

Aus dem Institut/der Klinik für Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung zum Einfluß schnell resorbierbarer bioaktiver  
Knochenersatzmaterialien auf die osteoblastische  
Zelldifferenzierung in vivo

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Jonscher

aus Lutherstadt Wittenberg

Gutachter/in:     1. PD Dr. med.dent. Christine Knabe  
                          2. Prof. Dr. G. Gómez-Román  
                          3. PD Dr. Dr. M. Stiller

Datum der Disputation:     08.06.2010

Datum der Promotion:     03.09.2010

**Für Lenz**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	<b>Stand der Forschung auf dem Gebiet der alloplastischen Knochenersatzmaterialien (KEM)</b>	<b>5</b>
<b>1.3.</b>	<b>Ziele und methodischer Ansatz der Untersuchung schnell resorbierbarer Knochenersatzmaterialien</b>	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
<b>2.1.</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>9</b>
<b>2.2.</b>	<b>Versuchstiere und deren Haltung</b>	<b>9</b>
<b>2.3.</b>	<b>Operationstechniken und zeitliche Abläufe</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1.</b>	<b>Zahnextraktion und Defektschaffung</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2.</b>	<b>Implantation der KEM</b>	<b>13</b>
<b>2.3.3.</b>	<b>Probengewinnung</b>	<b>16</b>
<b>2.4.</b>	<b>Probenaufbereitung und Auswertung</b>	<b>16</b>
<b>2.4.1.</b>	<b>Lichtmikroskopie</b>	<b>16</b>
<b>2.4.2.</b>	<b>Immunhistologie</b>	<b>19</b>
<b>2.4.3.</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</b>	<b>21</b>
<b>2.4.4.</b>	<b>Histomorphometrie</b>	<b>22</b>
<b>2.4.5.</b>	<b>2.4.5. Statistische Auswertung</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>3.1.</b>	<b>Lichtmikroskopische Auswertung</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>nach 1 Woche Liegezeit</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>nach 4 Wochen Liegezeit</b>	<b>29</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>nach 12 Wochen Liegezeit</b>	<b>33</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>nach 24 Wochen Liegezeit</b>	<b>39</b>

<b>3.2.</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Ausgangspartikel</b>	<b>43</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>nach 1 Woche Liegezeit</b>	<b>46</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>nach 4 Wochen Liegezeit</b>	<b>50</b>
<b>3.2.4.</b>	<b>nach 12 Wochen Liegezeit</b>	<b>54</b>
<b>3.2.5.</b>	<b>nach 24 Wochen Liegezeit</b>	<b>58</b>
<b>3.3.</b>	<b>Synoptische Auswertung der immunhistologischen Beobachtungen und histomorphometrischen Messungen</b>	<b>63</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>nach 1 Woche Liegezeit</b>	<b>64</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>nach 4 Wochen Liegezeit</b>	<b>65</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>nach 12 Wochen Liegezeit</b>	<b>70</b>
<b>3.3.4.</b>	<b>nach 24 Wochen Liegezeit</b>	<b>73</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>4.1.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>81</b>
<b>4.1.1.</b>	<b>Diskussion der Lichtmikroskopie</b>	<b>81</b>
<b>4.1.2.</b>	<b>Diskussion der Immunhistochemie und Histomorphometrie</b>	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
325i	Code 325i, Calciumalkaliorthophosphatkeramik
AP	Alkalische Phosphatase
BSP	Bone Sialoprotein
BMA	Buthylmethacrylat
Ca	Calcium
Col I	Typ I Kollagen
CSD	Critical Size Defekt
Fibro	Fibroblast
FM	Fibröse Matrix
GB14	Code GB14, Calciumalkaliorthophosphatkeramik
GK	Glaskeramik
KEM	Knochenersatzmaterial
M	Molare Lösung
MMA	Methylmethacrylat
MNGC	Fremdkörperriesenzellen
OB	Osteoblast
OC	Osteocalcin
OD	Osteoid
OM	Osseäre Matrix
ON	Osteonectin
OP	Osteopontin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalciumphosphat
TRAP	Tartrat-Resistente-Saure(Acid)-Phosphatase
vGF	Von-Giemsa-Färbung
vKPF	Von-Kossa-Paragon-Färbung

# 1. Einleitung

## 1.1. Problemstellung

Der Einsatz von Zahnimplantaten ist heute zu einer Standardtherapie in der modernen Zahnmedizin geworden. Infolge der resorptiven Veränderungen im Bereich des Alveolarfortsatzes nach Zahnverlust sind jedoch häufig Augmentationen zur Verbesserung des Knochenvolumens erforderlich, bevor Zahnimplantate inseriert werden können. Hierbei haben sich die Verfahren der gesteuerten Knochenregeneration und der Sinusbodenelevation zu etablierten präimplantologischen Therapiemaßnahmen entwickelt. Der Goldstandard bei diesen augmentativen Eingriffen zur Knochenregeneration ist noch immer das autologe Knochen-  
transplantat, da die Regenerations- und Umbauzeit im Vergleich zu künstlichen Materialien reduziert und körpereigenes Gewebe weniger anfällig für Infektionen und Abwehrreaktionen ist. Die Verwendung autologer Knochen-  
transplantate ist jedoch auch mit einer Reihe von Nachteilen behaftet. Die Notwendigkeit eines zweiten OP-Gebiets, Morbidität am Entnahmeort, sowie begrenzte intraoral zu gewinnende Knochenmengen sind Gründe, um die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien (KEM) voranzutreiben. Ein ideales KEM sollte für den neu einwachsenden Knochen als Leitschiene dienen, d.h. eine stimulierende Wirkung auf die Osteogenese aufweisen und dann aber rasch resorbiert und durch funktionelles Knochengewebe ersetzt werden, um eine relativ frühzeitige Implantatinsertion nach drei bis vier Monaten zu ermöglichen. Resorption und Knochenneubildung müssen dabei in einem Gleichgewicht stehen, so dass einerseits der augmentierte Bereich nicht durch zu schnelle Resorption eher bindegewebig durchbaut wird und andererseits, bei verlangsamter Degradation, die knöcherne Durchbauung des Augmentates nicht gehindert wird. Auch im Rahmen anderer chirurgisch – rekonstruktiver Eingriffe wie z.B. zur Behandlung von Knochendefekten nach Tumorresektion oder Traumata, ist der Einsatz von KEM indiziert. Sie können unterschiedlicher Herkunft, z.B. alloplastisch (synthetisch) oder bovin sein. Bei allen klinisch einzusetzenden KEM ist die Bioaktivität, Löslichkeit, Degradation und das osteokonduktive Verhalten von besonderem Interesse. Hierüber wurden in den let-

zen Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, da sich eine Vielzahl verschiedener Materialien auf dem medizinischen Markt etabliert hat. Da das autologe Knochenangebot insbesondere zur Versorgung großer Defekte begrenzt ist, hat das Bestreben, alloplastische (synthetische) KEM einzusetzen, kontinuierlich zugenommen. Aus diesem Grund ist es notwendig, aufgrund der langwierigen Einheilungsvorgänge und Verknöcherungsprozesse (ca. 6-12 Monate) Materialien zu entwickeln und klinisch zu untersuchen, die den Zeitraum zwischen Applikation des KEM und vollständiger Neubildung des Knochens deutlich verringern. Damit werden gleichermaßen die Belastung für den Patienten herabgesetzt und die oft langen Therapiezeiträume erheblich verkürzt.

## **1.2. Stand der Forschung auf dem Gebiet der alloplastischen Knochenersatzmaterialien (KEM)**

Die Untersuchung und Weiterentwicklung moderner alloplastischer KEM hat ihren Ursprung schon zu Beginn der 70er Jahre (Hench LL et al. 1971). Der nachfolgende Zeitraum ist von Neuentwicklungen und Modifikationen der KEM geprägt (Gross & Strunz 1985, Hollinger & Battistone 1986, Hollinger & Battistone 1986, Klein et al. 1984, Kokubo 1991, MacNeill et al. 1999). Diese Untersuchungen offenbaren, dass in erster Linie die Struktur und deren Wirkung auf das Empfängergewebe von entscheidender Bedeutung für den Einheilungs- und Regenerationsprozess ist (De Aza & Luklinska 2003, Ducheyne & Qiu 1999, Holand et al. 1985, Hyakuna et al. 1989, MacNeill et al. 1999). In diesem Zusammenhang werden z.B. alloplastische Blocktransplantate gegen korrespondierende Partikulate mit verschiedenen Makro- und Mikrostrukturen verglichen und die Gewebeantwort sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht. Über die Jahre kristallisierten sich einige Materialien als besonders geeignet im Sinne der Anwenderfreundlichkeit und des Einheilungsverhaltens heraus. Hier sind als bewährte KEM die bioaktiven Gläser (Cordioli et al. 2001, Schepers & Ducheyne 1997, Tadjoeidin et al. 2000) und Tricalciumphosphate (Artzi et al. 2004, Zerbo et al. 2005a, Ogose et al. 2005) zu nennen. Dennoch erfüllen die heute verfügbaren KEM bezüglich ihrer Löslichkeit und ihrem Resorptionsverhalten nur zum Teil die oben genannten Anforderungen, die an



den implantatorientierten Regenerationsprozess gestellt werden. Insbesondere die Resorbierbarkeit der KEM ist daher ein wichtiger Aspekt, der den Erfolg der später zu inserierenden Implantate mit beeinflusst. Untersuchungen von  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) haben gezeigt, dass neun Monate post implantationem in der Mandibula noch 29% des Materials vorhanden sind und acht Monate nach Sinusbodenelevation sogar noch 44% (Zerbo et al. 2001). Auch bei Bioglass 45S5 werden Resorptionszeiten von 1-2 Jahren angegeben (Cordioli et al. 2001, Tadjedin et al. 2002). Die Einführung von Materialien mit kürzeren Resorptionszeiten erscheint daher sinnvoll. Basierend auf den Arbeiten von Köster et al (Köster 1976, Köster et al. 1977) wurden im wesentlichen Calciumalkaliorthosphosphatkeramiken mit unterschiedlichen Alkalizusätzen entwickelt. In diesem Zusammenhang sind auch insbesondere die neuartigen Glaskeramiken auf der Basis einer bislang nicht bekannten Kristallphase mit der Summenformel  $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$  von Berger und Mitarbeiter (Berger et al. 1995) zu nennen. Diese neuen KEM weisen prinzipiell eine höhere Löslichkeit als Tricalciumphosphate (Knabe et al. 2004c) auf und ermöglichen darüber hinaus auch eine abgestufte Resorption in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung (Berger et al. 1999). Zwei dieser Materialien sind in der Literatur unter der Bezeichnung GB14 und GB9 (Berger et al. 1995) bekannt geworden, wobei GB14 eine höhere Löslichkeit als GB9 aufweist (Berger et al. 1995, Knabe et al. 1998). Es handelt sich um glaskristalline Substanzen mit der kristallinen Phase  $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ , die eine sehr gut lösliche Glasphase enthalten. Einige dieser neuentwickelten schnell resorbierbaren Kalziumphosphatkeramiken wurden in der Knochenzellkultur getestet (Knabe et al. 1997, Knabe et al. 1998, Knabe et al. 2004b), und haben sich hierbei auch als hervorragend biokompatibel und degradierbar, sowie teilweise osteoinduktiv herausgestellt. Vergleichende Untersuchungen dieser neuen, schnell resorbierbaren Materialien mit den bisher verfügbaren klinisch routinemäßig angewendeten Materialien sind notwendig, um deren praktischen Einsatz am Menschen zu ermöglichen und sie als vielversprechende, den klinischen Erwartungen gerecht werdende Alternativen zu etablieren.

### **1.3. Ziele und methodischer Ansatz der Untersuchung schnell resorbierbarer Knochenersatzmaterialien**

Derzeit sind verschiedene Beta-Tricalciumphosphate ( $\beta$ -TCP), Hydroxylapatite (HA) und Glaskeramiken (GK) für den Einsatz am Patienten verfügbar, die aber das gewünschte Maß an Resorbierbarkeit und Degradation noch nicht erreichen (Cordioli et al. 2001, Tadjoeidin et al. 2002, Zerbo et al. 2001). Daher gab es zahlreiche Ansätze, neue Materialien mit einer höheren Resorptionsrate zu entwickeln (Knabe et al. 2004c, Moimas et al. 2006), von denen sich zurzeit auch einige in der tierexperimentellen Untersuchung befinden. Ziel der Entwicklung derartiger schnell resorbierbarer bioaktiver KEM ist es, die Degradierbarkeit soweit heraufzusetzen, bis ein Gleichgewicht zwischen der Materialdegradation und der Knochenneubildung entsteht, ohne dass es zu einer nachteiligen Beeinflussung der Gewebsreaktion durch die Degradationsprodukte kommt. Gleichzeitig sollen diese bioaktiven Keramiken die Knochenbildung und damit die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten stimulieren. Daher soll das Ziel dieser vergleichenden Untersuchung sein, das Degradations- und Löslichkeitsverhalten, sowie die osteokonduktiven oder sogar osteoinduktiven Eigenschaften bewährter und neu entwickelter KEM in Bezug auf ihren Einfluss auf die Osteoblastenaktivität und Zelldifferenzierung klinisch-histologisch zu eruieren. Zur vergleichenden Untersuchung wurden drei unterschiedliche synthetische KEM herangezogen, ein klinisch etabliertes  $\beta$ -TCP und zwei neu entwickelte glasig kristalline Calciumalkaliorthophosphate (Materialcode GB14 und 325i). GB14 basiert auf der Hauptkristallphase  $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$  und enthält einen kleinen amorphen Anteil Magnesiumkaliumphosphat (Berger et al. 1995), während 325i die Hauptkristallphase  $\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7$  aufweist. Als Kontrolldefekte wurden diese mit autologen Knochenspänen als derzeitigen Goldstandard und ein blutgefüllter Leerdefekt, mit einem Kollagenschwamm versetzt, verglichen. Der Kollagenschwamm dient zur Stabilisierung des Koagels im Leerdefekt. Zur Untersuchung der Gewebeantwort sowie des Degradations- und Löslichkeitsverhalten wurden als Versuchstiere Schafe herangezogen. In vorhergehenden Studien haben sich Schafe als Versuchstiere bereits bewährt, so dass auch in diesem Versuch aussagekräftige Er-

gebnisse zu erwarten sind (Fujishiro et al. 2007, Gosain et al. 2005, Ignatius et al. 2001a, Leniz et al. 2004, Niedhart et al. 2004, Peters et al. 2006, Tan et al. 2005). Da in der vorliegenden Studie die integrative Gewebeantwort unter Berücksichtigung mehrerer Zell- und Gewebetypen im Fokus der Untersuchungen steht, kam nur ein in vivo Modell für die Untersuchung in Frage. Nur so ist das ungestörte Interagieren verschiedener Zelltypen miteinander möglich. Bei der Wahl der Tierspezies sind bei möglichst naher phylogenetischer Verwandtschaft zur menschlichen Spezies ethische und finanzielle Aspekte zu berücksichtigen. Auch aus dieser Sicht schien das Schaf im Vergleich zu Beagle, Minischwein oder Ziege als Tiermodell vorteilhaft. Damit die zu untersuchenden Materialien möglichst unter annähernd klinischen Bedingungen getestet werden können, die speziell für den zahnmedizinisch-kieferchirurgischen Bereich von Interesse sind, wurden operativ Defekte im Bereich des Unterkiefers geschaffen, die einem kritischen Gewebedefekt (Critical Size Defekt - CSD, (Hollinger & Kleinschmidt 1990)) entsprachen. Hierdurch können, vergleichend zu anderen Studien, die osteogenen Eigenschaften der zu testenden Materialien definiert werden. Die Untersuchungszeiträume von 1,4,12,24 Wochen wurden derart gewählt, um die integrative Gewebeantwort, wie auch die quantitative Zunahme an neu gebildetem Knochen qualitativ und quantitativ hinreichend erfassen zu können. Zur Auswertung der allgemeinen Gewebeantwort wurde die konventionelle Lichtmikroskopie herangezogen, die speziell zellaktivierend-osteogenen Auswirkungen werden mittels Immunhistologie beurteilt. Die Erfassung der Degradation der Partikel und der Zuwachs an neu gebildetem Knochen innerhalb der o.g. Zeiträume erfolgten durch histomorphometrische Messungen. Für das vorliegende Forschungsvorhaben wurde eine spezielle hartgewebshistologische Technik entwickelt, die den immunhistochemischen Nachweis osteogener Marker an unentkalkten Sägeschnitten erlaubt (Knabe et al. 2006). Hierzu ist die Entwicklung eines Spezialeinbettverfahrens erforderlich, welches die Erhaltung der Antigenität ermöglicht, sowie nach Entlastung die Durchführung von Immunmarkierungen erlaubt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Materialien

Es wurden drei bioaktive Materialien in partikulärer Form mit einer Korngröße von 350 - 600µm untersucht. Die Partikel zeigen teils sphärische teils amorphe Formen. Die untersuchten KEM sind in der folgenden Tabelle mit Bezeichnung und Zusammensetzung aufgeführt.

Material	Zusammensetzung in Gewicht %						
	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	MgO	CaF <sub>2</sub>
β-TCP	0,0	54,24	45,76	0,0	0,0	0,0	0,0
325i	34,0	44,7	16,2	0,0	0,0	4,6	0,5
GB14	0,0	30,67	43,14	9,42	14,32	2,45	0,0

**Tab.1:** Komposition der untersuchten KEM

### 2.2. Versuchstiere und deren Haltung

Für die vorliegende Untersuchung wurden 34 weibliche Schafe der Rasse Merino und Texel mit einem Gewicht zwischen 55 – 75 Kilogramm und einem Alter von 2 – 2,5 Jahren beidseits am Unterkiefer operiert. Bei der Wahl des Alters und der Altersdifferenz der Versuchstiere wurde bewußt darauf geachtet, daß hormonelle Einfluß auf die Knochenumbaurate besitzen. Das Spektrum der bei der Erstuntersuchung der Schafe erhobenen klinischen Parameter ist in Tab.2 zu finden.

<b>Erstuntersuchung der Versuchstiere</b>	
Durchgeführt von einem Veterinärmediziner <sup>1</sup> der tierexperimentellen Einrichtungen der Charité – Berlin, Campus Virchow	
Herkunft der Schafe	Gutshof „Langerwisch“
Alter	2 ½ - 3 ½ Jahre
Gewicht	55 – 75 KG
Herzfrequenz	88 – 95/min
Herztöne	o.B.
Atemfrequenz	16 – 20/min
Atemtyp	costo - abdominal
Atemgeräusch	o.B.
Appetit	Normal (Angabe Tierpfleger)
Pansenfrequenz	Normal
Kotabsatz	o.B.
Klauen	o.B.; beschnitten
Gelenke	o.B.
Belastung der vier Extremitäten	Gleichmäßig
Ultraschalluntersuchung auf Trächtigkeit (bei Erstoperation)	Unwahrscheinlich
Medikamente (verabreicht bei Trächtigkeitsuntersuchung)	Iliren C 1,5ml ; Ivomec 1,2 ml Veracin s.c. 3ml / 50Kg KGW (ein Tag später)

**Tab.2:** Im Rahmen der Erstuntersuchung erfasste klinische und paraklinische Parameter der Schafe vor dem ersten operativen Eingriff. Legende: Die Angaben der Tabelle sind für alle 34 Schafe repräsentativ. Iliren C = zur Verhinderung und Unterbrechung von Trächtigkeit. Ivomec = Antiparasitikum, Veracin = Antibiotikum

Diese hielten sich vier Tage postoperativ in umzäunten Gattern<sup>2</sup> zur Kontrolle und Nachsorge auf. Hier bekamen sie Heu (J. Ruckdeschel & Söhne, Berlin, Deutschland), Kraftfutter (Frankfurter Kraftfutter GmbH, Frankfurt, Deutschland) und Wasser ad libitum. Danach wurden sie in ein Auslaufgebiet transportiert und erhielten dort ebenfalls Heu und Wasser ad libitum.

---

<sup>1</sup> Tierarzt Hauke Sonnenberg

<sup>2</sup> Tierexperimentellen Abteilung der Charité, Campus Virchow

Die Tierdokumentationsbögen über den gesamten Behandlungszeitraum bis zur Opfierung der Tiere sind zusammengefasst in Tab.3 aufgeführt.

Rasse	Texel / Merino
Geschlecht	weiblich
Alter	2 ½ - 3 ½ Jahre
Rektaltemperatur	38,6-40 °C
Körpergewicht	55-75kg
OP-Dauer Extraktion 3 Molaren im Unterkiefer beidseits mit Defektschaffung	1 ½ -2 Std
OP-Dauer Augmentation Unterkiefer beidseits	1- 1 ½ Std
OP-Dauer Augmentation Unterkiefer beidseits mit offenem Sinuslift beidseits	1 ½ - 2 Std
Fressbeginn nach Aufwachphase	sofort
Wundheilung	gut - sehr gut

**Tab.3:** Tierdokumentationsbögen zusammengefasst

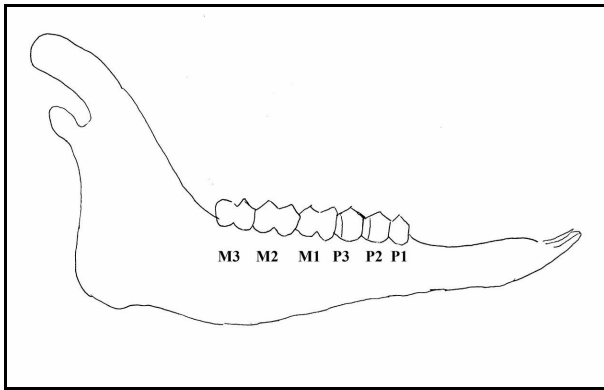
### 2.3. Operationstechniken und zeitliche Abläufe

Beide Operationen, sowohl die Defektschaffung als auch die Augmentation der KEM erfolgten unter Vollnarkose der Tiere. Eine Stunde vor dem Eingriff wurden die Versuchstiere mit Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) sediert. Die Narkose wurde mit 40ml Trapanal 0,5g (Thiopental-Natrium; Altana Pharma Deutschland GmbH; Konstanz, Deutschland) und einem Isofluran (Forene, Isofluran [Inhalationsnarkotikum], Abbott Laboratories Ltd.; Queenborough, Großbritannien) / Lachgas - Gemisch 1,6% / 60%) durch intravenösen Zugang in die Ohrvene eingeleitet. Das Verhältnis zwischen Lachgas und Sauerstoff betrug 1:2. Während der Operation wurden 2,2g Augmentan (Amoxicillin/Clavulansäure, Beecham s., Usine Hepignies; Belgien) zur Infektionsprophylaxe intravenös verabreicht. Der Wasser- und Elektrolythaushalt wurde während der Operation mit Jonosteril (NaCl Infusion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Bad Homburg, Deutschland) aufrecht gehalten. Zur Vermeidung einer Xerophthalmie wurden die Augen der Versuchstiere mit Panthenol-

Augensalbe (Panthenol Jenapharm, Otto Jenapharm GmbH & Co KG, Jena, Deutschland) intraoperativ behandelt. Die Desinfektion des intraoralen Operationsgebietes erfolgte mit Braunoderm (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Sämtliche operative Eingriffe, bis auf die Opferrung, wurden unter sterilen Kautelen mit Einmalsterilgut durchgeführt.

