Zweiter Gutachter: Univ. Prof. Dr. Dr. Ralf Gutwald
Dritter Gutachter: Univ. Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Sheep, experimental animals, Maxillary Sinus, Tissue Engineering, Cells, Cultured, Transplantation, Autologous, Osteoblasts, Bone Density, Dental Implantation, Biocompatible Materials, Collagen Type I, fluorescence microscopy

Tag der Promotion: 11.12.2009

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: 978-3-86664-712-1

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 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Mama

INHALT	III-IV
ABBILDUNGEN	V-VI
TABELLEN.....	VII
ABKÜRZUNGEN	VIII-IX

INHALT

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Sinuslift	1
1.2 Tiermodell Schaf	2
1.3 Brånemark-Implantat.....	3
1.4 Knochenersatzmaterialien.....	3
1.5 Osteoblasten.....	4
1.6 Tissue Engineering	5
2. PROBLEM, FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	9
3. MATERIAL UND METHODEN.....	10
3.1 Studiendesign und Gruppeneinteilung	10
3.2 Versuchstiere.....	12
3.3 Procedere.....	12
3.3.1 Narkose	12
3.3.2 Knochenbiopsie	14
3.3.3 Osteoblastenkultur und Vitalisierung des Kollagen-HA Konstrukts	14
3.3.4 Osteogenitätsnachweis	18
3.3.5 Sinusbodenelevation	21
3.4 Brånemark-Implantat.....	24
3.5 Polychrome Fluoreszenzmarkierung.....	24
3.6 Postoperatives Procedere	25
3.7 Computertomographische Untersuchungen	26

3.8	Histologie	30
3.9	Morphometrische Analyse (Lichtmikroskopie).....	33
3.10	Morphometrische Analyse (Fluoreszenzmikroskopie).....	34
3.11	Datenverarbeitung und statistische Auswertung	36
4.	ERGEBNISSE	39
4.1	Versuchsverläufe	39
4.2	Computertomographische Volumen- und Knochendichtebestimmung ..	39
4.3	Vitalitäts- und Osteogenitätsnachweis.....	45
4.4	Histologie	47
4.5	Morphometrische Analyse (Lichtmikroskopie).....	47
4.6	Morphometrische Analyse (Fluoreszenzmikroskopie).....	48
5.	DISKUSSION	51
5.1	Sinuslift und Implantate.....	51
5.2	Tiermodell	52
5.3	Statistische Auswertung.....	53
5.4	Autologe Zellen und Osteogenitätsnachweis	54
5.5	Kollagen	56
5.6	Tissue Engineering	58
6.	SCHLUSSFOLGERUNG UND PERSPEKTIVEN	61
7.	ZUSAMMENFASSUNG	62
8.	SUMMARY	63
	LITERATUR.....	64
	ANHANG	76
	PUBLIKATIONEN.....	82
	DANKSAGUNG	83
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.	84

ABBILDUNGEN

Abb. 1	Schematischer Aufbau der Kollagenfasern	6
Abb. 2	Elektronenmikroskopische Aufnahme des Kollagenkonstrukts, mit Hydroxylapatit-Partikeln verstärkt	8
Abb. 3	Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Hydroxylapatit-Partikel in Kollagenmatrix eingebettet	8
Abb. 4	Osteoblasten auf Kollagen-HA Konstrukt.....	8
Abb. 5	CT-Aufnahme: Schafschädel in Sagittalebene mit Markierung des extraoralen Zugangs (A) der Kieferhöhle bei Sinusbodenelevation	10
Abb. 6	Operationsszenario: Schaf in Inhalationsnarkose und Bauchlage.....	13
Abb. 7	Zellkulturflaschen für Ansatz (blau) und 1. Passage (rot)	15
Abb. 8	Zellpellet mit Osteoblasten vor der ersten Passage	16
Abb. 9	Kollagen-HA Konstrukt mit Osteoblasten im RPMI 1640 Medium	16
Abb.10	Schematische Darstellung der Osteoblastenkultivierung	17
Abb.11	Schematische Darstellung des Tissue-Engineering-Prozesses	20
Abb.12	Zugang zum linksseitigen Sinuslift: Hautschnittführung	22
Abb.13	Operativer Zugang zum Sinusboden mit Durchtrennung des Musculus masseter und des Periosts	22
Abb.14	Lösen der Schneiderschen Membran mit dem Raspatorium.....	22
Abb.15	Schneiden des Gewindelochs zur Verankerung des Bränemark-Implantats.....	23
Abb.16	Aufbereiteter Implantatschacht im Sinus mit Gewindeloch für Bränemark-Implantat und Kollagen-HA Konstrukt	23
Abb.17	Implantation des Kollagen-HA Konstrukts.....	23
Abb.18	Bränemark-Implantat	24
Abb.19	Schema für Polychrome Fluoreszenzmarkierung in den drei Versuchsgruppen	25
Abb.20	CT-Aufnahme, transversaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B).....	27
Abb.21	CT-Aufnahme, transversaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C).....	27
Abb.22	CT-Aufnahme, coronaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C).....	28
Abb.23	CT-Aufnahme, coronaler Schnitt von der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C) , Nahaufnahme.....	28
Abb.24	Dreidimensionale Rekonstruktion des Kollagen-HA Konstrukts ohne Zellen (rot) und mit Zellen (gelb)	29

Abb.25	Dreidimensionale Rekonstruktion der rechten Kieferhöhle (rot) augmentiert mit Kollagen-HA Konstrukt mit Zellen (grau) und der linken Kieferhöhle (gelb) augmentiert mit Kollagen-HA Konstrukt ohne Zellen (rosa)	29
Abb. 26	Lichtmikroskopische Darstellung des Augmentatbereichs mit Brånemark-Implantat und Kollagen-HA Konstrukt	32
Abb.27	Vermessung des neu gebildeten Knochens am Brånemark-Implantat	33
Abb.28	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Implantats aus der Gruppe mit einer Überlebenszeit von 24 Wochen	35
Abb.29	Kieferhöhlenvolumen: Kontroll- und Testseite in den 3 Überlebensgruppen	40
Abb.30	Augmentatvolumen: Kontroll- und Testseite in den 3 Überlebensgruppen	41
Abb.31	Kompaktadichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie	42
Abb.32	Spongiosadichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie	43
Abb.33	Augmentatdichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie.....	44
Abb.34	Lichtmikroskopische Aufnahme kultivierter Osteoblasten (A) (Van Kossa Färbung).....	45
Abb.35	Lichtmikroskopische Aufnahme kultivierter Osteoblasten (ALP-Anfärbung).....	46
Abb.36	Lichtmikroskopische Aufnahme kultivierter Osteoblasten mit positivem Kollagen Typ I Test.....	46
Abb.37	Lichtmikroskopische Abbildungen der Testseite Kollagen-HA Konstrukt mit Zellen und Kontrollseite Kollagen-HA Konstrukt ohne Zellen, 16 Wochen nach Implantation.....	47
Abb.38	Fluoreszenz- und lichtmikroskopische Darstellung: Brånemark-Implantat testseitig nach 24 Wochen.....	48
Abb.39	Knochenneubildung an der Implantatoberfläche im Verlauf der Zeit	49
Abb.40	Knochenstoffwechsel an der Oberfläche des Brånemark-Implantats im Verlauf der Zeit	50

TABELLEN

Im Text

Tab. 1	Versuchsaufbau, Anzahl der Tiere sowie Überlebenszeiträume	11
Tab. 2	Statistische Werte: Kieferhöhlenvolumen (ml)	40
Tab. 3	Statistische Werte: Augmentatvolumen (ml)	41
Tab. 4	Statistische Werte: Kompaktadichte (HU) Test- und Kontrollseite.....	42
Tab. 5	Statistische Werte: Spongiosadichte (HU) Test- und Kontrollseite.....	43
Tab. 6	Statistische Werte: Augmentatdichte (HU) Test- und Kontrollseite.....	44
Tab. 7	Statistische Werte: Knochenneubildung an der Bränemark Implantatoberfläche (%).....	49
Tab. 8	Statistische Werte: Knochenstoffwechsel an der Oberfläche des Bränemark-Implantats (%).....	50

Im Anhang

Tab. 9	CT-Messwerte der 8-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU).....	79
Tab. 10	CT-Messwerte der 16-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU).....	79
Tab. 11	CT-Messwerte der 24-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU).....	80
Tab. 12	CT-Messwerte: Volumen der Kieferhöhle und des Augmentats (ml)	81
Tab. 13	Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel der 8 Wochen Gruppe.....	82
Tab. 14	Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel der 16 Wochen Gruppe.....	83
Tab. 15	Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel der 24 Wochen Gruppe.....	84

ABKÜRZUNGEN

ALP	Alkalische Phosphatase
Abb.	Abbildung
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph
3D	Dreidimensional
d.h.	das heißt
Diff.	Differenz
et al.	und andere
EKG	Elektrokardiogramm
Fa.	Firma
g	Gramm
GBR	Guided Bone Regeneration
ggf.	gegebenenfalls
HA	Hydroxylapatit
HU	Hounsfield Unit/-s
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Kollagen-HA	Kollagen-Hydroxylapatit
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
M	Molar
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute/-n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
OP	Operation
s.c.	subkutan
Sek.	Sekunde/-n
SFF	solid freeform fabrication

ABKÜRZUNGEN

Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
μm	Mikrometer
v.a.	vor allem
V.	Vena
Wo.	Woche/-n
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Sinuslift

In der Vergangenheit wurde der präprothetischen Chirurgie des atrophen Oberkiefers wenig Aufmerksamkeit geschenkt (CAWOOD und HOWELL, 1988). Es gab nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten, da eine Alveolarfortsatzhöhung wegen massiver Resorptionsquoten bei fehlender Belastung und bei rein gingival getragenen prothetischen Versorgungen oft keine Langzeiterfolge aufweisen konnte (KOBBERG, 1985). Knöchern verankerte Implantate sind heute der Goldstandard, um den Zahnersatz im atrophen Unter- und Oberkiefer zu verankern. Sie ersetzen häufig früher verwendete präprothetisch-chirurgische Maßnahmen zur Verbesserung des Prothesenhalts, wie zum Beispiel die Mundbodensenkung oder die Vestibulumplastik. Neben der prothetischen Indikation zur Wiederherstellung der Kaufunktion erstreckt sich die Anwendung von Implantaten auf traumatologische Folgezustände, kieferorthopädische- und epithetische Bereiche. Veränderungen in der Zahngesundheit wirken sich stark auf die Lebensqualität eines Menschen aus. Vor allem festsitzender Zahnersatz, der abhängig vom Patientenalter immer häufiger implantatgetragen ist, trägt individuell entscheidend zur Steigerung der Lebensqualität bei (JOHN und MICHEELIS, 2004; KARLSSON et al., 1995). Voraussetzung für den Durchbruch der dentalen Implantate waren die Erkenntnisse über deren knöcherne Einheilung oder Osseointegration (BRÅNEMARK et al., 1969). Durch eine ständige Verbesserung der Materialien und der Oberflächen stellt die Osseointegration von Implantaten heute meist kein Problem mehr dar. Als Material für dentale Implantate hat sich Titan mit einer rauen Oberfläche als ideal erwiesen. Um Implantate fest im Ober- und Unterkiefer zu verankern, ist ein ausreichendes Knochenangebot Voraussetzung (SCHILLI und KREKELER, 1984). Aufgrund des, im Vergleich zum Unterkiefer, geringeren Knochenvolumens, der geringeren Spongiosadichte, der dünneren Kortikalis und der engen Beziehung zur Kieferhöhle und zum Nasenboden sind augmentative Maßnahmen im Oberkiefer oder Alveolarkamm zur Vorbereitung eines entsprechenden Prothesen- oder Implantatlagers schwierig. In Fällen extremer Alveolarkammatrophy im Oberkiefer stellt die Sinusbodenelevation, auch Sinuslift genannt, mit autologer Knochenaugmentation oft das einzige therapeutische Mittel dar. Durch augmentative Verfahren kann die Knochenhöhe unterhalb des Sinusbodens vergrößert werden (SIMILAR et al., 1992). Die Sinusbodenelevation ist ein standardisiertes Verfahren, bei dem durch die Einlage von Spongiosa oder Knochenersatzmaterial der Boden der Kieferhöhle angehoben wird (BOYNE und JAMES, 1980).

Das autologe Knochentransplantat ist bei Transplantationen im Kiefer- und Gesichtsbereich auch heute noch als Goldstandard anzusehen (SCHIMMING et al., 2002). Es besitzt eine hohe autoimmunologische Toleranz. Die Größe des Defekts oder die Morbidität an der Entnahmestelle sind limitierende Faktoren für den Einsatz von autologen Transplantaten (MARK et al., 1990). Wenn kleine Knochenmengen zur Augmentation ausreichen, ist es möglich, auf verschiedene intraorale Knochenentnahmestellen, wie den aufsteigenden Unterkieferast, das Kinn, oder die Tuberregion des Oberkiefers als Spenderareal zurückzugreifen. An diesen Stellen kann Knochen unter Lokalanästhesie in begrenztem Umfang gewonnen werden. Bei größeren Volumina wird als Entnahmestelle die Beckenschaufel oder der Tibiakopf gewählt (SCHIMMING et al., 2002), wo Knochen als Spongiosa- und Kortikalistransplantat gewonnen werden kann (NEUGEBAUER et al., 2003). Trotz der hervorragenden biologischen Verträglichkeit bestehen Nachteile durch den Zweiteingriff mit der Gefahr lokaler Komplikationen unter anderem auch durch eine verlängerte Operationsdauer: Infektion, postoperativer Schmerz, Blutung oder Beckenfraktur (RUEGER, 1998). Dies führte dazu, dass nach Knochenersatzmaterialien gesucht wurde, welche den Knochen adäquat ersetzen können und gleichzeitig in großen Mengen verfügbar sind (CHAPMANN et al., 1997). Einen neuen Therapieansatz bietet das Tissue Engineering, d.h. biologische Materialien (wie nachfolgend auf Seite 3 beschrieben) zu entwickeln, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrecht zu erhalten, oder zu verbessern (LANGER und VACANTI, 1993). In der vorgelegten Arbeit soll geprüft werden, ob das *in vitro* getestete Konstrukt bestehend aus Biomaterial Kollagen-HA, mit definierter Porengröße und Architektur, bei der Implantologie als Trägermaterial für autologe Osteoblasten geeignet ist. Beurteilt werden soll Biokompatibilität, Volumenstabilität und zeitlicher Verlauf der Knochenneubildung an der Implantatoberfläche.

1.2 Tiermodell Schaf

Um das Verhalten des Kollagen-HA Konstrukts, das mit Methoden des Tissue Engineering hergestellt wurde, zu verschiedenen Zeitpunkten standardisiert, radiologisch und histologisch untersuchen zu können, wurde als Tiermodell das Schaf gewählt, weil dessen Größe und der Knochenstoffwechsel den Verhältnissen der Sinusbodenaugmentation beim Menschen ähnlich ist. Abgesehen davon liegen zahlreiche Daten zur Knochenheilung und Osteosynthese vom Schaf aus tierexperimentellen Studien vor (HAAS et al., 1998, 2002; RAHN und PERREN, 1970, 1971; RAHN, 1976; REHMAN et al., 1995; GUTWALD, 2005).

1.3 Brånemark-Implantat

Um die Knochenneubildung am Implantat zu studieren, wurde als Implantatsystem das „TiUnite Implantat RP 27389 LOT 625903“ (Fa. Brånemark, Schweden) eingesetzt. Es besteht aus ‚Commercially Pure Titanium‘ mit einer TiUnite Oberfläche. Es hat eine kontrolliert nach apikal sich verstärkende Titanoxidschicht. Seit 30 Jahren werden biokompatible, poröse Metallbeschichtungen bei Hartgewebe-Implantationen eingesetzt, um die Knocheninduktion zu fördern (BOBYN et al., 1980; COCK et al., 1985). Seit Mitte der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts werden Implantate mit porösen Metallbeschichtungen aus Titan und Tantalum mit guten osteokonduktiven und mechanischen Eigenschaften, ähnlich trabekulärem Knochengewebe, hergestellt. Die Implantate sind stabil und integrieren sich gut in den Knochen (BOBYN et al., 1999, 2004).

1.4 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sind Biomaterialien. RUEGER (1998) charakterisiert sie als nichtkörpereigene Substanzen, die im menschlichen Organismus strukturell ganze Gewebe und deren Funktion teilweise ersetzen.

Beim Tissue Engineering wird durch Kombination verschiedener Biomaterialien mit Zellen oder Wachstumsfaktoren ein Gewebeersatz geschaffen, der auch die Gewebefunktion wieder herstellt, aufrecht erhält, oder gar verbessert (LANGER und VACANTI, 1993). Biomaterialien werden nach ihren Ausgangsverbindungen differenziert in:

1. Biologische organische Substanzen
2. Synthetische anorganische Materialien
3. Synthetische organische Verbindungen
4. Komposite (RUEGER, 1998)

Biomaterialien der ersten Gruppe sind mineralisierte und demineralisierte Knochenmatrizes, Knochenmatrixextrakte, extrahierte Knochenwachstumsfaktoren (z.B. Bio-Oss[®], Bone Morphogenetic Proteins), sowie chemotaktisch proliferativ, induktiv differenzierend wirkende Faktoren (z.B. TGF- β , Interleukine). In der zweiten Gruppe werden monophasische Verbindungen, Hydroxylapatitkeramik-Analoga aus Korallen bzw. Algen oder bovinen Knochen, Biogläser und mehrphasige Keramiken, sowie kalziumphosphathaltige Knochenzemente zusammengefasst. Zu den synthetisch organischen Verbindungen der dritten Gruppe werden unter anderem Polymere wie Polyester, Polyaminosäuren, Polyanhydride und Polyphosphazene zusammengefasst. Die vierte Gruppe beschreibt Komposite unterschiedlicher Kombinationen aus den Gruppen eins bis drei, wie Kollagen-Hydroxylapatit (Kollagen-HA) Konstrukte, die mit autologen Osteoblasten besiedelt sind.

1.5 Osteoblasten

Um die Knochenneubildung zu beschleunigen, können Konstrukte mit autologen Osteoblasten besiedelt werden (ZIZELMANN et al. 2007). Osteoblasten lassen sich leicht aus Knochen gewinnen, und können nach *in vitro* Vermehrung wieder beim Patienten eingepflanzt werden (IKADA, 2006). Hauptaufgabe der Osteoblasten ist die Synthese organischer Bestandteile der Knochengrundsubstanz (Osteoid), v.a. Kollagen Typ I, Osteokalzein, Proteoglykane und Enzyme, wie z.B. Alkalische Phosphatase (ALP), die teilweise auch zur Charakterisierung der Osteoblasten dienen (MARKS Jr., 1997). Osteoblasten produzieren neue Matrix und mauern sich damit ein und werden zu Osteozyten (ABENDROTH, 1992). Die Osteogenität von den Osteoblasten in Zellkultur lässt sich sensitiv und verlässlich durch Nachweis von ALP (LEUNG et al. 1993), Kalzium und Produktion von Kollagen Typ I nachweisen (MARKS Jr., 1997).

1.5 Tissue Engineering

Seit Ende des vergangenen Jahrhunderts wird das Tissue Engineering wissenschaftlich betrieben (HOLLISTER, 2005). Ziel ist es, aus wenig vitalem Gewebe Zellen zu gewinnen und in einem geeigneten Milieu *in vitro* zu expandieren, so dass die Zellen in Suspension auf biodegradierbare, d.h. abbaubare Materialien, sogenannte „Scaffolds“ oder „Konstrukte“, aufgetragen werden können. Sie induzieren Zellen durch ihre dreidimensionale Struktur, Matrix auszubilden, so dass ein vitaler Gewebeersatz entsprechender Größe entsteht und implantiert werden kann. Wesentliche Vorteile derartiger Transplantate sind die Autologität und Vitalität des Materials, ohne vorher bei einer autologen Knochenentnahme große Entnahmedefekt beim Patienten zu schaffen (SITTINGER et al., 1996). Scaffolds sollten folgende Kriterien erfüllen:

1. Die Oberfläche sollte Zellhaftung, Differenzierung und Proliferation fördern.
2. Scaffolds sollten aus einem bioresorbierbaren Material bestehen, das bei Abbau keine zelltoxischen Metaboliten oder Nebenprodukte abgibt und so die Zellproliferation negativ beeinflussen.
3. Die Abbauphase der Scaffolds soll mit der Zuwachszeit des neuen Gewebes übereinstimmen.
4. Die Herstellung in verschiedenen Formen, Größen und Härtegraden sollte möglich sein.
5. Eine poröse Struktur sollte die Integration in das umliegende Gewebe und eine ausreichende Vaskularisierung ermöglichen (SACHLOS et al., 2003).

Wichtig ist die innere Struktur des Scaffolds. Poröse Schaumstrukturen sind nachteilig, da die Größe der Poren nicht standardisiert ist und keine Interkonnektivität besteht (HUTMACHER et al., 2001). Dadurch werden die Zellen der Oberfläche gut von den Gefäßen des angrenzenden Gewebes versorgt und bilden relativ schnell Knochengewebe, dagegen werden tiefere Abschnitte des Scaffolds nur wenig vaskularisiert, so dass Zellen hier schlecht versorgt werden (HOLY et al., 1997; MARTIN et al., 1998) und deshalb nur eine relativ dünne Gewebeschicht an der Scaffoldoberfläche entsteht (FREED et al., 1998). Mit der optimierten Herstellungstechnik, „solid freeform fabrication“ (SFF) gelingt es heute, dreidimensionale Scaffolds mit definiertem Porenmuster und -größe am Computer zu entwerfen (SACHLOS et al., 2003). Dies verbessert die Vaskularisierung und optimiert das Zellwachstum auch in der Tiefe des Konstrukts (PHAM et al., 2000).

Kollagen als Hauptbestandteil der extrazellulären Knochenmatrix ist ein geeignetes Scaffold-Material. Die Oberfläche der Kollagenfaser ist optimal für gute Zellhaftung und weist, verglichen mit synthetischen Polymeren, chemoattraktorische Eigenschaften auf (POSTLETHWAITE et al., 1978; KLEINMANN et al., 1981).

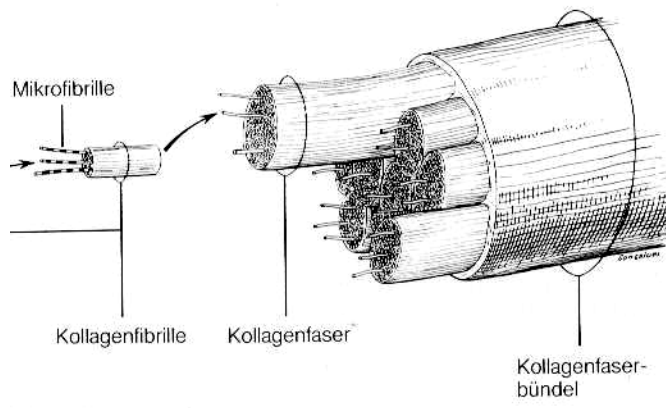


Abb. 1

Schematischer Aufbau der Kollagenfasern

Konstrukte aus Kollagen können, entsprechend der Morphologie, die Migration und auch die Differenzierung von Zellen beeinflussen (KLEINMANN et al., 1981). Haben sie eine Schaumstruktur sind die Vaskularisierung und Nutrition der Zellen in der Tiefe, wie bei Scaffolds aus synthetischen Polymeren, erschwert (DAGALAKIS et al., 1980). Erst die SFF-Technik macht es möglich, Scaffolds herzustellen, die die Vorteile der Kollagenfasern mit ihren guten Zellbindungseigenschaften nutzen (SACHLOS E. und CZERNUSZKA J. T., 2003). Hydroxylapatit verstärkt als Kalzium- und Phosphat-Ionenquelle die Bioaktivität des Konstrukt-Gerüsts. Sie wird von osteogenen Zellen genutzt, um Knochenmatrix zu bilden (SACHLOS et al., 2006). Heute ist es möglich, Konstrukt-Gerüste, die der Zusammensetzung und mikrostrukturellen Anordnung von Kollagen und Hydroxylapatit im Knochen sehr ähneln, herzustellen (Biomimikry). Zunächst wird eine Kollagen-HA Matrixmembrane generiert, in die durch eine spezielle Technik (SACHLOS et al., 2006) HA-Kristalle mit einer Größe von $180 \times 80 \times 20 \mu\text{m}$ präzipitiert wurden. Diese Kompositmembran werden in kleine Flocken zerrissen, in einer Kollagen-Dispersion beigemischt und in SFF-Technik zur 3D-Konstrukten verarbeitet.

Die SFF-Technik ist eine Printing-Technik, bei der dünne Stränge des Materials fadenartig übereinander gelegt werden, jede Schicht 90° gegen die vorherige gedreht, so können Formen für Gerüste mit Mikro-Kanal Eigenschaften hergestellt werden. Derartige Mikro-Kanäle können bei der Perfusion des Gerüsts hilfreich sein und den Massentransport essentieller metabolischer Komponenten, sowie die Entfernung von Abfallprodukten in der Tiefe der Gerüste verstärken (WAHL D.A. et al. 2007). Wichtig bei der Gewebeneubildung mit Tissue Engineering Konstrukten ist die Neo-Vaskularisierung, die die Versorgung der Zellen im Konstrukt mit Sauerstoff und Nährstoffen garantiert. Die *in vivo* Gewebeneubildung mit Tissue Engineering Konstrukten regt den Gefäßaufbau an, falls das Konstrukt umgebende Gewebe dies ausreichend stimuliert (IKADA, 2006). In dieser Studie werden individuell geplottete Konstrukte aus Kollagen Typ I und Hydroxylapatit mit autologen Osteoblasten erstmals *in vivo* beim Sinuslift am Schaf eingesetzt. In einer *in vitro* Studie konnte SACHLOS et al. (2006) zeigen, dass es möglich ist, diese Konstrukte mit Osteoblasten zu besiedeln (Abb. 2-4). Das Konstrukt mit den Osteoblasten wurde dabei *in vitro* durch Perfusion mit Nahrung und Sauerstoff versorgt. Die Eignung von Kollagen-HA Konstrukt mit definierter Porengröße und Architektur als Zellträgermodell für autologe Osteoblasten, wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Abb. 2,3,4), (SACHLOS et al., 2006).

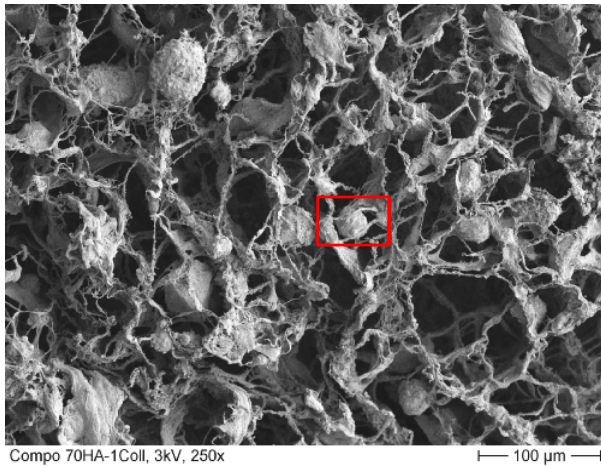


Abb. 2
Elektronenmikroskopische Aufnahme des
Kollagenkonstrukts, mit
Hydroxylapatit-Partikeln verstärkt (im
roten Rahmen)
(SACHLOS et al., 2006).

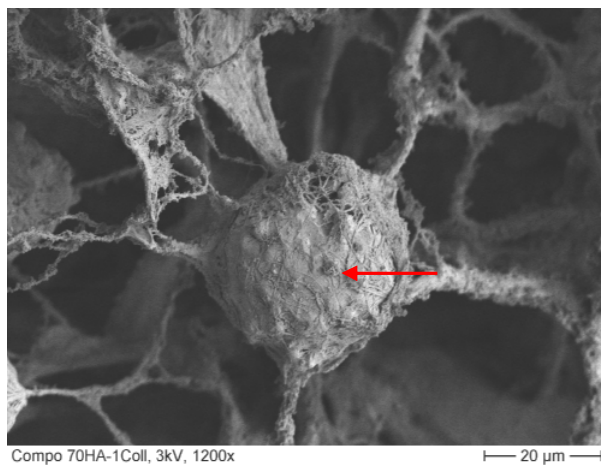


Abb. 3
Elektronenmikroskopische Aufnahme
von einem Hydroxylapatit-Partikel
(roter Pfeil) in Kollagenmatrix eingebettet
(SACHLOS et al., 2006).

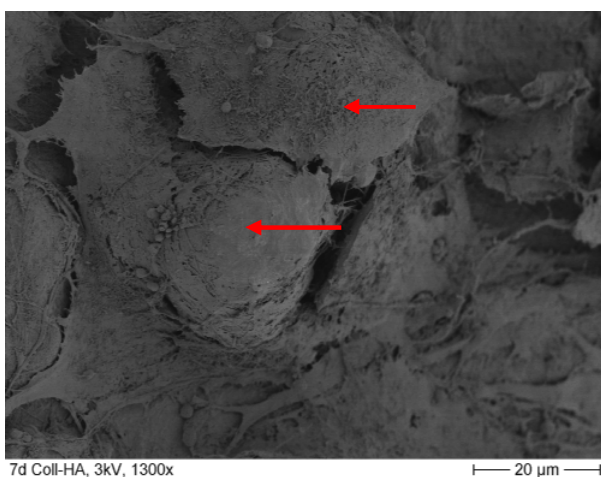


Abb. 4
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Osteoblasten (rote Pfeile) auf Kollagen-HA
Konstrukt (SACHLOS et al., 2006).

2. Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit

Bei der Entnahme autologen Knochenmaterials bleibt ein Defekt zurück. Entsprechend wird seit langem nach weniger invasiven Verfahren zur Gewinnung von Knochengewebe gesucht. In der vorgelegten Arbeit soll geprüft werden, ob das *in vitro* getestete Biomaterial Kollagen-HA, mit definierter Porengröße und Architektur, bei der Implantologie als Trägermaterial für autologe Osteoblasten in Rahmen einer Knochenaugmentation geeignet ist. Festzustellen ist auch, ob die Ergebnisse gegebenenfalls einen Einsatz beim Menschen möglich erscheinen lassen. Für den Sinuslift wurde als Modell das Schaf gewählt, weil von dieser Tierart bereits zahlreiche Daten aus dem weiten Feld der Osteologie vorliegen und bezüglich Knochenstruktur und Stoffwechsel große Ähnlichkeit mit dem Menschen besteht. Der Einfluss von autologen Osteoblasten sollte im „split mouth“ Modell untersucht werden. Dazu sollte eine Kieferseite nur mit Kollagen-HA Konstrukt und die andere mit einer Kombination aus osteoblastären Zellen und Kollagen-HA Konstrukt augmentiert werden. Beurteilt werden sollte Biokompatibilität, Volumenstabilität und zeitlicher Verlauf der Knochenneubildung direkt an der Oberfläche dentaler Implantate. In dieser Studie wird erstmals *in vivo* ein individuell formbares Kollagen-HA Material eingesetzt, das bei positivem Ergebnis zukünftig bei weiteren Indikationen, wie Knochendefektfüllung z.B. in der rekonstruktiven Chirurgie, eingesetzt werden könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign und Gruppeneinteilung

Das osteoinduktive Potential von Kollagen-HA Konstrukten mit autologen Osteoblasten soll im Rahmen einer beidseitigen Sinusbodenelevation mit simultaner Insertion von Dentalimplantaten untersucht werden. Der Tierversuch war durch die zuständige Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Freiburg unter der Registrier-Nr. G-06/42 (2006) genehmigt worden. Die Knochenneubildung in einem individuell geplotteten Biomaterial aus Kollagen-Hydroxylapatit (HA) mit autologen Osteoblasten (Testseite), sollte im Vergleich zum Biomaterial aus Kollagen-HA ohne Zellen (Kontrollseite) getestet werden. Es wurden insgesamt neun Schafe in Gruppen von jeweils drei Tieren mit unterschiedlichen Überlebenszeiträumen eingeteilt. Allen Tieren wurde bei der ersten Operation eine Knochenbiopsie aus der Mandibula zur Osteoblastengewinnung entnommen. Innerhalb einer Woche wurden jeweils drei Schafe operiert. Diese bildeten eine Gruppe mit gleichem postoperativen Überlebenszeitraum. In drei aufeinander folgenden Wochen wurden alle drei Gruppen operiert. Nach 6-8 Wochen nach Biopsie-Entnahme erfolgte ein Zweiteingriff, wobei Kollagen-HA Konstrukte mit und ohne Zellen samt Implantaten in den Sinus maxillaris eingebracht wurden (Abb. 5).

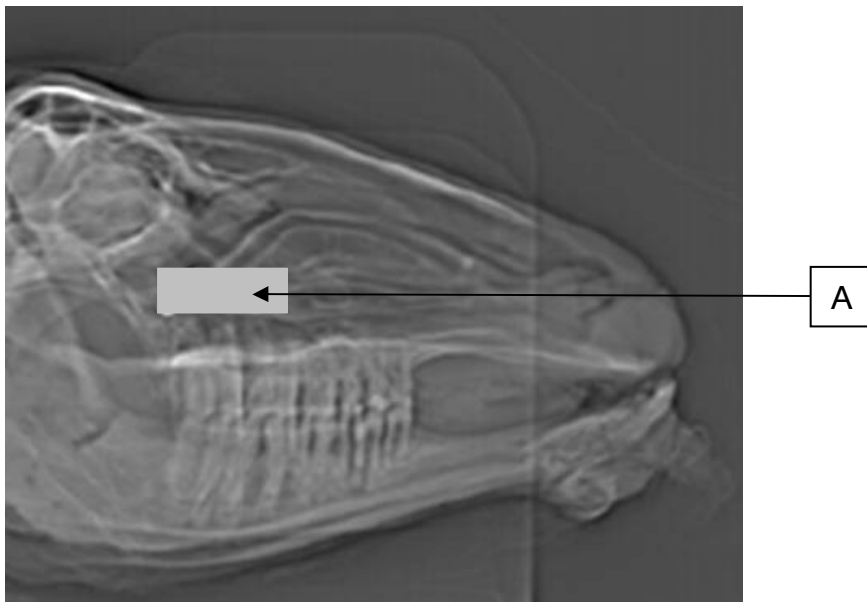


Abb. 5

CT-Aufnahme: Schafschädel in Sagittalebene mit Markierung des extraoralen Zugangs (A) der Kieferhöhle bei Sinusbodenelevation

Vitalstoff-Farbmarkierungen mit 2 verschiedenen Farbstoffen (Calzein und Xylenolorange) erfolgten nach einem festgelegten Schema. 2 und 3 Wochen nach der Sinusbodenelevation wurde in der 8-Wochen Gruppe subkutan Calzein, sowie nach 6 und 7 Wochen Xylenolorange injiziert. Das Gleiche erfolgte in der 16-Wochen Gruppe nach 10 und 11 Wochen, sowie in der 14. und 15. Woche. In der 24-Wochen Gruppe lagen die Injektionszeitpunkte in den Wochen 18 und 19, sowie 22 und 23 (Abb. 19). Um die Knochenneubildung mit der Zeitdauer korrelieren zu können, wurde die Einlagerung der Farbstoffe in den Knochen histologisch und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht und bewertet. Die Tiere wurden in drei Gruppen nach Überlebenszeit eingeteilt. Die erste Gruppe wurden nach 8, die 2. nach 16 und die 3. nach 24 Wochen euthanasiert (Tab. 1).

Tab. 1

Versuchsaufbau, Anzahl der Tiere sowie Überlebenszeiträume

Zeit; Wochen	1. Eingriff 6-8 Wochen vor Sinusboden- elevation	2. Eingriff	Farb- Markierungen Calzein und Xylenolorange	8 Wo später	16 Wo später	24 Wo später
Gruppe 1 Überlebenszeit 8 Wochen	Knochen- biopsie	Sinusbodenelevation mit Kollagen-HA Konstrukt mit/ohne Zellen und Implantat- Insertion	2., 3. Wo und 6., 7. Wo post OP	3 Tiere Eutha- nasia		
Gruppe 2 Überlebenszeit 16 Wochen	Knochen- biopsie	Sinusbodenelevation mit Kollagen-HA Konstrukt mit/ohne Zellen und Implantat- Insertion	10., 11. Wo und 14., 15. Wo post OP		3 Tiere Eutha- nasia	
Gruppe 3 Überlebenszeit 24 Wochen	Knochen- biopsie	Sinusbodenelevation mit Kollagen-HA Konstrukt mit/ohne Zellen und Implantat- Insertion	18., 19. Wo und 22., 23. Wo post OP			3 Tiere Eutha- nasia

3.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden neun weibliche Landschafe im Alter von 2½ Jahren ausgewählt. Die Schafe wurden nach Anlieferung tierärztlich untersucht. Klinische Hinweise einer Infektion dürfte nicht gegeben sein. Ernährungszustand und Klauenpflege wurde kontrolliert. Jedes Schaf wurde dem Gewicht entsprechend, mit Doramectin 0,2 mg/kg KGW. (Dectomax[®], Pfizer, Karlsruhe) gegen Endo- und Ektoparasiten behandelt, über zwei Wochen in Quarantäne verbracht und regelmäßig tierärztlich kontrolliert. Die Tiere wurden in kleinen Gruppen in Boxen mit einer Größe von 4x5 m auf Stroh gehalten. Bei gutem Wetter grasten sie auf einer Weide. Sie hatten freien Zugang zu Heu und Wasser. Am Tag vor der Operation wurden sie in Einzelboxen gehalten und Futter für 24 Stunden, sowie Wasser für 8 Stunden vor der Narkoseeinleitung entzogen. Nach der OP verweilten die Tiere drei Tage lang zur Beobachtung in Einzelboxen. Jedem Tier wurde post operationem täglich 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Karlsruhe) s.c. über drei Tage appliziert, sowie Atmung, Kreislauf und Körpertemperatur regelmäßig kontrolliert. Danach wurden sie wieder zu den anderen Tieren gelassen, sowie das Fressverhalten, die Körpertemperatur und die Wundheilung täglich kontrolliert.

3.3 Procedere

3.3.1 Narkose

Für den Eingriff wurden die Tiere mit 0,05 mg/kg KGW Atropin (Atropinsulfat Braun[®], Braun Melsungen AG, Melsungen), 0,1 mg/kg KG Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen) und 20,0 mg/kg KGW Ketamin (Ketavet[®], Essex, München) i.m. prämediziert. Nach Wirkungseintritt wurden sie auf einer Trage in den Vorbereitungsraum gebracht und über drei Minuten mit 7 l/min. Sauerstoff pernasal präoxygeniert. Es wurde ein Venenkatheter in die V. cephalica gelegt und die Narkose mit Propofol 6,0 mg/kg KGW i.v. (Disoprivan[®], Astra Zeneca GmbH, Wedel) eingeleitet. Danach wurde dieses Schaf orotracheal unter laryngoskopischer Kontrolle intubiert, sowie zur Entgasung und Abhebern anderen Inhalts, eine Magen-Pansensonde (Magensonde) gelegt. Der Endotrachealtubus wurde im Maulwinkel angenäht. Das Tier wurde manuell mit einem Ambubeutel unter kapnographischer Kontrolle beatmet. Im Vor-bereitungsraum wurde der Kopf im Bereich des Eingriffs geschoren und die Haut mit 70 % Ethanol (Klinische Apotheke, Universitätsklinikum Freiburg) und Braunovidonjodlösung (Fa. Braun, Melsungen) gewaschen.

Danach wurde das Schaf in den Operationsraum gebracht und mit Hilfe einer Vakuummatratze so auf dem OP-Tisch in Bauchlage positioniert (Abb. 6), dass einerseits das Operationsfeld gut zugänglich war und andererseits die Hintergliedmaßen so entlastet waren, dass möglichst keine Parese während der lang dauernden Operation entstehen konnte. Intraoperativ wurde die Narkose mit 1,6–2,0 Vol.% Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden) in O₂/Luft und die bedarfsgesteuerte Gabe von 0,05–0,10 µg/kg KGW/h Fentanyl i.v. (Fentanyl-Jansen[®], Janssen-Cilag, Neuss) aufrechterhalten. Zur Volumenresubstitution wurde 10,0 ml/kg KGW/h Ringer-Lösung (Ringer Infusionslösung, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) infundiert. Überwacht wurden die Tiere mit EKG, Pulsoximetrie, Kapnographie und nicht-invasiver Blutdruckmessung. Vor Beginn des Hautschnittes erhielten die Schafe zur Vervollständigung der Analgesie 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Karlsruhe) i.v. und als Antibiotikaprophylaxe 2 g Cefotiam (Spizef[®], Grünenthal GmbH, Aachen). Gegen Ende des Eingriffs wurde die Inhalationsnarkose abgestellt. Das Tier wurde fünf Minuten lang mit Sauerstoff beatmet, anschließend von der Beatmung entwöhnt bis es suffizient spontan atmete und der Schluckreflex einsetzte, so dass es extubiert werden konnte.



Abb. 6

Operationsszenario: Schaf in Inhalationsnarkose und Bauchlage

3.3.2 Knochenbiopsie

Beim Ersteingriff wurde ein Knochenbiopstat aus der Mandibula entnommen, um Osteoblasten zu gewinnen. Unmittelbar vor dem Eingriff wurde die Haut nochmals mit Braunovidonjodlösung (Fa. Braun, Melsungen) desinfiziert, Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) appliziert, das Operationsfeld abgedeckt und das Hautinzisionsfeld mit 5,0 ml eines Lokalanästhetikums, Articainhydrochlorid und Epinephrinehydrochlorid (Ultracain 1 %-Suprarenin, Fa. Sanofi-Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt) im Bereich des Corpus mandibulae periostal injiziert, um etwaige Blutungen zu minimieren und eine postoperative Analgesie zu gewährleisten. Es wurde ein ca. 3 cm langer Schnitt kaudolateral im Bereich des Unterkiefers gesetzt. Haut und Muskelgewebe wurden durchtrennt und die Knochenoberfläche mit einem Raspatorium denudiert. Aus der Mandibula wurden mehrere 0,5 x 0,4 cm große Stücke schonend ausgemeißelt und danach die Wunde schichtweise mit 4-0 Vicryl (Ethicon, Johnson-Johnson Intl., Langhorne, PA, USA), Muskel und Haut mit 2-0 Ethilon*II (Ethicon, Johnson-Johnson Intl., Langhorne, PA, USA) verschlossen.

3.3.3 Osteoblastenkultur und Vitalisierung des Kollagen-HA Konstrukts

Die Knochenbiopstat wurden in sterile Ringerlaktat-Lösung (Ringerlaktat Infusionslösung, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) eingelegt und im Labor in ein Laminar Air Flow (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) in 70 % Ethanol (Klinische Apotheke, Universitätsklinikum, Freiburg) über 10-20 Sekunden desinfiziert, sodann 4 mal in PBS (Phosphat Buffered Saline, 0,1 M, pH 7,2 Fa Bichrom, Berlin) gewaschen und mit einer sterilen Luer-Zange in 1x2 mm große Stücke zerteilt. Jeweils vier Stückchen wurden in eine von insgesamt zwei mit 1,5 ml Opti-MEM 1 Medium (Fa. Invitrogen GmbH, Technologiepark, Karlsruhe) gefüllte, 25 cm² Kulturflasche (Greiner, Frickenhausen) gegeben. Beachtet wurde, dass die Stücke gleichmäßig verteilt voneinander entfernt lagen. Die Proben wurden 7 Tage lang bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO₂ inkubiert, um das Anwachsen der Kulturen zu ermöglichen. In Abständen von 3-4 Tagen wurden jeweils 2 mal 1,0 ml und einmal 1,5 ml Medium zugegeben, so dass sich 5,0 ml Medium in der Kulturflasche befanden. Der Wechsel des kompletten Kulturmediums (5,0 ml) erfolgte nach weiteren drei bis vier Tagen.

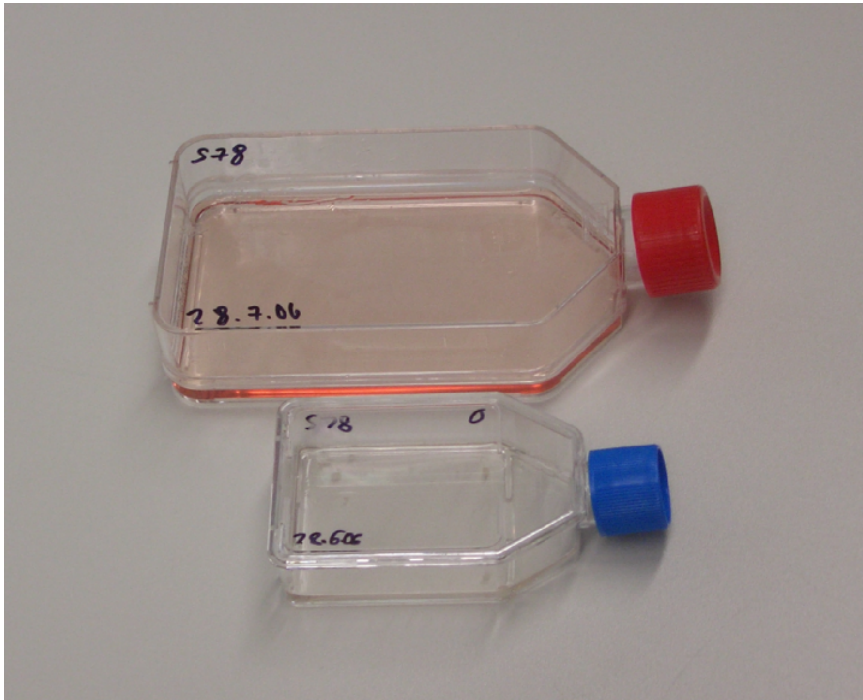


Abb. 7
Zellkulturflaschen für Ansatz (blau) und 1. Passage (rot)

Die Zellkulturen wurden über 2-3 Wochen weiter versorgt, bis sich ein konfluierender Zellrasen in der 25 cm² Kulturflasche gebildet hatte (Abb. 7). Der Zellrasen wurde mit Trypsin/PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) im Verhältnis 1:5 behandelt und 10 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Lichtmikroskopisch wurde geprüft, ob die Zellen sich abgerundet und damit abgelöst hatten. Mit PBS wurden sie über einen 100 µm-Cell-Strainer (Falcon, NJ, USA) in ein 50 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) gegeben. Um möglichst viele Zellen zu erhalten, wurden die Kultur-Flaschen insgesamt 4 mal mit je 10,0 ml PBS nachgespült. Zum Schluss waren 40,0 ml Zellsuspension im Röhrchen. Die Zellsuspension wurde bei 1120 g über 12 Minuten bei 20°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Osterode). Der Überstand über den Zellpellet wurde dekantiert und das so entstandene Zellpellet (Abb. 8) in 4,0 ml Opti-MEM 1 Medium (Fa. Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe) resuspendiert und je 1,0 ml dieser Suspension in eine 75 cm² Kulturflasche (Greiner, Frickenhausen) gegeben, in der zuvor 30,0 ml RPMI 1640 Medium (Rosswell Park Memorial Institute Grund Medium, Gibco Life Technologies, NY, USA) vorgelegt worden waren. Die so entstandene erste Passage wurde weiter im Brutschrank inkubiert und durch regelmäßige Mediumwechsel über 3-4 Wochen weiterversorgt, bis sich wiederum ein konfluierender Zellrasen bildete. Die Zellen wurden wie zuvor trypsiniert und geerntet.

Die Vitalitätsprüfung erfolgte durch Trypanblaufärbung und Zählung in einer Neubauer-Kammer. Bei der Bestimmung der Anzahl wurden nur die nicht angefärbten Zellen berücksichtigt. Eine blaue Färbung indiziert eine defekte Zellmembran und damit eine nicht lebensfähige Zelle.

Die Kollagen-HA Konstrukte wurden vor der Besiedlung 5 mal mit sterilem PBS (Phosphat Buffered Saline, 0,1 M, pH 7,2 Fa Bichrom, Berlin) gespült und unter sterilen Bedingungen im Laminar Air Flow über Nacht getrocknet, um danach in ein 50 ml Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt zu werden. Die Zellsuspension wurde mit RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute Grund Medium, Gibco Life Technologies, NY, USA) so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von 1×10^7 /ml erreicht wurde. Die Kollagen-HA Konstrukte der Test-Seite wurden mit 1,5 ml der Zellsuspension besiedelt und 2 weitere Tage kultiviert (Abb. 9), bevor sie in den Sinus maxillaris transplantiert wurden. Die Konstrukte der Kontrollseite wurden vor dem chirurgischen Eingriff ebenfalls 2 Tage in RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute Grund Medium, Gibco Life Technologies, NY, USA) im Inkubator gelagert. Der Kultivierungsprozess ist in Abbildung 10 und der Tissue-Engineering-Prozess in Abbildung 11 dargestellt.

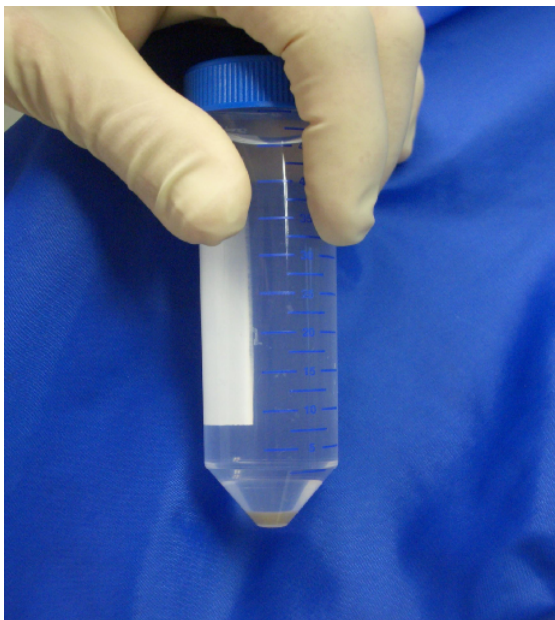


Abb. 8
Zellpellet mit Osteoblasten vor der
ersten Passage

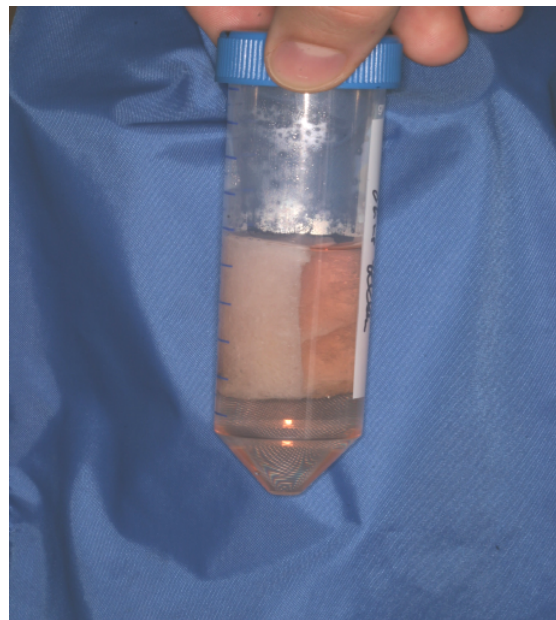


Abb. 9
Kollagen-HA Konstrukt mit
Osteoblasten im RPMI 1640 Medium

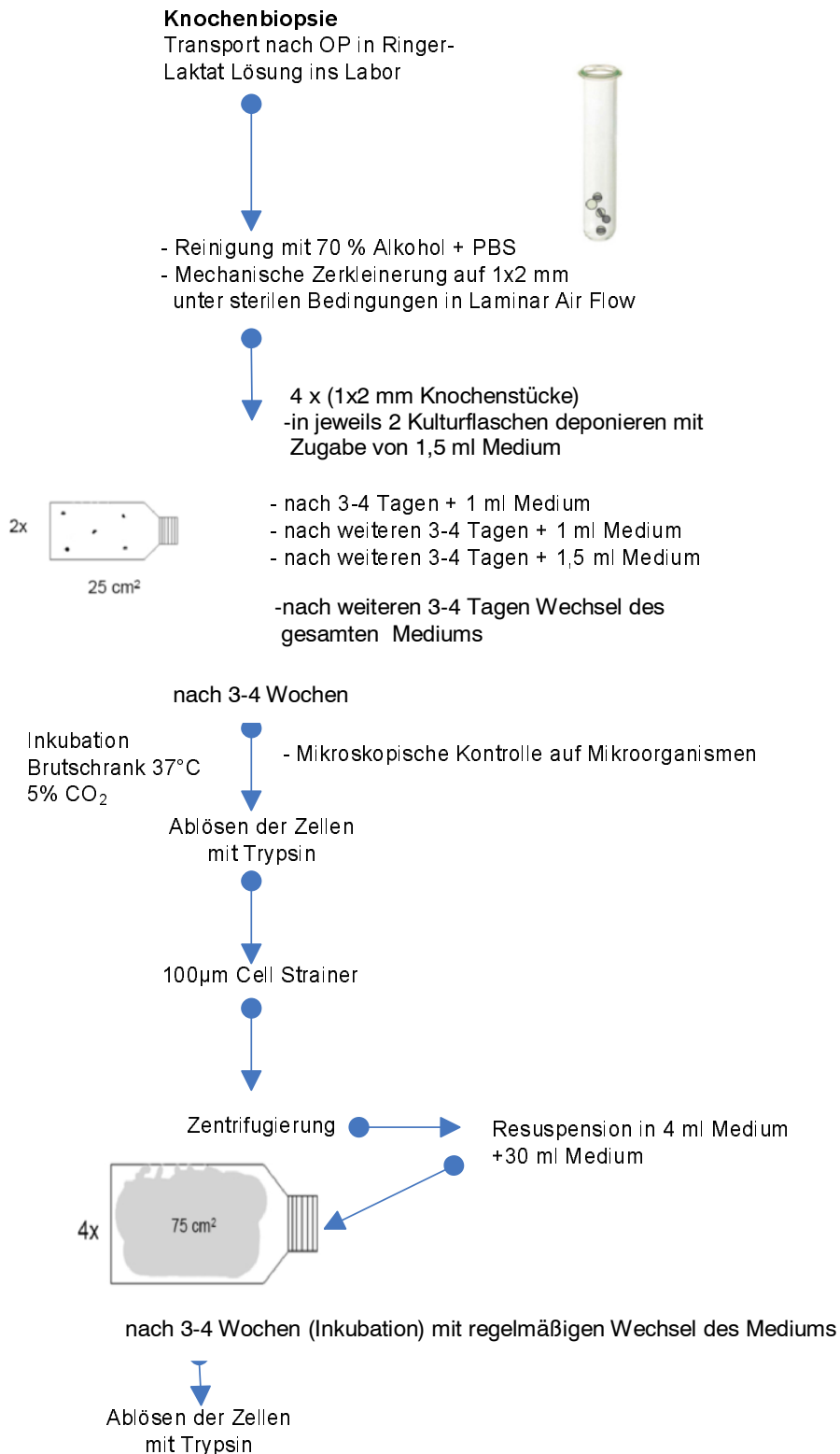


Abb. 10

Schematische Darstellung der Osteoblastenkultivierung

3.3.4 Osteogenitätsnachweis

Für den Osteogenitätsnachweis wurden Zellen der Kultur verwendet, die nicht zur Vitalisierung des Konstrukts benötigt wurden. Diese Zellen wurden in 24-well-Platten (Greiner, Frickenhausen) eine Woche lang mit RPMI Medium kultiviert und an ihnen drei Tests vorgenommen.