### **2.3.1. Zahnextraktion und Defektschaffung**

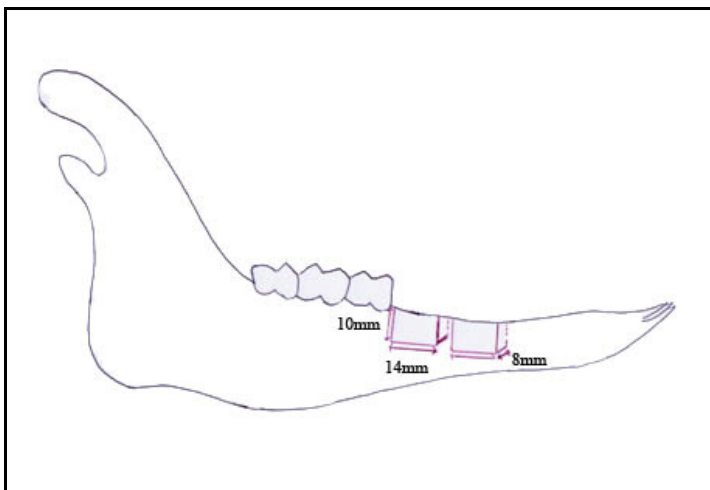
Die Defektschaffung wurde in Vollnarkose durchgeführt. Hierfür wurden die Zähne P1 – P3 (Abb.1) beidseits im Unterkiefer osteotomiert. Dafür wurde mesial dieser Zähne eine 2 cm lange crestale Inzision angelegt, die in eine marginale Inzision an den Prämolaren überging. Eine vestibuläre Entlastung wurde mesial von M1 angelegt. Nach Präparation des Mukoperiostlappens wurde der Knochen um die Prämolaren osteotomiert, die Zähne vertikal mit diamantierten Zylindern durchtrennt und in Teilen entfernt. Der primäre Wundverschluß erfolgte mittels resorbierbarer Naht (Vicryl 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Postoperativ erhielten die Versuchstiere zur Analgesie um den linken, rasierten Oberschenkel ein schmerzstillendes Pflaster (Durogesic SMAT 75µg/h, Fentanyl; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Weiterhin wurden die Tiere abermals mit Ultraschall auf Schwangerschaftsanzeichen untersucht. Zur Schwangerschaftsprophylaxe wurde ihnen einmalig 1,5ml intramuskulär Iliren C (Tiaprost; Intervet Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland) und als Antiparasitikum 1,2ml subkutan Ivomec (Ivermectin; Merial GmbH; Hallbergmoos, Deutschland) nach der ersten Operation verabreicht. Im Rahmen der postoperativen Infektionsprophylaxe wurde nach 24 Stunden 3ml subkutan Veracin – compositum (A. Albrecht GmbH + Co. KG; Vet-med. Erzeugnisse; Aulendorf, Deutschland) injiziert.



**Abb.1:** laterale Ansicht des Schafunterkiefers mit Zahnbezeichnung .

### 2.3.2. Implantation der KEM

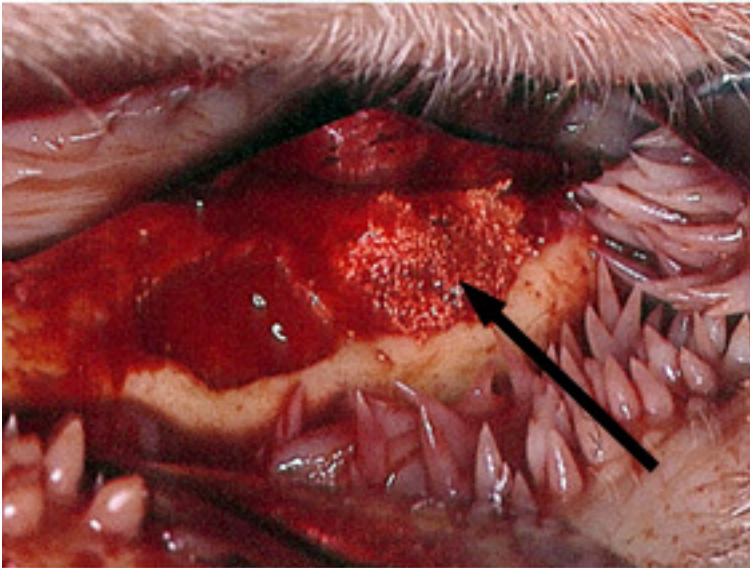
Die Implantation der KEM wurde acht Wochen nach Extraktion der benannten Zähne durchgeführt. Zur Exposition der für die Defektpositionierung vorgesehenen Knochenfläche wurde erneut ein Mukoperiostlappen mittels crestaler Inzision anterior von M1 mit ca. 4cm Länge und einer vestibulären Entlastung mesial M1 und dem ehemaligen P1 angelegt. Nach Excochleation von eventuell vorhandenem Granulationsgewebe wurden die Defekte unter Zuhilfenahme einer Messlehre und eines Kugelfräsers in der gewünschten Ausdehnung (Abb.2) konfiguriert.



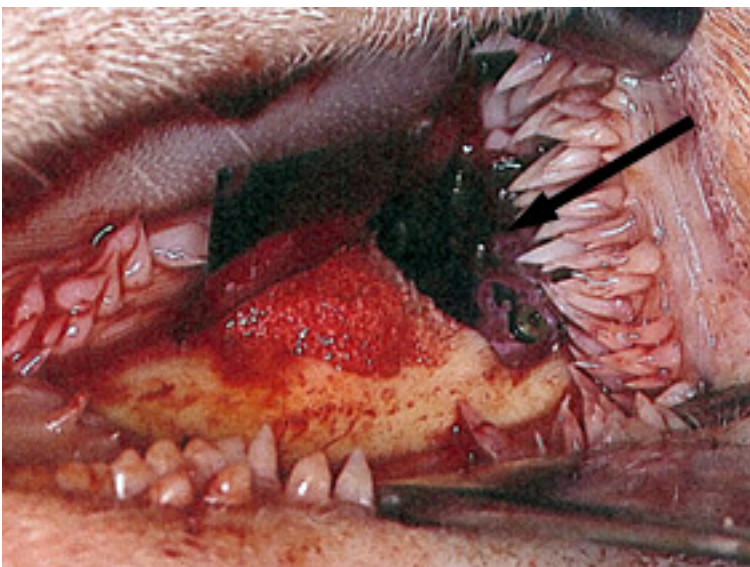
**Abb.2:** Schematische Darstellung des im Rahmen des Zweiteingriffs angelegten Defektes.



Die Implantation der granulären KEM richtete sich nach einem strengen Protokoll und wurde erst im distalen und nach Membranapplikation im mesialen Defekt durchgeführt (Abb.3 und 4).

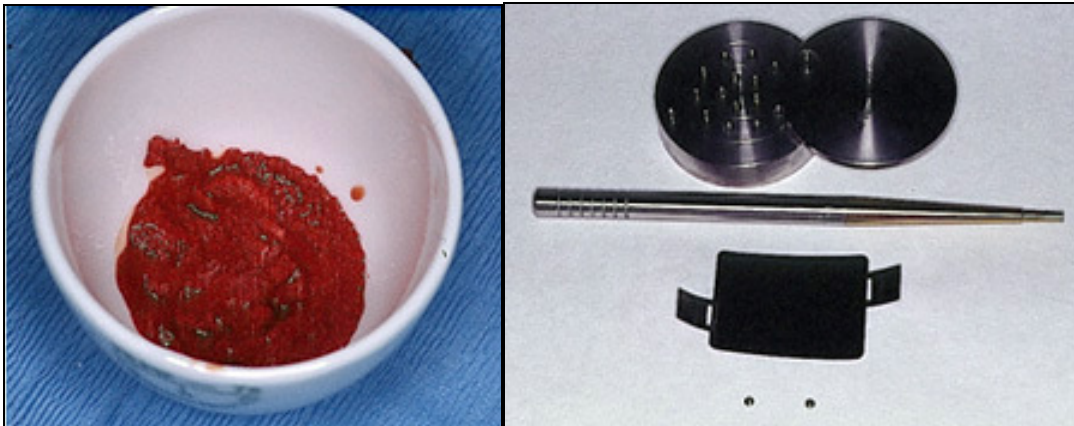


**Abb.3:** Distaler Knochendefekt mit KEM (Pfeil) gefüllt.



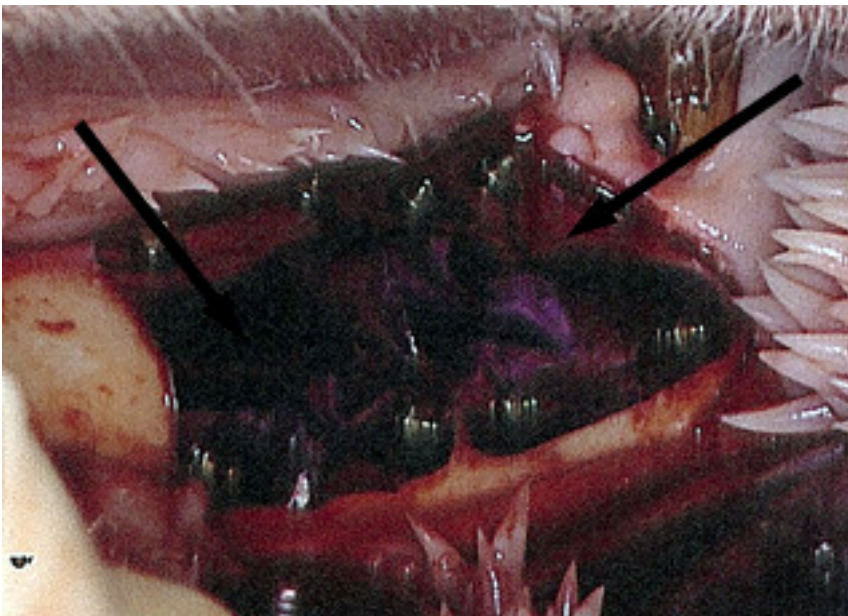
**Abb.4:** Mesialer Knochendefekt mit KEM gefüllt. Der distale Knochendefekt ist mit einer Titanmembran (Pfeil) bedeckt.

Die Granulate wurden mit vorher entnommenem Venenblut gemischt (Abb.5) und die Defekte damit in kompletter Ausdehnung augmentiert. Zur Isolation vor Weichgewebseinsprossung wurden Titanfolien (Curasan, Kleinostheim, Deutschland) über den aufgefüllten Defekten mit vier Titanpins (Curasan, Kleinostheim, Deutschland) am umliegenden Knochen befestigt (Abb.7).



**Abb.5:** Venenblut gemischt mit KEM im Gefäß.

**Abb.6:** Titanmembran und Pins (Curasan, Kleinostheim, Deutschland).



**Abb.7:** Beide Defekte mit einer Titanmembran und Pins (Pfeil) abgedeckt.

Der primäre Wundverschluß, sowie die postoperative Analgesie wurden auch nach diesem Eingriff wie unter 2.3.1. beschrieben durchgeführt.

### **2.3.3. Probengewinnung**

Die Probengewinnung erfolgte nach 1 Woche Liegezeit bei vier Versuchstieren und bei jeweils zehn Versuchstieren nach 4, 12 und 24 Wochen. Zur Sedierung wurde Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid; Bayer Vital GmbH; Leverkusen, Deutschland) verwandt. Die Opferung der Versuchstiere erfolgte dann durch 100ml Trapanal 2,5g (Thiopental-Natrium; Altana Pharma Deutschland GmbH; Konstanz, Deutschland), Pancuronium Curamed (CuraMED Pharma GmbH; Karlsruhe, Deutschland) und 100ml 1Molarer Kaliumchloridlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Bad Homburg, Deutschland) in eben dieser Reihenfolge. Der Tod trat danach unverzüglich ein. Im Anschluss folgte die sofortige Resektion der zu untersuchenden Kieferabschnitte mit einer oszillierenden Handkreissäge (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland).

### **2.4. Probenaufbereitung und Auswertung**

Die Probenaufbereitung und Fixierung der Knochenblöcke erfolgte unmittelbar nach Opferung der Versuchstiere. Hierbei wurde jeder Knochenblock (zwei pro Kieferhälfte) geteilt. Eine Hälfte wurde für die konventionelle Hartgewebshistologie in Formaldehydlösung, die andere für die Immunhistologie in Neo-Fix-Lösung (Alkoholgemisch; Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) fixiert. Von einer Hälfte wurden dünne Scheiben abgetrennt und für die Rasterelektronenmikroskopie in Glutaraldehyd fixiert. Die weiteren Schritte sind detailliert in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### **2.4.1. Lichtmikroskopie**

Die Proben für die lichtmikroskopische, konventionelle Hartgewebshistologie wurden zur Auswertung in Formaldehyd fixiert, durch Immersion in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Äther-Chloroform entfettet. Schließlich wurden die Proben über vier weitere Stufen in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet (Tab.4). Nach mehrtägigem Aushärten des Kunststoffes in einem 38°C warmen Wasserbad wurden die so gewonnenen Kunststoffblöcke mit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer

GmbH, Wehrheim, Deutschland) auf einem Metallhalter montiert. Der Objekthalter wurde in dem zugehörigen Sägemikrotom (Modell 1600, Leitz, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) derart eingebracht, um eine Schnittfolge möglichst durch das Zentrum des angelegten Defekts zu realisieren. Von jedem Block wurde eine Schnittfolge von 7 je 50 µm dicken Schnitten in bucco-lingualer Richtung angefertigt, die auf Plexiglasobjekttägern (Exakt GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Instantbond (Fa. M. Langnas, Instantbond, Berlin, Deutschland) aufgeklebt wurden. Die dadurch fixierten Schnitte wurden anschließend unter mikroskopischer Kontrolle auf einem halbautomatischen Poliergerät (Exakt GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit Naßschleifpapier (2000er Körnung) poliert. Anschließend wurden je zwei Schnitte mittels von Giemsa-Färbung (vGF, Tab.5), sowie von Kossa-Paragon-Färbung (vKPF, Tab.6) behandelt.

Immersionsfixation in Formaldehyd nach Lillie, pH 7,4, 4 °C	4-7 Tage
Spülen in Leitungswasser, Raumtemperatur (RT)	über Nacht
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 70, 80, 90, 96, 2x100%, RT	2x3 Tage
Äther - Chloroform 1:1, RT	2x3 Tage
Äther - Chloroform -Methylmethacrylat (MMA) 1:1:1, RT	2x3 Tage
MMA, RT	1-7 Tage
MMA 4 °C	2x1-7 Tage
Einlegen in MMA in verschließbare Glasröhrchen, Wasserbad, 38 °C	2-4 Tage
Glasröhrchen öffnen, RT	über Nacht

**Tab.4:** Verlauf der Aufbereitung der für die Lichtmikroskopie verwendeten Schnitte.

**Legende:** 2x3Tage: jeweilige Lösung drei Tage, danach weitere drei Tage in frischer Lösung.

Die Färbung der für die Lichtmikroskopie hergestellten Präparate wurde nach von Giemsa (vGF, Tab.5) und nach von Kossa-Paragon (vKPF, Tab.6) in der nach Gross und Strunz (Gross & Strunz 1977) modifizierten Form durchgeführt. Die vGF diente zur Beurteilung der Gewebe im Allgemeinen. Die vKPF wurde speziell zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Knochenneubildung und des Mineralisationsgrades genutzt.

Sörensen - Aqua destillata 1:1, RT	5 min
Giemsa - Sörensen 1:1, RT	40 min
Sörensen - Aqua destillata 1:1, RT	kurz
Aqua destillata	kurz

**Tab.5:** Färbung nach von Giemsa

Aqua destillata, RT	kurz
5% Silbernitratlösung, RT	10 min
Aqua destillata, RT	3x5min
Soda Formol, RT	3 min
Leitungswasser fließend, RT	10 min
5% Na-Thiosulfat, RT	3 min
Leitungswasser fließend, RT	10 min
Paragon, 60°C	15 min
Aqua destillata, RT	kurz

**Tab.6:** Modifizierte von Kossa-Paragon-Färbung nach Gross und Strunz.

**Legende:** 3x5 min: jeweilige Lösung 5 Minuten, danach 2 weitere Male 5 Minuten in jeweils frischer Lösung.

Zur Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate wurden pro Tier und Liegezeit je vier Präparate in vGF und vKPF deskriptiv bewertet und zusammenfassend dargestellt. Die Beurteilung der Gewebe- und Zelltypen erfolgte anhand der vGF-Präparate. Knochendichte und Mineralisation der Proben wurden mit Hilfe der vKPF Präparate dargestellt. In einer 2,5fachen Vergrößerung wurde der augmentierte Bereich auf entzündliche Anzeichen, leukozytäre Infiltrate, mehrkernige Riesenzellen und perivaskuläre Infiltration überprüft, die Partikel in ihrer Form beschrieben und das Färbeverhalten festgestellt. Sowie das Verhältnis von Bindegewebe und Knochenneubildung im augmentierten Bereich semiquantitativ beurteilt. Anschließend wurde die Gewebe- und Materialantwort detailliert bei 20 und 40facher Vergrößerung untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt der Betrachtung auf den Kontaktflächen von Partikel und umgebendem Gewebe. Die Beurteilung der Knochenneubildung und insbesondere die Differenzierung und das Vorhandensein osseospezifischer Zellen, wie auch die Strukturänderungen der Partikel waren hierbei von erstrangigem Interesse.

## 2.4.2. Immunhistologie

Die Aufbereitung der zur immunhistologischen Auswertung gedachten Proben ist in Tab.7 ausführlich beschrieben. Die Kunststoffeinfbettung und Färbung sind separat aufgeführt.

<b>Protokoll der Probenaufbereitung für die Immunhistologie</b>	
<b>1. Kunststoffeinfbettung</b>	
	<p><b>1. Fixierung in NEO-Fix</b> (Alkoholgemisch, Cat. # 1.05261.1000, Merck), bei Knochenblöcken mehrere Tage in Neofix bei RT.</p> <p><b>2. Entwässern in Aceton + 5% PEG (Vol%)</b> (Polyethylenglycol 400 (zur Synthese), Cat. # 8.07485.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vier Tage im Tiefkühlfach</p> <p><b>3. Weiteres Entwässern und Vorbereitung der Infiltration</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>– Aceton 1,5h im Kühlschrank (bei ca. 4 C°)</li><li>– Methylbenzoat 2h im Kühlschrank (bei ca. 4 C°)</li><li>– Xylol 2h bei RT</li><li>– Destabilisieren von MMA (Methylmethacrylat) und BMA (Butylmethacrylat)</li></ul> <p><b>4. Infiltration der Knochenblöcke</b> Infiltration in folgendem Infiltrationsgemisch für mehrere Tage: entstabilisiertes MMA : entstabilisiertes BMA : PEG 40 : 60 : 2</p> <p><b>5. Einbettung der Knochenblöcke mit einem Polymerisationsgemisch aus MMA und BMA</b> (Katalysator: DMT (DMT = N,N-Dimethyl-p-Toluidin, Cat. # 822040, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) in Polyethylengefäßen. Die Polymerisation erfolgte bei 4-8°C. Polymerisationszeit ca. 1 Woche.</p> <p><b>6. Ausbetten der Knochenblöcke und Aufkleben auf Probenteller der Innenlochsäge</b> Erst werden die Proben aus den Kartellgefäßen ausgebettet und die Blöcke mit Technovit 3040 (Cat # 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) auf dem Probenteller aufklebt.</p> <p><b>7. Herstellen von Sägeschnitten mit dem Innenlochsägemikrotom</b> Den Plexiglassobjektträger mit Zweikomponentenklebstoff ( UHU Plus schnellfest, UHU GmbH,) auf Epoxidharzbasis aufkleben</p> <p><b>8. Schleifen der Sägeschnitte mit dem Exaktschleifgerät</b> Erst mit 1200er, dann mit 4000er Körnung</p>

## 2. Färbung

Für den immunhistochemischen Nachweis osteogener Marker:

Entplastung der Schnitte in Toluol, Xylol und Aceton unter Verwendung folgender Antikörper und des Dako Envision System (Meerettichperoxidase-konjugierte Sekundärantikörper)

Col I	(LF-39)	1: 200	(polyklonaler Kaninchen)
ALP	(Sigma A2951)	1: 500	(monoklonale Maus)
OP	(LF-124)	1: 200	(polyklonaler Kaninchen)
ON	(BON-I)	1: 200	(polyklonaler Kaninchen)
BSP	(LF-84)	1: 200	(polyklonaler Kaninchen)
OC	(V-19)	1: 200	(polyklonale Maus)

(Cat. # sc-18319) (LF-Antikörper von Larry Fisher NIDCR)

Kontrollen: Maus IgG (Cat # PP 54, Chemicon, 25mg/ml)  
1:12500

Kontrollen: Kaninchen IgG (Cat # PP 64, Chemicon, 10,3  
(mg/ml) 1:5250

Zunächst wird eine 100fache Lösung hergestellt. Dann werden 2µl IgG zu 103 µl Antikörperdilution hinzugefügt. Von dieser Lösung dann mit 2µl auf 200 µl verdünnen.

Kontrollen: ROT-cell CD45 (Cat # MO742 , Dako) 1:100

- 3x2 min Spülen mit Tris-Puffer
- Labeled Polymer (DakoCytomation Envision + Duallink System Peroxidase, Cat # K4063, DAKO) für 30 min 3x2 min Spülen mit Tris-Puffer
- AEC (AEC Plus Substratlösung Cat # K3461, DAKO) ca. 7-10min, Gegenfärbung mit Mayer's Hamalaun 2-4min.
- in Glyceringelatine (Cat. # 1.09242.0100, Merck) eindecken

Weitere Schnitte wurden enzymhistochemisch zum Nachweis der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) mit einem präfabrizierten Kit (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) gefärbt, um osteoklastäre Aktivitäten identifizieren zu können. Diese Methode wurde von Goldberg und Barka beschrieben (Goldberg & Barka 1962).

**Tab.7:** Aufbereitung der Schnitte für die Immunhistologie.

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte durch vorher festgelegte Intensitäten im Färbeverhalten der osteogenen Marker. Die damit korrelierende Quantität ist ebenfalls ein Indiz für das osteoblastäre Stadium und gleichermaßen für die Knochenbildungsprozesse (Aubin et al. 1993, Aubin et al. 1995). Die betrachteten osteogenen Marker - Typ I Kollagen (Col I, LF-39), Alkalische Phosphatase

(ALP, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), Bone Sialoprotein (BSP, LF-84), Osteocalcin (OC, Abcam Ltd., Cambridge, U.K.), Osteopontin (OP), Osteonectin (ON) - zeigen entsprechend der osteoblastären Differenzierung unterschiedliche Konzentrationen und damit Färbeintensitäten. Sie ermöglichen so einen quantitativen Vergleich. Die Bewertung erfolgte lichtmikroskopisch und semiquantitativ. Es wurden pro Tier und Liegezeit sechs Schnitte bewertet, wobei die numerische Einteilung der Intensitäten in Tab.8 aufgeführt ist. Bindegewebe, Bindegewebszellen, Knochen, Knochenzellen und Osteoid wurden getrennt voneinander betrachtet.