Van Kossa Färbung

Das Prinzip der Van Kossa Färbung besteht in einem Austausch von Calcium in seinen Verbindungen gegen Silberionen. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 5%-iger Silbernitratlösung (Fa. Merck, Darmstadt) eine Stunde im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült. Durch Zugabe von 1%-iger Pyrogallussäure (Fluka, Ch, 9471 Buchs, Schweiz) über 3-5 Minuten, wurden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und erneut mit Aqua dest. gewaschen. Mit 5%-igem Natriumthiosulfat (Fluka, Ch, 9471 Buchs, Schweiz) über 3-5 Minuten wurde die Färbung der Zellen fixiert. Um die Zellen auf die Gegenfärbung vorzubereiten, wurden sie über 15 Minuten wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde den Zellen zur Gegenfärbung eine Kernechtrotlösung (0,1 g Kernechtrot, Aluminiumsulfat 5 % und 100,0 ml Aqua dest., Fluka, Ch, 9471 Buchs, Schweiz) über 8 Minuten zugegeben. Danach wurden sie mit H₂O abgespült. Calciumhaltige Partikel, die von den Zellen produziert wurden, waren tiefschwarz gefärbt. Die Beurteilung der van Kossa Färbung wurde mit einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) bei 100-facher Vergrößerung durchgeführt.

Alkalische Phosphatase Nachweis, (ALP-Test)

Alkalische Phosphatase wird mit einer immunhistochemischen Färbung mit einem Testkit (Fa Sigma, Deisenhofen) nachgewiesen. Zunächst wurde die ALP-Färbelösung hergestellt. Dazu wurden 0,25 ml Fast-Blue-B Lösung und 0,25 ml Natriumnitrit Lösung abgemessen und mit 11,25 ml destilliertem Wasser und 0,25 ml alkalischer Naphthol AS-BI Lösung vermischt. Das Medium der Zellkultur wurde entfernt, die Proben luftgetrocknet und danach 30 sek. in einer Citrat-Aceton-Formaldehyd Lösung fixiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült, ALP-Färbelösung auf die Präparate gegeben und die Ansätze 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die gefärbten Zellkulturen wurden wiederum mit Aqua dest. abgespült und danach 5 Minuten mit Neutralrot gegengefärbt und nochmals gespült. Im Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) zeigte sich ALP als diffuser blauer Niederschlag im Zytoplasma.

Kollagen Typ I Test

Mit dem Kollagen Typ I Test wurden die Zellkulturen immunhistochemisch auf Kollagen Typ I untersucht. Dazu wurden die Kulturen über 5 Minuten mit PBS (Phosphat Buffered Saline, 0,1 M, pH 7.2 Fa Bichrom, Berlin) gespült, mit 70 % Ethanol eine Stunde fixiert, erneut mit PBS über 5 Minuten gespült und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach wiederholtem Spülen mit PBS wurden die Präparate 10 Minuten mit 0,3 % Wasserstoffperoxid (Fa. Merck, Darmstadt) in Methanol behandelt und mit PBS nachgespült. Unspezifische Immunreaktionen wurden durch 10-minütige Zugabe von 10 % Rinderalbumin blockiert. Anschließend wurde der erste Antikörper (Anti-Kollagen Typ I, Sigma, Deisenhofen) in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und die Zellen damit über 1 Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wurden über jeweils 45 Minuten der biotinylierte 2. Antikörper (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und der Avidin/Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) zugegeben. Zwischen jedem Inkubationsschritt erfolgte eine 3-5 malige Spülung mit PBS. Durch die Peroxidasesubstrat-Lösung (4 mg Diaminobenzidin + 10,0 ml 0,05 M Trispuffer + 17 µl 30 % H₂O₂) wurde die Enzymreaktion über 20 Minuten bei Raumtemperatur gestartet. Nach wiederholter Spülung mit PBS wurden die Proben mit Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. über 30 Sekunden konnten die Präparate mit dem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) bei 100-facher Vergrößerung beurteilt werden. Kollagenfasern färbten sich bei positiven Kollagen Typ-1 Test bräunlich.

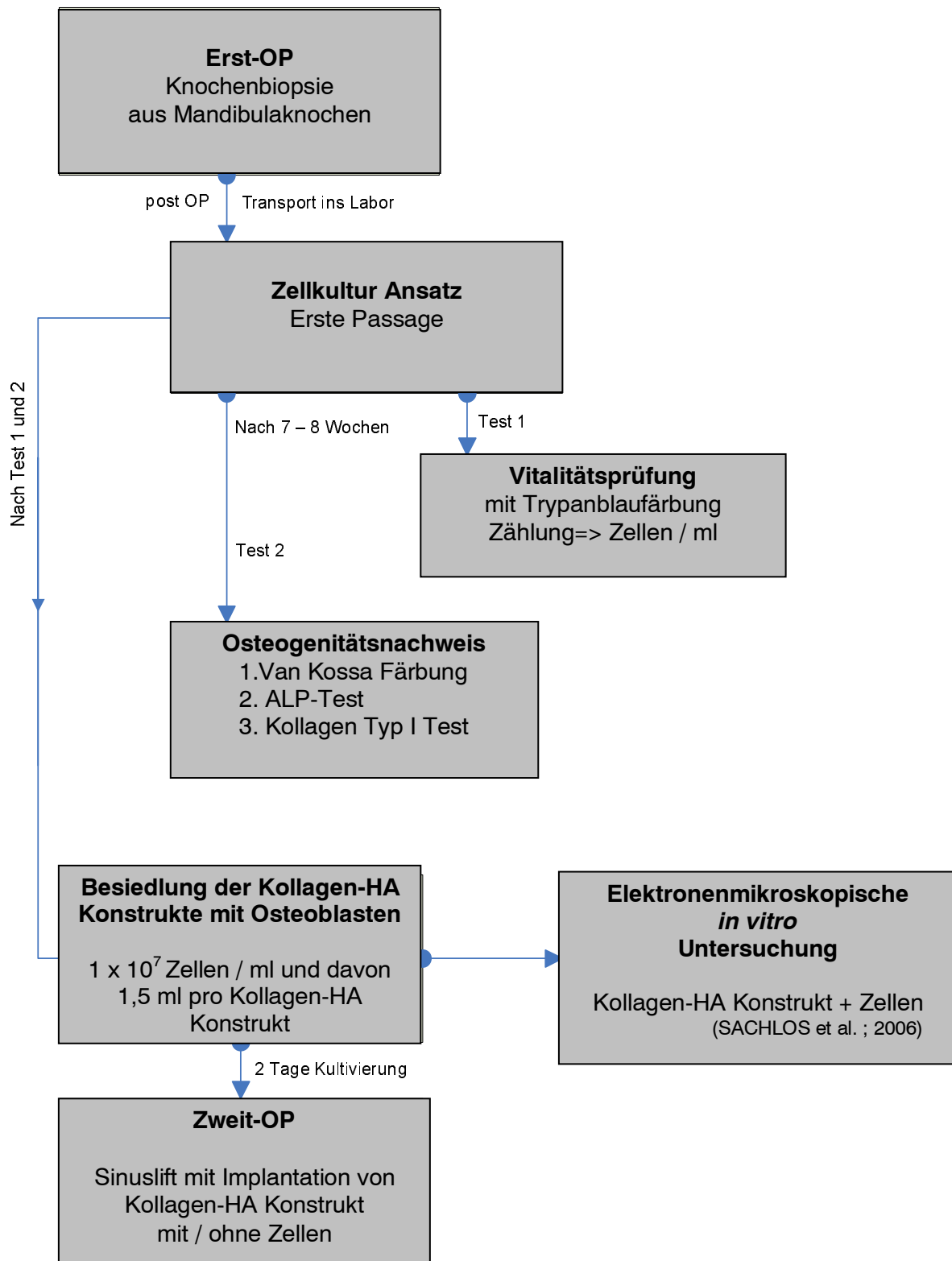


Abb. 11

Schematische Darstellung des Tissue-Engineering-Prozesses

3.3.5 Sinusbodenelevation

Die zweite Operation erfolgte 6-8 Wochen nach dem Ersteingriff. Bei der Sinusbodenelevation wurde die Haut infraorbital über 7-8 cm lang durchtrennt (Abb. 12), das Subkutangewebe und die kranialen Anteile des Musculus masseter mit dem Periost inzidiert. Durch die Dissektion des Musculus masseter und das Abschieben des Periosts wurde die faciale Kieferhöhlenwand bis zum Margo infraorbitalis dargestellt (Abb. 13). Ein 1 x 2 cm großes Knochenfenster wurde 1 cm caudal des Margo infraorbitalis angelegt. Dabei wurden diamantierte Fräsen verwendet. Es wurde äußerst sorgsam vorgegangen, um die dahinterliegende Kieferhöhlenschleimhaut (Schneidersche Membran) nicht zu verletzen. Mit feinen, gebogenen Elevatoren wurde die Kieferhöhlenschleimhaut von der noch vestibulär bestehenden Wand gelöst und der Boden der Kieferhöhle ebenfalls von der Schleimhaut frei präpariert und die Schleimhaut kraniomedial verlagert (Abb. 14). Distal des Knochenfensters wurde ein Dentalimplantat der Länge 10,0 mm und des Durchmessers von 4,0 mm (TiUnite Implantat RP 27389 LOT 625903, Fa Brånemark, Schweden) eingebracht. Zur Insertion des Implantats wurde mit dem Rosenbohrer eine Pilotbohrung von 2,85 mm Durchmesser gelegt und das Bohrloch über 3,0 mm auf 3,15 mm erweitert, um das Implantat manuell inserieren zu können (Abb. 15). In den Hohlraum wurde rechtsseitig das Kollagen-HA Konstrukt mit Zellen und links das 3.5 cm³ große Kollagen-HA Konstrukt ohne Zellen implantiert (Abb. 16 und 17). Der Musculus masseter wurde zurückgelagert und die Wunde in der Tiefe schichtweise mit resorbierbarem Nahtmaterial (4-0 und 2-0 Vicryl Ethicon, Johnson-Johnson Intl., Langhorne, PA, USA) und die Haut mit nicht resorbierbarem Material (2-0 Ethilon*II, Ethicon, Johnson-Johnson Intl., Langhorne, PA, USA) verschlossen. Die Hautfäden wurden nach 10-12 Tagen entfernt.



Abb. 12
Zugang zum linksseitigen Sinuslift: Hautschnittführung

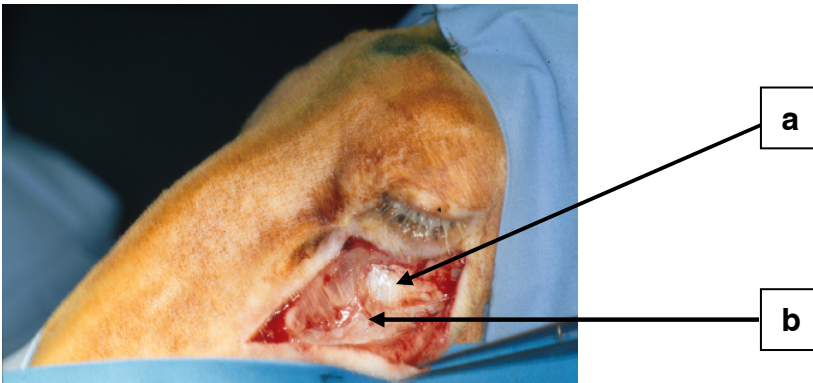


Abb. 13
Operativer Zugang zum Sinusboden mit Durchtrennung des Musculus masseter (b) und des Periosts (a)

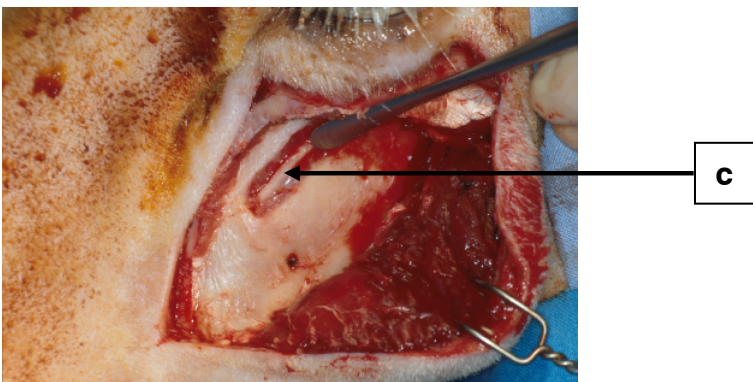


Abb. 14
Lösen der Schneiderschen Membran (c) mit dem Raspatorium



Abb. 15

Schneiden des Gewindelochs zur Verankerung des Bränemark-Implantats

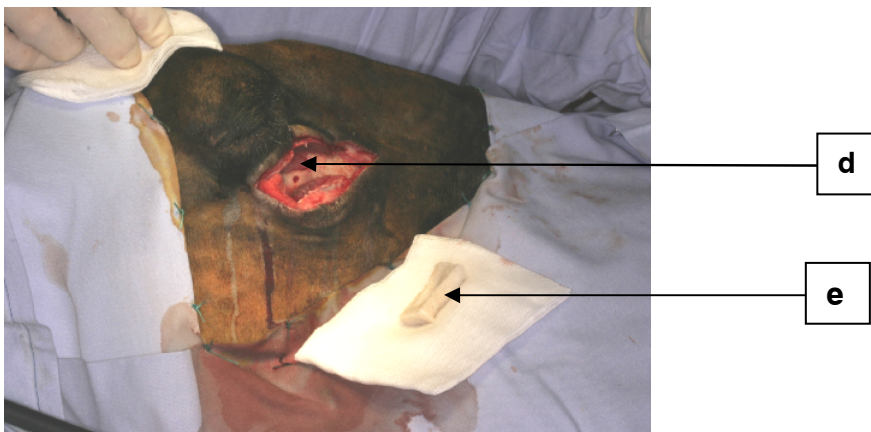


Abb. 16

Aufbereiteter Implantatschacht im Sinus mit Gewindeloch für Bränemark-Implantat (d);
Kollagen-HA Konstrukt (e)

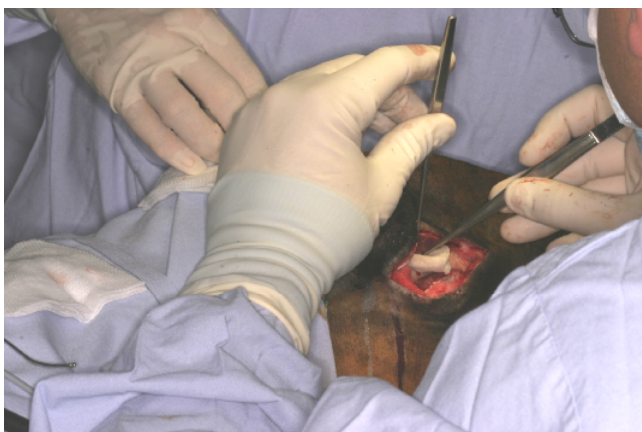


Abb. 17

Implantation des Kollagen-HA Konstrukts

3.4 Brånemark-Implantat

Es wurde das Implantatsystem TiUnite Implantat RP 27389 LOT 625903 (Fa. Brånemark, Schweden, Abb. 18) mit einem Durchmesser von 4,0 mm und einer Länge von 10,0 mm eingesetzt. Die Implantate bestehen aus Commercially Pure Titanium und einer TiUnite Oberfläche, die apikal eine sich kontrolliert verstärkende Titanoxidschicht hat (Abb. 18).



Abb. 18

Brånemark-Implantat

3.5 Polychrome Fluoreszenzmarkierung

Zur Verlaufsbeurteilung wurden Vitalfarbstoffmarkierungen vorgenommen. Die Farbstoffe wurden als steril filtrierte Lösungen subkutan im Bereich der Leistenbeuge, oder seitlich in der Lendenregion der Schafe appliziert. Das Markierungsschema und die Dosierung wurden zuvor mit dem AO Research Institute, Davos, Schweiz, abgestimmt (Rahn und Perren 1970, 1971, 1972 und Rahn 1976), (Abb. 19). Für die drei Überlebenszeiträume wurden verschiedene Schemata erstellt. Calzein wurde in einer Dosis von 10 mg/kg KGW (Calzein, Artikel Nr. Co875, Fa Sigma, Deisenhofen) und Xylenolorange in einer Dosierung von 90 mg/kg KGW (Xylenol Orange, Artikel Nr. X0127, Fa Sigma, Deisenhofen) injiziert.

8 Wochen Gruppe

W.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
M.	OP		C	C			X	X	†

16 Wochen Gruppe

W.	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
M.	OP						C	C			X	X	†

24 Wochen Gruppe

W.	0	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
M.	OP										C	C			X	X	†

Abb. 19

Schema für Polychrome Fluoreszenzmarkierung in den drei Versuchsgruppen.

C=Calzein, grün in Fluoreszenzaufnahme, X=Xylenolorange, orange in Fluoreszenzaufnahme

W.= Woche post OP, M.= Markierung nach der angegebenen Woche

3.6 Postoperatives Procedere

Die Tiere wurden nach der Operation 2-3 Tage lang isoliert gehalten und anschließend wieder zu den anderen Tieren in den Stall gelassen. Die Schafe erhielten direkt nach Erwachen aus der Narkose Heu und Wasser, um die bekannt empfindliche Magenfunktion nicht zu beeinträchtigen. Zur Analgesie wurde 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Karlsruhe) über die ersten 3 Tage nach dem Eingriff s.c. injiziert.

Am Ende der Versuchszeit wurden die Tiere nach jeweils 8, 16 oder 24 Wochen mit einer intravenösen Gabe von 100,0 mg/kg KGW Pentobarbital (Narcofen, Fa. Merial GmbH, Halbergmoos) narkotisiert und anschließend mit 2 mmol/kg KGW Kaliumchlorid i.v. (Kaliumchlorid 7,45 % Braun, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) getötet und dann dekapitiert. Der Kopf wurde für die weiteren Untersuchungen bei minus 20° Celsius gelagert.

3.7 Computertomographische Untersuchungen

Von jedem Tierschädel wurden mit einem Computertomographen (CT, General Electric GE Pro Speed SX Power, Aachen) Spiraldatensätze mit einer Schichtdicke von 1,0 mm gewonnen. Der Datensatz wurde auf 0,5 mm Schichten hochgerechnet, 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. 20-23). Der Schafsschädel wurde in der Sagittalachse ausgerichtet. Als Standardeinstellung diente die koronale Schichtung. Kontrolliert wurde der markierte Bereich sowohl in der Koronal-, als auch in der Sagittalebene. In den CT-Schnitten wurden jeweils die Umrisse der Augmentation umfahren und farblich markiert. Durch Aneinanderreihen der einzelnen CT-Schichten konnte das Volumen der augmentierten Kieferhöhlen berechnet und drei-dimensional dargestellt werden (Abb. 24-25). Zur Verblindung waren dem Untersucher während der Auswertung weder Tiernummer noch Überlebenszeitraum bekannt. Zugeordnet wurde erst nach Ermittlung der Werte. Um die Materialdichte zu bestimmen, wurde die Röntgen-Opazität in Hounsfield Units (HU) im Augmentat, in der Spongiosa und in der Kompakta des originären Knochens an jeweils drei Bereichen gemessen.

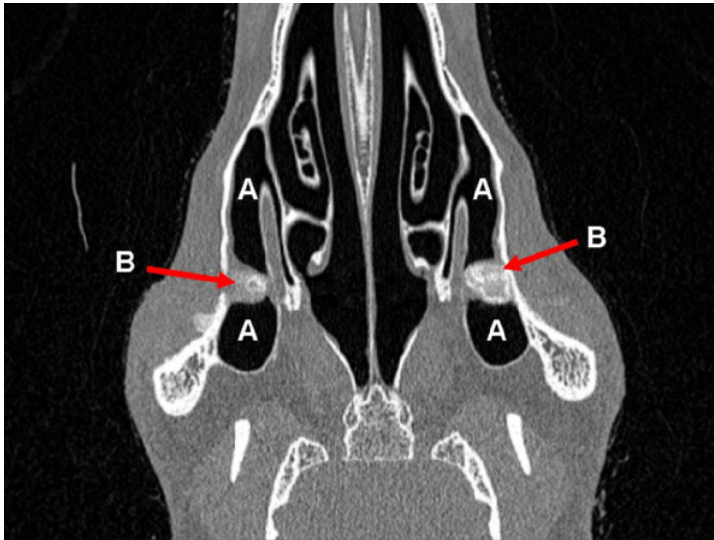


Abb. 20

CT-Aufnahme, transversaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B)

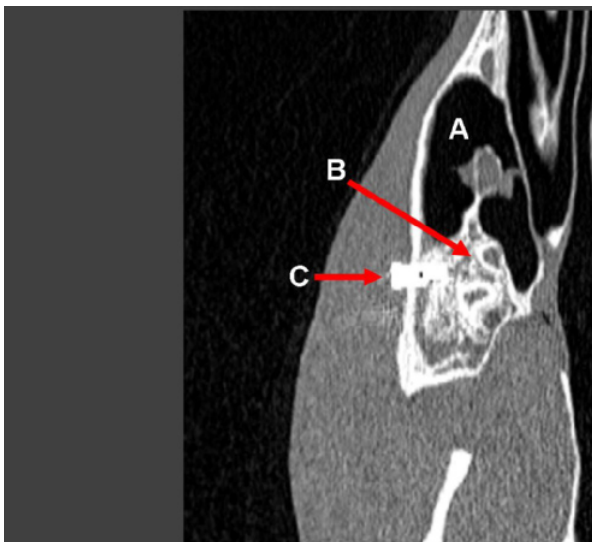


Abb. 21

CT-Aufnahme, transversaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C)

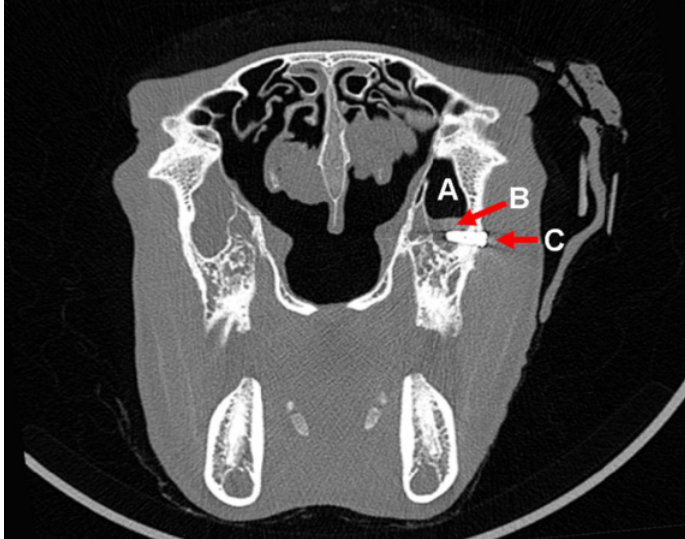


Abb. 22

CT-Aufnahme, koronaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C)

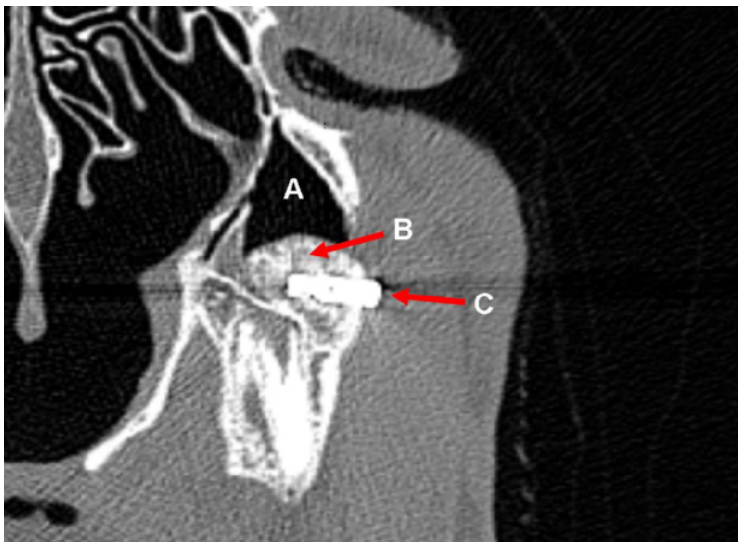


Abb. 23

CT-Aufnahme, koronaler Schnitt der Kieferhöhle (A) mit Kollagen-HA Konstrukt (B) und Bränemark-Implantat (C), Nahaufnahme



Abb. 24

Dreidimensionale Rekonstruktion des Kollagen-HA Konstrukts ohne Zellen (rot) und mit Zellen (gelb)

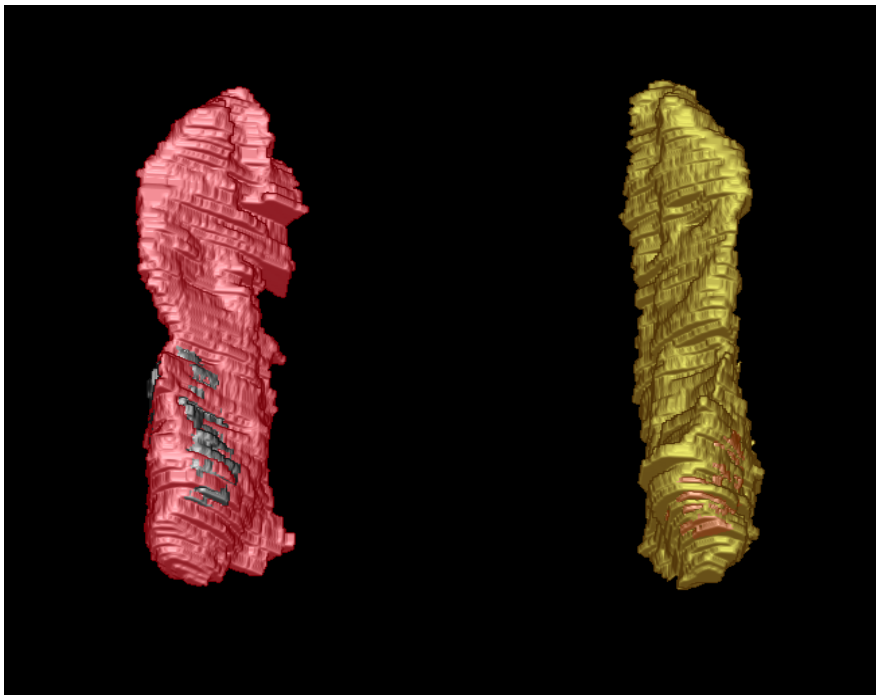


Abb. 25

Dreidimensionale Rekonstruktion der rechten Kieferhöhle (rot) augmentiert mit Kollagen-HA Konstrukt mit Zellen (grau) und der linken Kieferhöhle (gelb) augmentiert mit Kollagen-HA Konstrukt ohne Zellen (rosa)

3.8 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Implantat-tragenden Knochenteile ca. 1,0 cm vor und hinter dem Implantat vom Oberkiefer mit einer Säge abgetrennt und im histologischen Labor der Abteilung für Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie des Universitätsklinikums Freiburg aufbereitet. Dazu wurden die Knochenpräparate zwei Wochen in vierprozentigem Formaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert, danach unter fließendem Leitungswasser das Formaldehyd ausgewaschen und in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 % und 100 %, Klinische Apotheke, Universitätsklinikum, Freiburg) dehydriert. Die Präparate blieben dazu jeweils 3 Tage in jeder Konzentrationsstufe, wobei die Alkohollösungen einmal pro Konzentrationsstufe erneuert wurden. Beginn und Abschluss der Entwässerung fanden im Exsikkator unter Vakuum statt. Nach Dehydrierung wurden die Präparate einen Tag lang in Xylol (Merck, Darmstadt) entfettet und in drei Stufen kunststoffinfiltriert. In der ersten Stufe wurden die Präparate über 2 Wochen in eine Mischung aus Methylmethacrylat, (Merck, Darmstadt) und 15 % Dibutylphthalat (Fluka, Steinheim) gegeben. Für die zweite Stufe wurden die Präparate über einen Tag in eine Mischung aus MMA, 15 % Dibutylphthalat und 1,5 % Benzoylperoxid (Merck, Darmstadt) überführt. Die dritte Stufe der Infiltration erfolgte in luftdicht verschlossenen Glasgefäßen über 2 Wochen im Kühlschrank, in einem Polymerisationsgemisch aus MMA, (Merck, Darmstadt), 15 % Dibutylphthalat und 3 % getrocknetem Benzoylperoxid. Zu Beginn der Stufe eins und drei der Infiltration wurden die Proben im Exsikkator über eine Stunde unter Vakuum gesetzt. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Ableitung der Polymerisationswärme wurden die Glasgefäße in ein Wasserbad gestellt und verblieben dort bis zur vollständigen Aushärtung des Kunststoffes. Nach Herauslösen der Kunststoffblöcke aus den Gläsern wurde mit einer Bandsäge (Proxxon, Niersbach) der überflüssige Kunststoff vom Präparat entfernt. Mit einer Präzisionsinnenlochsäge (Microslice, IBS Cambridge, GB), mit einem Diamantsägeblatt der Stärke 0,1 mm wurden die Präparate in ca. 500 µm dicke Schnitte zerlegt. Die Sägeschnitte wurden mit Sekundenkleber (Loctite 401, Dublin, IRL) auf weiße Acrylglasobjektträger (Maertin, Freiburg) geklebt, mit Parafilm (American National Can, Chicago, USA) abgedeckt und mit einem Gewicht über einige Sekunden fest angepresst. Vor der Weiterbearbeitung wurden die aufgeklebten Schnitte mindestens über 24 Stunden luftgetrocknet.

Aus den aufgeklebten Schnitten wurden Dünnschliffe mit einem rotierenden Schleifteller (Struers, Dänemark), Nassschleifpapier (Struers, Dänemark) der Körnung 180 und 1200, Nasspolierpapier (Struers, Dänemark) der Körnung 2400 und 4000 hergestellt. Unter Wasserzufuhr und mit geringer Rotationsgeschwindigkeit wurden die Sägeschnitte mit dem Nassschleifpapier der Körnung 180 planparallel auf etwa $140\ \mu\text{m}$ herunter geschliffen und mit der Körnung 1200 weiter bis etwa $80\ \mu\text{m}$ reduziert. Anschließend wurden sie mit Körnungen 2400 und 4000 poliert. Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die Dünnschliffe nach Richardson, Levai und Laczko gefärbt. Zur Oberflächenfärbung der Schnitte kamen Azur II (Merck, Darmstadt) zur Darstellung des Weichgewebes, sowie Pararosanilin (Fa. Sigma, Steinheim) zur Differenzierung von altem und neu gebildetem Knochen, zum Einsatz. Die Farbeindringtiefe betrug ca. $5\ \mu\text{m}$. Zwei Schnitte je Seite wurden bei der Präparatherstellung der Implantate in ihrer Längsachse abgebildet. Um eine Überlagerung durch die endgültige Oberflächenfärbung zu vermeiden, wurden die Präparate vor dem Färben nativ mit der Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die Fotos elektronisch gespeichert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 2,5-fachen Vergrößerung auf einem Axioscope Mikroskop (Fa. Carl Zeiss), das mit einer Fluoreszenzlampe HBO 50 (Fa. Carl Zeiss, Jena) und einer digitalen Farbkamera (CC-12, Fa. Soft Imaging System, Hamburg) ausgestattet ist, erstellt. Zur Bilddatensammlung, Optimierung und Auswertung wurde das Bildauswertungsprogramm Analysis[®] eingesetzt (Fa. Soft Imaging System, Olympus, Hamburg). Da die Knochenneubildung an der Implantatoberfläche untersucht werden sollte, wurden zur Auswertung nur Schnitte berücksichtigt, auf denen die Implantate getroffen waren (Abb. 26).

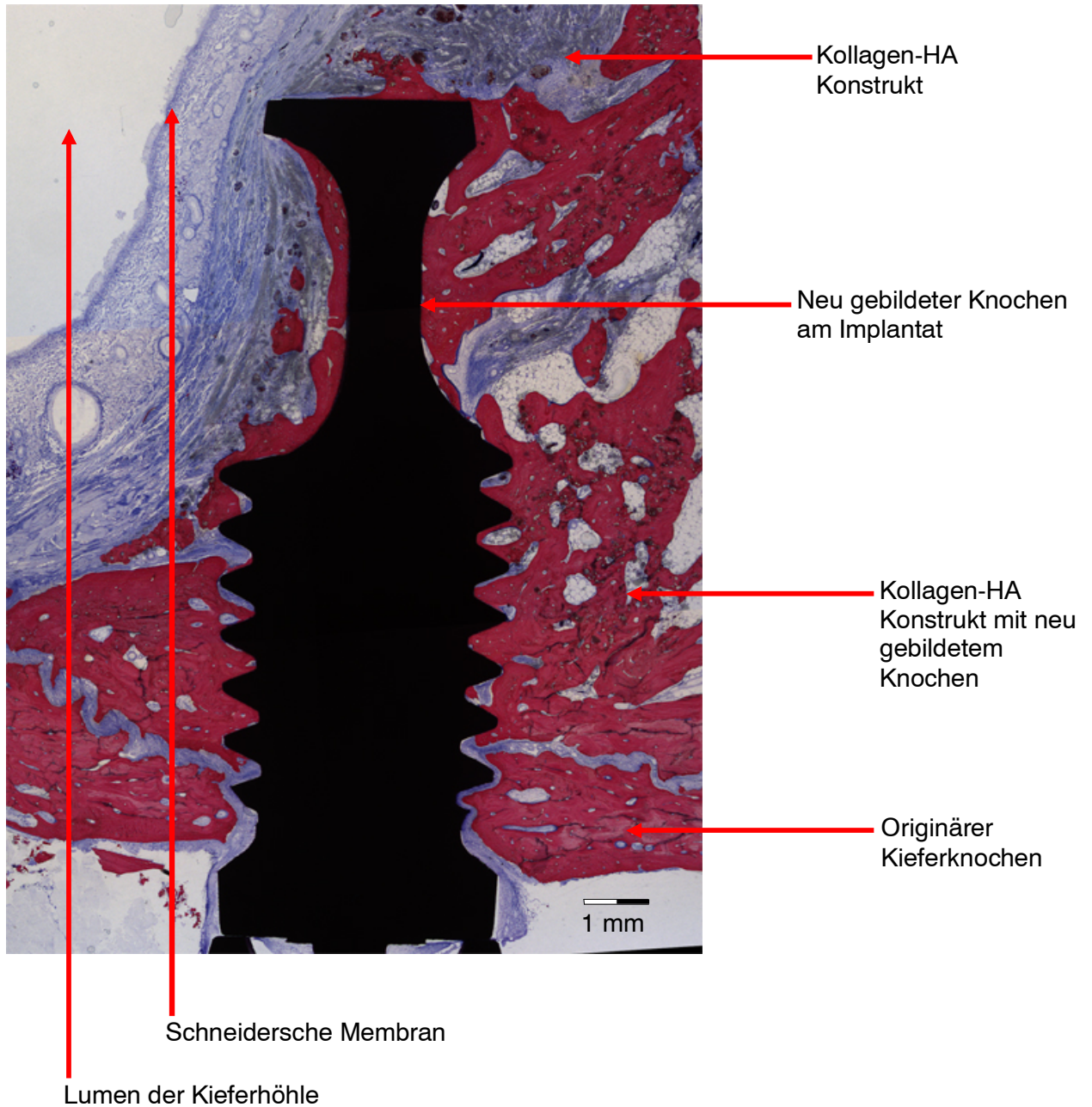


Abb. 26

Lichtmikroskopische Darstellung des Augmentatbereichs mit Brånemark-Implantat und Kollagen-HA Konstrukt (Vergrößerung 25-fach)

3.9 Morphometrische Analyse (Lichtmikroskopie)

Es wurden die Strecken der direkten knöchernen Anlagerungen an der Implantatoberfläche vermessen und ausgewertet. Dabei wurde der Knochenkontakt am Implantat mit den originären Knochen nicht miteinbezogen, sondern nur neugebildeter Knochen im Augmentationsbereich berücksichtigt (Abb. 27).

Es wurden die prozentualen Anteile neu ossifizierter und nicht ossifizierter Anlagerungen in Relation zur relevanten Länge des Implantats gesetzt. Als relevante Länge des Implantats wurde der Teil festgelegt, der im Augmentat lag und an dem eine Knochenneubildung zu erwarten war (Messwerte Tab 13,14,15).

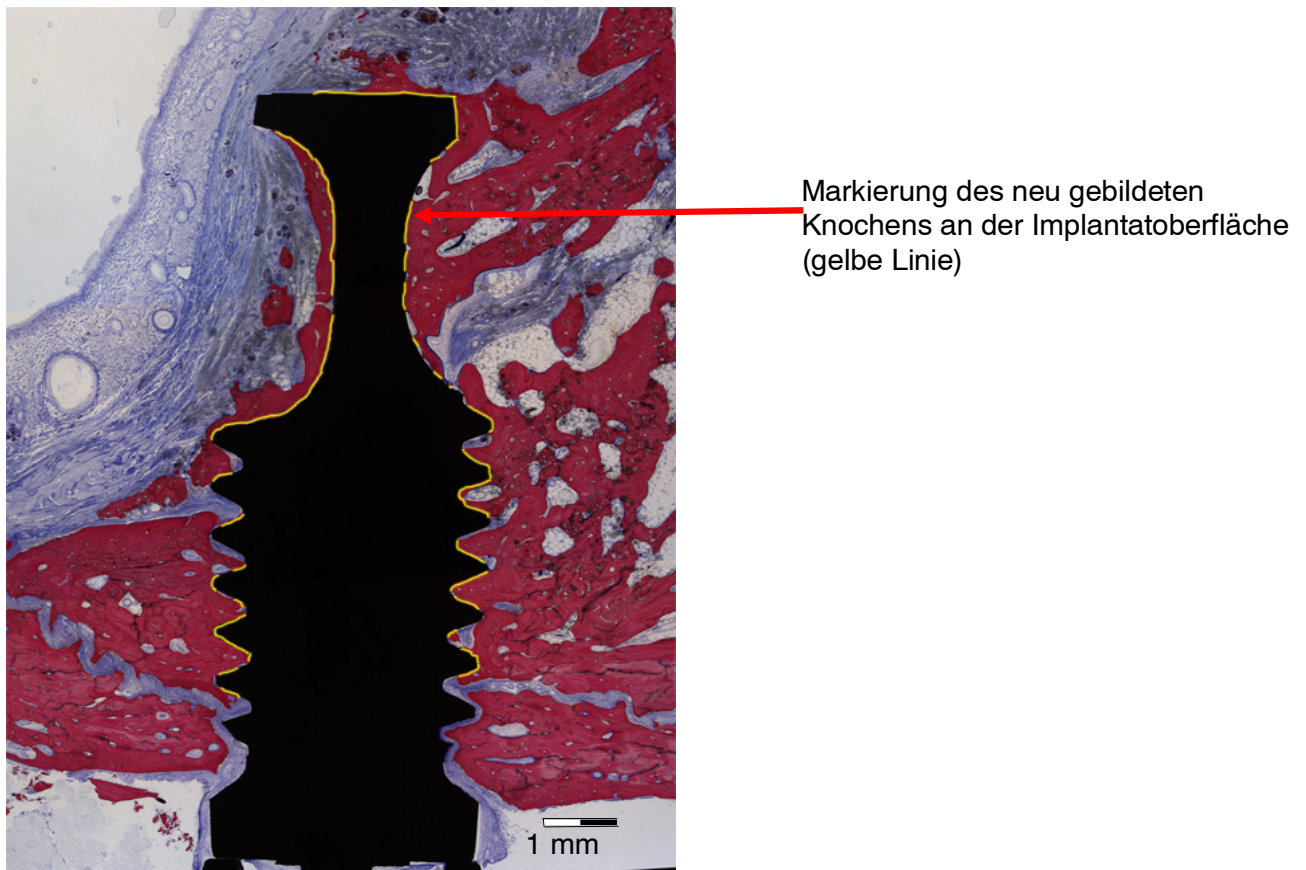


Abb. 27

Vermessung des neu gebildeten Knochens am Bränemark-Implantat
(Vergrößerung 25-fach)

3.10 Morphometrische Analyse (Fluoreszenzmikroskopie)

Durch das subkutane Farbstoffdepot wurden ab dem Zeitpunkt der Injektion die Vitalfarbstoffe, über einen Zeitraum von einer Woche, in die neu gebildeten Knochenstrukturen eingebaut. Durch Mehrfachinjektionen wurden verschiedene Farbbänder und Farbflächen erzeugt. Dadurch konnte die Knochenneubildung einem bestimmten Zeitraum zugeordnet werden. Da in diesem Versuch Überlebenszeiten von 8, 16 und 24 Wochen geplant waren, war dies bei der Aufstellung der unterschiedlichen Markierungsschemata zu berücksichtigen. Bei den Proben nach 8 Wochen Überlebenszeit stellten sich die Vitalfärbungen in der 3. und 4. Woche grün (Calzein) und in der 7. und 8. Woche orange (Xylenolorange) dar. Nach einer Überlebenszeit von 16 Wochen waren die neuen Ossifikationen in der 11. und 12. Woche grün (Calzein) und in der 15. und 16. Woche orange (Xylenolorange) markiert. Bei den Tieren mit einer Überlebenszeit von 24 Wochen zeigten sich in der 19. und 20. Woche die Vitalfärbungen grün (Calzein) und in der 23. und 24. Woche orange (Xylenolorange). Auch im ortständigen Kieferknochen wurden fluoreszierende Linien gesehen, die durch den physiologischen Knochenumbau entstanden waren (Abb. 28). Die Werte wurden in Prozent des neugebildeten Knochens am Bränemark-Implantat angegeben.

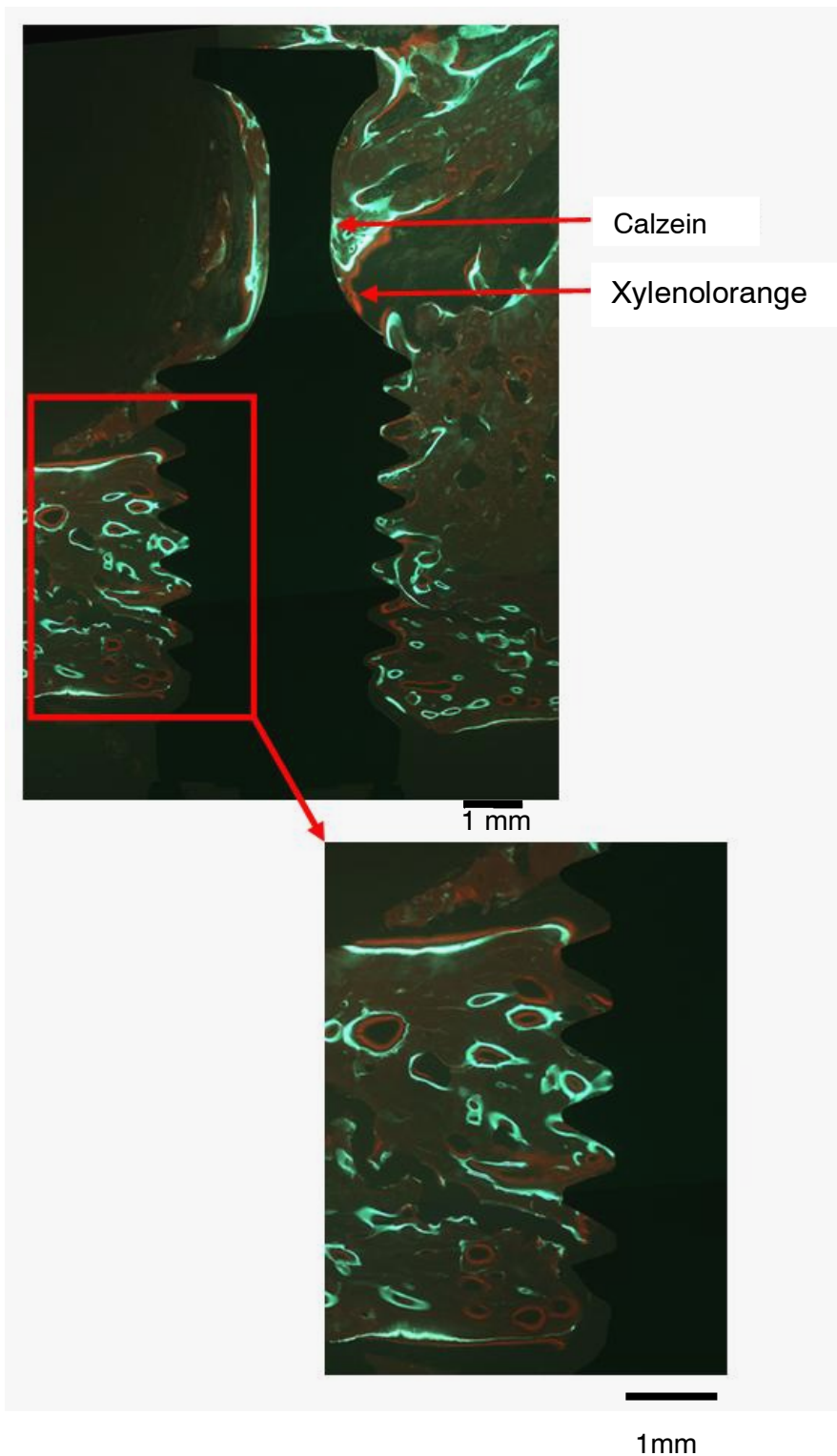


Abb. 28

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Implantats aus der Gruppe mit einer Überlebenszeit von 24 Wochen

Die grün, (Calzein) und orange, (Xylenolorange) fluoreszierenden Bänder zeigen neu-gebildetes Knochengewebe an (Vergrößerung 25-fach)

3.11 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die Daten wurden mit der Software Excel 2002 (Microsoft[®], Redmond, USA) archiviert und statistisch durch die Firma Menne Biomed Consulting, Tübingen, ausgewertet. Bei den Daten handelt es sich um verallgemeinerte Wachstumskurven. In jedem Versuchstier werden dabei auf den beiden Kieferseiten Kontrolle und Test parallel registriert. Dazu ist einerseits ein Vergleich von Daten eines Tiers erforderlich („within subject“). Da die Tiere aber erst nach Tötung histologisch untersucht werden konnten, also kein Zeitverlauf bei einem Tier gemessen wurde, sind zusätzlich Vergleiche zwischen den Tieren erforderlich („between subject“). Eine solche Mischung zwischen „within“ und „between“, in der Kombination aus einer kontinuierlichen Variablen „Zeit“ und einem zweistufigen Faktor „Treatment“, wird mit einem Mixed-Model statistisch untersucht (Software: package *nlme*, PINHEIRO und BATES, 2000). Im Modell wird der Zeitverlauf durch eine lineare Regressionsgerade angenähert, deren Steigung das Wachstum pro Woche angibt zur Begründung für die Zulässigkeit der linearen Näherung (DAWES und CORRIGAN, 1974). Das Ergebnis der statistischen Analyse wurde in Kontrasttabellen zusammengefasst. Beispielhaft wird Abbildung 32 und Tabelle 5 zur statistischen Auswertung der Knochendichte der Spongiosa erläutert.

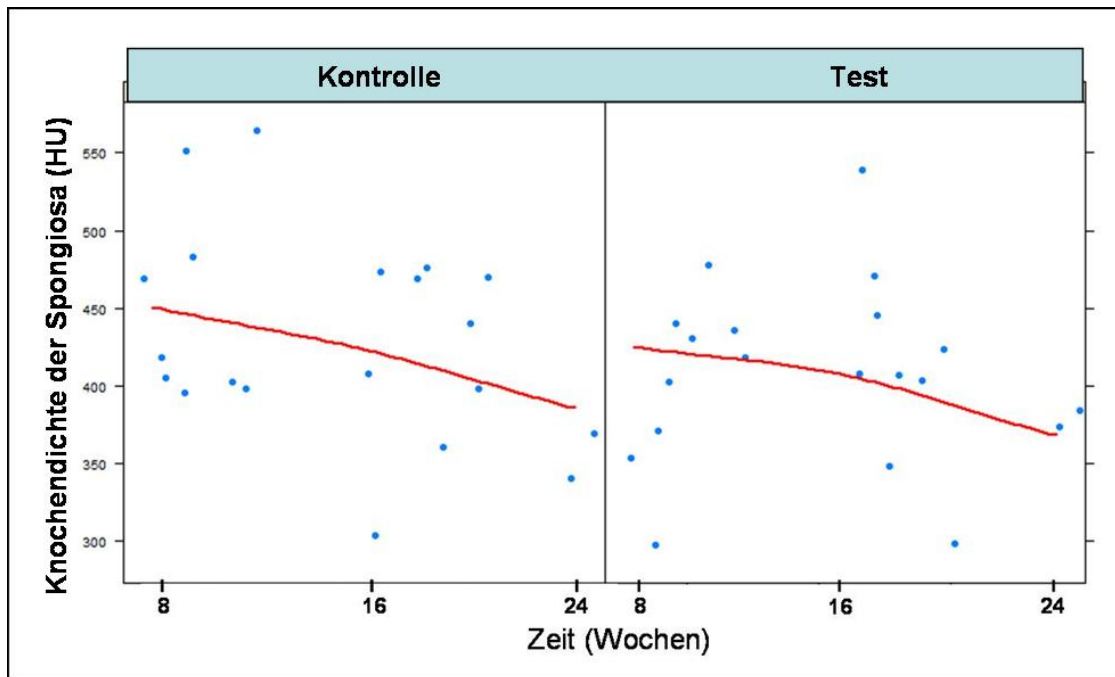


Abb. 32

Spongiosadichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie

Bei der Darstellung der Kurven wurden die Punkte in der horizontalen Achse (Zeit) auf einen statistischen „Jitter“ neben dem eigentlichen Messwert aufgetragen. Dies dient dazu, überlappende Punkte einzeln darzustellen.

Tab. 5 Statistische Werte: Spongiosadichte (HU) Test-, Kontrollseite

	Wert (HU)	Standardfehler	p-Wert
Wert bei 8 Wochen, Kontrollseite in HU	455	24 HU	
Differenz Wert bei 8 Wochen zwischen Test und Kontrolle in HU	-42	19 HU	0,03
Steigung Test in HU/Woche	-4,5	2,4 HU/Woche	0,10
Differenz der Steigung zwischen Test- und Kontrolle in HU/Woche	2,2	1,8 HU/Woche	0,24

In der ersten Zeile ist in der Spalte *Wert* der Schnittpunkt der linearen Anpassung der Kontrollkurve zur ersten gemessenen Zeit (hier 8 Wochen) angegeben. In der zweiten Zeile wird die Differenz dieses Schnittpunkts der Testgruppe zum Schnittpunkt der Kontrollgruppe angegeben. Sie beträgt -42 HU. Das entspricht einem Absolutwert für den Schnittpunkt der Testgruppe von 413 HU (455-42 HU). Wie die letzte Spalte zeigt, ist diese Differenz der Schnittpunkte mit $p=0,03$ signifikant, die Ausgangswerte bei Test und Kontrolle sind also unterschiedlich. In der dritten Zeile ist die Dichtezunahme in HU pro Woche angegeben. Sie ist negativ (-4,5 HU/ Woche), es ist also ein leichter Trend zur Abnahme der Dichte zu beobachten, allerdings ist diese Abnahme nur schwach signifikant ($p=0,10$).

Die letzte Zeile gibt das für diese Studie wichtigste Ergebnis wieder: es ist die Differenz zwischen der Steigung der Testgruppe zur Kontrollgruppe, also ein Maß für den Unterschied im Wachstum durch die Behandlung. Wäre dieser Wert signifikant positiv, ließe sich feststellen, dass das Spongiosawachstum in der Versuchsgruppe signifikant stärker gefördert worden wäre als in der Kontrollgruppe. Die Differenz im Wachstum ist mit 2.2 HU/Woche zwar positiv, aber nicht signifikant verschieden ($p=0.24$).