<b>Intensität der Färbung</b>	<b>Numerische Einteilung generalisiert</b>
Keine Färbung	0
Geringe Färbung	+ = 1
Moderate Färbung	++ = 2
Starke Färbung	+++ = 3

**Tab.8:** Einteilung des Färbeverhaltens nach Intensität

### **2.4.3. Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die REM-Proben wurden in Glutaraldehyd fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, und schließlich mit Hexamethyldisilazane infiltriert (Tab.9). Im Anschluss wurden die Proben luftgetrocknet, im Exsikkator entgast und auf einem REM-Probenteller mit Leitsilber montiert. Frühestens nach 24 Stunden konnten die Proben mit einem Sputter-Gerät (Modell SC 500, Emscope, USA) im Hochvakuum sowohl mit Kohlenstoffpartikeln als auch mit Gold bedampft werden. Neben den aufgearbeiteten Proben wurden zum Vergleich auch nicht implantierte Partikel für die REM-Untersuchung vorbereitet.



4% Glutaraldehyd in 0,1 Molare Lösung (M) Cacodylatpuffer pH 7,2 4°C	2h
0,1 M Cacodylatpuffer, 4°C	3 x 5-15 min
1% OsO <sub>4</sub> in 0,1M Cacodylatpuffer, 4°C	60-90 min
0,1 M Cacodylatpuffer, 4°C	3 x 5-15 min
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 70, 80, 90, 96, 2x100%, RT	je 15-30 min
Propylenoxid (PO), RT	2 x 15 min
PO - Epon 3:1, RT	30-60 min
PO - Epon 1:1, RT	30-60 min
PO - Epon 1:3, RT	über Nacht
Epon	2 x 1-2h

**Tab.9:** Aufbereitung der Proben für die REM-Untersuchung.

**Legende:** 3 x 5-15min: jeweilige Lösung 5-15min, danach 2 weitere Durchgänge 5-15min in jeweils frischer Lösung.

#### 2.4.4. Histomorphometrie

Die im Zentrum des Defekts liegenden Schnitte wurden zur histomorphometrischen Untersuchung herangezogen. Die Präparate sind nach immunhistochemischer Probenaufbereitung (Tab.7) angefertigt worden. Zur histomorphometrischen Auswertung wurde das Softwareprogramm AnalySIS (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) verwendet. Vermessen wurden bei den Präparaten nach 1 Woche Liegezeit zwei Schnitte von zwei verschiedenen Tieren. Pro Material und Liegezeit wurden fünf Schnitte von fünf verschiedenen Tieren bei den Präparaten nach 4,12 und 24 Wochen Liegezeit zur Untersuchung angefertigt. Im Defekt wurden die von Knochen, Partikeln der KEM und von Weichgewebe eingenommenen Flächen in mm<sup>2</sup> vermessen und daraus der prozentuale Anteil von Knochen, Partikeln und Weichgewebe im Vergleich zur gesamten Defektfläche ermittelt. Weiterhin wurden die mittlere Partikelgröße, d.h. die gesamte Partikelfläche dividiert durch die Anzahl der vorhandenen Partikel, der prozentuale Partikel-Knochenkontakt, der Partikel-Osteoidkontakt und Partikel-Weichgewebekontakt bestimmt.

#### **2.4.5. 2.4.5. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Students t-test bei einem festgelegten Signifikanzniveau ( $p$ ) von  $<0,025$  unter Einsatz der Bonferroni-Adjustierung. Hierzu und zur grafischen Darstellung kamen die Softwareprogramme Statview Version 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina 27513, USA) sowie Microsoft® Office Excel 2003 zum Einsatz.

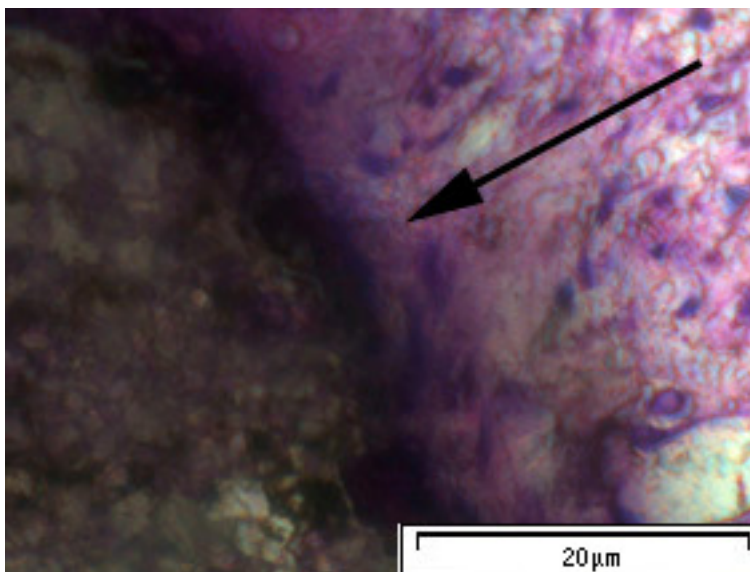
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Lichtmikroskopische Auswertung

##### 3.1.1. nach 1 Woche Liegezeit

###### *$\beta$ -TCP*

Es zeigte sich ein mit Partikeln und Koagel gefüllter Defekt, der interpartikulär sehr zellreich und zum knöchernen Defektrand in lockeres, faserreiches und zellarmes Organisationsgewebe überging. Hier fanden sich vereinzelt kapilläre Einsprossungen. Entzündliche Infiltrate oder Anzeichen vermehrt auftretender Entzündungszellen konnten nicht festgestellt werden. Vereinzelt traten Makrophagen am Defektrand auf. In vKPF waren sowohl der knöchernen Defektrand, als auch die Partikel von einem schwarzen Saum umgeben, was für eine Ca-Apposition spricht.



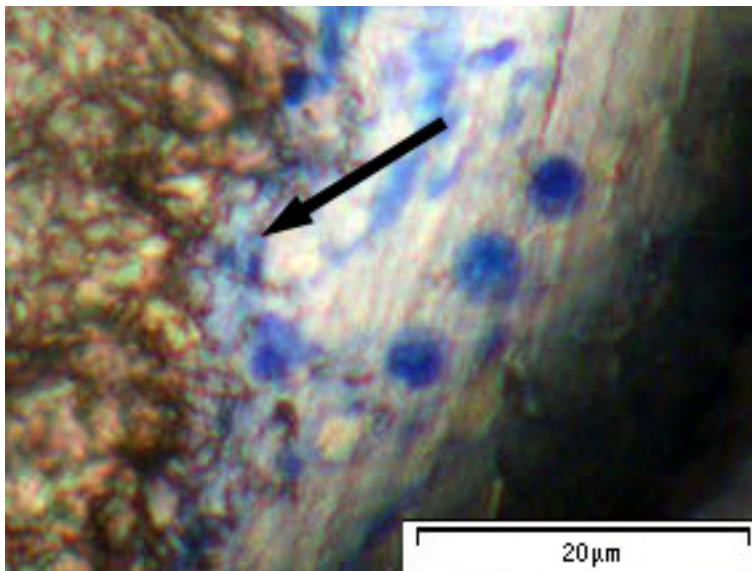
**Abb.8:** Lichtmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Ca-Apposition an einem  $\beta$ -TCP-Partikel (Pfeil), der vorwiegend von Bindegewebe umgeben (rechts) war. In vKPF, 20fache Vergrößerung.

Im Bereich des ortständigen Knochens fanden sich vermehrt Osteoblasten. In Lakunen liegende Osteoklasten kamen selten vor. Die  $\beta$ -TCP-Partikel zeigten einen lila-bläulichen Saum in vKPF, was jedoch nicht als klassisches Färbeverhalten zu bezeichnen war. Ihre Zeichnung und

Form zeigte keinerlei Veränderungen im Vergleich zur präimplantologischen Untersuchung. Interpartikuläre Knochenneubildungen oder Osteoid waren noch nicht auffindbar.

### 325i

Der Defekt war mit klar von der Umgebung abgegrenzten, unverändert scharfkantigen Partikeln und Koagel gefüllt. Zum ortständigen Knochen hin veränderte sich das interpartikulär zellreiche, faserarme Gewebe in ein lockeres, faserreiches und zellarmes Organisationsgewebe. In diesem fanden sich vereinzelt kapilläre Einsprossungen. Es befanden sich besonders an den Partikeln häufiger Makrophagen (Abb.9, Pfeil).



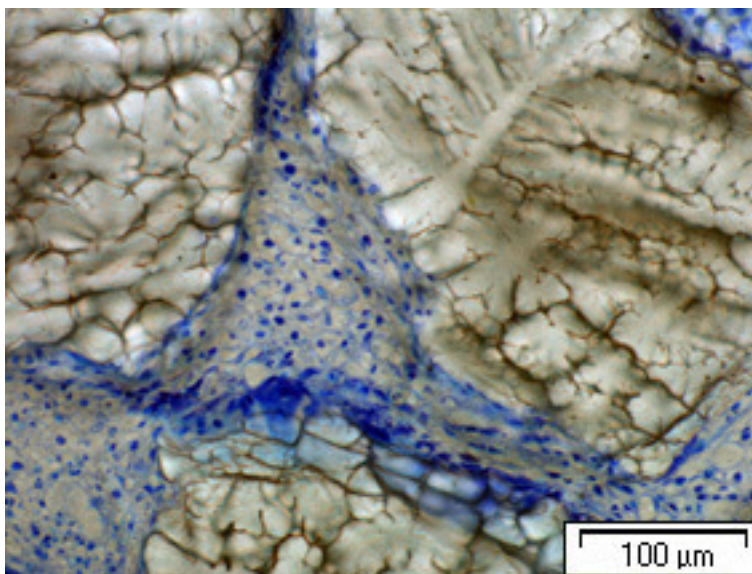
**Abb.9:** Lichtmikroskopische Aufnahme von 325i mit Makrophagen im Bereich der Partikel (Pfeil). In vGF, 20fache Vergrößerung.

Die Partikel wiesen eine gitternetzartige Binnenstruktur durch Ca-Deposition auf. Im Mittelpunkt der Partikel befand sich oftmals ein grauschwarz gefärbter Kern. Die Partikel waren von einem schwarzen Saum und dann wiederum von einem lila-bläulichen Band umgeben, was charakteristisch für die sich bildende Hydroxylapatitschicht (HA-Schicht) war. Sie erschienen in ihrer Form inhomogen und zeigten vereinzelt Abspaltungen und Aufspaltungen, wobei sich die abgespaltenen Stücke in schwarzer Färbung darstellten. Osteoid war selten und vorzugsweise am präexistenten Knochen vorzufinden. Das galt ebenso für Osteoklas-

ten in Howshipschen Lakunen, die häufig auftraten. Der präexistente Knochen wies einen dünnen schwarzgefärbten Saum auf. Anzeichen für entzündliche Infiltrate oder Anhäufungen entzündlicher Zellen waren nicht festzustellen.

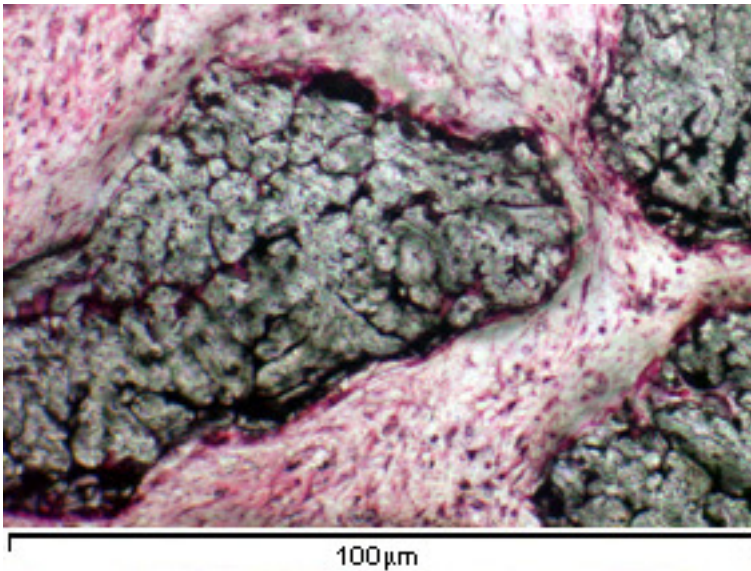
### **GB14**

Im Defekt befanden sich inhomogene, unscharf abgegrenzte Partikel mit umliegendem Organisationsgewebe und Koagel. Interpartikulär lag zellreiches, faserarmes Gewebe vor (Abb.10).



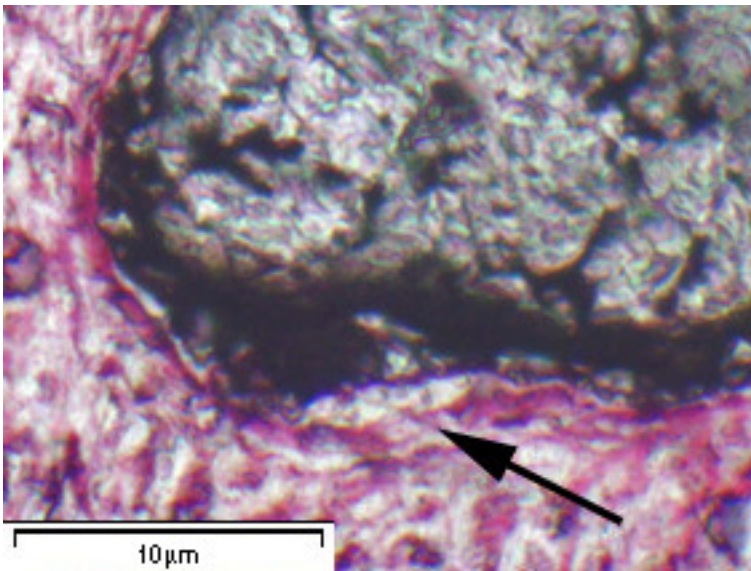
**Abb.10:** Lichtmikroskopische Aufnahme von GB14 mit zellreichem, faserarmem, interpartikulärem Gewebe. In vGF, 20fache Vergrößerung.

Zum Defektrand hin befand sich ein eher faserreiches, lockeres, jedoch zellreiches Gewebe, das von kapillären Einsprossungen durchsetzt war. Entzündliche Infiltrate waren nicht zu verzeichnen. Die Partikel wiesen in von Kossa-Paragon-Färbung (vKPF) eine durch schwarze und lila-bläuliche Linien abgegrenzte wabige Substruktur auf, die teilweise aufgespalten erschien. Das zeugte von Ca-Depositionen, die auch die Binnenstruktur erreicht hatten (Abb.11).



**Abb.11:** Präparat mit GB14-Partikeln nach einwöchiger Liegezeit mit Ca-Deposition (schwarze Linien) in den Substrukturen und zirkulär um die Partikel. In vKP-Färbung, 10fache Vergrößerung.

Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass sich interpartikulär schon vereinzelt Osteoidsäume an den Partikeln und am präexisten-ten Knochen zeigten (Abb.12).



**Abb.12:** Lichtmikroskopische Aufnahme von GB14 mit Osteoid (Pfeil) am Partikel (grau) und Ca-Anlagerungen (schwarze Zeichnungen), umgeben von jungem Organisationsgewebe. In vKPF, 40fache Vergrößerung.

In diesen Bereichen fanden sich auch verstärkt Osteoblasten, die zur Defektmitte hin abnahmen. Im Bereich der Kontaktzone zwischen ortständigem Knochen und Augmentat wurden geringfügig Osteoklasten vorgefunden.

Bei keinem der Materialien waren TRAP-positive Osteoklasten in Kontakt mit den Knochenersatzpartikeln zu beobachten.

### ***Autologer Knochen***

Die mit autologen Knochenspänen aufgefüllten Defekte waren, ähnlich den schon beschriebenen Präparaten, vorwiegend mit Exsudat und Koagel gefüllt. Im Zentrum des Defekts sah man in vKPF reichlich dunkel gefärbte Inseln, die Anhäufungen von applizierten Knochenspänen vermuten ließen. Bei stärkerer Vergrößerung wurde dies durch die angeschnittene lamelläre Strukturen deutlich. Der Defektrand war in vKPF dunkel bis schwarz gesäumt, was die beginnende Mineralisation verdeutlicht. Es gab keine Anzeichen für entzündliche Infiltrate. Makrophagen waren eher selten anzutreffen. Peripher überwog faser- und zellarmeres Gewebe. Es war kaum Osteoid und nur geringfügig lakunäre Resorption durch Osteoklasten feststellbar. Ebenso wenig waren randständige oder zentrale Knochenneubildungen zu sehen. Einzig kapilläre Einsprossungen waren insbesondere peripher zu verzeichnen.

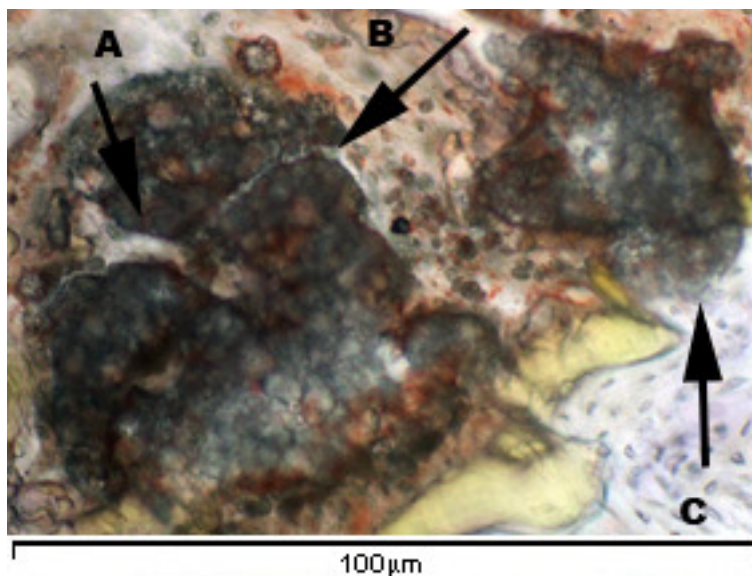
### ***Leerdefekt***

Der mit einem Kollagenschwamm stabilisierte, blutgefüllte Defekt war nach einer Woche durch überwiegend faser- und zellarmeres Exsudat gekennzeichnet. Der Defektrand war auch hier dunkel gesäumt und zeigte zum Teil Lakunen mit Osteoklasten. Es waren keine Entzündungszeichen zu sehen, jedoch vereinzelt Makrophagen auffindbar. Diffuse bindegewebige Strukturen im Defekt belegten das Vorhandensein des verwendeten Kollagenschwamms, der vom umliegenden Exsudat gut abgrenzbar war. Am ortständigen Knochen fanden sich vereinzelt Osteoidsäume. Knochenneubildungen waren nicht feststellbar.

### 3.1.2. nach 4 Wochen Liegezeit

#### $\beta$ -TCP

Im Defekt stellte sich nach 4 Wochen ein verändertes Verhältnis der Partikel und Gewebe untereinander dar. Es gab keine Anzeichen für entzündliche Infiltrate oder entsprechende Fremdkörperriesenzellen. Die interpartikulären Abstände schienen etwas größer, was der Resorption der Partikel zuzusprechen war. Das zentral liegende interpartikuläre Gewebe zeigte sich nun als junges, faser- und zellreiches Organisationsgewebe. Vom Defektrand her erstreckten sich erste Ausläufer jungen, ungerichteten Geflechtknochens nach zentral. Dieser war jedoch nur mäßig mineralisiert. Teilweise wiesen die randständigen Partikel Kontakt zu jenem Knochen auf. Das Auftreten von Osteoid häufte sich insbesondere am Defektrand und war eher selten an den Partikeln zu finden. Ebenso befanden sich reichlich Osteoblasten entlang des Defektrandes, waren aber auch an den Partikeln zu sehen. Die Partikel waren weniger von schwarz und lila gefärbten Linien gesäumt, brachen häufiger auf, waren nicht mehr scharf begrenzt und verloren ihre anfänglich sphärische Form. Diese Beobachtungen gaben einen Hinweis auf die bis zu diesem Zeitpunkt ablaufenden Degradations- und Resorptionsvorgänge.

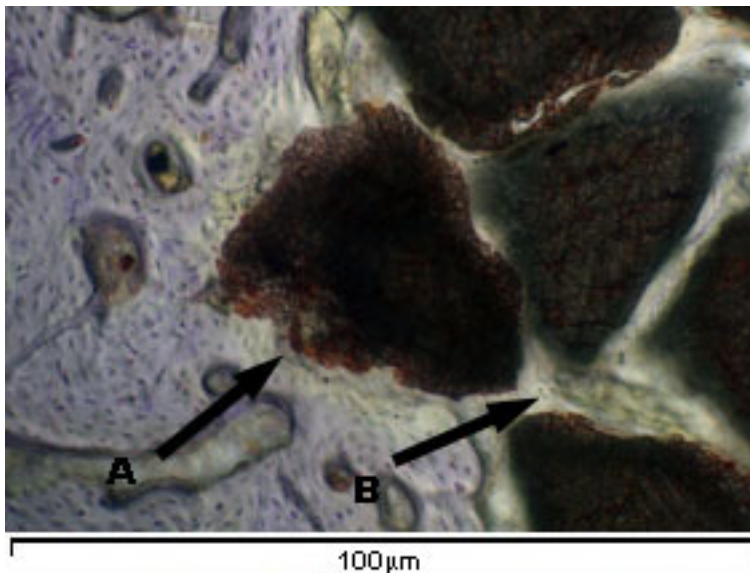


**Abb.13:** Immunhistologische Aufnahme von  $\beta$ -TCP nach 4 Wochen Liegezeit. Partikel mit Osteoid (A), Knochenkontakt (C) und Spaltbildung (B), Immunhistochemische Markierung von Kollagen I, Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 10fache Vergrößerung.