4. Ergebnisse

Die Einzelwerte der Messungen sind tabellarisch im Anhang zusammengestellt.

4.1 Versuchsverläufe

Narkose und Ersteingriff waren bei allen Tieren ohne Auffälligkeiten. Fressverhalten und Wundheilung waren komplikationslos. Die Tiere haben in der Zeit zwischen den beiden Operationen ihr Gewicht gehalten, oder um 2-3 kg zugenommen. Nach der zweiten Operation kam es bei Tier Nr. 76 nach einer Woche zu einer abszendierenden Schwellung im OP-Bereich, die spontan extraoral aufbrach und über ca. 4 Wochen dräniert und mit Antisepticum (Betaisadona, Braun, Melsungen) gespült wurde. Es wurden keine Antibiotika eingesetzt, da das Tier kein Fieber oder Einschränkungen des Fressverhaltens zeigte. Schaf Nr. 72 war, wohl als Folge einer relativ langen Operationszeit, kurzzeitig in der Hinterhand ohne Aufstehvermögen. Der Allgemeinzustand war bei allen Tieren gut.

4.2 Computertomographische Volumen- und Knochendichtebestimmung

Im CT wurden das Kieferhöhlenvolumen (ml), das Volumen des Augmentats (ml), sowie die Knochendichte (Hounsfield Unit [HU]) der Spongiosa, der Kompakta und des Augmentats ermittelt.

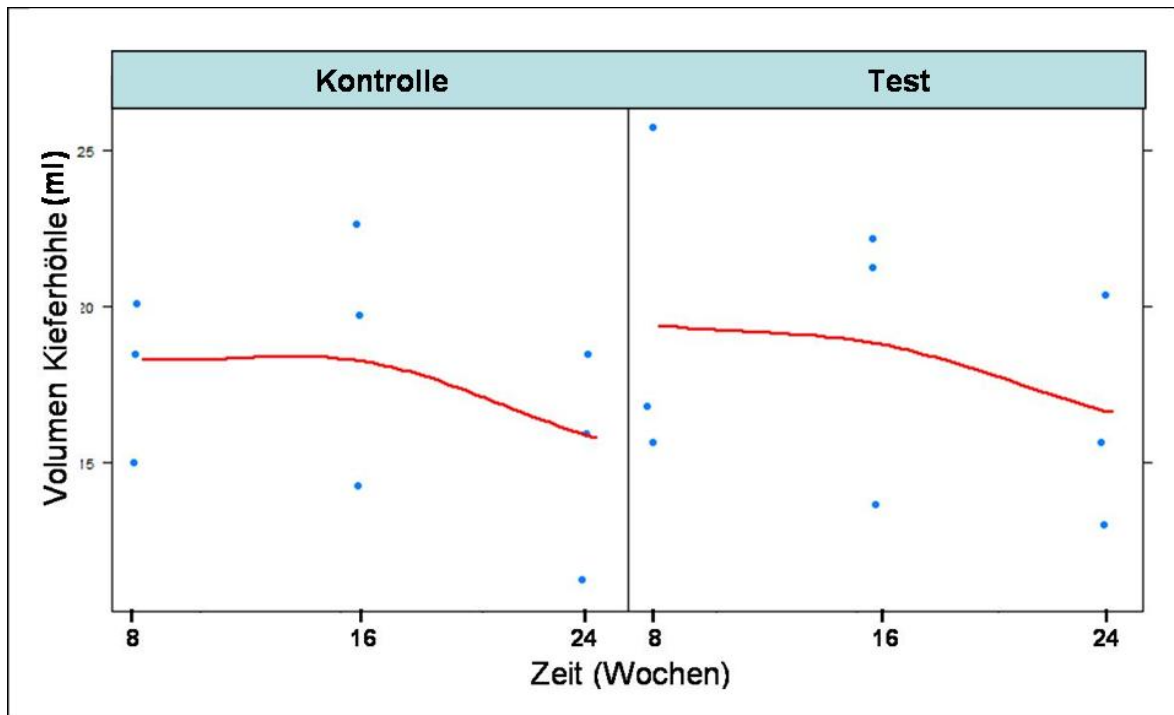


Abb. 29

Kieferhöhlenvolumen: Kontroll- und Testseite in den 3 Überlebensgruppen

Tab. 2 Statistische Werte: Kieferhöhlenvolumen

	Wert (ml)	Standard Fehler (ml)	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in ml	18,62	2,11	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in ml	1,15	1,21	0,37
Steigung Test (ml /Wo)	-0,16	0,20	0,45
Diff. Steigung Test- und Kontrolle (ml/Wo)	-0,02	0,12	0,84

Statistisch konnten für das Kieferhöhlenvolumen weder zwischen den Seiten, noch zwischen Gruppen Unterschiede aufgedeckt werden. Kontrollseitig war das Volumen nach acht Wochen (18,62 ml) nicht signifikant different zum testseitigen Volumen (19,77 ml) ($18,62 + 1,15 = 19,77$ ml), $p = 0,37$. Das Volumen nach 24 Wochen war nicht signifikant kleiner als in den anderen Gruppen, weil die negative Steigung der Testgruppe von -0,16 nicht signifikant war ($p = 0,45$). Test- und kontrollseitig unterschieden sich die negative Steigung der Kurven nicht ($p = 0,84$) (Abb. 29, Tab. 2).

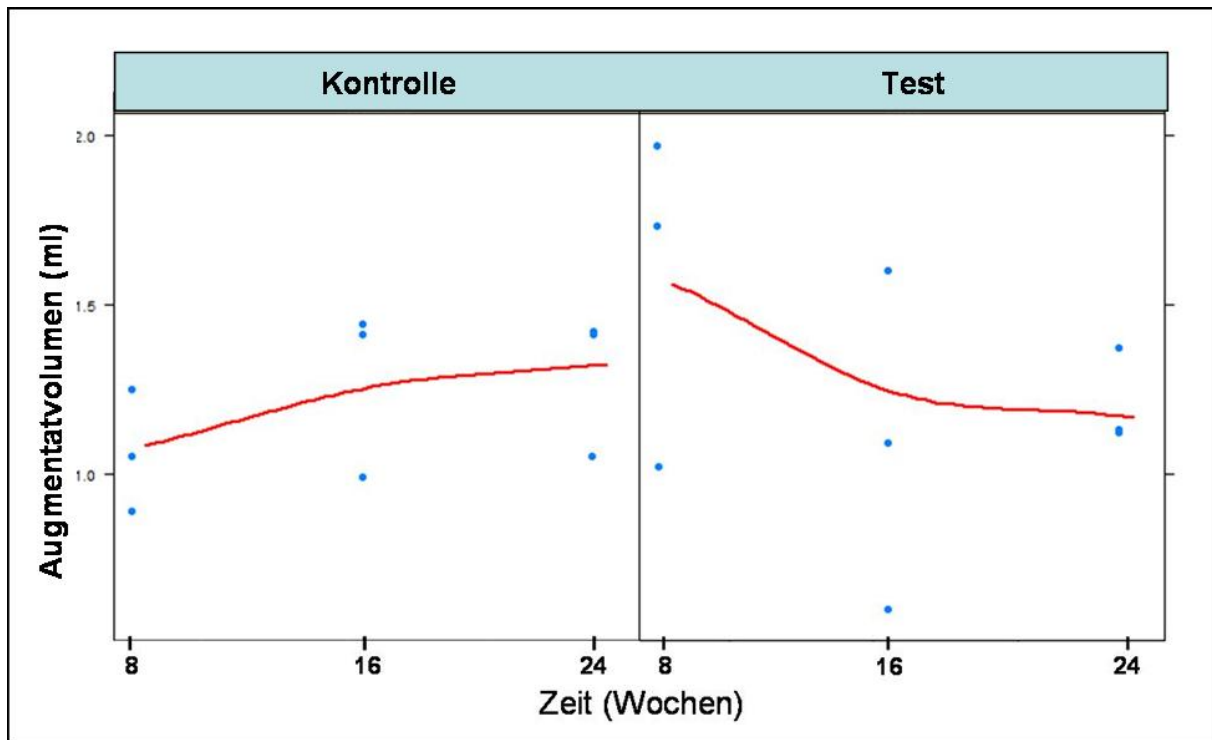


Abb. 30

Augmentatvolumen: Kontroll- und Testseite in den 3 Überlebensgruppen

Tab. 3 Statistische Werte: Augmentatvolumen in ml

	Wert (ml)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in ml	1,10	0,17	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in ml	0,38	0,20	0,09
Steigung Test (ml /Wo)	0,01	0,02	0,42
Diff. Steigung Test- und Kontrolle (ml/Wo)	-0,04	0,02	0,09

Es gab einen schwachen Trend, dass das Augmentatvolumen testseitig nach 8 Wochen ($1,10 + 0,38 = 1,48$ ml) ein größeres Volumen aufwies ($p = 0,09$), obwohl die gleichen Volumina transplantiert wurden. Es gab ebenso einen schwachen Trend, dass das Volumen testseitig abnahm ($0,01 - (-0,04) = -0,03$) ($p = 0,09$). Die kontrollseitige Volumenzunahme (Steigung 0,01) war nicht signifikant ($p = 0,42$), (Abb. 30, Tab. 3).

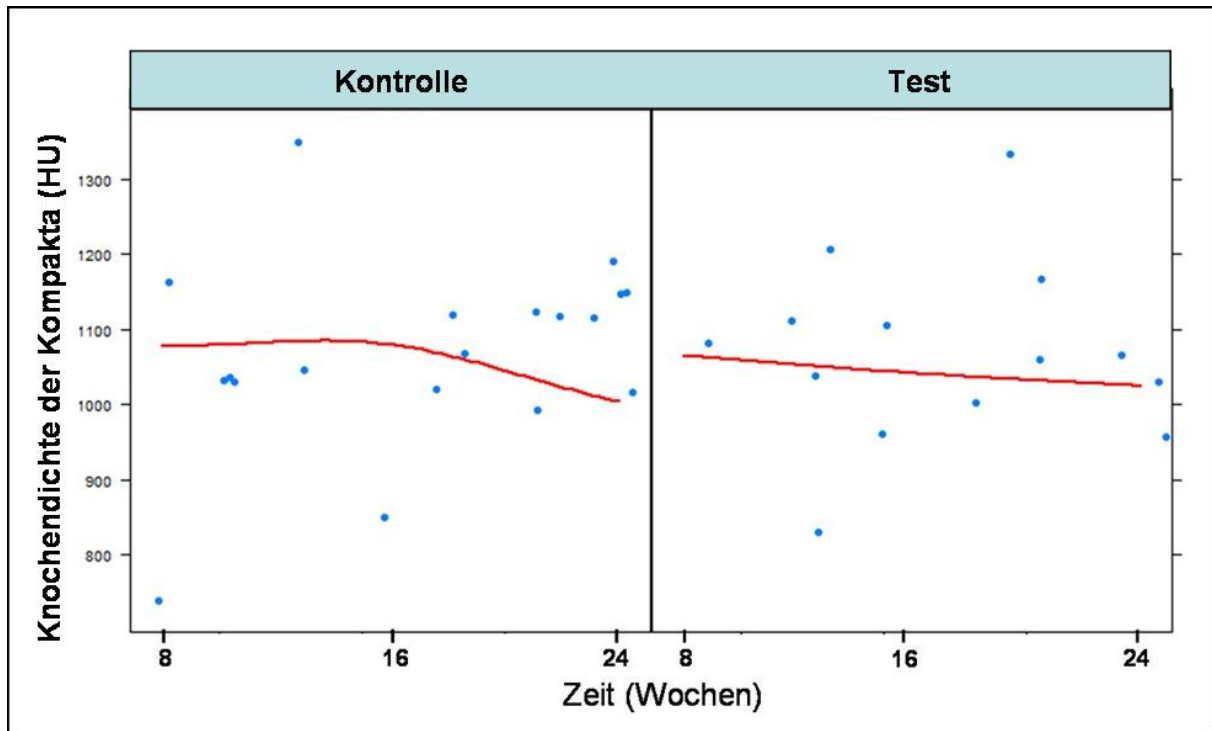


Abb. 31

Kompaktadichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie

Die Messpunkte wurden zur besseren Darstellung auf einen „Jitter“ verteilt.

Tab. 4 Statistische Werte: Kompaktadichte (HU) Test-, Kontrollseite

	Wert (HU)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in HU	1074	34	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in HU	-1,6	48	0,97
Steigung Test (HU /Wo)	-3,6	3,3 HU/ Woche	0,32
Diff. Steigung Test- und Kontrolle (HU/Wo)	0,7	4,7 HU/ Woche	0,88

Statistisch waren für die Kompaktadichte weder test- noch kontrollseitig (p für die Werte=0,97, p für die Steigung=0,32), noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede ($p=0,88$) aufzudecken (Abb. 31, Tab. 4).

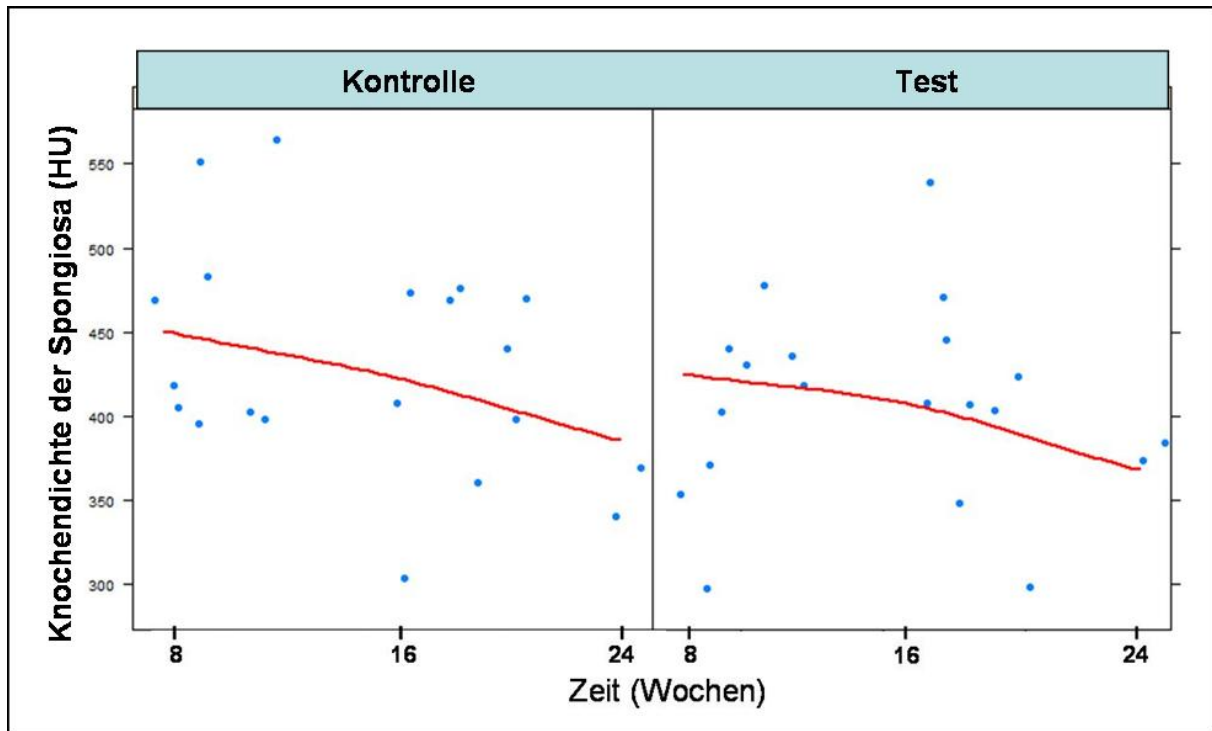


Abb. 32

Spongiosadichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie

Die Messpunkte wurden zur besseren Darstellung auf einen „Jitter“ verteilt

Tab. 5 Statistische Werte: Spongiosadichte (HU) Test-, Kontrollseite

	Wert (HU)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in HU	455,2	24,3	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in HU	-41,9	19,0	0,03
Steigung Test (HU /Wo)	-4,5	2,4 HU/Wo	0,10
Diff. Steigung Test- und Kontrolle (HU/Wo)	2,2	1,8 HU/Wo	0,24

Statistisch war die Spongiosadichte testseitig ($455,2 - 41,9 = 413,3$ HU) signifikant geringer ($p=0,03$) mit einem schwachem Hinweis ($p=0,10$) darauf, dass die Dichte kontrollseitig über die Zeit abnahm ($-4,5$ HU/Wo), ohne dass es einen Unterschied der Seiten gab. Die Differenz zwischen Test- und Kontrollseite war mit $2,2$ HU/Wo zwar positiv, aber nicht signifikant verschieden ($p=0,24$). Es konnte also in dieser Studie kein Unterschied im Wachstum zwischen den beiden Seiten festgestellt werden (Abb. 32, Tab. 5).

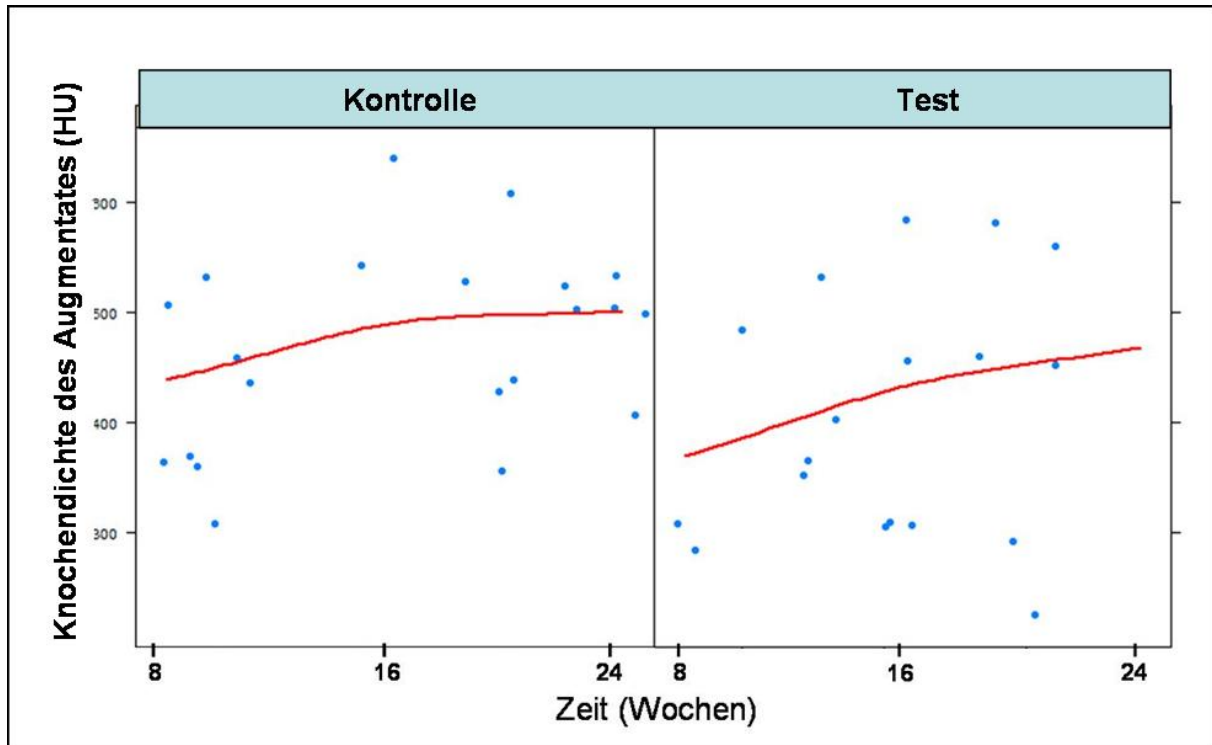


Abb. 33

Augmentatdichte: kontroll- und testseitig bei den Tieren der Studie

Die Messpunkte wurden zur besseren Darstellung auf einen „Jitter“ verteilt.

Tab. 6 Statistische Werte: Augmentatdichte (HU) Test-, Kontrollseite

	Wert (HU)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in HU	455,2	45,8	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in HU	-67,5	19,7	0,001
Steigung Test (HU /Wo)	3,8	4,4 HU/Wo	0,41
Diff. Steigung Test- und Kontrolle (HU/Wo)	2,0	1,9 HU/Wo	0,30

Testseitig zeigte sich eine signifikant geringere Dichte 8 Wo nach Implantation des Augmentats ($455,2 - 67,5 = 387,7$ HU), ($p = 0,001$). Die in Abb. 33 sichtbare Zunahme der Dichte testseitig (3,8 HU/Wo) konnte nicht als signifikant bestätigt werden ($p = 0,41$). Die Zunahme der Dichte über die Zeit (2,0 HU/Wo) unterschied sich nicht zwischen den Seiten ($p = 0,30$), (Abb. 33, Tab. 6).

Vitalitäts- und Osteogenitätsnachweis

Mit der Trypanblaufärbung wurde die Vitalität der Osteoblasten in Zellkultur geprüft. Berücksichtigt wurden nur nicht angefärbte Zellen. Blau war ein Indiz einer defekten Zellmembran und damit einer nicht lebensfähigen Zelle. Die übrigen Zellen wurden nach Auszählung in einer Zellkonzentration von 1×10^7 vitale Zellen/ml resuspendiert. 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden auf das Kollagen-HA Konstrukt gebracht. Zur Überprüfung, dass tatsächlich osteogene Zellen transplantiert wurden, wurden Kalzium, Kollagen Typ I und alkalische Phosphatase in der Zellkultur nachgewiesen.

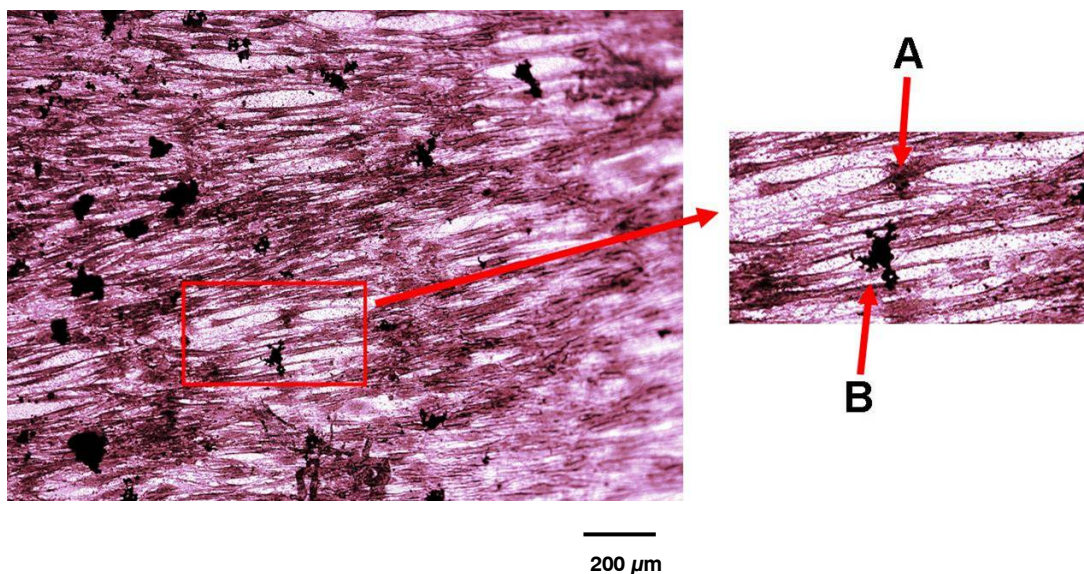


Abb. 34

Lichtmikroskopische Aufnahme von kultivierten Osteoblasten (A). In der van Kossa Färbung wird die von den Zellen produzierte, kalziumhaltige Matrix (B) schwarz markiert. (Übersicht in 60-facher Vergrößerung, Detailaufnahme in 120-facher Vergrößerung)

Mit der Van Kossa Färbung wurde die Fähigkeit der Zellen zur Kalziumbindung in den Kulturen bestätigt. Die Färbung war positiv, falls mikroskopisch (Axioskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) tiefschwarz gefärbte, kalziumhaltige Partikel zu sehen waren. Das Ergebnis wurde qualitativ und nicht quantitativ ausgewertet (Abb. 34).

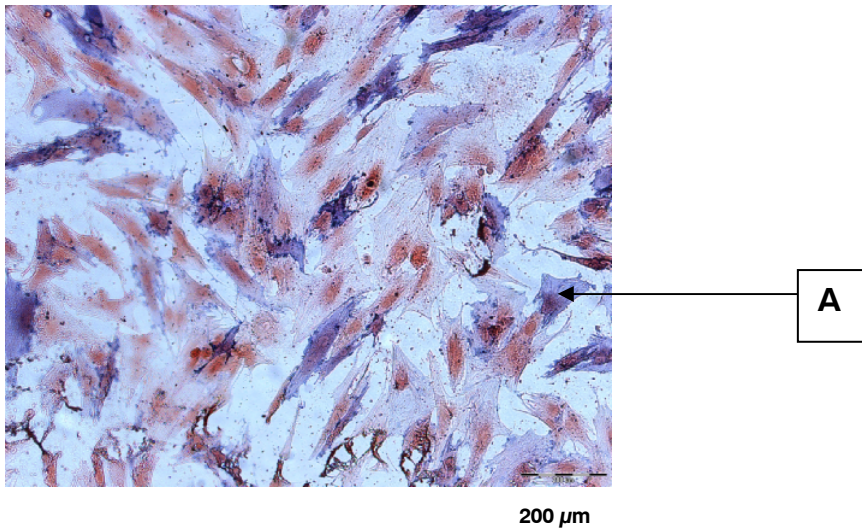


Abb. 35

Lichtmikroskopische Aufnahme kultivierter Osteoblasten (Vergrößerung 60-fach), (ALP-Färbung). Die Zellen, die alkalische Phosphatase exprimieren, sind blau gefärbt (**A**).

Die alkalische Phosphatase wurde in der Osteoblastenkultur direkt mit einer immunhistochemischen Färbemethode nachgewiesen. Das blaugefärbte Zytoplasma war der positive Nachweis, da es mit der ALP-Aktivität der jeweiligen Zellen korreliert. Rötlich angefärbte Zellen waren ALP-inaktiv (Abb. 35).

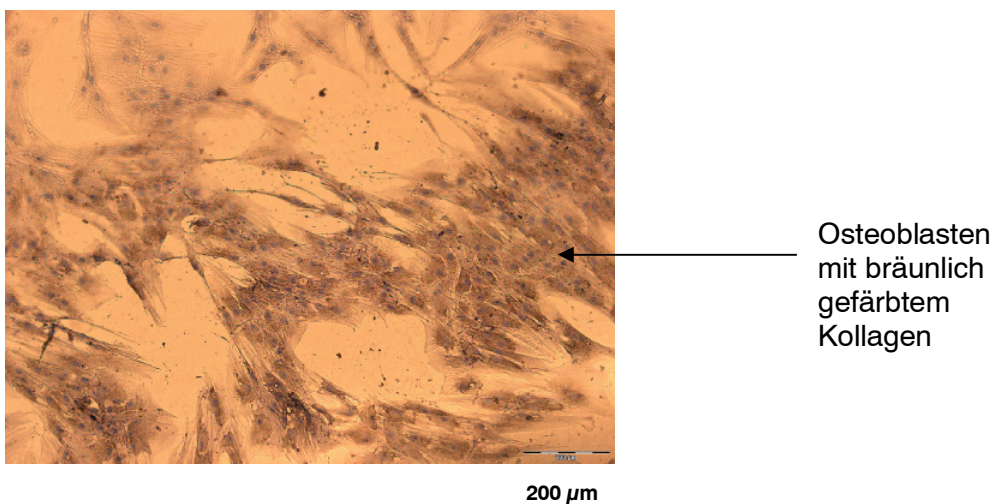


Abb. 36

Lichtmikroskopische Aufnahme: Kultivierte Osteoblasten (Vergrößerung 60-fach) mit positivem Kollagen Typ I Test

Kollagen Typ I wurde in der Osteoblastenzellkultur immunhistochemisch nachgewiesen (bräunliche Färbung), (Abb. 36). In allen Kulturen konnten Kalzifikation, ALP-Aktivität und Kollagen Typ I nachgewiesen werden.

4.4 Histologie

Es wurden insgesamt 18 Implantatpräparate ausgewertet. Rechtsseitig waren Kollagen-HA Konstrukte in Kombination mit autologen Osteoblasten implantiert worden und links Kollagen-HA Konstrukte ohne Zellen. Schon im Übersichtsbild ließ sich an den Implantaten eine direkte Knochenneubildung feststellen.

4.5 Morphometrische Analyse (Lichtmikroskopie)

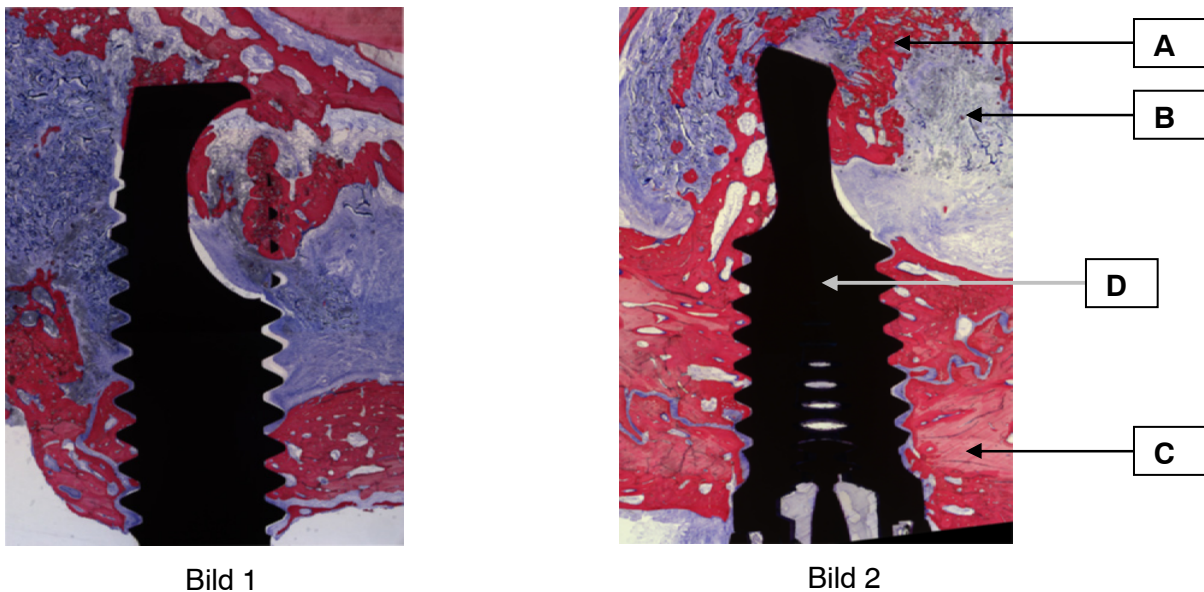


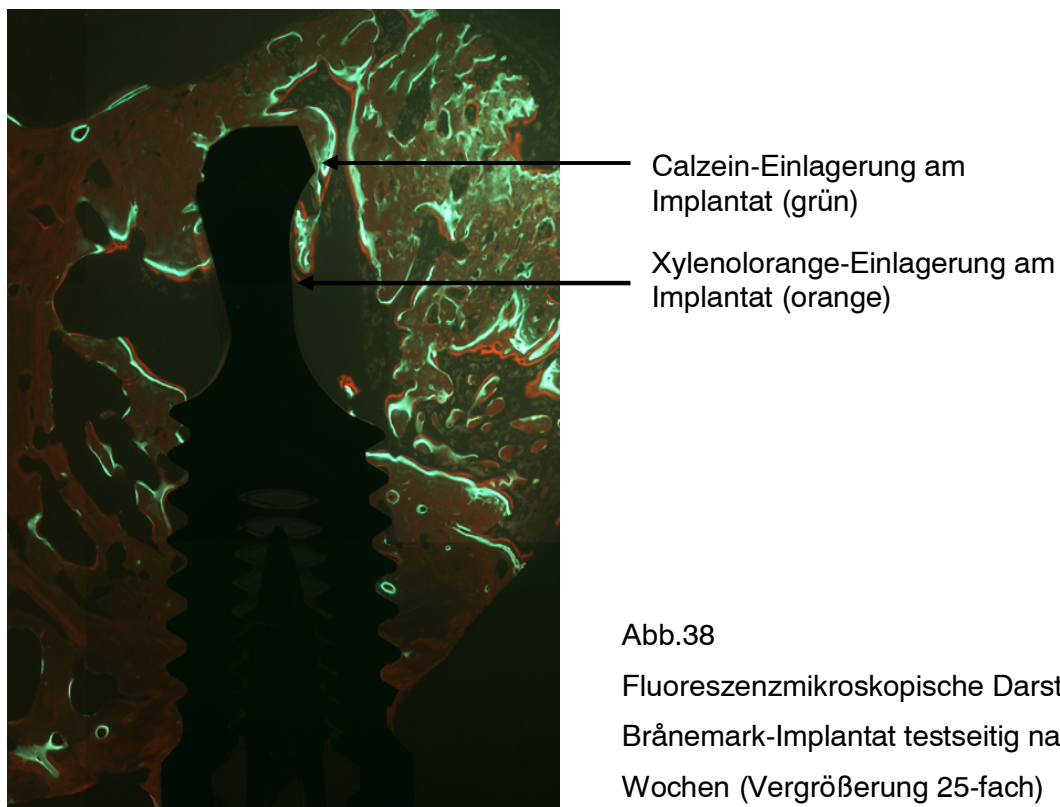
Abb. 37

Lichtmikroskopische Abbildungen der Testseite, Kollagen-HA Konstrukt mit Zellen (Bild 1) und der Kontrollseite, Kollagen-HA Konstrukt ohne Zellen (Bild 2), 16 Wochen nach Implantation
(Vergrößerung 25-fach)

Neu gebildeter Knochen (**A**) ausgehend von Kollagen-HA Konstrukt (**B**), ließ sich gut von originärem Knochen (**C**) differenzieren. Der originäre Kieferknochen war hellrosa gefärbt und wesentlich homogener als neu gebildeter Knochen. Das blaugefärbte Kollagenkonstrukt (**B**) war noch zu einem erheblichen Teil als Bindegewebe zu erkennen. Neu gebildeter Knochen (**A**) zeigte sich dunkler in der Färbung, als ortständiger Knochen (**C**). Durch anatomische Gegebenheiten der Kieferhöhle waren nicht alle Schnitte gleich mittig getroffen worden. Daher erschien das Bränemark-Implantat (**D**) teilweise variabel in der Form. Auch nach 8 und 24 Wochen glichen sich die Bilder. In der lichtmikroskopischen Darstellung war es nicht möglich, die Test- und Kontrollseite zu unterscheiden (Abb. 37).

4.6 Morphometrische Analyse (Fluoreszenzmikroskopie)

Der Knochenstoffwechsel ließ sich gut mit der Fluoreszenzmarkierung aufdecken. Ist der Farbstoff injiziert, wird er über 7 Tage in den Knochen eingebaut und markiert mit orangefarbenen und grünen Farbbändern neugebildeten Knochen. Dieser Zeitraum von 7 Tagen wurde mit einer 2. Injektion um weitere 7 Tagen verlängert. Die Farbbänder wurden vermessen und entsprachen der Knochenneubildung in einem Zeitraum von 2 mal 14 Tagen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Schema in Abb. 19. Die Länge der Farbbänder am Implantat wurden in % zur Gesamtlänge neu gebildeten Knochens am Implantat korreliert. Die Gesamtlänge des neugebildeten Knochens wurde in der lichtmikroskopischen Darstellung vermessen (Seite 33, Abb. 27) und die Länge von Calzein- und Xylenolorange-Einlagerungen in der fluoreszenzmikroskopisch Darstellung ausgewertet (Abb. 38).



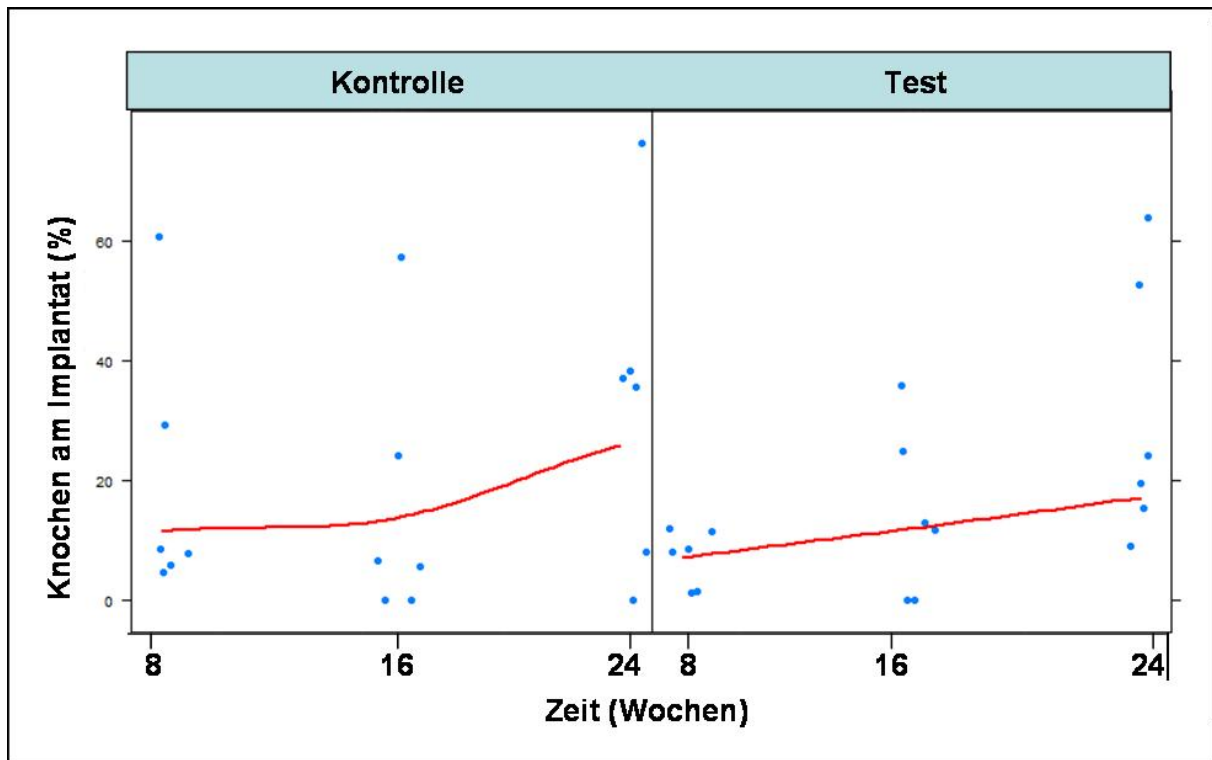


Abb. 39

Knochenneubildung an der Implantatoberfläche im Verlauf der Zeit

Die Messpunkte wurden zur besseren Darstellung auf einen „Jitter“ verteilt.

Tab. 7 Statistische Werte: Knochenneubildung an der Bränemark Implantatoberfläche (%)

	Wert (%)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in %	17,0	8,0	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in %	10,4	10,2	0,32
Steigung Test % Knochen/Wo	0,7	0,7 % pro Wo	0,33
Diff. Steigung Test- und Kontr. % Knochen/Wo	0,7	1,0 % pro Wo	0,51

Die Knochenneubildung unterschied sich nicht ($17,0 - 10,4 = 6,6$ %) zwischen den Seiten ($p=0,32$). Die Zunahme ($0,7$ % pro Woche) des neugebildeten Knochen testseitig war nicht signifikant ($p=0,33$) und unterschied sich nicht im Vergleich zu Kontrollseite ($p=0,51$), (Abb. 39, Tab. 7).

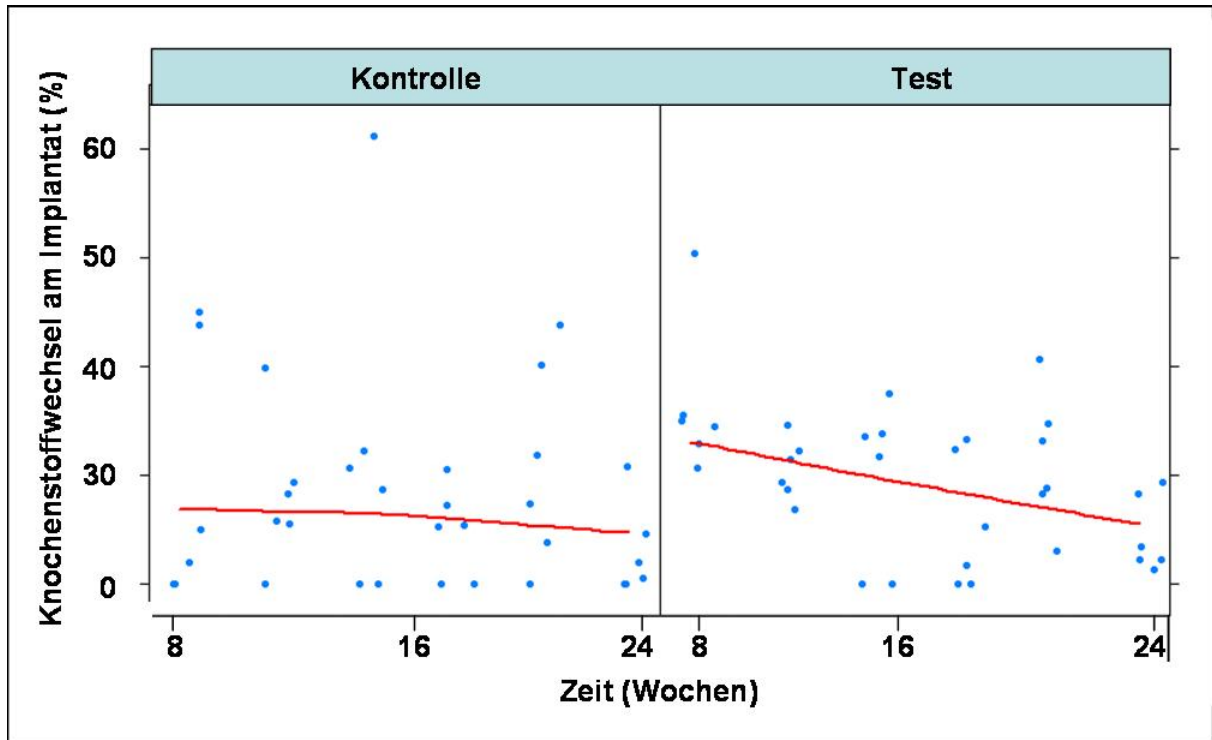


Abb. 40

Knochenstoffwechsel an der Oberfläche des Bränemark-Implantats im Verlauf der Zeit
 Die Messpunkte wurden zur besseren Darstellung auf einen „Jitter“ verteilt.

Tab. 8 Statistische Werte: Knochenstoffwechsel an der Bränemark Implantatoberfläche (%)

	Wert (%)	Standard Fehler	p-Wert
Wert bei 8 Wo, Kontrollseite in %	26,0	6,4	NA
Diff. Wert 8 Wo, Test- und Kontrolle in %	7,6	5,7	0,19
Steigung Test % Knochen/Wo	- 1,0	0,5	0,06
Diff. Steigung Test- und Kontr. % Knochen/Wo	- 0,4	0,5	0,34

Der test- und kontrollseitige Knochenstoffwechsel ($26,0 - 7,6 = 18,4$ %) unterschied sich nicht ($p=0,19$). Es lag ein Hinweis vor, dass der Knochenstoffwechsel im Verlauf der Zeit testseitig abnimmt (Steigung $-1,0$ %, $p=0,06$). Die Differenz der Abnahme zwischen den Seiten ($-1,0 - (-0,4) = -1,4$ % pro Woche) war nicht signifikant ($p=0,34$), (Abb. 40 Tab. 8).

5. Diskussion

5.1 Sinuslift und Implantate

Die Knochen des Schädeldachs, des Gesichtsschädels und die der Kiefer entstehen durch desmale Osteogenese. Sie sind Bindegewebsknochen mit großem Wachstumspotential, aber geringer mechanischer Festigkeit. Durch mechanische Beanspruchung wird der Knochen in stabileren Lamellenknochen umgebaut, während er unbelastet atrophieren kann (JUNQUEIRA I. C. et al., 1971), z.B. beim Menschen nach Zahnverlust in der Maxilla. Im zahnlosen Oberkiefer flacht der Alveolarfortsatz nicht nur ab, sondern die Kieferhöhle pneumatisiert im Alter zunehmend, so dass als Folge nicht selten ein ungenügend hoher, vertikaler Knochen resultiert. Deswegen wurde zum Knochenaufbau die Sinusbodenelevation entwickelt, um dentale Implantate sicher auch im atrophien Oberkiefer-Seitenzahnbereich zu verankern (SCHUH et al., 1984). Durch diese anerkannte und standardisierte Knochenaugmentation entsteht in der Mundhöhle kein zusätzliches Volumen. BOYNE und JAMES (1980) haben damit erstmals präimplantologisch das Knochenangebot im posterioren Oberkiefer-Seitenzahnbereich verbessert. Die Augmentation führten sie über ein laterales Knochenfenster durch. Als Material nutzten sie autologen, spongiösen Knochen. Das Verfahren wurde vielfach modifiziert. Inzwischen werden zahlreiche Knochenersatzmaterialien angeboten. Allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, alle Aspekte im Hinblick auf Verfahrenstechnik, Eingriff und Material optimal zu lösen (SCHIMMING und SCHMELZEISEN, 2004; HAK, 2007; LUNDGREN et al., 2004). In der vorliegenden experimentellen Studie wurde eine beidseitige Sinusbodenelevation vorgenommen. Testseitig wurde ein Konstrukt aus Kollagen-HA und autologen Osteoblasten implantiert. Kontrollseitig wurde ein Konstrukt aus Kollagen-HA ohne Zellen eingebracht. Simultan wurde jeweils zum rechts/links Vergleich, ein 10 mm langes TiUnite beschichtetes Implantat plziert. Bisher sind poröse, biokompatible Metallbeschichtungen eingesetzt worden, damit Implantate besser in das Hartgewebe integriert werden konnten (BOBYN et al., 1980; COOK et al., 1985). Mitte der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde festgestellt, dass manche poröse Metallbeschichtungen wie Titan, Cobalt-Chrom und Tantal dem Implantat besondere osteokonduktive Eigenschaften verleihen, da sie dem porösen Trabekelwerk des Knochens ähneln (BOBYN et al., 1999; 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals *in vivo* ein mit SFF (solid freeform fabrication) hergestelltes Kollagen-HA Konstrukt auf seine Eignung für die Kieferknochenaugmentation geprüft. Da der Implantatkontakt zum Knochengewebe eine entscheidende Rolle spielt, wurden Knochenneubildung und Knochenstoffwechsel in verschiedenen Zeiträumen an der Implantatoberfläche histologisch und histomorphometrisch untersucht. Zusätzlich wurden computertomographisch (CT) Volumen und Dichte des Augmentats gemessen.

5.2 Tiermodell

Um Informationen einer *in vivo* Studie vom Tiermodell auf den Menschen übertragen zu können, ist es wichtig, dass die morphologischen und physiologischen Gegebenheiten übereinstimmen. Das Schaf hat sich als Versuchstier vielfach zur Klärung verschiedener osteosynthetischer und distraktiver Fragestellungen bewährt (SUURONEN et al., 1992; SÖDERHOLM et al., 1991; MCTAVISH et al., 2000). Es wurde auch schon bei Fragestellungen des Sinuslifts verwendet (HAAS et al., 1998; 2002a, b, 2003). Vorteilhaft ist auch nach BRILL et al. (1987), ein landwirtschaftliches Nutztier zu nutzen, da die Haltung, insbesondere die des Schafes, unproblematisch ist. Schafe lassen sich in homogenen, vergleichbaren Gruppen genetisch verwandter Individuen gleichen Alters, Gewichts und Größe zusammenstellen, so dass standardisierte Versuchsgrundlagen geschaffen sind. Das Schaf weist zudem eine dem Menschen vergleichbare Kieferhöhlengröße auf. Es ist bekannt, dass die Osteoinduktivität eines Transplantats mit zunehmender Größe des Versuchstiers abnimmt (ASPENBERG et al., 1992). Bei Nagetieren ist die Regenerationsfähigkeit des Knochens deutlich höher als beim Menschen und nur unter großem Vorbehalt übertragbar (WISSING et al., 1990; KEYDEL, 2002). Auch Minischweine weisen einen mehr als doppelt so hohen Knochenmetabolismus auf als Menschen (HÖNIG und MERTEN, 1993). Bei Schaf und Hund dagegen ist die Regenerationsrate des Knochens nur geringfügig höher als beim Menschen. (STÜRMER und SCHUCHARDT, 1980). Die Kieferhöhle eines ausgewachsenen Schafes hat ein Volumen, das in etwa ein so großes Augmentat aufnehmen kann, wie es beim Menschen notwendig ist, um den Kieferhöhlenboden für die Implantatinsertion anzuheben. Schafsknochen ist in seiner Größe, Struktur und Regenerationsfähigkeit mit humanem Knochen vergleichbar (THIELEMANN et al., 1984).

In differenzierten spektroskopischen Knochenanalysen erwiesen sich die Knochenstrukturen im mikromorphologischen Aufbau von Schaf und Mensch als vergleichbar (REHMAN et al., 1995). Insbesondere konnte aus den Regenerationsvorgängen beim Schaf auf die beim Menschen rückgeschlossen werden (WISSING et al., 1990), so dass handelsübliche dentale Implantate der Humanmedizin auch beim Schaf eingesetzt werden können. In der vorliegenden Studie wurden die Implantate nicht in den zahntragenden Abschnitt der Maxilla, sondern lateral in die Wand des Sinus maxillaris inseriert, wie auch schon von HAAS et al., (1998; 2002a; b; 2003) beschrieben. Entscheidende Vorteile dieses Vorgehens sind nach HAAS, dass die Implantate keinen Kontakt zur Mundhöhle haben und keiner Kaubelastung ausgesetzt sind. Da für die Tiere gleiche Ausgangsbedingungen bestehen, werden zudem interindividuelle Faktoren vermieden. Den Tieren müssen zuvor keine Zähne extrahiert werden. Schafe sind Wiederkäuer, ihre Zähne unterscheiden sich erheblich von denen des Menschen. Eine Extraktion der Zähne vor dem Versuch würde eine zweite belastende Inhalationsnarkose erfordern und die tägliche Nahrungsaufnahme, wegen der intraoralen Knochenwunden einschränken. Zudem würde ein derartiges nicht exakt planbares Knochentrauma ganz eigene Defekte setzen und eine individuelle Charakteristik der Knochenregeneration von Tier zu Tier provozieren. Die Testvariable, Kollagen-HA Konstrukt, wäre nicht mehr objektiv zu bewerten. In anderen Studien wiesen Implantate, die einer adäquaten mechanischen Belastung ausgesetzt waren, einen höheren Knochen-Implantatkontakt auf als funktionell nicht belastete Implantate (QUINONES et al., 1997).

5.3 Statistische Auswertung

Die Daten des Knochenwachstums wurden statistisch im Mixed-Model ausgewertet. Dabei wird das Wachstum nicht zwischen zwei Zeitpunkten (z.B. 8 gegen 16, 16 gegen 24 Wochen usw.) verglichen. Im Mixed-Model wird aus den gesamten Einzeldaten die Steigung einer linearen Anpassung bestimmt (DAWES und CORRIGAN, 1974). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Daten von mehreren Schafen ausgewertet wurden, bei jedem Schaf aber mehrere Messpunkte vorliegen („Messwiederholungen“). Da die Tiere aber erst nach Tötung histologisch untersucht werden konnten, also kein Zeitverlauf bei einem Tier gemessen wurde, sind zusätzlich Vergleiche zwischen den Tieren erforderlich („between subject“). Eine solche Mischung zwischen „within“ und „between“, in der Kombination aus einer kontinuierlichen Variablen „Zeit“ und einem zweistufigen Faktor „Treatment“, wurde mit einem Mixed-Model statistisch untersucht (Software: package *nlme*, PINHEIRO und BATES, 2000).

Die Steigung, als „% neugebildete Knochen pro Woche“, ist der kritische Parameter. Dieser Parameter gibt das für diese Studie wichtigste Ergebnis wieder: es ist die Differenz zwischen der Steigung der Testgruppe zur Kontrollgruppe, also ein Maß für den Unterschied im Wachstum durch die Behandlung. Im Mixed-Model wird berücksichtigt, dass je zwei Messungen bei zehn Schafen etwas Anderes sind, als zehn Messungen bei zwei Schafen. Diese statistische Auswertungsmethode ermöglicht, auch Resultate, die aus kleineren Tierversuchsgruppen gewonnen wurden, statistisch darzustellen.