### **325i**

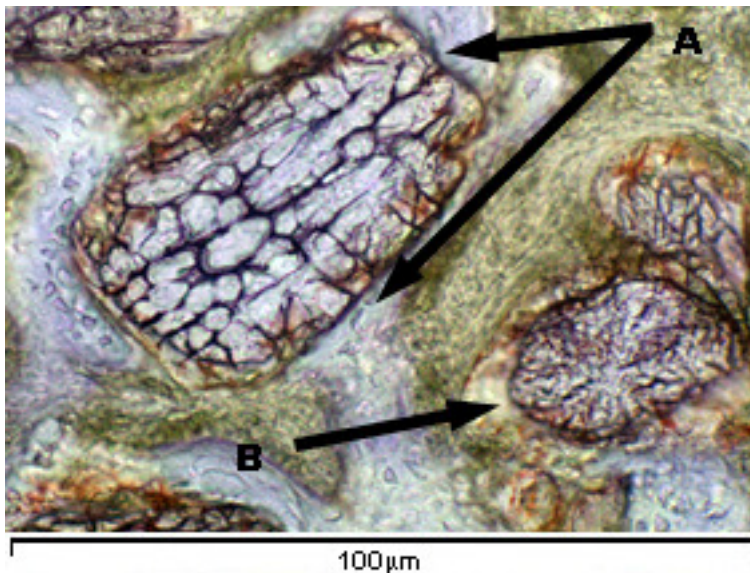
Es zeigte sich ein entzündungsfreier Defekt, größtenteils gefüllt mit jungem, lockeren, relativ zellarmen Organisationsgewebe. Die Partikel wirkten verkleinert, hauptsächlich jedoch in ihrem Aussehen unverändert. Vereinzelt zeigte sich eine brüchige, lila gefärbte Gitterstruktur in den Partikeln. Das bedeutet, dass intrapartikulär inzwischen auch Calcium appliziert wurde. Da die Ränder jetzt häufiger verschwommen, konnte von einer voranschreitenden Resorption ausgegangen werden. Noch immer waren dichte Kernstrukturen in einzelnen Partikeln zu erkennen. Ein kräftiger schwarzer Saum lag um die Partikel. Ähnlich dem Erscheinungsbild nach 1 Woche Liegezeit befanden sich Riesenzellen im Bereich der Partikel, waren jedoch nicht als TRAP-positive Zellen zu verifizieren. Hinweise oder Zeichen für resorptive und degradierende Vorgänge lagen sonst nicht vor. Es zeigten sich interpartikulär ähnlich dem  $\beta$ -TCP schwarze, streifige Züge. Vom präexistenten Knochen aus erwuchs nur spärlich junger, ungerichteter Geflechtknochen in Richtung der randständigen Partikel und stand auch teilweise in Kontakt mit diesen. Dennoch waren die Partikel größtenteils bindegewebig eingeschieden (Abb.14). Der Geflechtknochen war mäßig bis gering mineralisiert. Das vermehrte Auftreten von Osteoblasten verdeutlichte die nun verstärkten Knochenbildungsvorgänge. Osteoklasten waren am Defektrand noch immer häufig anzutreffen.



**Abb.14:** Lichtmikroskopische Aufnahme von 325i mit Partikeln umgeben von Bindegewebe (B) und einstrahlendem Knochen mit leichtem Kontakt zum Partikel (A). Immunhistologische Markierung von Kollagen I, Gegenfärbung Mayers-Hämatoxylin, 10fache Vergrößerung.

#### **GB14**

Nach 4 Wochen wurde ein beeindruckender Wandel der Defektstruktur sichtbar. In der Übersicht deutet sich schon eine starke Zunahme osseären Gewebes an, was sich in der detaillierten Ansicht eindrucksvoll bestätigt. Die Partikel zeigten ein in ihrer Größe verkleinertes, polymorphes und inhomogenes Aussehen. Sie waren von innen her schon stark degradiert, zeigten Zonen der Auslaugung und kristalline Strukturen mit vereinzelt auftretenden Taschen (Abb.15). Ihre schon vorher beschriebene Gitterstruktur war jetzt deutlich ausgeprägt. Die gitterbildenden, lilafärbten Linien waren sehr breit. Fast alle Partikel besaßen mehr oder weniger intensiven Kontakt zum Knochen und waren häufig von Osteoid und Osteoblasten umsäumt.



**Abb.15:** Lichtmikroskopische Aufnahme von GB14 nach 4 Wochen Liegezeit, Partikel mit deutlichem Knochenkontakt (A) und Zonen der Auslaugung (B). Immunhistologische Markierung von Osteopontin (OP), Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 10fache Vergrößerung.

Osteoklasten waren selten und nur am präexistenten Knochen nachweisbar. Vom Defektrand aus strahlte teils lamellärer, nach oral verstärkt geflechtartiger Knochen in das Augmentat ein. Beide, sowohl lamellärer als auch Geflechtknochen, wiesen eine gute Mineralisierung der Trabekelränder auf. Am Defektrand waren erste Ausbildungen von Osteonen erkennbar. Generell herrschte in den Präparaten nach 4 Wochen Liegezeit eine starke Mineralisierung vor, sich sowohl als breites dunkles Band am Defektrand als auch am neu gebildeten Knochen darstellend. Ansonsten findet man in den restlichen Bereichen des Defekts eher zellarmes, faserreiches und gut vaskularisiertes Organisationsgewebe vor.

Bei keinem der Materialien werden TRAP-positive Osteoklasten in Kontakt mit den Knochenersatzpartikeln beobachtet.

### ***Autologer Knochen***

Zum jetzigen Untersuchungszeitpunkt kam es zu einer deutlichen Zunahme knöchernen Gewebes, das vom Defektrand nach zentral einstrahlte, jedoch noch nicht den kompletten Defekt durchsetzte. Nach zentral-oral änderte sich die Gewebequalität, so dass hier vorwiegend junges, unspezifisches und zellreiches Gewebe vorzufinden war. Der

linguale Randbereich war durch parallelfaserige Anordnungen des jungen Gewebes charakterisiert. Die schon nach einer Woche festgestellten dunkel umsäumten Inseln waren nach vier Wochen wesentlich stärker gesäumt und auch dunkler gezeichnet. Lakunäre Resorptionen traf man nun vermehrt an, Osteoid und Osteoblasten hingegen weniger häufig. Der gesamte Defekt war frei von entzündlichen Infiltraten.

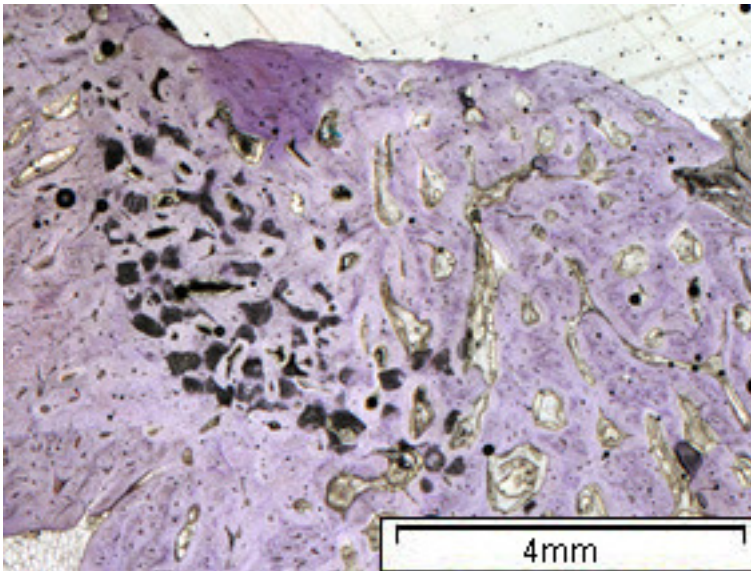
### ***Leerdefekt***

Der Defekt war auch nach vier Wochen fast ausschließlich bindegewebig durchsetzt. Bei Vergrößerung zeigte sich in erster Linie junges, ungerichtetes und zellreiches Gewebe. Ausschließlich randständig waren erste knöcherne Einsprossungen zu erkennen, sowie vereinzelt knöcherne Zellen. Entzündliche Veränderungen gab es nicht. Ebenso waren Makrophagen eher spärlich anzutreffen.

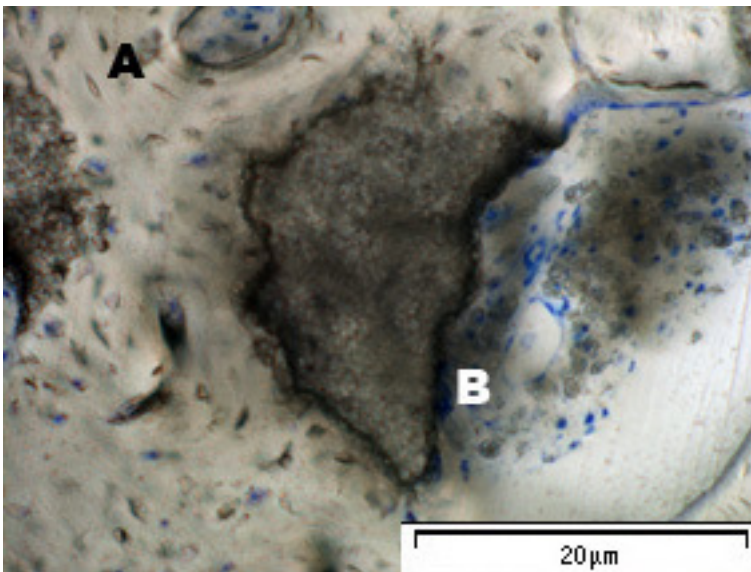
### **3.1.3. nach 12 Wochen Liegezeit**

#### ***$\beta$ -TCP***

Das Gewebeverhältnis hat sich deutlich zugunsten des Knochens verändert. Jedoch persistierten noch immer reichlich Partikel, die inzwischen eine eher amorphe Form angenommen, aber dennoch ihre Substrukturen beibehalten haben. Es waren keine Auslaugungszonen oder Taschenbildungen erkennbar. Resorptive Vorgänge waren im Bereich der wenigen Osteoidsäume um die Partikel herum feststellbar. Der Defekt war moderat von Knochenlamellen durchsetzt, die in Kontakt mit den zum Teil degradierten Partikeln standen.



**Abb.16:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme von  $\beta$ -TCP nach 12 Wochen Liegezeit mit persistierenden Partikeln (schwarz). Immunhistologische Markierung von Osteopontin (OP), Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 2,5fache Vergrößerung.

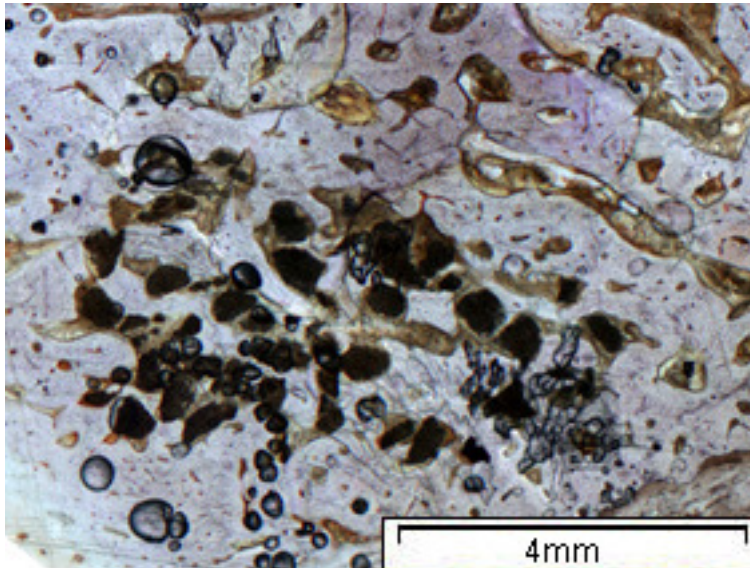


**Abb.17:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines Partikels mit Degradationszone und calciumreicher Schicht (B) der von Knochen (A) umgeben ist. In vGF, 20fache Vergrößerung.

Anhand der vKPF erschien die Mineralisation mäßig bis gut. Nur selten waren Osteoklasten im Bereich des präexistenten Knochens zu sehen. Die restlichen Defektabschnitte waren durchsetzt von straffem, zellarmem, kollagenem Bindegewebe, welche keine Hinweise auf entzündliche Infiltrate aufwiesen.

### 325i

Nach 12 Wochen dominierten noch immer bindegewebige Strukturen im Defekt, der reichlich persistierende Partikel besaß (Abb.18).



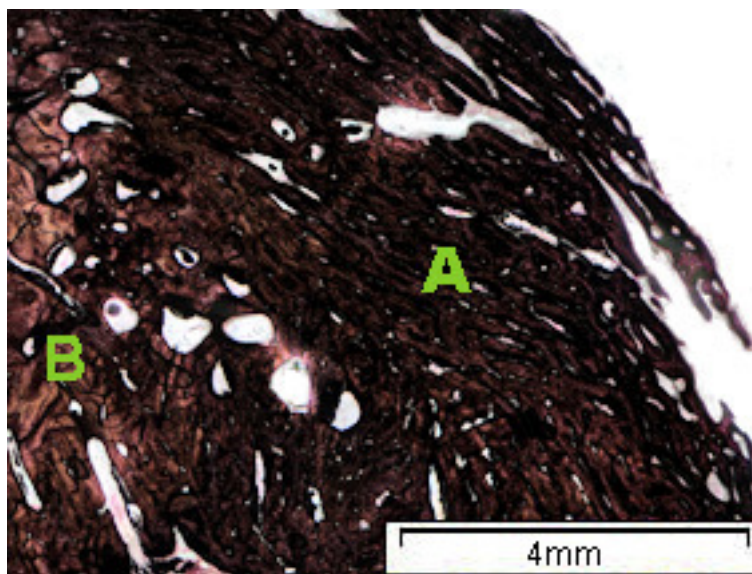
**Abb.18:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme von persistierenden Partikeln bei 325i nach 12 Wochen Liegezeit. Immunhistologische Markierung von OP, Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 2,5fache Vergrößerung.

Dieses Gewebe war locker und faserreich. Zellreiche Areale wechselten sich mit zellarmen Arealen ab. Entzündungszeichen waren nicht erkennbar. Makrophagen kamen in sehr geringem Maße vor. Vom Defekttrand her verlief geflechtartiger Knochen in Richtung Partikel und inserierte hier scheinbar in der Binnenstruktur. Einige versprengte knöcherne Inseln befanden sich auch interpartikulär. Ein direkter Kontakt zwischen neu gebildetem Knochen und Partikeln bestand kaum. Die Partikel waren in ihrer Form verkleinert, wirkten homogen und zeigten noch immer wabig-gitternetzartige Substrukturen, deren Linien, im Vergleich zu den Präparaten nach 4 Wochen, stark verbreitet waren. Diese Linien waren bläulich gefärbt, was für eine verstärkte Gewebedurchsetzung spricht. Der im Vergleich zu den Präparaten nach 4 Wochen Liegezeit breite schwarze Saum war nur noch vereinzelt anzutreffen. Osteoid und Osteoblasten waren geringfügig im Bereich der Partikel zu sehen und säumten verstärkt den Defektrand. Wie unter Abschnitt 3.1.2. beschrie-

ben, fanden sich auch zu diesem Zeitraum Partikel mit Ausbuchtungen, in denen nun eher Osteoblasten anzutreffen waren. Die Mineralisation war am präexistenten Knochen gut und nach zentral im Bereich des ungerichteten, neu gebildeten Knochens eher moderat. Der vom Defekt-rand kommende trabekuläre, teilweise lamelläre Knochen war ebenfalls am Rand gut mineralisiert.

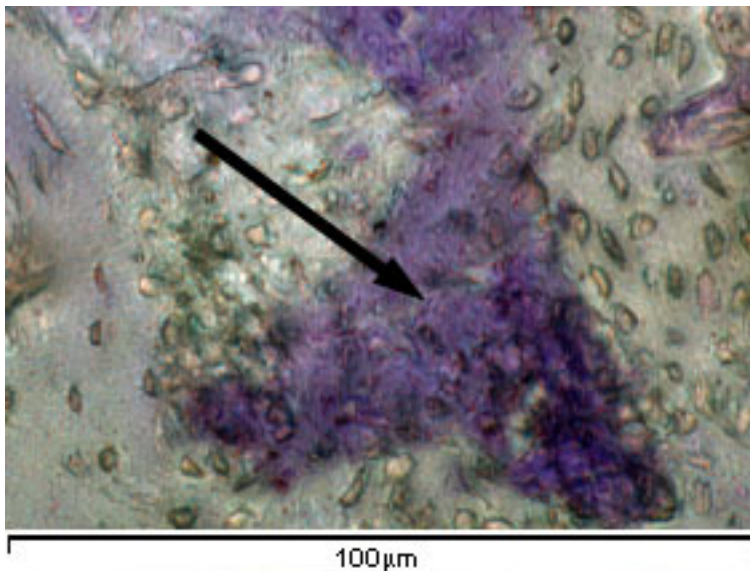
#### **GB14**

Das komplett von Knochen durchwachsene Augmentat zeigte nach oral noch deutlich Bereiche mit größeren Markräumen.



**Abb.19:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme nach 12 Wochen Liegezeit bei GB14. Der Defekt (A) ist durchweg von neugebildetem Knochen gefüllt der sich nur vom ortständigen Knochen (B) unterscheiden lässt. In vKPF, 2,5fache Vergrößerung.

Nur an ganz vereinzelt Stellen waren degradierte Partikelreste sichtbar, welche vollständig in den neu gebildeten Knochen integriert und von ihm durchsetzt waren. Bei stärkerer Vergrößerung zeigten sich konzentrische Anhäufungen von Osteoblasten, die den Bereich anfangs befindlicher, inzwischen vollständig resorbierter Partikel vermuten ließen.



**Abb.20:** Histologische Aufnahme einer Osteoblastenhäufung (Pfeil) im Bereich (lila) eines fast vollständig resorbierten Partikels nach 12 Wochen Liegezeit. Immunhistologische Färbung von Osteocalcin (OC), Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 10fache Vergrößerung.

Der Defekt war durchsetzt von trabekulärem, lamellärem Knochen, der nach oral vereinzelt in jungen Geflechtknochen überging. Beginnend vom Defektrand waren deutlich Bildungen von Osteonen und Havers'schen Kanälen zu erkennen. Am Rande der neu gebildeten Knochen trabekel waren teilweise Osteoidsäume mit Osteoblasten an der Oberfläche sichtbar. Das veranschaulicht den Prozess der zunehmenden Verdichtung des neu gebildeten Knochens durch Apposition nach 12 Wochen. Osteoklasten wurden sehr selten beobachtet. Der neu gebildete, junge Knochen war besonders entlang der lamellären Strukturen stark mineralisiert.

Auch nach 12 Wochen wurden bei keinem der Präparate TRAP-positive Osteoklasten in Kontakt mit den Knochenersatzpartikeln gesehen.

### ***Autologer Knochen***

Das Gewebeverhältnis hat sich erheblich zugunsten des Knochens verändert, der noch stark von markhaltigen Bereichen durchsetzt war. Nach oral befanden sich vereinzelt bindegewebige Inseln, die sehr zellreich waren. Der vom Defektrand her einstrahlende Knochen war gesäumt von Osteoid und wies einen breiten, dunkelbraun bis schwarz gefärbten Saum auf, der einen großen Bereich des gesamten Defekts



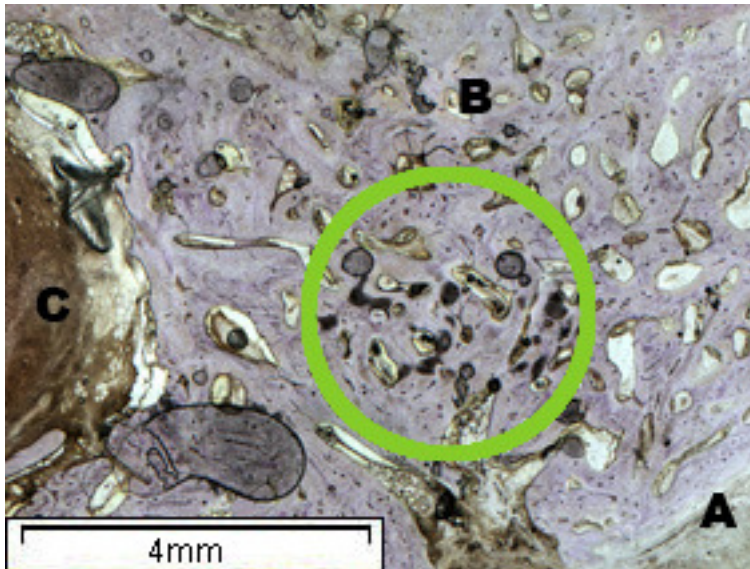
durchsetzte. Osteoklastäre Resorption in Lakunen waren nur vereinzelt auszumachen. Der neu gebildete Knochen im Bereich des ortsständigen Knochens beeindruckte durch erste Ausbildungen von Osteonen und Havers'schen Systemen. Auch zu diesem Zeitpunkt konnten keine Entzündungszeichen festgestellt werden.

### ***Leerdefekt***

Im Vergleich zu den beschriebenen Beobachtungen nach 4 Wochen Liegezeit haben sich die Gewebeverhältnisse zwar merklich gewandelt, schienen aber dennoch mehr bindegewebiger Natur zu sein. In vKPF stellten sich dunkelgefärbte streifige Züge von peripher kommend dar, die sich mit parallelfaserigen, zellarmen Kollagenanordnungen abwechselten. Randständig fanden sich gehäuft Lakunen mit osteoklastären Resorptionen. Osteoid und Osteoblasten waren eher moderat und vorzugsweise im Bereich der trabekulären, knöchernen Einsprossungen am Defektrand anzutreffen. Nach zentral nahm die Anzahl an Fibroblasten zu. Ebenso kam es zu einer klar erkennbaren Zunahme an Kapillaren. Makrophagen traten eher nach zentral-oral auf. Entzündliche Infiltrate waren nicht auszumachen.

### 3.1.4. nach 24 Wochen Liegezeit

#### $\beta$ -TCP

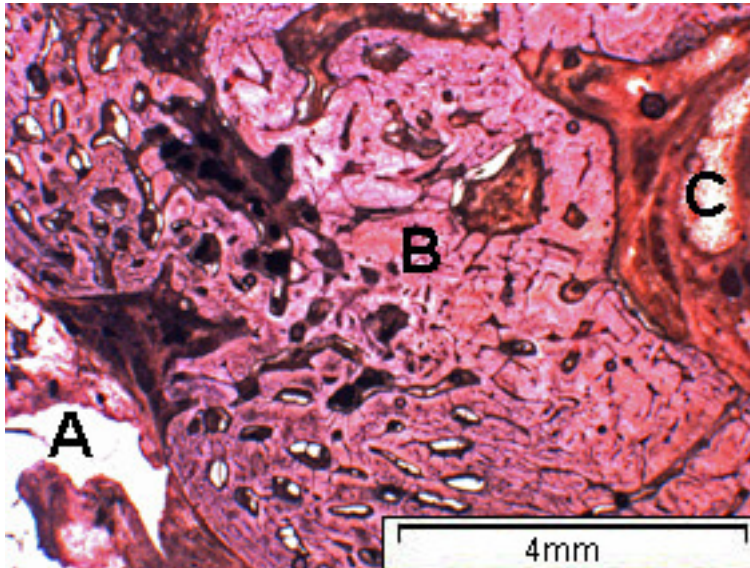


**Abb.21:** Lichtmikroskopische Defektübersicht von  $\beta$ -TCP nach 24 Wochen Liegezeit. Das Bild gliedert sich in orale Begrenzung (A), Defekt (B) und Canalis mandibularis mit Nervus mandibularis (C). Die persistierenden Partikel (grüner Ring) liegen verstärkt in der Defektmitte. Immunhistologische Färbung von OP, Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin, 2,5fache Vergrößerung.