5.4 Autologe Zellen und Osteogenitätsnachweis

Die Nachweise von Kalziumsalzen (Van Kossa Test), ALP-Aktivität und die Produktion von Kollagen Typ I, sind gut etablierte Testparameter (ITTHICHAISRI et al., 2006). Osteoblasten synthetisieren insbesondere die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz (Osteoid), v.a. mit Kollagen Typ I, Osteokalzein, Proteoglykane und zeigen Enzymaktivität von alkalischer Phosphatase (ALP). ALP und Kollagen Typ I sind frühe Merkmale der Differenzierung der Osteoblasten. Es lassen sich drei Subtypen der ALP differenzieren: der Leber-Knochen-Nieren Typ, der intestinale und der plazentare Typ. ALP kommt sowohl zellmembrangebunden in Zellen mit hoher sekretorischer Aktivität als auch als mikrosomales ungebundenes Enzym vor (AHN et al., 1998). Knochenspezifische ALP wird von Osteoblasten und in geringerem Maße auch von Chondrozyten und Fibroblasten gebildet. Auch wenn ALP kein spezifischer Marker für Osteoblasten ist, weist eine steigende ALP-Aktivität auf einen progressiven Differenzierungsgrad hin. Die ALP-Aktivität der Osteoblasten ist abhängig vom Zellzyklus und der Differenzierungsphase. Maximale Werte werden in der S-Phase und während der Proliferationsphase erreicht (OWEN et al., 1990). ALP spielt zudem wohl eine entscheidende Rolle die Matrixmineralisierung zu initiieren. Hat die Mineralisierung begonnen, wird die Expression des Enzyms herunterreguliert (ROBEY und TERMINE, 1985, LEUNG et al., 1993, KASPERK et al., 1995; PITTENGER et al., 1999). Dazu ist der Nachweis von ALP histologisch über die Naphthol/Diazoniumsalz Färbungen entscheidend (KASPERK et al., 1995; PITTENGER et al., 1999). Es wird nicht das Protein direkt, sondern lediglich seine Enzymaktivität nachgewiesen.

Enzymaktivitätsmessungen sind vorteilhaft, weil sie hochspezifisch sind, auch wenn die Quantität des Proteins nicht exakt bestimmt wird. ALP oder TNS-ALP („tissue non specific alkaline phosphatase“) werden aber auch von Zelltypen außerhalb der osteoblastären Linie gebildet (HARRIS, 1990). Die Konzentration an ALP stellt einen sensitiven und verlässlichen Marker der Osteoblastenaktivität, und damit der Knochenneubildung dar (LEUNG et al., 1993). Die in diesem Versuch verwendeten Zellen waren positiv für den ALP-Test.

Im Knochen kommt vorwiegend Kollagen Typ I vor, während z.B. Knorpel vorwiegend Kollagen Typ II enthält. Die Bildung von Kollagen Typ I ist ein klassisches Charakteristikum der Osteoblasten (AUBIN et al., 1995). Kollagen Typ I ist mit 90 % der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knochengewebes und ist für den Mineralisationsprozess entscheidend (ANSELME, 2000). Als Nachweismethode für Kollagen Typ I wurde mit der Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) ein Verfahren gewählt, bei dem ein Komplex von Primärantikörper, Avidin, Biotin und Peroxidase an biotinylierte Sekundärantikörper bindet. Dieser Komplex setzt den Farbstoff Diaminobenzidin als Substrat um; dabei fällt ein farbiger Niederschlag aus. Die ABC-Nachweismethode ist gegenüber anderen Nachweissystemen sehr sensitiv, da zwischen Avidin und Biotin eine sehr hohe Bindungsaffinität herrscht (HSU und RAINE, 1981). Zudem wird eine hohe Spezifität durch verschiedene Schritte innerhalb der Nachweisreaktion erreicht. Hierzu zählen die Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern, ABC-Komplexbildung und die Komplexbindung an den Sekundärantikörper. Dadurch werden auch sehr schwache Immunreaktionen erkennbar. Nachteilig ist, dass keine Korrelation zwischen der Intensität der Immunreaktion und dem tatsächlich vorhandenen Antigen herzustellen ist und folglich nur bedingt quantitative Aussagen getroffen werden können. Die Auswertung der Immunreaktion ist mit der ABC-Methode technisch sehr einfach und setzt neben dem Mikroskop keine weiteren Geräte voraus. In dieser Arbeit konnte, wie methodisch zuvor beschrieben, Kollagen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Die mineralisierte Matrix besteht zum Großteil aus Kalziumsalzen. Kalzium und Phosphor sind Hauptbestandteile des anorganischen Teils der Knochenmatrix, die von Osteoblasten produziert wird. Der mineralische Teil der Knochenmatrix trägt zur Festigkeit und Stabilität des Knochengewebes bei (JUNQUEIRA et al., 1971). Mit der positiven Van Kossa Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen Kalziummatrix produzieren. Durch die simultane Detektion von Kalzium, ALP und Kollagen Typ I kann davon ausgegangen werden, dass funktionstüchtige Osteoblasten transplantiert wurden.

5.5 Kollagen

Kollagen ist für die Knochenregeneration aus mehreren Gründen ein interessantes Material. Es gehört zu den am besten untersuchten Biomaterialien. Die Mikrofibrille ist eine Triple-Helix, 300 nm lang und mit einem Durchmesser von 1,5 nm. Sie besteht zu 33 % aus der Aminosäure Glycin, zu 12 % aus Prolin und zu 10 % aus Hydroxyprolin und bildet den kleinsten Komponenten einer Kollagenfaser (JUNQUEIRA et al. 1971). Kollagen ist ein Faserprotein, das aus verbundenen Einzelfäden mit hoher Zugfestigkeit besteht (DOUGLAS T et al., 2007). Kollagene Fasern sind u.a. für die Strukturelastizität im kristallinen Knochenaufbau verantwortlich. 98 % des physiologischen Knochens bestehen aus einer Kombination von Hydroxylapatit (HA) mit Kollagen. Kollagen ist hoch dynamisch und verändert sich kontinuierlich in der Form, um eine entsprechende physiologische Funktion aufrecht zu erhalten (ASZÓDI et al. 2006). Bisher wurden 28 Kollagentypen identifiziert; I, II, III und V sind Haupttypen, die in Knochen, Knorpel, Sehnen, Haut und Muskel vorkommen. Knochengewebe besteht aus einem Netzwerk, vor allem aus Kollagen Typ I und einem geringen Teil Typ V mit integrierten Hydroxylapatit-Kristallen in Nanogröße (LIAN CEN et al. 2008). Trotz bekannter und befürchteter Kontaminierungen (BSE) und möglicher allergischer Reaktionen beim Einsatz von tierischem Kollagen, überwiegen die Vorteile gegenüber rekombinantem Kollagen wegen dessen fehlender posttranslationaler Modifizierung (KOIDE, 2007). Kollagen wird seit Jahren chirurgisch als Nahtmaterial, zur Wundabdeckung und als Hämostyptikum eingesetzt. In Deutschland sind nur wenige Knochenersatzmaterialien mit Kollagen (DENTAL VADEMECUM, 2008) zugelassen. Eine Kombination mit autologen Osteoblasten ist nicht darunter.

In der Zahnmedizin werden Membranen aus Kollagen eingesetzt, um andere Knochenaugmentationsmaterialien im Rahmen der „guided bone regeneration“ (GBR) abzudecken (DENTAL VADEMECUM, 2008). „Guided bone regeneration“ (GBR) bedeutet, dass Fibroblasten von einer Barriere abgehalten werden, in Knochenersatzmaterial einzuwachsen, bevor langsamer proliferierende Knochenzellen in den Raum vorgedrungen sind. Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten ergaben, dass nach Implantation von kollagenen Membranen aus gereinigtem Kollagen keine inflammatorischen Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) am Implantationsort akkumulierten, d.h. es wurde keine unerwünschte zelluläre Reaktion hervorgerufen. Außerdem war keine erhöhte Antikörperproduktion im Serum der Tiere nachzuweisen und somit keine Antigenität (PATINO et al., 2003).

Eine Verwendung von Kollagen als Gerüstträger oder sogenanntes „Scaffold“ ist naheliegend, da es eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix ist. Die Oberfläche von Kollagen fördert Zelladhäsion und Chemotaxis besser als synthetische Polymere (POSTLEHTWAITE et al., 1978; KLEINMAN et al., 1981). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die im Schrifttum nachgewiesene Biokompatibilität von Kollagen. Es zeigte sich eine gute Integration des Materials, allerdings bei hohem Volumenverlust. RAMMELT et al. (2004) wiesen nach, dass ein Knochendefekt in der Tibia bei Ratten mit Kollagen-HA Material erfolgreich repariert werden konnte. Damit wurden weit bessere Ergebnisse erzielt, als mit einem reinen HA Material. Sie zeigten, dass mit Implantaten (2 mm Durchmesser und 6 mm Höhe), die proximal in die Tibia bei Ratten implantiert wurden, schon nach 2 Tagen osteoblastäre Zellen eingewachsen waren. Damit wiesen sie die osteokonduktiven Eigenschaften des Kollagen nach. SCHNEIDERS et al. (2008) setzten HA-verstärktes Kollagen beim Schaf mit großen Knochendefekten an der Tibia ein. Die Knochenneubildung war signifikant besser, wenn den Kollagen-HA Konstrukten Chondroitinsulfat zugesetzt wurde. Die mangelnde Stabilität des Kollagen-HA Konstrukts wurde mit einem Tibianagel ausgeglichen. LAFLAMME (2008) konnte das Osteoblastenwachstum und die Knochenmatrixproduktion durch Zusatz von BMP-2 und BMP-7 stimulieren. Die Kombination von Kollagen-HA mit Wachstumsfaktoren und Stammzellen ist demnach ein viel versprechender Ansatz der aktuellen Forschung.

5.6 Tissue Engineering

Autologer Knochen ist nach wie vor das Material der Wahl, um Knochen aufzubauen (TONG et al., 1998). Zur Elevation des Kieferhöhlenbodens sind meist große Volumina autologen Knochens erforderlich, die aus dem Beckenkamm genommen werden. Die Morbidität bei der Transplantatentnahme ist nicht unerheblich (YOUNGER und CHAPMAN, 1989), deshalb wird intensiv nach alternativen Methoden der Knochenaugmentation gesucht. Die Vorteile des autologen Knochentransplantats sollten nun genutzt werden, dabei sollten die Nachteile der Transplantatentnahme umgangen werden, wie dies mit „Tissue Engineering“ (1987 von der US-amerikanischen National Science Foundation in Washington DC definiert) erreicht werden könnte. „Im Tissue Engineering werden Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkungen von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes, sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, zum Erhalt oder zur Verbesserung der Gewebefunktionen angewandt“. Bei der Geweberegeneration mit Methoden des Tissue Engineering wird durch Kombination von Biomaterialien mit Wachstumsfaktoren und/oder autologen Zellen eine funktionelle Rekonstruktion von verloren gegangenem Gewebe versucht. Seit Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts ist die Entwicklung von dreidimensionalen (3D) Konstrukten weiter vorangetrieben worden, um Zellproliferation und Migration zu steuern (YANNAS, 2005). Kollagenkonstrukte haben positive osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften (NIEMEYER et al., 2003 und O'BRIAN et al., 2005). In einer klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Konstrukte aus Kollagenmatrix mit autologen Zellen, autologe Knochentransplantate ggf. ersetzen könnten (SPRINGER et al., 2006). Über einen Beobachtungszeitraum von sieben Jahren ließ sich nachweisen, dass Kollagenmatrixkonstrukte eine vergleichbar stabile Knochenbildung aufwiesen, wie autologe Knochentransplantate oder xenogene Knochenmatrix mit autologen Zellen, um eine vergleichbar stabile Verankerung der Implantate zu ermöglichen. Allerdings betrug die Anzüchtungszeit der Zellen sechs bis acht Monate. Entsprechend wurde die Forschung forciert (SPRINGER et al., 2006), Gewebe über Tissue Engineering Methoden schneller herzustellen. Dazu wurden die autologen Zellen oxygeniert und in Nährlösungen gebracht (IKADA, 2006). Besonders 3D-Konstrukte ab einer Größe von 1 cm³ sind eine große Herausforderung. Bei *in situ* Tissue Engineering konnte demonstriert werden, dass Gefäße bei entsprechender Architektur einwachsen können (IKADA, 2006). Ein Konstrukt mit einem konstant durchgehenden Porennetzwerk ermöglicht, dass Gefäße besser einwachsen und somit Zellen wahrscheinlicher überleben, als bei einer Schaumstruktur (HOLLISTER, 2005). Die Vaskularisierung ist wichtig, um die Gewebeneubildung anzuregen (FARIA, 2008). SCHWARZ et al. (2008) konnten dies in einer Studie an Beagle-Hunden bestätigen, in der sie Kollagen-HA Konstrukte mit Interstitialzellen aus humanen Herzkappen beimpften.

DREGER et al. (2006) vitalisierten in einer *in vitro* Studie ein mit SSF hergestelltes Kollagenkonstrukt mit interstitiellen Herzklappenzellen. Die Zellen waren nach 28 Tagen Kultur vital und hatten phenotypische Marker produziert. Um eine optimale Zelldichte in einem 3D-Konstrukt zu erhalten, ist eine große Fläche im Verhältnis zum Volumen erwünscht. Konstrukte mit Makro- und Mikroporen können die Wanderung von Zellen und den Transport von Nährstoffen in die Tiefe gewährleisten (SACHLOS et al. 2003). TAYLOR et al. (2005) wiesen nach, dass das Zellwachstum am besten in 1%-iger Kollagen-Konzentration verlief. 2%-ige und 5%-ige Kollagen-Konzentrationen waren weniger geeignet zur Konstruktherstellung. In Konstrukten mit einer Porengröße kleiner als 10 μm ist Zellwachstum nicht möglich. Eine Größe von 15-50 μm unterstützt eine fibrovaskuläre Besiedlung, 50-150 μm ermöglichen eine Knochenmatrixbildung. Bei einer Porengröße von über 150 μm kommt es zur Mineralisierung von Knochen (TURHANI et al., 2005). Rapid Prototyping Techniken, wie zum Beispiel SFF, erlauben, auch größere Konstrukte mit exakter innerer Architektur herzustellen (HOLLISTER, 2005). SACHLOS et al. (2006) haben ein Konstrukt mit einer konkreten inneren Architektur geschaffen, das perfundiert und vaskularisiert wird. In der vorliegenden Studie wurde ein 3,5 cm^3 großes Konstrukt mit interkonnektierenden Poren von einer Größe bis zu 800 μm , *in vivo* mit autologen Osteoblasten im Schafmodell getestet. Die Anzahl von 4×10^6 Zellen pro cm^3 entspricht der beschriebenen Menge, die von TURHANI et al., 2005; WIEDMANN-AL-AHMAD M. et al., 2002 verwendet worden ist. SPRINGER et al. (2006) fanden an Humanbiopsien, dass Kollagen-Konstrukte mit Periostzellen im Median 38 % Knochenneubildung nach sechs bis acht Monaten aufwiesen. Im Vergleich dazu hatte mineralische bovine Knochenmatrix (BioOss, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) mit Zellen im Median 32 %, ohne Zellen 25 % (Median) neu gebildeten Knochen. Die Werte bewegen sich in Bereichen, die in der vorliegenden Arbeit nach 24 Wochen gefunden wurden. Hier betrug die Knochenneubildung im Median von 21,8 % mit Zellen und 36,4 % ohne Zellen (Median). Im Gegensatz zu SPRINGER et al. (2006) konnte nach sechs Monaten kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Osteoblasten überleben wohl nur kurzzeitig. Um dies genau zu erforschen müssten die Zellen mit einem Marker gekennzeichnet werden, um ihre Vitalität *in vivo* zu bestimmen. TERROVITIS et al. (2006) markierten deswegen mesenchymale Stammzellen mit Eisenoxid und konnten diese im MRI (Magnet Resonanz Imaging), in einem dreidimensionalen Kollagen Konstrukt darstellen. Demnach ist das MRI bestens geeignet, um eine Zellmigration *in vivo* nachzuweisen. Die Eisenoxidpartikel verbleiben aber nach dem Zelltod ortsständig. Deswegen war dieses Vorgehen für den vorliegenden Versuch nicht geeignet. Vitalität und Quantität der autologen Osteoblasten wurden entsprechend durch mehrere andere Tests bewiesen.

Computertomographisch waren die angrenzende Knochenspongiosa und das transplantierte Konstrukt in der Testgruppe signifikant weniger dicht, als in der Kontrollgruppe ($p=0,03$ für die Spongiosadichte und, $p=0,001$ für die Konstruktichte). Es gab eine schwache Tendenz, dass das Volumen des Konstrukts testseitig größer als kontrollseitig war ($p=0,09$), aber über die Zeit einen größeren Volumenverlust gegenüber der Kontrolle aufwies ($p=0,09$). Somit unterschieden sich die zeitlichen Entwicklungen der augmentierten Volumina beider Gruppen. Daraus ließ sich schließen, dass Zellen vorhanden sein können. Bei der Transplantation wiesen die Konstrukte der Test- und Kontrollseite das gleiche Volumen auf. Das Volumen der Konstrukte nahm testseitig geringer als kontrollseitig ab. Die geringere Dichte und das größere Volumen könnten durch eine Auflockerung des Gewebes testseitig erklärt werden, ohne dass deren Ursache erklärbar ist. Zelltod und Zerfallsprodukte könnten diesen Prozess fördern. Histologisch konnten keine inflammatorischen Zellen gefunden werden. Die Vermessung der Kieferhöhlenvolumina ergab keine signifikanten Differenzen zwischen den Tieren sowie test- als kontrollseitig. In beiden Gruppen wurde eine Volumenreduzierung des Augmentats um 44% bis 83% im Vergleich zum Ausgangsvolumen gefunden. Der Zeitpunkt mit dem höchsten Ausmaß an Resorption des Konstrukts ließ sich nicht feststellen, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Volumina der Konstrukte in den verschiedenen Überlebensgruppen gemessen wurden. Wegen der relativ großen Volumenreduktion und der fraglichen Wirkung autologer Osteoblasten, muss der hohe Aufwand des Tissue Engineering mit Zellen, wie er in dieser Studie geprobt wurde, kritisch hinterfragt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen einer klinische Studie von ZIZELMANN et al. (2007). Allerdings konnten im Gegensatz zu ZIZELMANN et al. (2007) in der vorliegenden Studie keine klinisch unerwünschten Reaktionen nach Transplantation des Konstrukts weder mit noch ohne Zellen gesehen werden. Nach dieser Studie und aus dem Schrifttum ergibt sich die eindringliche Forderung nach einer erweiterten interdisziplinären Zusammenarbeit, insbesondere zwischen Chirurgen, Material-Wissenschaftlern, Biologen, Biochemikern und Histologen. Nur so kann in der regenerativen Medizin den Erwartungen der Patienten, einen funktionellen Gewebeersatz zu erhalten, entsprochen werden (IKADA, 2006).

6. Schlussfolgerung und Perspektiven

Kollagen-Hydroxylapatit ist ein osteokonduktives Material mit guter Biokompatibilität, aus dem mit der „Solid Freeform Fabrication“ Technik individuell gestaltete 3D-Konstrukte mit einer definierten Porengröße hergestellt werden können. Eine Beschleunigung der Knochenneubildung durch die Vitalisierung mit kultivierten autologen Osteoblasten konnte nicht festgestellt werden. Das Kollagen-HA Konstrukt wies keine ausreichende Volumensstabilität auf. Dadurch ist das Material nicht formstabil und in seiner jetzigen Zusammensetzung nicht geeignet, große Knochenaufbauten zu schaffen. Für den Sinuslift könnte das Material eine Alternative zu anderen Biomaterialien unter der Voraussetzung darstellen, dass die Restknochenhöhe über 4 mm liegt und dadurch simultan, primär stabile Implantate eingebracht werden können. Um die Wachstumsbedingungen für optimale Knochenneubildung zu ermöglichen, müssten weitere Faktoren berücksichtigt werden:

1. Optimale Kollagen-HA Konzentration im Konstrukt
2. Optimale Zellpassagen und Zellmenge der Osteoblasten
3. Zusatz von Wachstumsfaktoren *in vitro* und *in vivo*
4. Optimaler Zeitraum für *ex vitro* und *in vivo* Knochenneubildung

Durch seine positiven Eigenschaften ist Kollagen weiterhin ein interessantes und aktuelles Material für die regenerative Medizin.

7. Zusammenfassung

Knochenaufbauten im zahnlosen Oberkiefer sind eine der Hauptindikationen für Biomaterialien in der präprothetischen Chirurgie. Durch die zunehmende Alterung der Gesellschaft gewinnt dieses Problem an Relevanz. In der vorliegenden Arbeit ist in einer *in vivo* Studie zur Sinusbodenaugmentation am Schafmodell ein Biomaterial geprüft worden. Getestet wurde ein Konstrukt aus einer Kombination von Kollagen mit Hydroxylapatit und autologen Osteoblasten. Um einen intraindividuellen Vergleich zu ermöglichen, wurde ein Splitmouth-Model eingesetzt. Auf der Testseite wurde das Material mit autologen Osteoblasten besiedelt, die aus einer Knochenbiopsie in 6-8-wöchiger Zellkultur gezüchtet wurden. Als Kontrolle diente das Biomaterial ohne Zellen. Simultan wurden dentale Implantate eingebracht. Vitalfarbstoff-Markierungen erfolgten in den Zeiträumen 5-6 und 1-2 Wochen vor Euthanasie. Jeweils 3 der insgesamt 9 Tiere wurden nach 8, 16 und 24 Wochen euthanasiert. Mit der CT wurde das Volumen der Augmentate ermittelt und eine Volumenreduktion um bis zu 83 % des Ausgangsvolumens festgestellt. Die Augmentate und der angrenzende spongiöse Knochen wiesen auf der Testseite eine signifikant geringere Dichte auf, als auf der Kontrollseite. Die Knochenneubildung am Implantat und die Osseointegration wurden histomorphometrisch bestimmt. Eine bessere Osseointegration der Implantate konnte auch bei der Verwendung von Zellen nicht festgestellt werden. Ebenso fand keine Beschleunigung der Knochenneubildung durch die Vitalisierung mit kultivierten autologen Osteoblasten in klinisch relevantem Ausmaß statt. Das Material hat sich als biokompatibel, aber nicht als volumenstabil erwiesen, so dass es sich in seiner jetzigen Zusammensetzung nicht für große Knochenaufbauten empfiehlt. Wegen der unklaren Wirkung der autologen Osteoblasten muss hinterfragt werden, ob der erhöhte Aufwand des Tissue Engineering mit Zellen in dieser Form einen sinnvollen Ansatz darstellt. Für kleinere Augmentationen im Bereich primär-stabiler Implantate können Kollagenkonstrukte eine Alternative werden.

7. Summary

Collagen scaffolds with autologous cells for sinuslift in a sheep model

The augmentation of bone in the edentulous maxilla is one of the main indications for bio-materials in preprothetic surgery. This problem gains in importance because of the increasing age of society. This thesis describes an *in vivo* study for sinus floor bone augmentation in the sheep model. Bio-material made out of a combination from collagen and hydroxyapatite was tested. A split-mouth model was used to allow intra-individual comparison. On the test side, the material was seeded with autologous osteoblasts, cultured out of a bone biopsy in 6 to 8 weeks of cell culture. Bio-material without cells was used for control. Dental implants were inserted simultaneously. Over the period of week 5 to 6 and week 1 to 2 before euthanasia, vital dyes were applied to mark the newly formed bone. Out of the total of nine animals, three at a time were euthanized after 8, 16 and 24 weeks. The volume of augmented material was ascertained by means of CT-exposures. Subsequently the volume was reduced by up to 83 % of the volume on the outset. There was a significantly lower density in the augmented area and the adjacent cancellous bone on the test side compared to the control side. Osseointegration, new growth of bone on the implant, was defined histomorphometrically. Accelerated growth of new bone and an improved osseointegration of the implants by vitalisation with cultivated, autologous osteoblasts did not occur. The material has proven itself as biocompatible but not as stable in volume, so that it does not recommend itself for a larger augmentation of bone structures in its present composition. The effect of cultured osteoblast-like cells is questionable. For smaller augmentations in the area of primarily stable implants, collagen constructs may constitute an alternative.

8. Literatur

Abendroth, K. (1992):

Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation.
Aktuelle Aspekte der Osteologie, 3-9, Springer Verlag, Heidelberg.

Anh, D. J., H. P. Dimai, S. L. Hall, und J. R. Farley (1998):

Skeletal Alkaline Phosphatase is primarily released from Human Osteoblasts in an insoluble form, and the Net Release is inhibited by Calcium and Skeletal Growth Factors.
Calcif Tissue Int, 62: 332-340.

Anselme, K., M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Lost und P. Hardouin (2000):

Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness.
J Biomed Mater Res, 49: 155-166.

Aspenberg, P., E. Wang und K. G. Thorngren (1992):

Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not.
Acta Orthop Scand, 63(6): 619-622.

Aubin, J. E., F. Liu, L. Malaval und A. K. Gupta (1995):

Osteoblast and Chondroblast Differentiation.
Bone, 17(2): 77S-83S.

Aszódi, A., K. R. Legate, I. Nakchbandi und R. Fässler (2006):

What mouse mutants teach us about extracellular matrix function.
Annu Rev Cell Dev Biol, 22: 591-621.

Boyne, J. und R. A. James (1980):

Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone.
J Oral Surgery, 38: 313-316.

Bobyn, J. D., H. U. Cameron, R. M. Pillar und G. C. Weatherly (1980):

The optimum poresize for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone.
Clin Orthop Rel Res, 50: 263-270.

Bobyn, J. D., S. A. Hacking, J. J. Krygier, M. Tanzer und G. J. Stackpool (1999):
Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial.

J Bone Joint Surg Br, 81: 907-914.

Bobyn, J. D., A. D. Hanssen und R. A. Poggie (2004):

Clinical validation of a structural porous tantalum biomaterial for adult reconstruction.

J Bone Joint Surg Am, 86A: 123-129.

Brånemark, P. I., R. Adell, U. Breine, B. O. Hansson, J. Lindstrom und A. Ohlsson (1969):

Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies.

Scand J Plast Reconstr Surg, 3(2): 81-100.

Brill, DM., H. A. Fozzard, J. C. Makielski und J. A. Wasserstrom (1987):

Effect of prolonged depolarizations on twitch tension and intracellular sodium activity in Sheep cardiac Purkinje fibres.

J Physiol, 384: 355-375.

Cawood, J. I. und R. A. Howell (1988):

A classification of the edentulous jaws.

Int J Oral Maxillofac Surg, 17(4): 232-236.

Cen, L., W. Liu, L. Cui, W. Zhang und Y. Cao (2008):

Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications.

Pediatr Res, 63(5): 492-496.

Chapman, M. W., R. Buchholz und C. Cornell (1997):

Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphat graft material.

A randomized clinical trial.

J Bone J Surg Am, 79: 495-502.

Cook, S. D., A. J. Haddad und K. A. Walsh (1985):

Interface mechanics and bone growth into porous Co-Cr-Mo alloy implants.

Clin Orthop Rel Res, 193: 271-280.

Dagalakis, N., J. Flink, P. Stasikelis, J.F. Burke und I. V. Yannas (1980):

Design of an artificial skin. Part III: Control of pore structure.

Biomaterials, 14: 511-528.