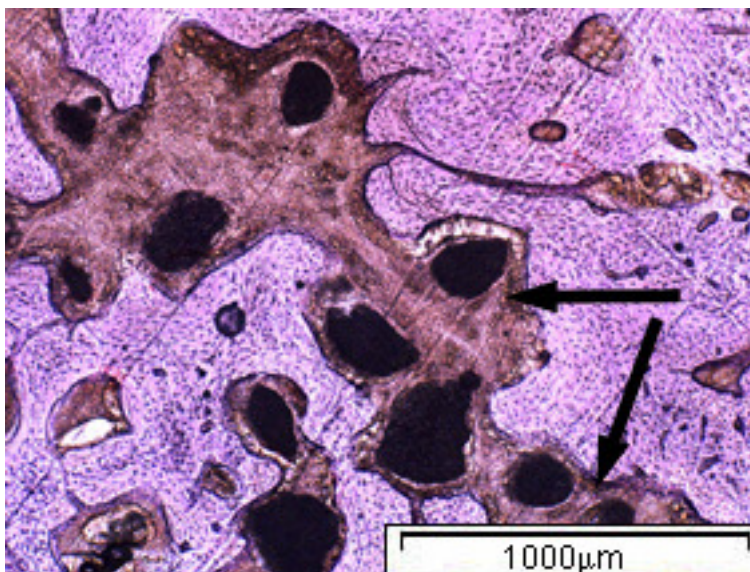
Nach 24 Wochen zeigte sich ein fast vollständig von Knochen durchbaur Defekt. Präexistenter und neu gebildeter Knochen waren noch gut voneinander zu unterscheiden. Vom Defektrand her erstreckten sich vorwiegend Schaltlamellen und trabekuläre Strukturen nach oral. Defektrandständig waren eher Osteone anzutreffen, die ein schon gut ausgebildetes Havers'sches System aufwiesen. Die Peripherie der Schaltlamellen erscheint in vKPF stark mineralisiert. Partikelreste waren noch vereinzelt vorhanden (Abb.21). Sie zeigten jedoch keine Hinweise auf eine voranschreitende Resorption und lagen zum Teil einfach nur von Knochen eingebettet im Defekt. In den von zentral nach oral befindlichen Markräumen verweilten ebenso Absprengungen von Partikeln, die von Markgewebe oder von Bindegewebe umgeben waren. Osteoblasten und Osteoid kamen eher im Randbereich der Trabekel vor. Osteoklasten waren nur selten zu sehen.

### 325i

Der ehemalige Defekt war durch die große Menge noch vorhandener Partikel leicht auszumachen. Sie wirkten verkleinert, jedoch weiterhin homogen in ihrer engmaschigen, gitternetzartigen Struktur.



**Abb.22:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme von 325i nach 24 Wochen Liegezeit. Die Übersicht unterteilt sich in orale Begrenzung, (A) Defekt (B) und Nervus mandibularis (C). Immunhistologische Markierung von OC, Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin. 2,5fache Vergrößerung.

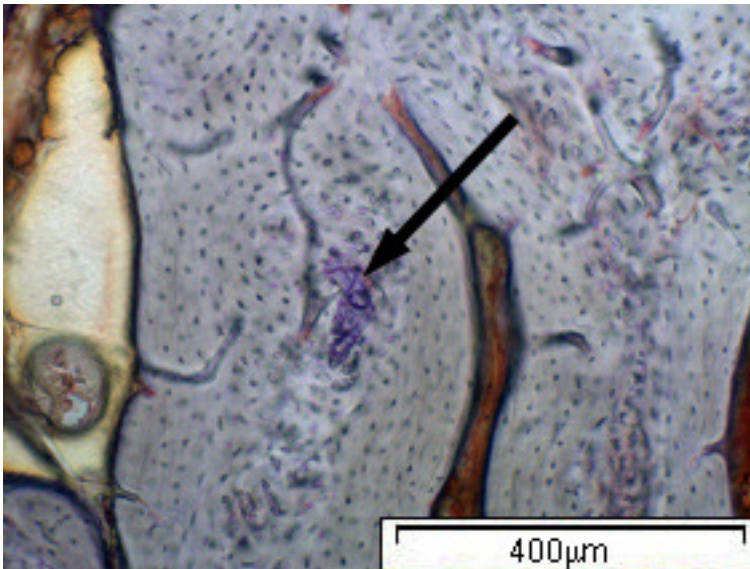


**Abb.23:** Lichtmikroskopische Aufnahme von 325i-Partikel, die von Bindegewebe umsäumt waren (Pfeil). Immunhistologische Markierung von OC, Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin. 4fache Vergrößerung.

Insgesamt wiesen die Partikel einen hohen Anteil an Bindegewebskontakten auf (Abb.23). Auch zu diesem Zeitpunkt war ein feiner blau-lila Saum feststellbar. Der neu gebildete Knochen dominierte. Dennoch war reichlich zellarmes Bindegewebe im Defekt auszumachen. Es gab auch hier keine Anzeichen für entzündliche Prozesse. Osteone waren nicht erkennbar. Einige trabekuläre Strukturen zogen vom Defektrand kommend nach oral und waren geringfügig von Osteoblasten und Osteoid gesäumt. Der Knochen zeigte in vKPF nun ebenfalls eine gute Mineralisierung.

#### **GB14**

Im Hinblick auf die beeindruckenden Beobachtungen nach 12 Wochen waren nach 24 Wochen nur noch geringe Veränderungen zu verzeichnen, die auf eine weitere Reifung des Knochens hindeuteten. Der durchweg von Knochen durchsetzte Defekt konnte dennoch vom prä-existenten Knochen gut differenziert werden. Es zeigten sich vorzugsweise trabekuläre und lamelläre Strukturen und defektrandständige Osteone. Partikelreste waren bei nur wenigen Präparaten und in sehr geringer Menge aufzufinden. Diese meist stark ausgelaugten Gerüstreste von Partikeln waren vollkommen in das Knochengewebe eingebaut und von ihm durchsetzt (Abb.24).



**Abb.24:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines GB14-Partikels (Pfeil) nach 24 Wochen Liegezeit, der komplett von neugebildetem Knochen durchsetzt und von Osteoblasten umsäumt ist. Immunhistologische Markierung von Osteonectin (ON), Gegenfärbung mit Mayers-Hämatoxylin. 10fache Vergrößerung.

Die Anzahl der osteoblastären Zellhäufungen an Orten vorher befindlicher Partikel hatten abgenommen. Die lamellären Strukturen waren umgeben von langgestreckten Osteoidsäumen und reichlich Osteoblasten, so dass hier weiterhin verstärkt mit Knochenumbauvorgängen zu rechnen war. Auch zu diesem Zeitpunkt waren keine Osteoklasten zu finden. Die breiten, schwarzen Bänder um die trabekulären Strukturen waren nicht mehr zu erkennen, da der Knochen inzwischen gereift war. Anzeichen für entzündliche Prozesse gab es nicht.

### ***Autologer Knochen***

Der Defekt war nun komplett von neu gebildetem Knochen durchzogen. Großlumige Markräume erstreckten sich verstärkt zwischen den trabekulären Strukturen. Nach oral befand sich ein dünner bindegewebiger Saum, der als gingivales Gewebe zu identifizieren war. Der Defekt wies in der Übersicht eine von oral kommende, muldenförmige Vertiefung auf, die als eine Art Schrumpfung der Defektoberfläche nach zentral anzusehen ist. Der junge neu gebildete Knochen hob sich durch seine intensive dunkle Färbung vom ortsständigen „alten“ Knochen sichtbar ab. Osteone und Havers'sche Systeme waren zum Rand hin größtenteils sehr gut ausgeprägt. Nach zentral verstärkte sich das Auftreten

von Osteoid, jedoch in geringer Ausprägung im Vergleich zur Liegezeit nach 12 Wochen.

### ***Leerdefekt***

Nach 24 Wochen dominierten bindegewebige und markhaltige Strukturen im Defekt. Erst jetzt kommt es zur Ausbildung von Osteonen und knöchernen Lamellen. Der einstrahlende, neu gebildete Knochen war in vKPF gut mineralisiert, jedoch sehr einfach vom ortsständigen Knochen abgrenzbar. Osteoidsäume befanden sich bevorzugt an den einstrahlenden Lamellen. Anzeichen für entzündliche Veränderungen im Defekt kamen nicht vor.

## **3.2. Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung**

Es wurden pro Material und Liegezeit rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerung ausgewertet, die als Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Beobachtungen genutzt wurden. Innerhalb der dargestellten Bilder sind Beschriftungen in abgekürzter Form zu finden. Diese gelten ausschließlich für den Ergebnisteil der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung.

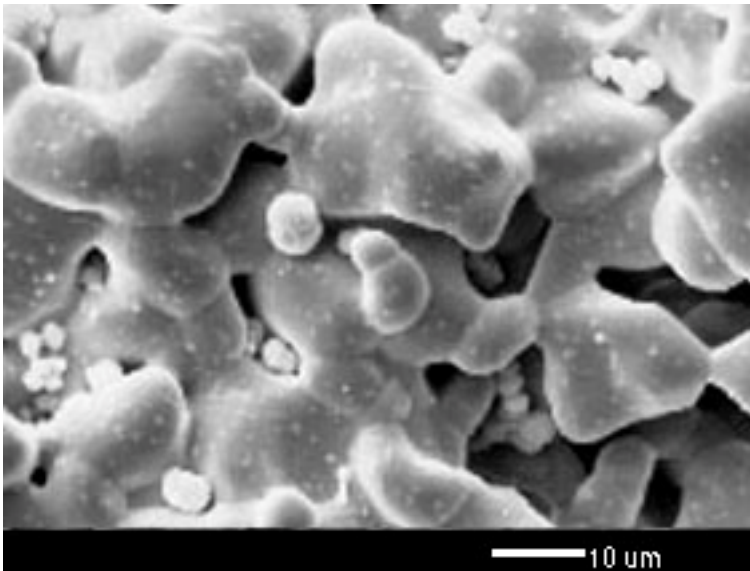
### **Legende:**

**K** – Knochen, **F** – Fasergeflecht, **P** - Partikel

### **3.2.1. Ausgangspartikel**

#### ***$\beta$ -TCP***

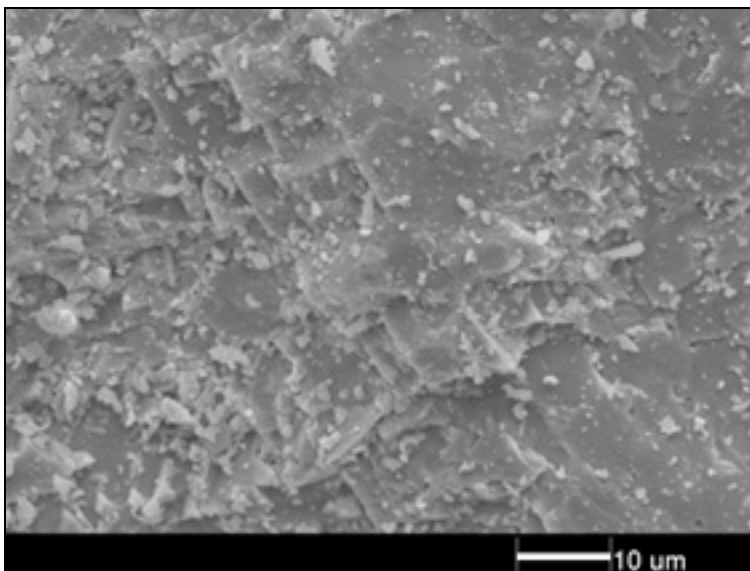
Das Material war charakterisiert durch ein korallenartig, dreidimensional wirkendes Relief mit hoher Anzahl an Mikroporositäten, erschien aber dennoch sehr homogen. Die Oberfläche der tropfen- und schwammartigen Gebilde machte einen homogenen Eindruck. Mikropartikuläre Versprengungen lagen diffus auf den Partikeln und in deren Porositäten (Abb.25).



**Abb.25:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Ausgangspartikels von  $\beta$ -TCP vor der Augmentation bei 1000facher Vergrößerung.

### **325i**

Die Partikel zeigten in der Übersicht eine scharfkantige, ungleichmäßige Geometrie. Die Oberfläche wirkte rau aber relativ homogen.

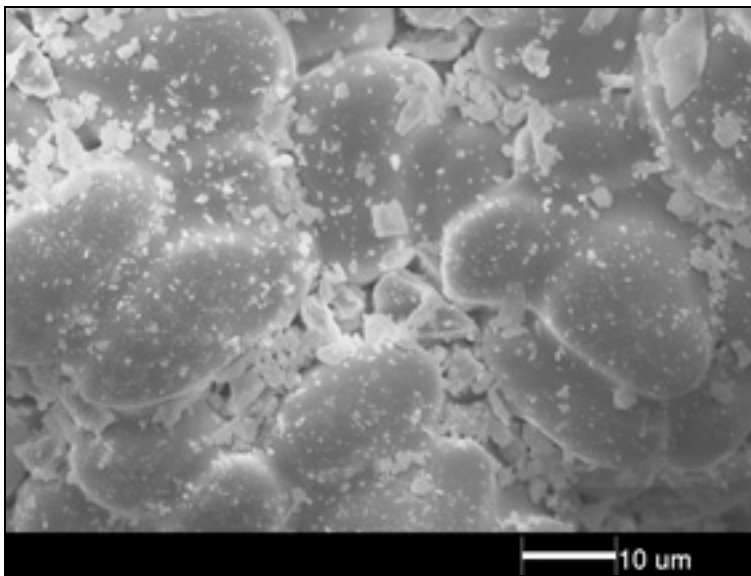


**Abb.26:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Ausgangspartikels von 325i vor der Augmentation bei 1000facher Vergrößerung.

Porositäten waren nicht zu erkennen. Bei 1000facher Vergrößerung stellte sich die Oberfläche, der ca. 1-2µm große Fragmente auflagen, gleichmäßig rau strukturiert dar.

### **GB14**

Bei 100facher Vergrößerung sah man teils sphärisch, teils scharfkantig geformte Partikel. Die Oberfläche war bei diesen Partikeln vorwiegend homogen und mit einer Vielzahl kleiner Wölbungen konstituiert. Diese Wölbungen stellten sich bei 1000facher Vergrößerung als kleine, eng aneinander liegende kugelförmige Erhebungen dar, die sehr glatt erschienen und die Oberfläche deutlich größer wirken ließen. Es fanden sich auch bei GB14 1-2µm kleine Fragmente auf der Partikeloberfläche, die jedoch eher diffus und unkontrolliert verteilt waren.



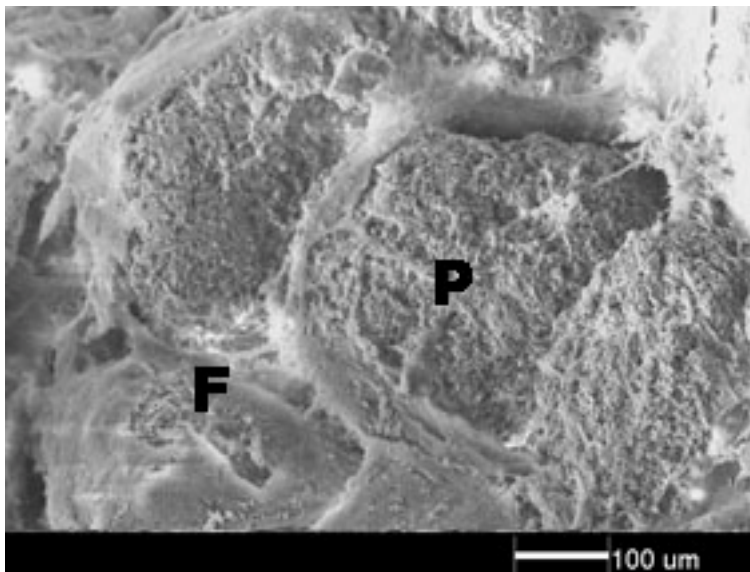
**Abb.27:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Ausgangspartikels von GB14 vor der Augmentation bei 1000facher Vergrößerung.



### 3.2.2. nach 1 Woche Liegezeit

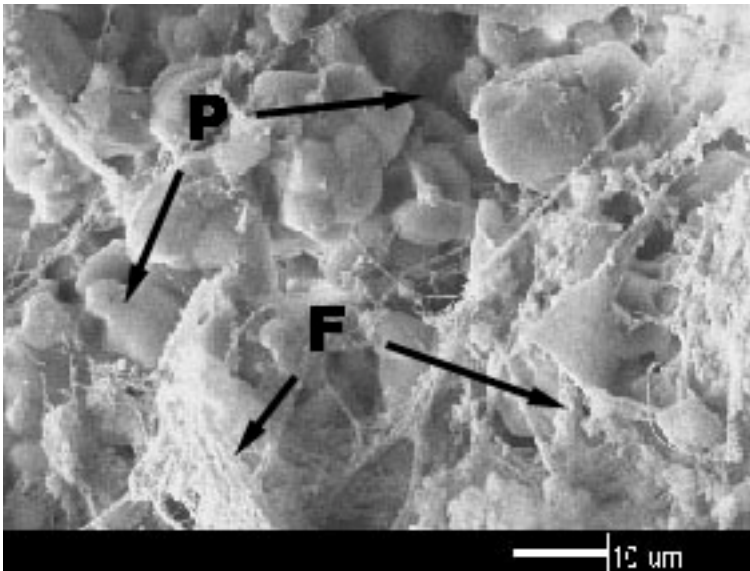
#### *$\beta$ -TCP*

Die eng beieinander liegenden Partikel ragten scheinbar unverändert, ohne Anzeichen von Resorptionen, aus der Oberfläche des Defektes hervor. Sie waren interpartikulär von Granulationsgewebe und jungem ungerichteten Organisationsgewebe getrennt.



**Abb.28:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Die Partikel (P) waren ausschließlich von Fasernetzwerk (F) umspannt. 100fache Vergrößerung.

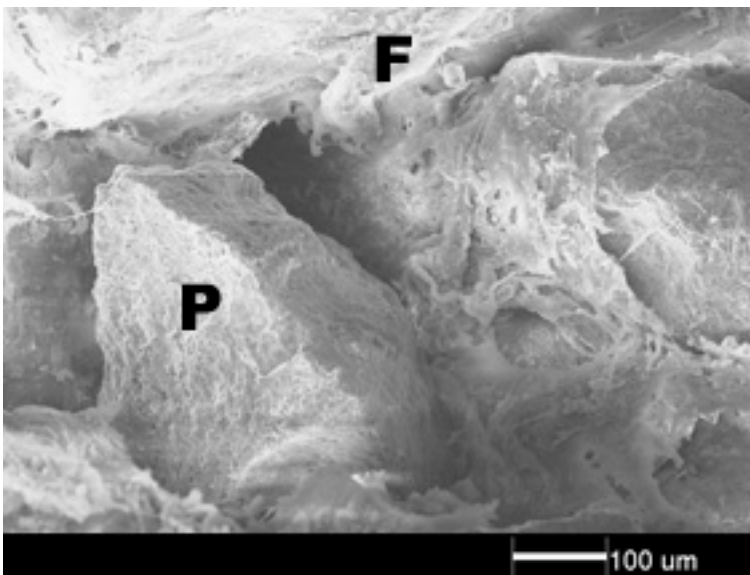
Die Oberflächenstruktur der Partikel hatte sich nicht wesentlich verändert, auch fanden sich keine Anzeichen für resorptive Vorgänge. Ein diffus wirkendes Fasernetzwerk spannte sich über die Partikel, wobei ein Vordringen in tiefere Substrukturen scheinbar noch nicht stattgefunden hatte (Abb.29).



**Abb.29:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Die Partikel (P) waren spinnengewebsartig von Fasergeflecht (F) umspannt. 1000fache Vergrößerung.

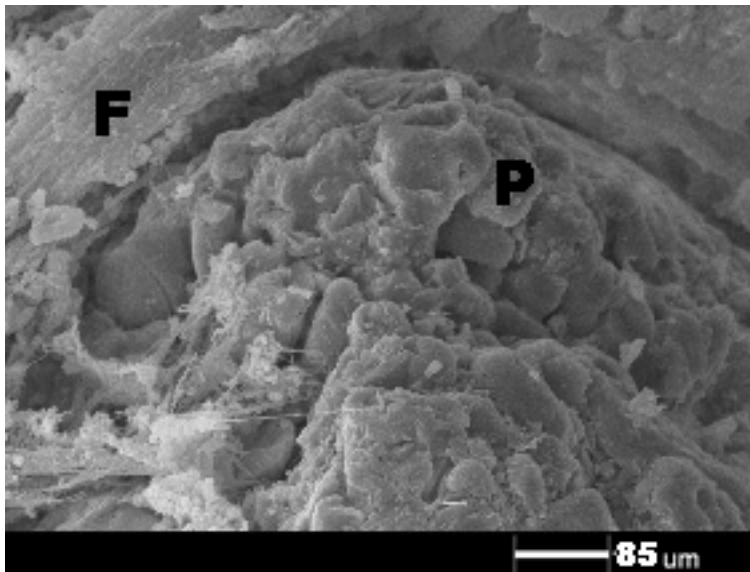
### **325i**

Dem bei  $\beta$ -TCP beschriebenen Aussehen ähnlich ragten die scharfkantig und rau wirkenden Partikel, die ihre ursprüngliche Form beibehalten hatten, aus der Defektoberfläche. Die interpartikulären Räume schienen eher geringfügig von fibrösem Organisationsgewebe ausgefüllt zu sein (Abb.30).



**Abb.30:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Es waren Partikel (P) und Fasergeflecht (F) zu erkennen. 100fache Vergrößerung.

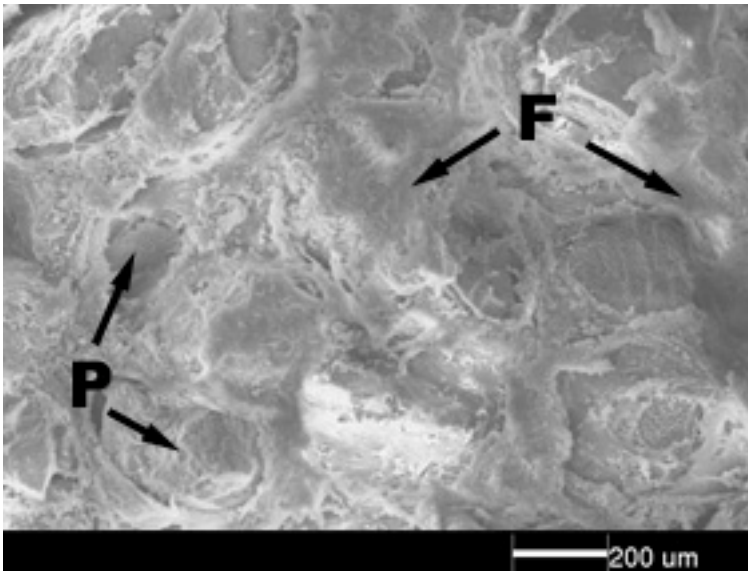
Bei 850facher Vergrößerung wirkte die Partikeloberfläche zerklüftet und inhomogen. Teilweise traten kristallartige Ablagerungen auf, die scheinbar in Kontakt zu fibrillären Strukturen standen. Es schien als würden diese Fibrillen in oberflächennahe Substrukturen inserieren. Anzeichen für vorangeschrittene Resorptionen oder Degradationen kamen nicht vor (Abb.31).



**Abb.31:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Es waren Partikel (P) und Fasergeflecht (F) zu erkennen. 850fache Vergrößerung.

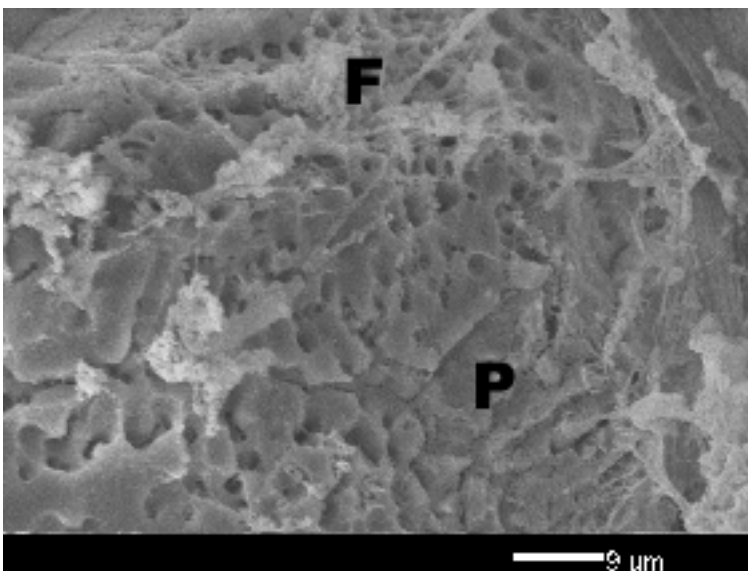
#### **GB14**

Die dicht liegenden Partikel waren gesäumt und umspannt von jungem ungerichteten Organisationsgewebe. Die Oberfläche erschien bei 50facher Vergrößerung eher rau. Die interpartikulären Bereiche waren größtenteils von sich organisierendem Granulationsgewebe durchsetzt (Abb.32).



**Abb.32:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Es waren Partikel (P) und Fasergeflecht (F) zu erkennen. 50fache Vergrößerung.

Bei stärkerer Vergrößerung präsentierte sich eine zerklüftete, von kommunizierenden Poren geprägte Oberfläche, die schon erste lakunäre Resorptionsbereiche aufwies. Kristallartige Gebilde saßen den Partikeln eher ungleichmäßig auf und standen in Kontakt zu fibrillären Strukturen, die ihrerseits wiederum in die Oberfläche und deren Substrukturen zu inserieren schienen (Abb.33).

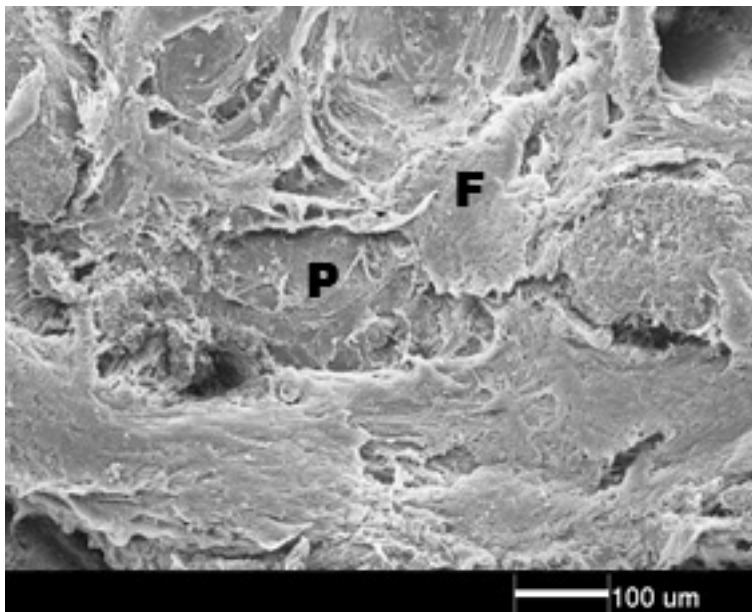


**Abb.33:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 1 Woche Liegezeit. Ansicht der Partikelflächen (P) im Fasergeflecht (F). 1100fache Vergrößerung.

### 3.2.3. nach 4 Wochen Liegezeit

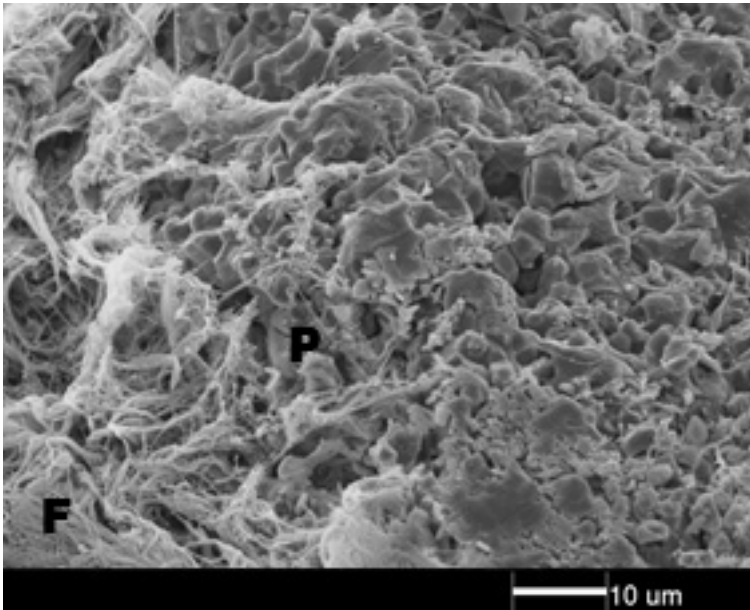
#### $\beta$ -TCP

Bei 100facher Vergrößerung stellten sich von jungem Bindegewebe umschlossene Partikel dar. Das Bindegewebsgeflecht erschien hierbei eher den Partikeln aufliegend als direkt mit diesen in Kontakt stehend oder gar inserierend (Abb.34).



**Abb.34:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 4 Wochen Liegezeit. Der Faserapparat umschließt den Partikel fast vollständig. 100fache Vergrößerung.

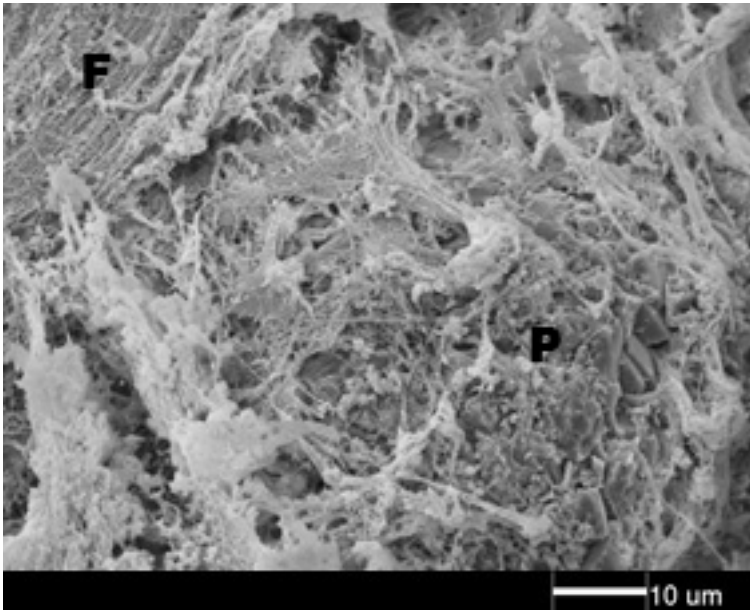
Die Detailansicht bei 1000facher Vergrößerung verdeutlicht eine zerklüftete, jedoch gleichmäßig strukturierte Partikeloberfläche mit einer großen Anzahl kleiner kugelartiger Erhebungen. Dazwischen fanden sich keine sichtbaren organischen Strukturen. Diese befanden sich vorwiegend peripher und schienen teils oberflächlich zu inserieren (Abb.35).



**Abb.35:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 4 Wochen Liegezeit. Die zerklüftet wirkende Oberfläche eines Partikels (P) mit strukturierter wirkenden Fasern. 1000fache Vergrößerung.

### **325i**

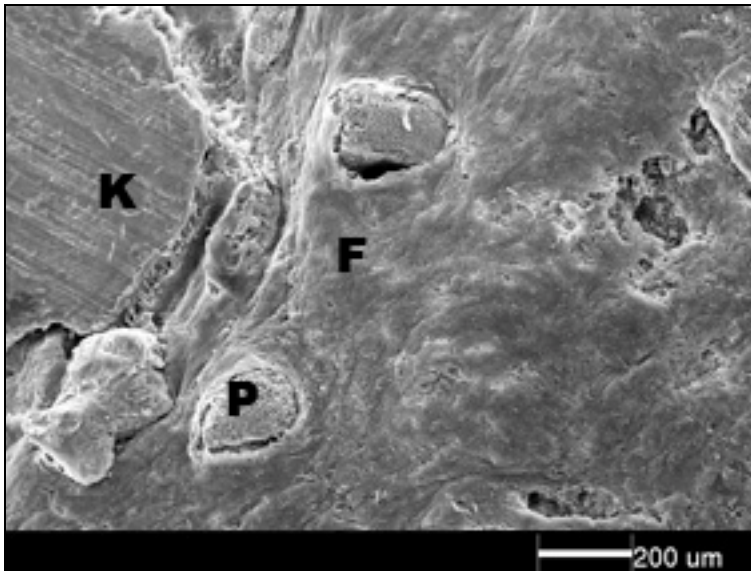
Bei der Betrachtung der Abb.36 präsentierte sich ein nahezu identisches Bild im Vergleich zu  $\beta$ -TCP. Erkennbar waren Partikel, umschlossen von diffus wirkenden kollagenen Fasern und Fibrillen, die jedoch keine Verzahnung mit dem Partikel aufwiesen. Die detaillierte Darstellung hingegen zeigte ein relativ dichtes Fasernetz auf den Partikel, das dennoch oberflächlich blieb und nicht in die Binnenstruktur inserierte.



**Abb.36:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 4 Wochen Liegezeit. Sich organisierendes Fasergeflecht (F) ist auf der Partikeloberfläche (P) zu erkennen. 1000fache Vergrößerung.

#### **GB14**

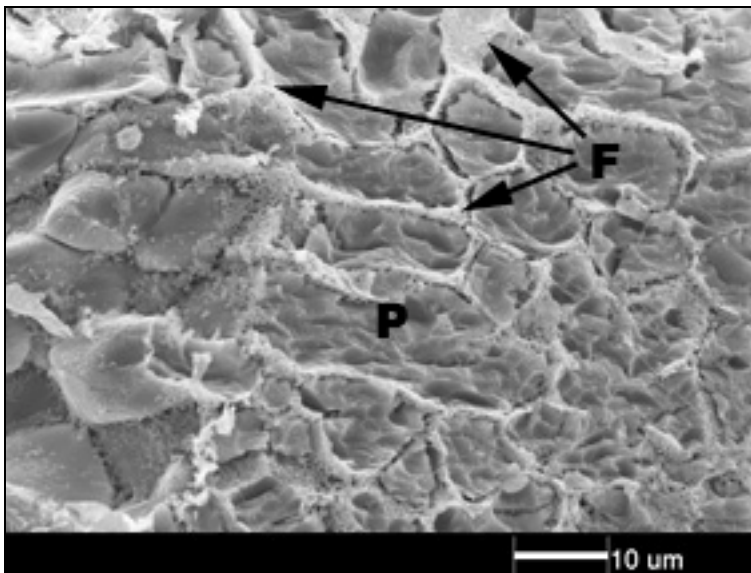
Das interpartikuläre Gewebe sieht im Vergleich zu den anderen Materialien reifer und homogener aus. Die faserartigen Geflechte wirkten sehr geordnet und weniger diffus. Die Partikel lagen sehr weit auseinander, was eine erhebliche Resorption vermuten ließ. Diese waren dennoch sehr gut vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden und schienen mit diesem nicht komplett in Kontakt zu stehen, wie sichtbare Spalten an der Grenzfläche zwischen Partikel und Gewebe zeigten. Vom Defektrand kommend strahlte Knochen in den augmentierten Bereich ein und stand mit ersten Partikeln in Kontakt (Abb.37, links unten).



**Abb.37:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 4 Wochen Liegezeit. Defektübersicht mit ortsfestem Knochen (K) und dichtem Gewebe (F) um die Partikel (P). 50fache Vergrößerung.

Bei 1000facher Vergrößerung wurden Veränderungen an der Oberfläche der Partikel sichtbar. Die ursprünglich kugelartigen Erhebungen waren durch Lösungsvorgänge aufgebrochen und führten somit zu einer weiteren Oberflächenvergrößerung. Diese aufgebrochenen Erhebungen waren von kollagenen, bindegewebigen Fibrillen dicht umspannt, so dass der Eindruck entstand, als würde sich ein feinmaschiges Netz über die Partikel spannen, das bis in tiefliegende Partikelstrukturen reichte (Abb.38).

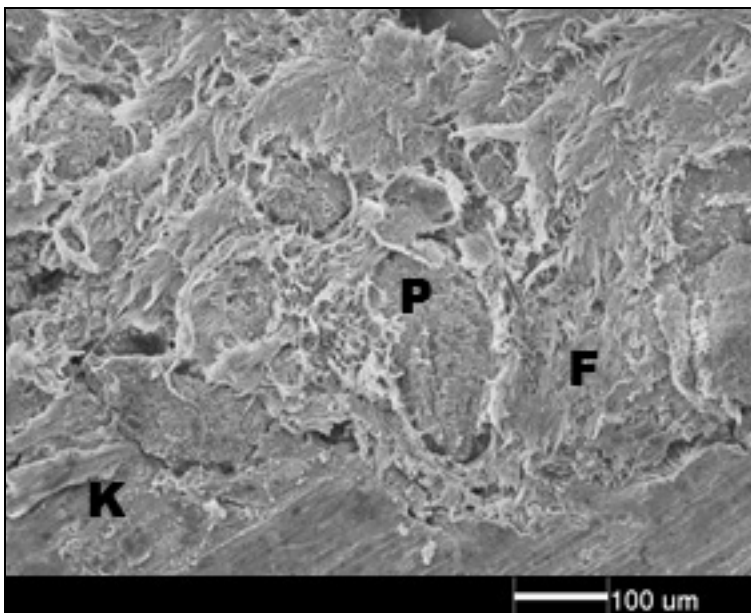




**Abb.38:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 4 Wochen Liegezeit. Partikeloberfläche (P) mit in den Substrukturen liegendem jungen Organisationsgewebe (F). 1000fache Vergrößerung.

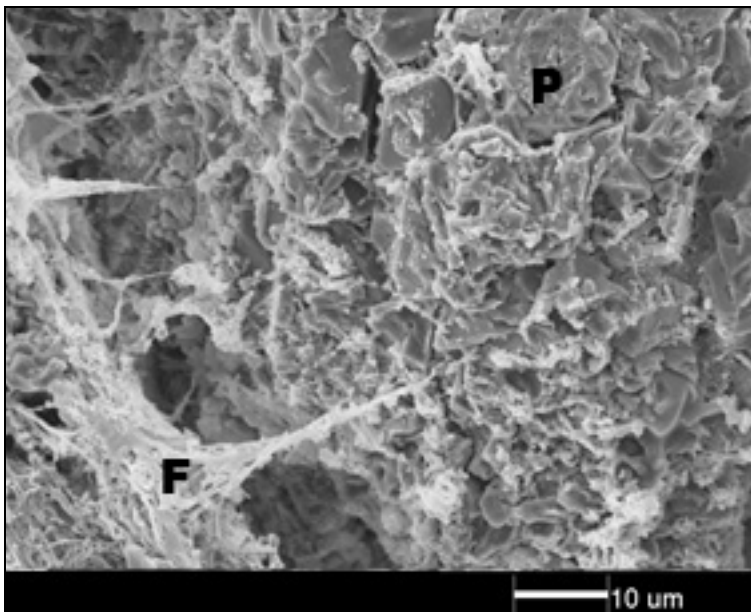
### 3.2.4. nach 12 Wochen Liegezeit

#### *β-TCP*



**Abb.39:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Partikel (P), dichtes Organisationsgewebe (F) und Knochen, der in Kontakt mit Partikeln (unten links) steht. 100fache Vergrößerung.

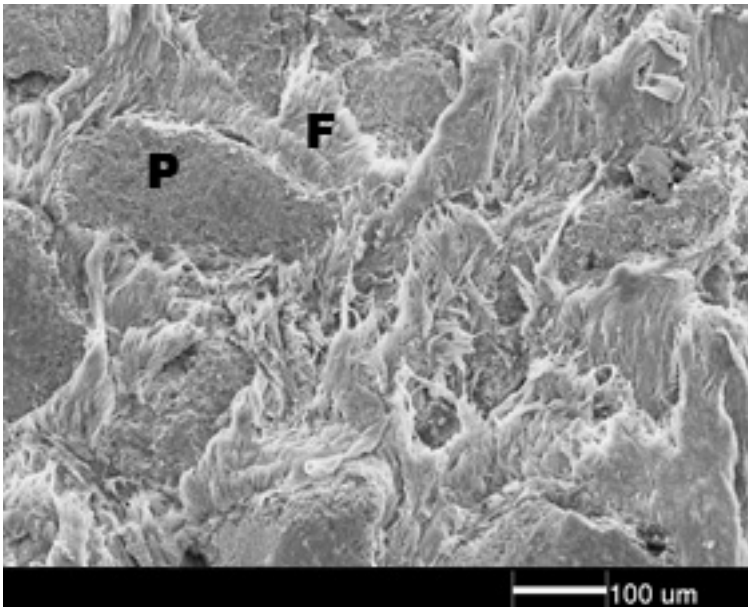
Die faserartigen Strukturen um die Partikel machten nunmehr einen dichteren und geordneteren Eindruck. Die Partikel selbst waren vom umliegenden Gewebe noch immer gut abgrenzbar. Am unteren Bildrand (Abb.39) war mit Partikeln in Kontakt stehender Knochen zu sehen. Bei näherer Betrachtung der Grenzschicht zwischen Partikel und Gewebe fiel auf, dass die Oberfläche mit Aufspaltungen versehen war, über die einige umliegende Fasern in die Substrukturen des Partikels inserierten (Abb.40). Die inzwischen abgelaufenen Degradationsprozesse hinterließen ebenfalls ihre Spuren auf der Oberfläche, die wie zerfressen erschien und an vielen Stellen rosenblütenähnliche Scherben aufwies, was erheblich zur Vergrößerung der Oberfläche beitrug.



**Abb.40:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Zu erkennen ist eine Partikeloberfläche (P) mit einstrahlenden fibrillären Fasern (F). 1000fache Vergrößerung.

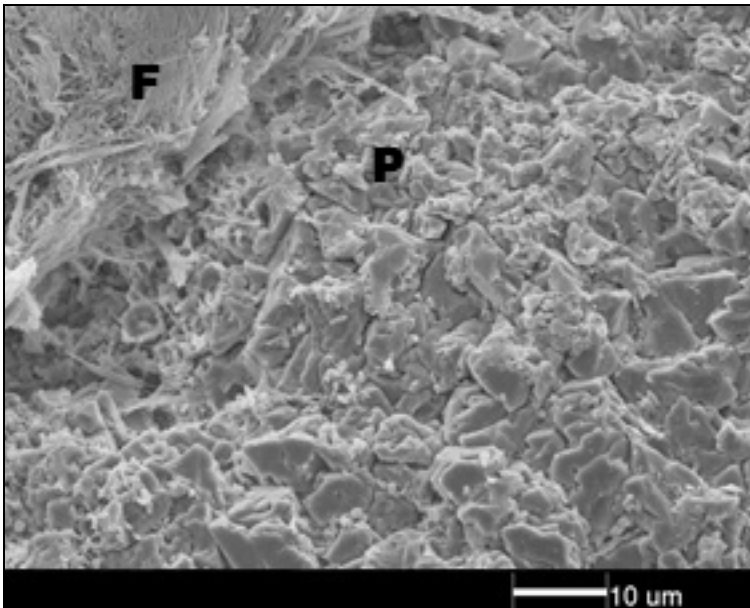
### **325i**

Dem Erscheinungsbild von  $\beta$ -TCP ähnelnd, befand sich bei 325i nach 12 Wochen Liegezeit verstärkt kollagenes Fasergeflecht interpartikulär. Die Partikel waren von diesem deutlich abgrenzbar, standen aber in sehr engem Kontakt zueinander (Abb.41).



**Abb.41:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Partikel (P) dicht umschlossen von Geflechtknochen und Organisationsgewebe (F). 100fache Vergrößerung.

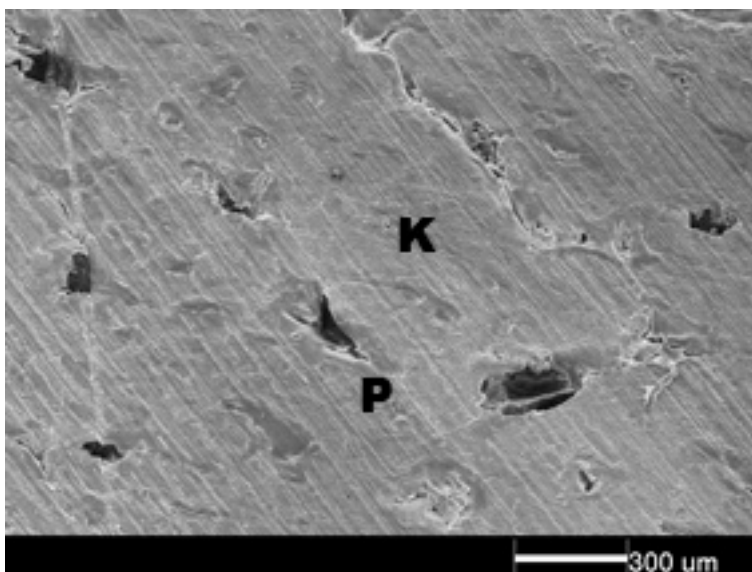
Die Partikel zeigten einen verringerten Durchmesser im Vergleich zu den Ausgangspartikeln und den anderen Liegezeiten. Die Oberfläche wirkte dennoch unverändert. Dieser Eindruck bestätigte sich bei genauer Betrachtung der Oberfläche der Partikel nicht. Die ursprünglich homogene, gleichmäßig kantige Struktur wurde durch Degradations- und Löslichkeitsvorgänge zu einer stark vergrößerten Oberfläche, die charakterisiert war durch diverse Erhebungen und Einbrüche. Spalten, die einen Zugang in die Substrukturen oder den Kern des Partikels zulassen würden, waren nicht aufzufinden. Dennoch stehen faser- und fibrillenartige Strukturen häufig in Kontakt mit der Partikeloberfläche (Abb.42).



**Abb.42:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Angelöste Partikeloberfläche mit randständigem Fasergeflecht (F). 1000fache Vergrößerung.

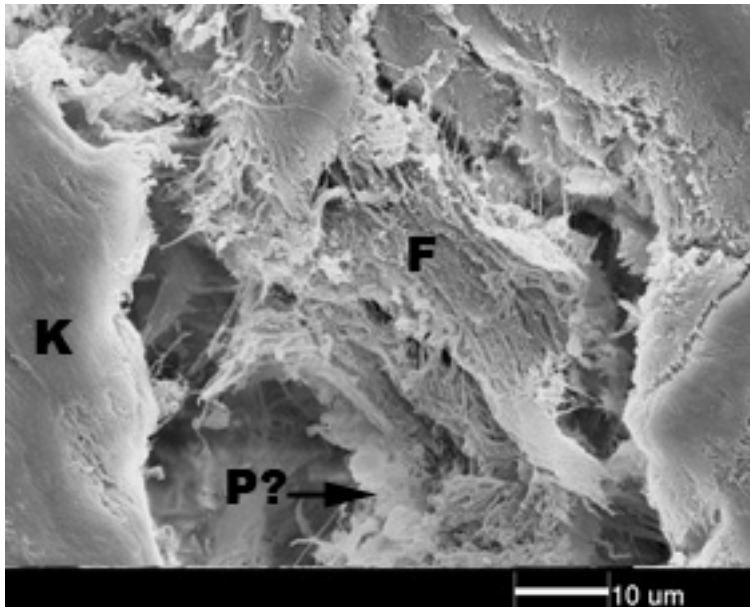
#### **GB14**

Die Gewebeverhältnisse hatten sich deutlich zugunsten des Knochens verändert. In der Übersicht lassen sich Partikel nur noch im Bereich einiger Ausbuchtungen erahnen. Dazwischen befand sich eine homogene und gleichmäßige Struktur, die klar als neugebildeter Knochen identifiziert werden konnte.