Dawes, R. M. und B. Corrigan (1974):

Linear models in decision making.

University of Oregon and Oregon Research Institute Eugen, OR.

Psychol Bull, 81: 95-106.

Dental Vademecum, 2008

Deutscher Zahnärzte Verlag; Auflage: 9. Ausgabe.

**Douglas, T., S. Heinemann, C. Mietrach, U. Hempel, S. Bierbaum,
D. Schwarnweber und H. Worch et al. (2007):**

Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates A-C and their effect on osteoblast adhesion.

Biomacromolecules, 8(4): 1085-1092.

**Dreger, S. A., P. Thomas, E. Sachlos, A. H. Chester, J. T. Czernuszka,
M. T. Taylor und M. H. Yacoub (2006):**

Potential for synthesis and degradation of extracellular matrix proteins by valve interstitial cells seeded onto collagen scaffolds.

Tissue Eng, 12(9): 2533-2540.

**Faria, P. E., R. Okamoto, R. M. Bonilha-Neto, S. P. Xavier, A. C. Santos und
L. A. Salata (2008):**

Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodelling.

Clin Oral Implants Res, 19(4): 393-401.

Freed, L. E. und G. Vujnak-Novakovic (1998):

Culture of organized cell communities.

Adv Drug Deliver Rev, 33: 15-30.

Gutwald, R. (2005):

Neue Entwicklungen und Aspekte der Miniplattenosteosynthese, -
Oberflächenkonfiguration, Schraubendesign, Fixierungstechnik, BMP -
Habilitationsschrift, Albert Ludwig Universität, Freiburg.

Haas, R., K. Donath, M. Fodinger und G. Watzek (1998):

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

Clin Oral Implants Res, 9: 107-116.

Haas, R., M. Baron, K. Donath, W. Zechner und G. Watzek (2002,a):

Porous Hydroxyapatite for Grafting the Maxillary Sinus. A comparative Histomorphometric Study in Sheep.

Int J Oral Maxillofac Implants, 17: 337-346.

Haas, R., D. Haidvogel, K. Donath und G. Watzek (2002, b):

Freeze-dried homogenous and heterogenous bone for sinus augmentation in sheep Part I, Histological findings.

Clin Oral Implants Res, 13: 396-404.

Haas, R., M. Baron, W. Zechner und 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.

Hak, D. J. (2007):

The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma.

J Am Acad Orthop Surg, 15(9): 525-536.

Harris, H. (1990):

The human alkaline phosphatase: what we know and what we don't know.

Clin Chim Acta, 186: 133-150.

Hollister, S. J. (2005):

Porous scaffold design for tissue engineering.

Nature materials, 4: 518-524.

Holy, C. E., M. S. Shoichet und J. E. Davies (1997):

Bone marrow cell colonization of, and extracellular matrix expression on biodegradable polymers.

Cellmater, 7: 223-234.

Hönig, J. F. und H. A. Merten (1993):

The Göttingen mini pig as experimental animal in the human medical fundamental research.

Z Zahnärztl Implantol, 2: 237-243.

Hutmacher, D. W. (2001):

Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues: state of the art and future perspectives.

J Biomater Sci Polym, E12: 107-124.

Hsu, S. M. und L. Raine (1981):

Protein A, Avidin, and biotin in immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem, 29: 1349-1353.

Ikada, Y. (2006):

Challenges in tissue engineering.
J of Royal Society Interface, 3: 589-601.

Itthichaisri, C., M. Wiedmann-Al-Ahmad, U. Huebner, A. Al-Ahmad, R. Schoen, R. Schmelzeisen und N.C. Gellrich (2007):

Comparative in vitro study of the proliferation and growth of human osteoblast-like cells on various biomaterials.
J Biomed Mater Res A, 15:82(4): 777-787.

John, M. T., W. Micheelis und R. Biffar (2004):

Reference values in oral health-related quality of life for the abbreviated version of the Oral Health Impact Profile.
Schweiz Monatsschr Zahnmed, 114(8): 784-791.

Junqueira, I. C., J. Carneiro J. und J. A. Long (1971):

Basic Histology.
Kap 8: 140-165.

Karlsson, G., A. Teiwik, A. Lundstrom und N. Ravalid (1995):

Costs of periodontal and prosthodontic treatment and evaluation of oral health in patients after treatment of advanced periodontal disease.
Community Dent Oral Epidemiol, 23(3): 159-164.

Kasperk, C., J. Wergedal, D. Strong, J. Farley, K. Wangerin, H. Gropp, R. Ziegler und D. J. Baylink, (1995):

Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin.
J Clin Endocrinol Metab, 80: 2511-2517.

Keydel, M. V. (2002):

Untersuchungen zur Dynamik der Knochendefektheilung bei der Ratte am standardisierten Bohrlochdefekt in den Femurkondylen.
Dissertation, München

Kleinmann, H. K., R. J. Klebe und G. R. Martin (1981):

Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells.
J Cell Biol, 88: 473-485.

Koberg, W. (1985):

Unwanted late results following augmentative alveolar ridge-plasty of the mandible using autologous rib transplants.

Fortschr Kiefer Gesichtschir, 30: 41-46.

Koide, T. (2007):

Designed tripel-helical peptides as tools for collagen biochemistry and matrix engineering.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 362: 1281-1291.

Laflamme, C. und M. Rouabhia (2008):

Effect of BMP-2 and BMP-7 homodimers and mixture of BMP-2/BMP-7 homodimers on osteoblast adhesion and growth following culture on a collagen scaffold.

Biomed Mater, 3(1): 15008.

Langer, R und J. P. Vacanti (1993):

Tissue Engineering.

Science, 260: 920-926.

Leung, K. S., K. P. Fung, A. H. L. Sher, C. K. Li und K. M. Lee (1993):

Plasma Bone-Specific Alkaline Phosphatase as an Indicator of Osteoblastic Activity.

J Bone Joint Surg, 75-B: 288-292.

Lundgren, S., S. Andesson, F. Gualini und L. Sennerby (2004):

Bone reformation with sinus membrane elevation, a new surgical technique for maxillary sinus floor augmentation.

Clin Implant Dent Relat Res, 6(3): 165-173.

Mark, D. E., J. O. Hollinger, C. Hastings, G. Chen, L. Marden und A. H. Reddi (1990):

Repair of calvaria nonunion by osteogenin, a bone-inductive protein.

Plast Reconstr Surg, 86: 623-630.

Marks, Jr. S. C. (1997):

The Structural Basis for Bone Cell Biology.

Acta Med Dent Helv, 2: 141-157.

Martin, I., R. F. Padera, G. Vujnak-Novakovic und L. E. Freed (1998):

In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues.

J Orthopaed Res, 16: 181-189.

McTavish, J., D. D. Marucci, S. F. Bonar, W. R. Walsh und M. D. Poole (2000):
Does the sheep mandible relapse following lengthening by distraction osteogenesis?
J Craniomaxillofac Surg, 28: 251-257.

Neugebauer, J., J. H. Oh, M. Scheer und A. C. Kübler (2003):
Wirkung von Knochenersatzmaterialien auf die Osteoblastenproliferation.
ZWR, 112(7): 311-318.

Niemeyer, P., U. Krause, M. Punzel, J. Fellenberg und H. G. Simank (2003):
Mesenchymal stem cells for tissue engineering of bone: 3D-cultivation and
differentiation on mineralized collagen.
Z Orthop Ihre Grenzgeb, 141: 712.

O'Brian, B. J., B. A. Harley, I. V. Yannas und L. I. Cihson (2005):
The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds.
Biomaterials, 26: 433.

**Owen, T. A., M. Aronow, V. Shalhoub, L. M. Barone, L. Wilming, M. S. Tassinari,
M. B. Kennedy, S. Pockwinse, J. B. Lian und G. S. Stein (1990):**
Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype In Vitro: Reciprocal
Relationships in Expression of Genes Associated With Osteoblast Proliferation and
Differentiation During Forming of the Bone Extracellular Matrix.
J Cell Physiol, 143: 420-430.

Patino, M. G., M. E. Neiders, S. Andreana, B. Noble und R. E. Cohen (2003):
Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes.
J Periodontal Res, 38(5): 458-464.

Pham, D. T. und S. S. Dimov (2000):
Rapid manufacturing: the technologies and applications of rapid prototyping and
rapid tooling.
London Springer, 19-42.

Pinheiro, J. M. und DM. Bates (2000):
Mixed models were estimated with package nlme under R: Mixed-effects models in S
and S-PLUS
Springer, New York.

**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 und D. R. Marshak D. R.
(1999):**
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science, 284: 143-147.

Postlethwaite, A. E., J. M. Seyer und A. H. Kang (1978):

Chemotactic attraction of human fibroblasts by Type I, II and III collagens and collagen derived peptides.

Proc Natl Acad Sci USA, 75: 871-875.

Quinones, C. R., M. B. Hurzeler, P. Schupbach, A. Kirsch, P. Blum, R. G. Caffesse und J. R. Strub (1997):

Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and osseointegrated dental implants in monkeys. Part II. Evaluation of porous hydroxyapatite as a grafting material.

Clin Oral Implants Res, 8(6): 487-496.

Quinones, C. R., M. B. Hurzeler, P. Schupbach, D. R. Arnold, J. R. Strub und R. G. Caffesse (1997):

Maxillary sinus augmentation using different grafting materials and dental implants in monkeys. Part IV. Evaluation of hydroxyapatite-coated implants.

Clin Oral Implants Res, 8(6): 497-505.

Rahn, B. A. und S. M. Perren (1970):

Calcein blue as a fluorescent label in bone.

Experientia, 26(5): 519-520.

Rahn, B. A. und S. M. Perren (1971):

Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues.

Stain Technol, 46(3): 125-129.

Rahn, B. (1976):

Die polychrome Sequenzmarkierung Intravitale Zeitmarkierung zur tierexperimentellen Analyse der Knochen- und Dentinbildung.

Habilitationsschrift, Albert Ludwig Universität Freiburg.

Rammelt, S., E. Schulze, M. Witt, E. Petsch, A. Biewener, W. Pompe und H. Zwipp (2004):

Collagen type I increases bone remodelling around hydroxyapatite implants in the rat tibia.

Cells Tissues Organs, 178(3): 146-157.

Rehman, I., R. Smith, L. L. Hench und 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.

Robey, P. G. und J. D. Termine (1985):

Human bone cells in vitro.
Calcif Tissue Int, 37(5): 453-460.

Rueger, J. M. (1998):

Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick.
Orthopäde, 27: 72-79.

Sachlos, E. und J. T. Czernuszka (2003):

Making tissue engineering scaffold work. Review on application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.
European Cells and Materials Vol, 5: 29-40.

Sachlos, E., N. Reis, C. Ainsley, B. Derby und J. T. Czernuszka (2003):

Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication.
Biomaterials, 24: 1487-1497.

Sachlos, E., D. Gotora und J. T. Czernuszka (2006):

Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain microchannels.
Tissue Eng, 12(9): 2479-2487.

Schilli, W. und G. Krekeler (1984):

Endosseous implants-an alternative to conventional preprosthetic surgery?
Schweiz Monatsschr Zahnmed, 94(8): 688-694.

Schimming, R., N. C. Gellrich und R. Schmelzeisen (2002):

Von der autologen Knochentransplantation bis zum Tissue Engineering.
ZBW, 8: 18-21.

Schimming, R. und R. Schmelzeisen (2004):

Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation.
J Oral Maxillofac Surg, 62(6): 724-729.

Schneiders, W., A. Reinstorf, A. Biewener, A. Serra, R. Grass, M. Kinscher, J. Heineck, S. Rehberg, H. Zwipp und S. Rammelt (2009):

In vivo Effects of modification of hydroxyapatite/collagen composites with and without chondroitin sulphate on bone remodelling in the sheep tibia.
J Orthop Res, 27(1): 15-21.

Schuh, E., R. Schmiedl und G. Vogel (1984):

Anatomic limits of endosseous dental implantation.
Z Stomatol, 81(2): 81-90.

Schwarz, F., D. Rothamel, M. Herten, M. Wüstenfeld, M. Sager, D. Ferrari und J. Becker (2008):

Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs.
Clin Oral Implants Res, 19(4): 402-415.

Similer, D. G., P. W. Johnson, L. Lozadaj, C. Misch, J. L. Rosenlicht, O. H. Jr. Tatum und J. R. Wagner (1992):

Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla.
Dent Clin North Am, 36: 151-187.

Sittinger, M., J. Bujia, N. Rotter, D. Reitzel, W. W. Minuth und R. Burmester (1996):

Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.
Biomaterials, 17: 237-242.

Springer, I. N., P. F. Nocini, K.A. Schlegel, D. De Santis, J. Park, P. H. Warnke, H. Terheyden, R. Zimmermann, K. Gardner, L. Chiarini, F. Ferrari und J. Wiltfang (2006):

Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: steps into clinical application.
Tissue Eng, 12(9): 2649-2656.

Söderholm, A.L., C. Lindqvist, K. Skutnabb und B.Rahn (1991):

Bridging of mandibular defects with two different reconstruction systems: an experimental study.
J Oral Maxillofac Surg, 49: 1098-1105.

Stürmer, K. M. und W. Schuchardt (1980):

Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle im Tierexperiment. I. Die Schafstibia als Tiermodell für die Marknagelung.
Unfallheilkunde, 83: 341-345.

Suuronen, R., T. Pohjonen, L. Wessman, P. Tormala und S. Vainionpaa (1992):

New generation biodegradable plate for fracture fixation: comparison of bending strengths of mandibular osteotomies fixed with absorbable self-reinforced multi-layer-poly-L-lactic plates and metallic plates- an experimental study in sheep.
Clinical Materials, 9(2): 77-84.

Taylor, P. M., E. Sachlos, S. A. Dreger, A. H. Chester, J. T. Czernuszka und M. H. Yacoub (2005):

Interaction of human valve interstitial cells with collagen matrices manufactured using rapid prototyping.

Biomaterials, 27: 2733-2737.

Terrovitis, J. V., J. W. Bulte, S. Sarvananthan, L. A. Crowe, P. Sarathchandra, P. Batten, E. Sachlos, A. H. Chester, J. T. Czernuszka, D. N. Firmin, P. M. Taylor und M. H. Yacoub (2006):

Magnetic resonance imaging of ferumoxide-labeled mesenchymal stem cells seeded on collagen scaffolds-relevance to tissue engineering.

Tissue Engineering, 12(10): 2765-2775.

Thielemann, F. W., A. M. Feller und K. Schmidt (1984):

Defect replacement with osteogenin containing gelatin.

Z Orthop Ihre Grenzgeb, 122(6): 843-847.

Tong, D. C., K. Rioux, M. Drangsholt und O. R. Beirne (1998):

A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis.

Int J Oral Maxillofac Implants, 13(2): 175-182.

Turhani, D., M. Weissenböck, E. Watzinger, K. Yerit, B. Cviki, R. Ewers und D. Thurnher (2005):

Invitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials.

Int J Oral Maxillofac Surg, 34(5): 543-550.

Wahl, D. A., E. Sachlos, C. Liu und J. T. Czernuszka (2007):

Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering.

J Mater Sci Mater Med, 18(2): 201-209.

Wiedmann-Al-Ahmad, M., R. Gutwald, G. Lauer, U. Hübner und R. Schmelzeisen (2002):

How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials.

Biomaterials, 23(16): 3319-3328.

Wissing, H., K. M. Stürmer und G. Breidenstein (1990):

Die Wertigkeit verschiedener Versuchsspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.

Hefte Unfallheilkd, 212: 479-488.

Yannas, I. V. (2005)

Facts and theories of induced organ regeneration.
Adv Biochem Eng Biotechnol, 93: 1-38.

Younger, E. M. und M. W. Chapman (1989).

Morbidity at bone graft donor sites.
J Orthop Trauma, 3(3): 192-195.

**Zizelmann, C., R. Schoen, M. C. Metzger, R. Schmelzeisen, A. Schramm,
B. Dott, K-H. Bohrmann und N. C. Gellrich (2007):**

Bone formation after sinus augmentation with engineered bone.
Clin Oral Impl Res, 18: 69-73.

Tabelle 9:

CT-Messwerte der 8-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU)

Messung 1-2-3	Probe Nr.	Schaf Nr.	Test=1 Kontr.=2	Zeit (Wo)	Dichte Spongiosa (HU)	Dichte Kompakta (HU)	Dichte Augmentat (HU)
1	1	1	2	8	395	740	363
2	1	1	2	8	564	1350	369
3	1	1	2	8	483	1047	360
1	2	2	2	8	418	1163	435
2	2	2	2	8	398	1021	308
3	2	2	2	8	405	1069	458
1	3	3	2	8	469	1033	542
2	3	3	2	8	402	1031	506
3	3	3	2	8	551	1037	532
1	1	1	1	8	440	1106	309
2	1	1	1	8	436	1003	307
3	1	1	1	8	430	1207	305
1	2	2	1	8	297	1038	365
2	2	2	1	8	402	962	283
3	2	2	1	8	353	1112	352
1	3	3	1	8	478	1082	483
2	3	3	1	8	371	831	532
3	3	3	1	8	418	1334	402

Tabelle 10:

CT-Messwerte der 16-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU)

Messung 1-2-3	Probe Nr.	Schaf Nr.	Test=1 Kontr.=2	Zeit (Wo)	Dichte Spongiosa (HU)	Dichte Kompakta (HU)	Dichte Augmentat (HU)
1	4	4	1	16	298	1008	560
2	4	4	1	16	348	1002	584
3	4	4	1	16	407	1013	581
1	5	5	1	16	408	1107	451
2	5	5	1	16	471	1060	459
3	5	5	1	16	539	957	455
1	6	6	1	16	445	1066	225
2	6	6	1	16	423	1168	306
3	6	6	1	16	403	1031	292
1	4	4	2	16	360	1150	503
2	4	4	2	16	398	1149	607
3	4	4	2	16	303	851	639
1	5	5	2	16	470	992	524
2	5	5	2	16	476	1124	528
3	5	5	2	16	473	1154	502
1	6	6	2	16	408	1119	355
2	6	6	2	16	469	1117	438
3	6	6	2	16	440	1115	427

Tabelle 11:

CT-Messwerte der 24-Wochen Gruppe: Spongiosa-, Kompakta- und Augmentatdichte in Hounsfield Unit (HU)

Messung 1-2-3	Probe Nr.	Schaf Nr.	Test=1 Kontr.=2	Zeit (Wo)	Dichte Spongiosa (HU)	Dichte Kompakta (HU)	Dichte Augmentat (HU)
1	7	7	1	24	435	1046	443
2	7	7	1	24	372	1004	440
3	7	7	1	24	305	1049	449
1	8	8	1	24	351	984	469
2	8	8	1	24	384	986	433
3	8	8	1	24	365	980	458
1	9	9	1	24	349	1001	401
2	9	9	1	24	373	1120	523
3	9	9	1	24	357	1091	562
1	7	7	2	24	394	848	522
2	7	7	2	24	292	1192	498
3	7	7	2	24	340	1147	533
1	8	8	2	24	373	934	406
2	8	8	2	24	369	930	402
3	8	8	2	24	380	939	404
1	9	9	2	24	415	894	512
2	9	9	2	24	428	1074	569
3	9	9	2	24	447	1016	581

Tabelle 12:

CT-Messwerte: Volumen der Kieferhöhle (V-Kh) und des Augmentats (V-Aug) (ml).

Zeit (Wo)	Test=1 Kontrolle= 2	V-Kh (ml)	V-Aug (ml)
8	1	25,74	1,02
8	1	15,62	1,97
8	1	16,79	1,73
8	2	20,07	0,89
8	2	14,97	1,25
8	2	18,48	1,05
16	1	13,66	1,6
16	1	22,18	0,6
16	1	21,27	1,09
16	2	14,25	1,44
16	2	22,65	0,99
16	2	19,72	1,41
24	1	13,01	1,13
24	1	20,38	1,37
24	1	15,65	1,12
24	2	11,22	1,41
24	2	18,46	1,05
24	2	15,93	1,42

Tabelle 13:

Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel angegeben in μm und berechnet in % von der Länge des Bränemark-Implantats im Kollagen-HA Konstrukt, in der 8 Wochen Gruppe.

Tier		Knochen Anlagerung	Länge von Implantat Im Konstrukt	Knochen	Calzein	Calzein	Xylenol.	Xylenol
		μm	μm	%	μm	%	μm	%
Tier Nr. 76	- Zellen	2039,76	23987,17	8,5	205,4	10,10	384,47	18,8
	- Zellen	1682,53	21704,81	7,8	69,77	4,10	280,40	16,7
	+ Zellen	1764,84	22038,62	8,0	377,25	21,40	516,91	29,3
	+ Zellen	2327,77	26971,76	8,6	721,58	31,00	531,04	22,8
Tier Nr.79	- Zellen	1091,20	22931,09	4,8	0,00	0,00	431,83	39,6
	- Zellen	1351,97	23287,34	5,8	0,00	0,00	0,00	0,0
	+ Zellen	366,52	22249,01	1,6	105,75	28,90	49,88	13,6
	+ Zellen	252,45	19851,62	1,3	65,52	25,90	44,11	17,5
Tier Nr.72	- Zellen	9328,69	15352,48	60,8	4436,10	47,60	1086,30	11,6
	- Zellen	5716,19	19564,73	29,2	2859,30	50,00	632,22	11,1
	+ Zellen	1440,21	11906,48	12,1	876,14	60,80	351,34	24,4
	+ Zellen	1872,75	16343,47	11,5	559,66	30,00	351,48	18,8

Tabelle 14:

Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel, angegeben in μm und berechnet in % von der Länge des Bränemark-Implantats im Kollagen-HA Konstrukt, in der 16 Wochen Gruppe.

Tier		Knochen- Anlagerung	Länge von Implantat im Konstrukt	Knochen	Calzein	Calzein	Xylenol.	Xylenol
		μm	μm	%	μm	%	μm	%
Tier Nr. 73	- Zellen	4287,46	17702,91	24,2	912,03	21,3	906,29	21,1
	- Zellen	9883,84	7224,80	57,4	1733,00	17,5	1447,90	14,6
	+ Zellen	5302,32	21283,80	24,9	1849,20	34,9	555,16	10,5
	+ Zellen	6800,53	18957,17	35,9	1600,80	23,5	236,10	3,5
Tier Nr.77	- Zellen	0	0	0	216,27		0	0
	- Zellen	0	0	0	0	0	0	0
	+ Zellen	0	0	0	0	0	0	0
	+ Zellen	0	0	0	0	0	0	0
Tier Nr.78	-Zellen	1906,70	34331,64	5,6	1567,00	82,2	204,51	10,7
	-Zellen	1900,12	28574,36	6,6	466,66	24,6	206,19	10,8
	+ Zellen	3093,90	26310,40	11,8	840,00	27,1	819,40	26,5
	+ Zellen	2457,50	18879,90	13,0	679,30	27,6	609,30	24,8

Tabelle 15:

Messwerte: Knochenneubildung und -stoffwechsel angegeben in μm und berechnet in % von der Länge des Bränemark-Implantats im Kollagen-HA Konstrukt, in der 24 Wochen Gruppe.

Tier		Knochen- Anlagerung	Länge von Implantat Im Konstrukt	Knochen	Calzein	Calzein	Xylenol.	Xylenol
		μm	μm	%	μm	%	μm	%
Tier Nr. 71	-Zellen	6139,13	16528,73	37,10	1447,30	23,6	563,62	9,2
	-Zellen	6128,19	16007,83	38,30	2468,50	40,3	1329,40	21,7
	+ Zellen	5110,07	26207,84	19,50	901,10	17,6	133,84	2,6
	+ Zellen	5885,34	24443,97	24,10	1552,80	26,4	968,92	16,5
Tier Nr. 74	-Zellen	0	20964,65	0	0	0	0	0
	-Zellen	1825,86	22504,90	8,10	866,49	47,5	0	0
	+ Zellen	12173,70	23046,61	52,80	2029,20	16,7	548,31	4,5
	+ Zellen	16091,60	25134,92	64,00	4767,40	29,6	748,74	4,6
Tier Nr. 75	-Zellen	14507,60	19009,00	76,30	1138,20	7,8	175,56	1,2
	-Zellen	19460,00	23075,52	35,70	2891,80	14,9	752,93	3,9
	+ Zellen	2928,97	19119,23	15,30	1208,00	41,2	547,23	18,7
	+ Zellen	2264,53	24627,86	9,20	137,46	6,1	157,45	7,0

Publikationen

1. Joujou-Sisic K., Granerus M., Wetterling H., Wikström K., Engström W., Jeffcott L.B., Schofield P. N. und Welin A. (1993):

Developmental regulation of insulin like growth factor II gene expression in the horse.
Cell Biology International, 17; 603-608.

2. Welin A., Joujou-Sisic K., Schofield P.N. und Engström W. (1993):

Developmental regulation of TGF Beta 1 gene expression in the horse.
Reproduction in Domestic Animals 28:207-209.

3. Joujou-Sisic K., Andren P., Bondesson U., Fredriksson E., Ingvast Larsson C., Kallings und Persson S.G.B. (1995):

A pharmacokinetic study of isoxsuprine in the horse.
Proceedings of the 11th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians
Queensland, Australien, 453-457.

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Herrn Professor Dr. Leo Brunberg, der die Doktorarbeit im Fachbereich vertreten und damit dafür Verantwortung für die Arbeit übernommen hat,

Herrn Professor Dr. Dr. Ralf Gutwald für die Überlassung des interessanten Themas, für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskriptes,

Herrn Professor Dr. Jörg Haberstroh für die Unterstützung, Motivation und für den jederzeit gewährten freundlichen und fachlichen Beistand bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit und für die souveräne medizinische Betreuung der Schafe,

Herrn Dr. Jens Kuschnierz, der diese Arbeit u.a. in der operativen Phase maßgeblich unterstützt hat,

Herrn Dr. Sebastian Sauerbier für die stets hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung, Textkorrektur und unermüdliche freundliche und kompetente Unterstützung,

Frau Anette Lindner möchte für die Hilfe bei der Fertigung histologischen Schliffpräparate, sie war immer freundlich und engagiert beim Fotografieren, Ausmessen und Auswerten der Präparate,

Frau Ute Hübner, die mir im Zelllabor beistand,

Herrn Studzienski und dem Tierpflegerpersonal im Landwasser für die liebevolle und artgerechte Betreuung der Tiere,

Frau Martina Golding für die Hilfe bei der Textverarbeitung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Gernot Pöpperl, der mich stets motivierte und unterstützte und in der Zeit meine Pferde gut versorgte.

Meiner Mutter Hedvig Sisic danke ich von Herzen für ihre liebevolle Unterstützung und Motivation.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Karina Pöpperl, die vorliegende Dissertation selbständig sowie, nur mit in dieser Arbeit aufgeführten Hilfsmitteln und Hilfen, verfasst zu haben.

Diese Arbeit wurde noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.

Freiburg den 12.08.2009

Karina Pöpperl