**Abb.43:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Defektübersicht mit vorwiegend Knochen (K) und Partikelresten (P) in den Ausbuchtungen liegend. 40fache Vergrößerung.

Bei Betrachtung dieser von Knochen umschlossenen Hohlräume, traf man innenliegend vorerst auf eine diffuse Faserstruktur und in der Tiefe vermutlich auf Reste der inzwischen fast durchweg aufgelösten und degradierten Partikel.

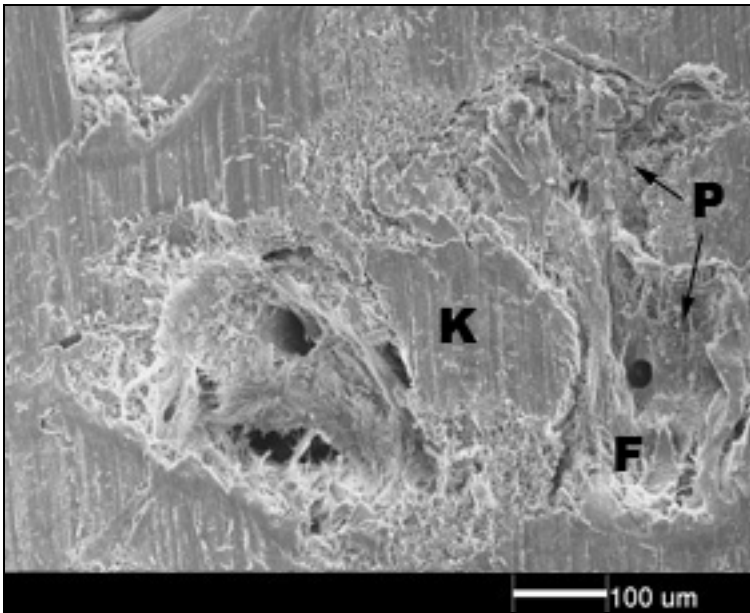


**Abb.44:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 12 Wochen Liegezeit. Ausbuchtung mit möglichem Restpartikel (P), Knochen (K) und jungem geflechtartigem Gewebe (F) am Rand. 1000fache Vergrößerung.

### 3.2.5. nach 24 Wochen Liegezeit

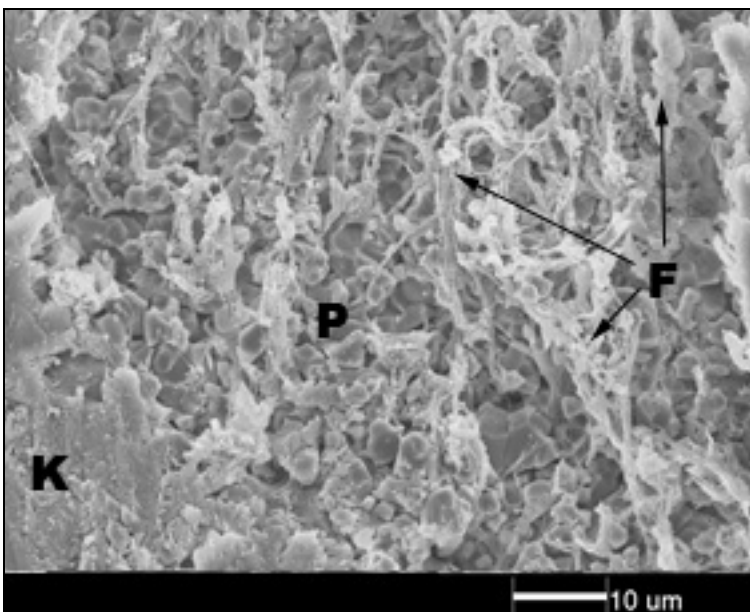
#### *$\beta$ -TCP*

Inzwischen zeigte sich auch bei  $\beta$ -TCP eine qualitative Änderung des interpartikulären Gewebes. Knochen war die dominierende organische Matrix zwischen Ausbuchtungen, die denen von GB14 nach 12 Wochen ähnelten. In der Tiefe kamen unter dem kollagenen Geflecht, das die Ausbuchtungen auskleidete, die persistierenden Partikel zum Vorschein (Abb.45).



**Abb.45:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Persistierende Partikel (P) umgeben von geflechtartigen Strukturen und Knochengewebe (K). 100fache Vergrößerung.

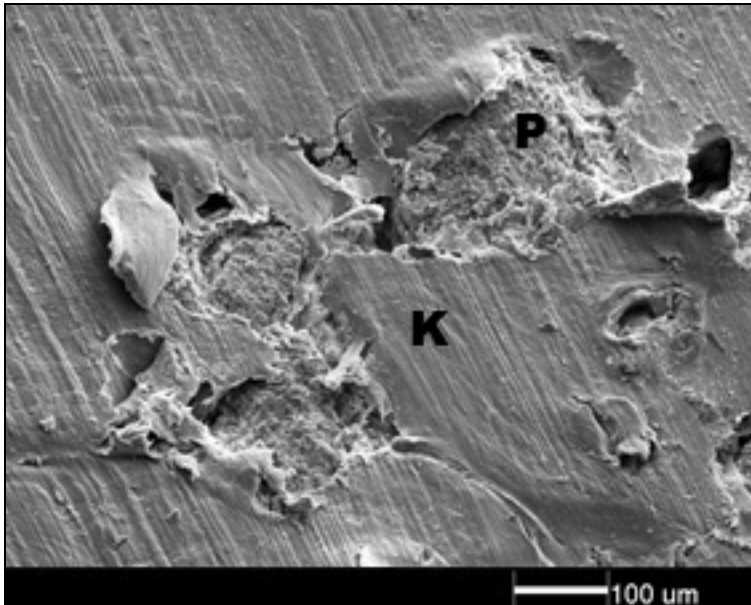
Die Oberfläche der persistierenden Partikel wirkte noch feinkörniger im Vergleich zu den Beobachtungen nach 12 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt waren auch kollagene Fibrillen und Fasern dicht über die Partikeloberfläche gespannt, jedoch weniger geordnet und auch nicht die Substrukturen erreichend wie im Vergleich zu GB14 (Abb.46).



**Abb.46:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Partikeloberfläche mit Knochen- (K) und Geflechtkontakt (F). 1000fache Vergrößerung.

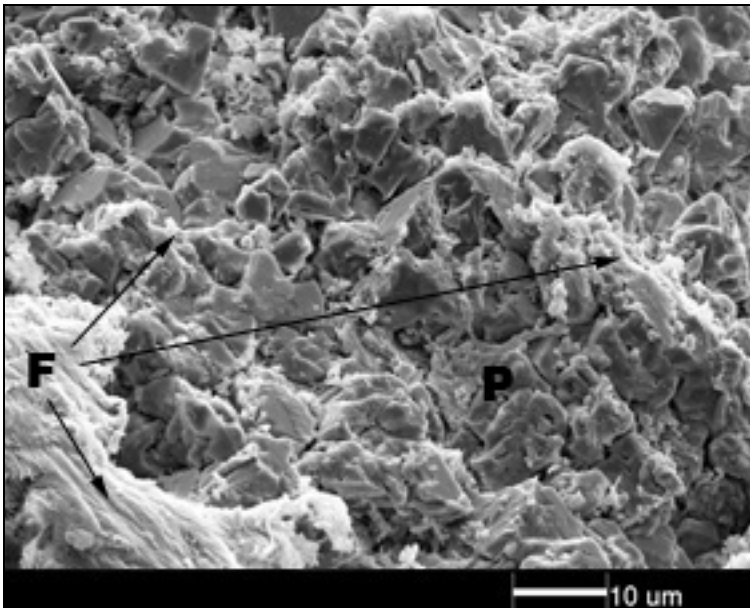
### 325i

Nach 24 Wochen Liegezeit befanden sich reichlich persistierende Partikel im Defekt, die deutlich vom angrenzenden Gewebe zu unterscheiden waren. Auch bei 325i hatte der Knochen interpartikulär erheblich zugenommen und jetzt fast den gesamten Defekt durchsetzt (Abb.47).



**Abb.47:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Die Partikel waren noch deutlich erkennbar, jedoch von Knochen umgeben. 100fache Vergrößerung.

Es befanden sich noch viele Partikel im Defekt, die aber in engem Kontakt zum umliegenden Knochen standen. Trotz der langen Liegedauer von 24 Wochen erschien die Oberflächenstruktur der Partikel nicht grundlegend verändert und auch die Größe der noch vorhandenen Partikel war eher unwesentlich verringert. Das kollagene Geflecht überzog nun ebenfalls die Partikel, schien jedoch, dem von  $\beta$ -TCP entsprechend, nicht in tiefere intrapartikuläre Substrukturen vorgedrungen zu sein (Abb.48).

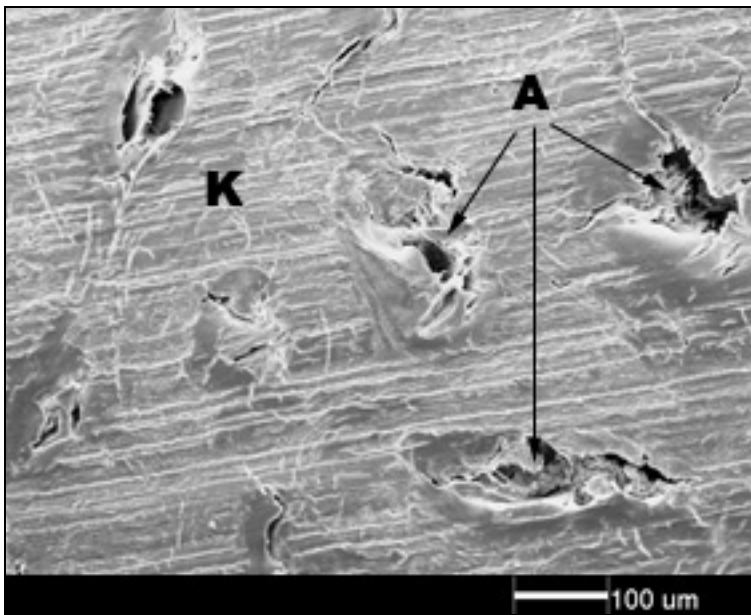


**Abb.48:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Partikeloberfläche mit inserierendem Geflecht. 1000fache Vergrößerung.

### **GB14**

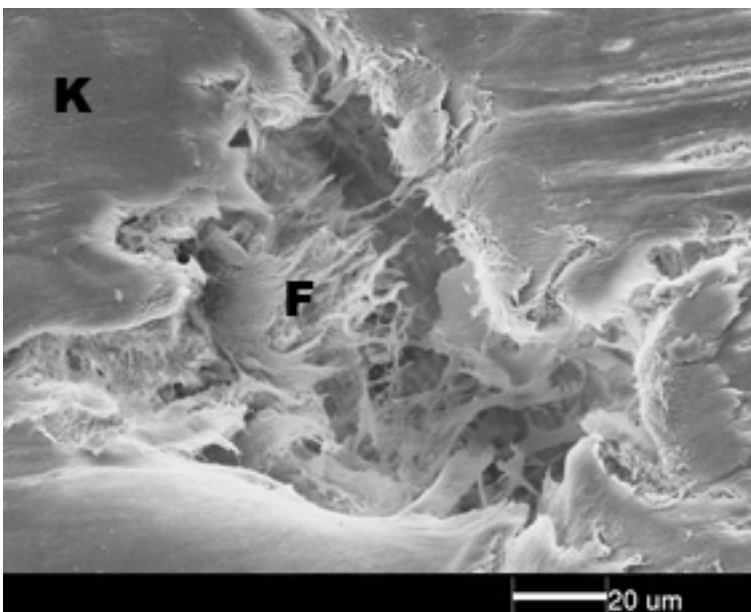
Zur Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach 24 Wochen bei GB14 konnten keine besonderen Änderungen im Vergleich zu 12 Wochen herangezogen werden, denn es hatte sich strukturell wenig geändert. Da es nach 12 Wochen schon kaum möglich war Partikel nachzuweisen, konnten diese nach 24 Wochen nur noch vermutet werden.





**Abb.49:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Defektübersicht mit Knochen (K) und lakunären Ausbuchtungen (A). 100fache Vergrößerung.

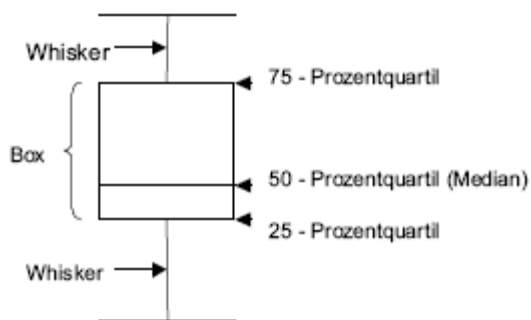
Die oben beschriebenen Ausbuchtungen waren noch erkennbar (Abb.49). Ihr Durchmesser hatte sich deutlich verringert und der Raum wurde wahrscheinlich durch kollagenes Gewebe nahezu vollständig ausgefüllt (Abb.50).



**Abb.50:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nach 24 Wochen Liegezeit. Ausbuchtung mit randständigem Knochen (K) und einstrahlendem Fasergeflecht (F). 500fache Vergrößerung.

### 3.3. Synoptische Auswertung der immunhistologischen Beobachtungen und histomorphometrischen Messungen

Die Auswertung der immunhistologischen und histomorphometrischen Ergebnisse erfolgte simultan und im Zusammenhang, da sie biochemisch und auch histologisch miteinander verknüpft sind. Die Darstellung der histomorphometrischen Ergebnisse wurde mittels Boxplot-Grafiken realisiert. Die Darstellung und der Vergleich der Ergebnisse erfolgten anhand des gebildeten Median, da die Gruppengröße gering war und nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Die Boxplotdarstellung enthält folgende Parameter: Den Median (auch 50-Prozentquartil genannt), das 25- und 75-Prozentquartil, den Minimal- und Maximalwert. Außerdem werden Ausreißer und Extremwerte dargestellt. Der Körper des Boxplots wird vom 25- und 75-Prozentquartil begrenzt und vereint 50 Prozent der Werte in sich. Die sich oben und unten an den Körper anschließenden Whisker (T-förmige Markierung) umfassen jeweils die Werte unterhalb des 25-Prozentquartils bzw. oberhalb des 75-Prozentquartils. Die Whisker können maximal die 1,5-fache Länge der Box betragen. Gibt es Fälle mit Werten außerhalb dieses Bereichs, werden sie als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet.

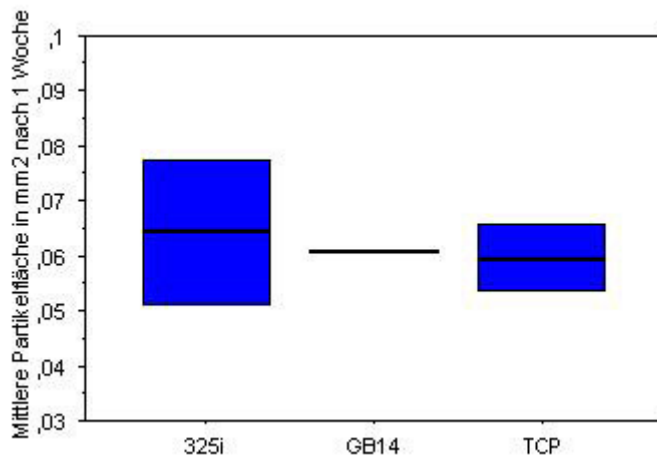


**Abb.51:** Erläuterung des Aufbaus der Boxplot-Grafiken.

Die Auswertung der beobachteten immunhistologisch gefärbten Proben wurde gewebs- und zellspezifisch durchgeführt. Es wurde die Intensität der Färbung in den Osteoblasten, Osteozyten, Fibroblasten, der fibrösen und osseären Matrix sowie dem Osteoid beurteilt.

### 3.3.1. nach 1 Woche Liegezeit

Die histomorphometrische Auswertung nach 1 Woche spiegelt die lichtmikroskopische Beurteilung wieder. Knochen und eine durchschnittliche Färbung der Osteoblasten mit Typ I Kollagen (Col I) fand sich ausschließlich bei den Präparaten mit autologem Knochen, wobei dieser nicht als neugebildeter, sondern als Bereich augmentierter Knochen-späne zu sehen war. Die semiquantitative Auswertung der Färbeintensitäten der osteogenen Marker zeigte, dass bei allen untersuchten Materialien moderate bis starke Färbungen des Col I und Bone Sialoproteins (BSP) im Bereich der Fibroblasten und der fibrösen Matrix auftraten. Col I und BSP bilden die frühen osteogenen Marker, welche bezeichnend für die Sezernierung der extrazellulären Matrix sind. Die für die extrazelluläre Mineralisation charakteristischen osteogenen Marker, wie Alkalische Phosphatase (ALP), Osteonectin (ON), Osteocalcin (OC) und Osteopontin (OP) waren geringfügig, sowie mit minimaler Ausprägung nachweisbar. Die vereinzelt, leichten Anfärbungen befanden sich am Defektrand und stammten wahrscheinlich vom ortsständigen Knochen. Sie waren demnach nicht als Hinweise für Mineralisationsvorgänge im Augmentat anzusehen. Bei der Vermessung der Partikel lag der Medianwert der mittleren Partikelfläche aller betrachteten Materialien zu diesem Zeitpunkt bei ca.  $0,06-0,065\text{mm}^2$  (Abb.52), wobei die Streuung eher ein Zeichen für unterschiedliche Größen der eingebrachten Partikel war.

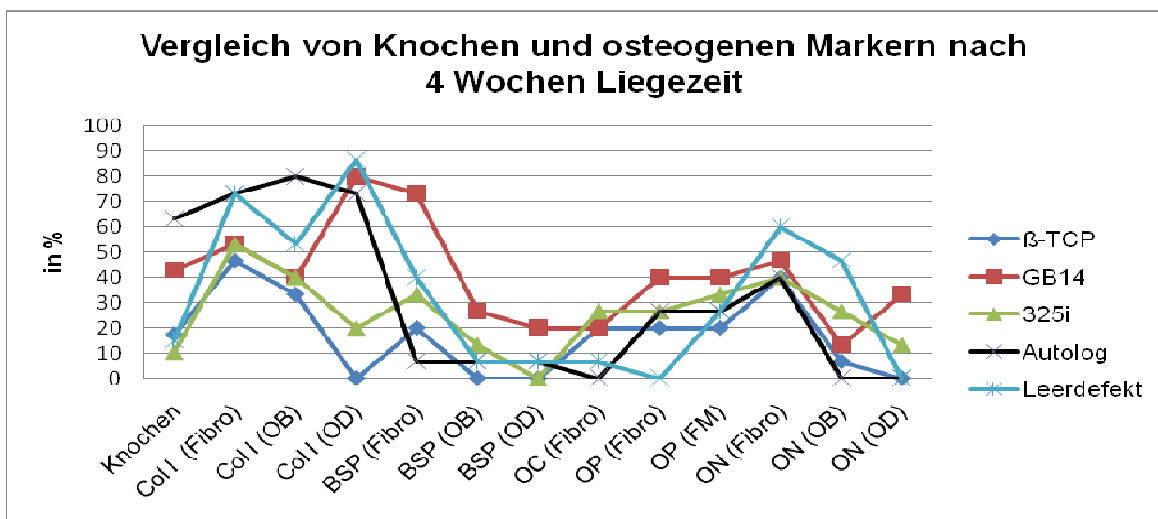


**Abb.52:** Graphische Darstellung der mittleren Partikelgröße nach 1 Woche Liegezeit.

### 3.3.2. nach 4 Wochen Liegezeit

Nach 4 Wochen traten deutliche Unterschiede und Änderungen bei den betrachteten Parametern auf. Beginnend mit der Beurteilung der Knochenfläche ergab sich, wie in Abb.54 zu sehen, ein teils deutlicher Zuwachs dieser. Der autologe Knochen zeigte zu diesem Zeitpunkt die prozentual höchste Knochenfläche. Der Median betrug hier 63,3%. Mit einem  $p = 0,0154$  bestand ein signifikanter Unterschied zur Knochenfläche nach 1 Woche Liegezeit (41,96%). Überzeugend war ebenso die Knochenneubildung bei GB14, dessen Median 42,93% beträgt. Somit ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied von  $p = 0,0004$  im Vergleich zu 1 Woche Liegezeit (4,39%). Diese markante Knochenneubildung wird durch die Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung bestätigt. Wie in Abb.53 deutlich wird, waren die frühen osteogenen Marker (Col I, BSP) im Bereich der Fibroblasten (Fibro), Osteoblasten (OB) und im Osteoid (OD) stark ausgeprägt und bescheinigen die hohe Aktivität dieser Zellen zu diesem Zeitpunkt. Ebenso die späten osteogenen Marker (Osteonectin (ON), Osteopontin (OP), Osteocalcin (OC)), die auf den Vorgang der Mineralisation der extrazellulären Matrix hinweisen, waren im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien intensiver angefärbt und somit quantitativ stärker ausgeprägt. Zum jetzigen Untersuchungszeitpunkt war hervorzuheben, dass speziell im Osteoid bei GB14 verstärkt osteogene Marker vorkamen. Diese Beobach-

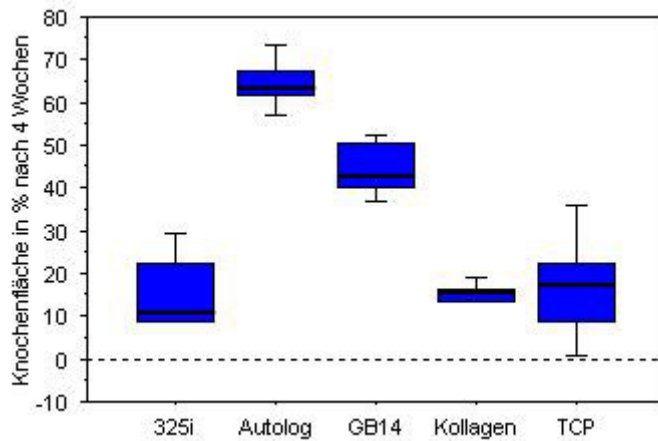
tungen gingen konform mit den histomorphometrischen Messungen bezogen auf den Partikel-Osteoidkontakt, der zu diesem Zeitpunkt deutlich stärker ausgeprägt war ( $p < 0,0001$ ) als bei den anderen Materialien (Abb.56). Ähnliche Werte bei der Betrachtung von Col I konnten nur der autologe Knochen und der Leerdefekt liefern. Im Hinblick auf die Färbeintensitäten von BSP vollzog sich ein Wandel im Vergleich zu den Präparaten der 1. Woche. Hier zeigte in erster Linie  $\beta$ -TCP deutliche Färbungen im Bereich der Fibroblasten. Nach 4 Wochen war das Aufkommen von BSP in den mit GB14 gefüllten Defekten besonders ausgeprägt.



**Abb.53:** Graphische Darstellung der Knochenneubildung im Vergleich zur Ausprägung der osteogenen Marker nach 4 Wochen Liegezeit.

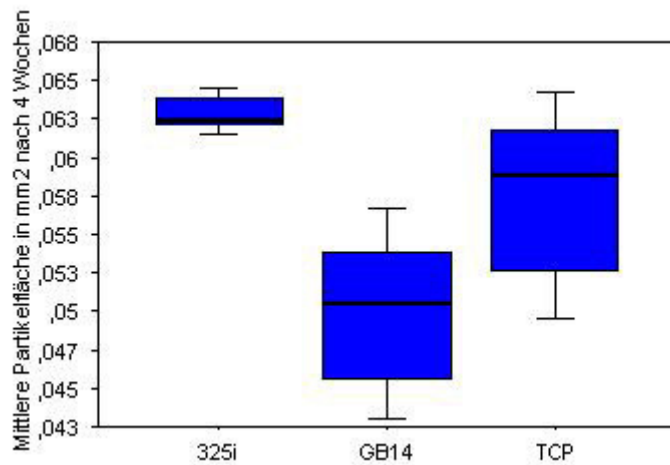
Trotz der guten Anfärbungen der Marker in den Leerdefekten kam es zwar zu einem signifikanten ( $p = 0,0004$ ) Zuwachs an Knochen, jedoch betrug die Knochenfläche nur 15,1%. Die Werte für alle weiteren betrachteten Materialien ( $\beta$ -TCP, 325i) zeigten keine signifikanten Knochenneubildungen.  $\beta$ -TCP lag mit 17,3% etwas höher als 325i mit 10,4%, hingegen waren die in Abb.51 betrachteten Marker bei 325i meist stärker angefärbt als bei  $\beta$ -TCP. Bei der Betrachtung der p-Werte der verschiedenen Materialien dieses Zeitraums untereinander, ergaben sich signifikante Unterschiede in den Knochenflächen zwischen dem autologen Knochen und allen weiteren untersuchten Materialien. Mit Aus-

nahme des autologen Knochens, der die besten Ergebnisse aufwies, lag die Knochenzunahme von GB14 gegenüber  $\beta$ -TCP, 325i und dem Leerdefekt signifikant höher (Abb.54).



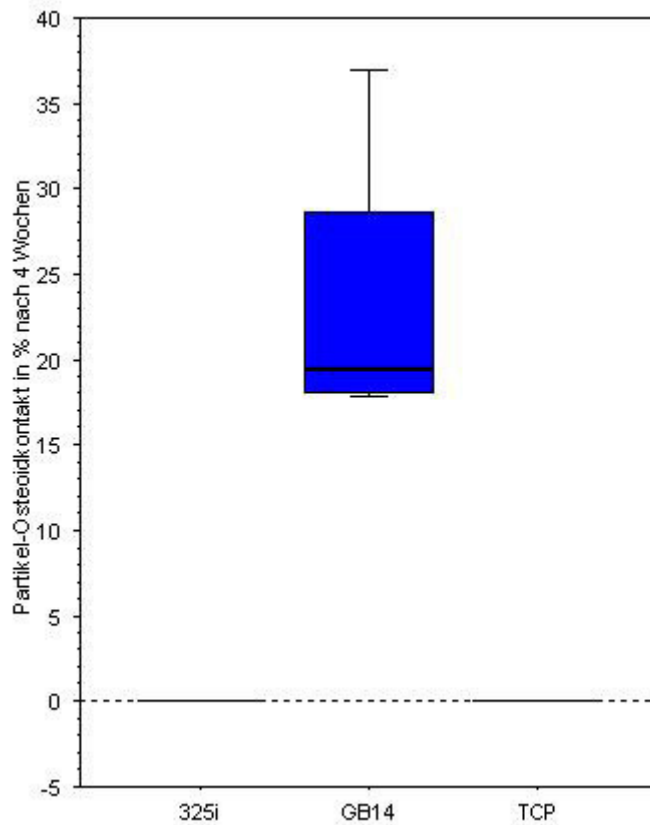
**Abb.54:** Graphische Darstellung der prozentualen Knochenfläche innerhalb der Defektfläche nach 4 Wochen Liegezeit.

Der Vergleich der mittleren Partikelfläche unterstrich reziprok die Ergebnisse der Knochenzunahme in diesem Zeitraum. Abb.55 zeigt den überzeugenden Unterschied in der Resorption der Materialien. Hatten alle untersuchten KEM in der ersten Woche eine mittlere Partikelfläche im Median von 0,06-0,064mm<sup>2</sup>, so zeigte sich nun eine deutliche Abnahme bei GB14 (0,051mm<sup>2</sup>) mit signifikantem Unterschied (p = 0,0007) gegenüber 325i (Abb.55).



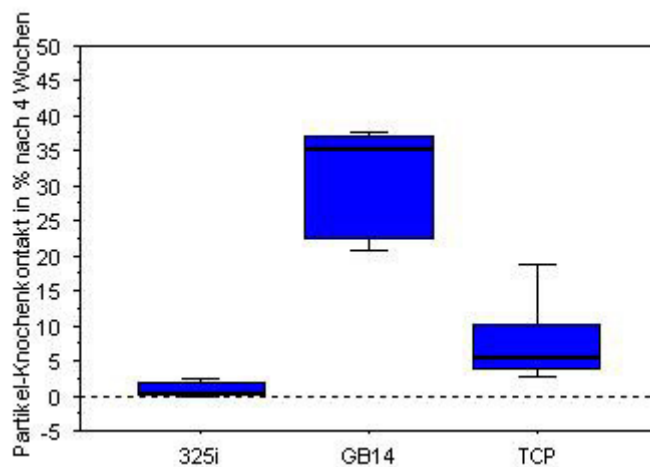
**Abb.55:** Graphische Darstellung der mittleren Partikelfläche nach 4 Wochen Liegezeit.

Ein Vergleich des Partikel-Osteoidkontaktes wurde nur in diesem Zeitraum durchgeführt, da die Häufigkeit der zu beobachtenden Osteoidsäume nach 4 Wochen insbesondere bei GB14 sehr ausgeprägt und somit statistisch beurteilbar war. Aus immunhistologischer Sicht ergaben sich deutliche Anfärbungen des Osteoids bei GB14 mit Col I, BSP und ON, was einer entsprechenden Aktivität in diesem Stadium zuzuordnen war. In Abb.56 wird die enorme Differenz des vorhandenen Osteoids bei GB14 zu den weiteren KEM zweifellos deutlich.



**Abb.56:** Graphische Darstellung des Partikel-Osteoidkontakts nach 4 Wochen Liegezeit.

Des Weiteren ergab sich ein vergleichbares Bild bei der Betrachtung des Partikel-Knochenkontaktes. Mit einem Median von 35,25% bringt GB14 ein überzeugendes Ergebnis hervor, gefolgt von  $\beta$ -TCP mit 5,4% und 325i mit nur 1%.

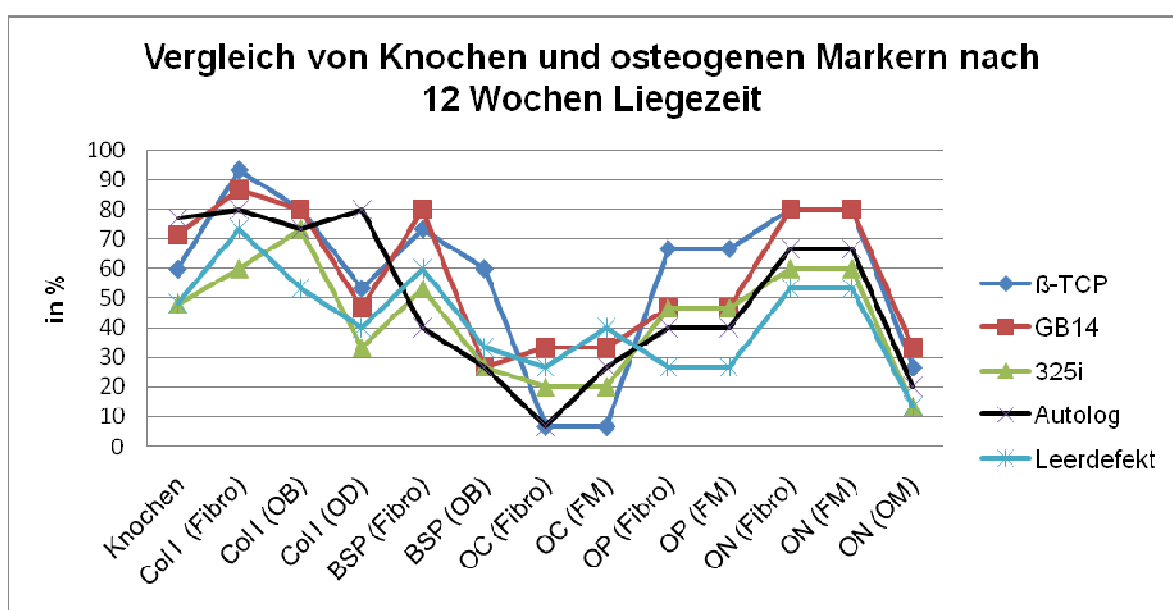


**Abb.57:** Graphische Darstellung des Partikel-Knochenkontaktes nach 4 Wochen Liegezeit.



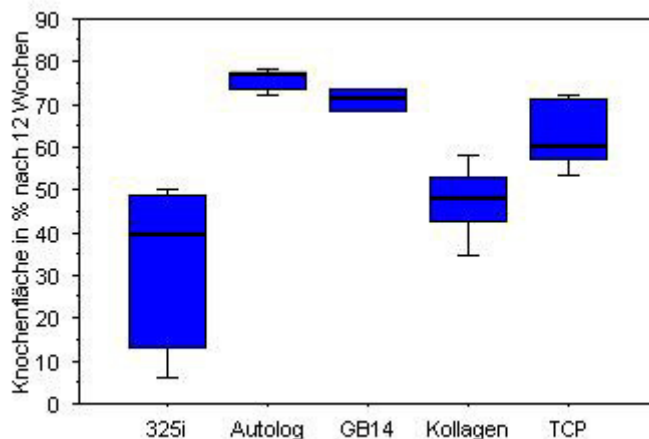
### 3.3.3. nach 12 Wochen Liegezeit

Die Änderungen des prozentualen Anteils der Knochenfläche innerhalb der Defektfläche, sowie die Quantität der osteogenen Marker im Vergleich zu 4 Wochen Liegezeit waren vielfältig und teilweise gravierend. Eine erhebliche Zunahme und somit signifikant war bei GB14 mit  $p < 0,0001$ , im Leerdefekt mit  $p < 0,0001$  und bei  $\beta$ -TCP mit  $p = 0,0001$  im Vergleich zu den 4 Wochen Präparaten zu verzeichnen. Beim autologen Knochen kommt es nach 12 Wochen nur zu einem moderaten Anstieg der Knochenfläche, der dennoch signifikant höher mit  $p = 0,004$  gegenüber der nach 4 Wochen war. 325i zeichnete sich eher durch eine sehr geringe, nicht signifikante Änderung aus, wie in Abb.59 festzustellen ist. Gleichermaßen interessante Veränderungen traten bei der Betrachtung der osteogenen Marker auf (Abb.58). Deutlich zugenommen hatten die Intensitäten bei  $\beta$ -TCP. Es stellte sich nun, vornehmlich im Bereich der frühen (Col I) aber auch späten osteogenen Marker (OC, ON) ein graphischer Verlauf dar, der dem von GB14 nach 4 Wochen ähnelt. Diese Änderungen erklären auch die erhebliche Zunahme an Knochen zu diesem Zeitraum. Parallel dazu machte 325i mit geringeren Intensitäten auf sich aufmerksam, was der eher mittelmäßigen Knochenzuwachsrate entsprach.



**Abb.58:** Grafische Darstellung des neugebildeten Knochens im Vergleich zur Ausprägung der osteogenen Marker nach 12 Wochen Liegezeit.

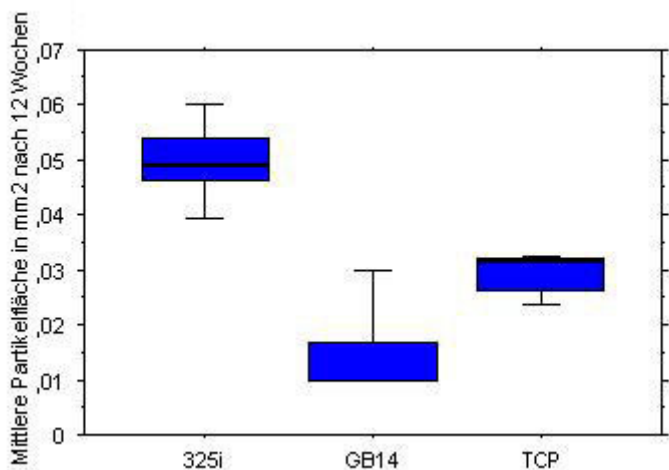
Die Quantität der frühen osteogenen Marker blieb bei GB14 im Vergleich zu 4 Wochen bestehen. Die späten osteogenen Marker hingegen hatten deutlich zugenommen und erklären die unter 3.1.3. beschriebene, ausgesprochen gute Mineralisation der extrazellulären Matrix im Defekt. Nach 12 Wochen hatte der autologe Knochen (76,89%) gegenüber den zu untersuchenden Materialien noch immer eine signifikant höhere Knochenfläche, zeigte aber im Hinblick auf die osteogenen Marker und hier insbesondere OC, OP und ON wesentlich schlechtere Ergebnisse als GB14 und die weiteren KEM. Weiterhin gab es bezogen auf die Knochenfläche zwischen GB14 (71,47%) und 325i (47,99%) und dem Leerdefekt (48,39%) signifikante Unterschiede, wie auch zwischen  $\beta$ -TCP (59,81%) und 325i ( $p = 0,0122$ ) und dem Leerdefekt ( $p = 0,01202$ ). Der nach 4 Wochen noch zu verzeichnende signifikante Unterschied zwischen GB14 und  $\beta$ -TCP war inzwischen aufgehoben. Obwohl GB14 prozentual ein besseres Ergebnis zeigte, verfügte  $\beta$ -TCP im Zeitraum von 4-12 Wochen über einen stärkeren Knochenzuwachs.



**Abb.59:** Boxplotgrafik mit Darstellung der prozentualen Knochenfläche innerhalb der Defektfläche nach 12 Wochen Liegezeit.

Bei der Betrachtung der mittleren Partikelfläche wurden die Änderungen in Bezug auf die Knochenflächen ebenfalls deutlich und korrelierten mit diesen. Die Degradations- und Lösungsvorgänge prägten ebenfalls den Zeitraum zwischen 4 und 12 Wochen. Bei den drei untersuchten KEM waren die Änderungen der mittleren Partikelfläche signifikant, wobei

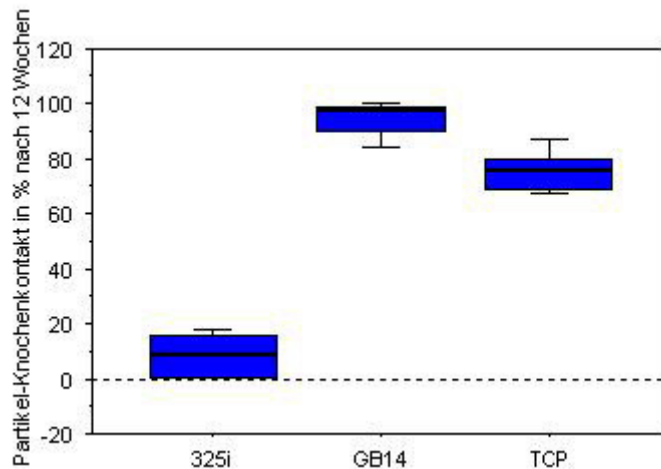
auch innerhalb dieses Zeitraumes GB14 eine hoch signifikante Differenz zu  $\beta$ -TCP und 325i zeigte (beide  $p < 0,0001$ ). Zwischen  $\beta$ -TCP und 325i hingegen gab es zwar einen sichtbaren Unterschied, wie Abb.60 zu entnehmen ist, dieser hatte jedoch keine Signifikanz. Vergleicht man die Medianwerte der mittleren Partikelfläche nach 1 Woche (GB14 =  $0,061\text{mm}^2$ , 325i =  $0,064\text{mm}^2$ ,  $\beta$ -TCP =  $0,06\text{mm}^2$ ) mit den Werten nach 12 Wochen (GB14 =  $0,013\text{mm}^2$ , 325i =  $0,049\text{mm}^2$ ,  $\beta$ -TCP =  $0,031\text{mm}^2$ ) werden die Unterschiede in Bezug auf die Degradation und Löslichkeit der Materialien deutlich. Drei Viertel der GB14-Partikel waren inzwischen schon degradiert, aufgelöst und durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt. Dieser Prozess war bei  $\beta$ -TCP lediglich zur Hälfte, bei 325i sogar nur zu einem Drittel der ursprünglichen Partikelgröße zu beobachten.



**Abb.60:** Boxplotgrafik mit Darstellung der mittleren Partikelfläche nach 12 Wochen Liegezeit.

Ein vergleichbarer Verlauf stellte sich bei der Begutachtung des Partikel-Knochenkontaktes dar. Beta-TCP hatte sich auch hier den Werten von GB14 angenähert, befand sich aber, ebenso wie 325i mit  $p < 0,0001$ , signifikant darunter ( $p = 0,0031$ ). Die Differenz zwischen  $\beta$ -TCP und 325i war nun auch als hoch signifikant einzustufen ( $p < 0,0001$ ). Anhand der Abb.61 war deutlich zu entnehmen, dass die persistierenden GB14-Partikel fast durchweg (97,597%) in Kontakt zum Knochen

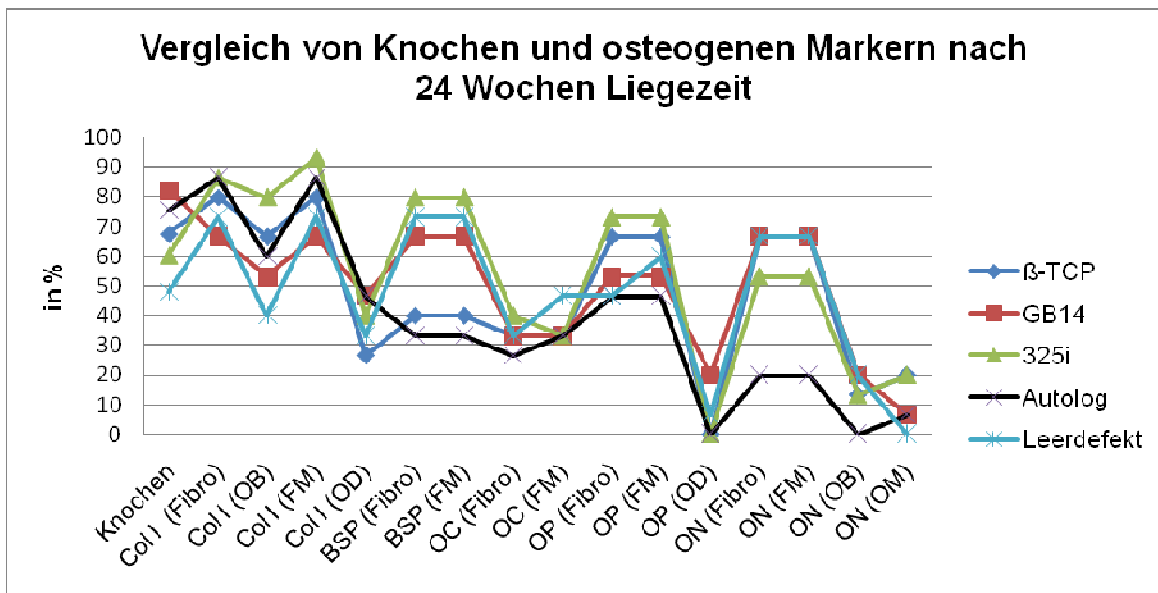
standen. Bei  $\beta$ -TCP waren es 77,03% und 325i sogar nur 8,81% Diese Werte ließen deutlich weniger Aktivität und auch Osteokonduktivität vermuten (Abb.61).



**Abb.61:** Boxplotgrafik mit Darstellung des Partikel-Knochenkontaktes nach 12 Wochen Liegezeit.

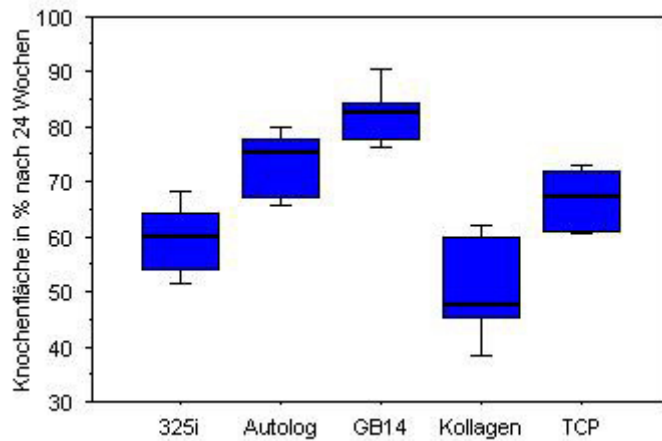
### 3.3.4. nach 24 Wochen Liegezeit

Nach 24 Wochen Liegezeit vollzog sich ein beeindruckender Wandel beim Vergleich der Knochenfläche. GB14 zeigte mit 82,33% gegenüber dem autologen Knochen mit rund 75,56% einen nicht signifikanten aber deutlichen Unterschied in der Gesamtknochenfläche im ursprünglichen Defekt. Die immunhistologische Auswertung unterstützte diese Entwicklung, da sich zu jedem betrachteten Zeitpunkt die Werte für die späten osteogenen Marker über denen des autologen Knochens befanden. Einzig die Intensitäten für Col I waren beim autologen Knochen nach 4 und 24 Wochen stärker ausgeprägt. Nach 12 Wochen zeigten beide vergleichbare Quantitäten (Abb.58). Ebenso nennenswert war die auffällig hohe und über die Liegezeiten konstante Konzentration an BSP im Bereich der Fibroblasten und fibrösen Matrix beim autologen Knochen und GB14. Die restlichen untersuchten Materialien schienen eher phasenweise ähnliche Werte, 325i und der Leerdefekt nach 24 Wochen und  $\beta$ -TCP nach 12 Wochen, zu erreichen. Erheblich zugenommen hatten die Intensitäten der späten osteogenen Marker wie OC, OP und ON bei  $\beta$ -TCP, 325i und im Leerdefekt (Abb.62).



**Abb.62:** Grafische Darstellung des neugebildeten Knochens im Vergleich zur Ausprägung der osteogenen Markern nach 12 Wochen Liegezeit

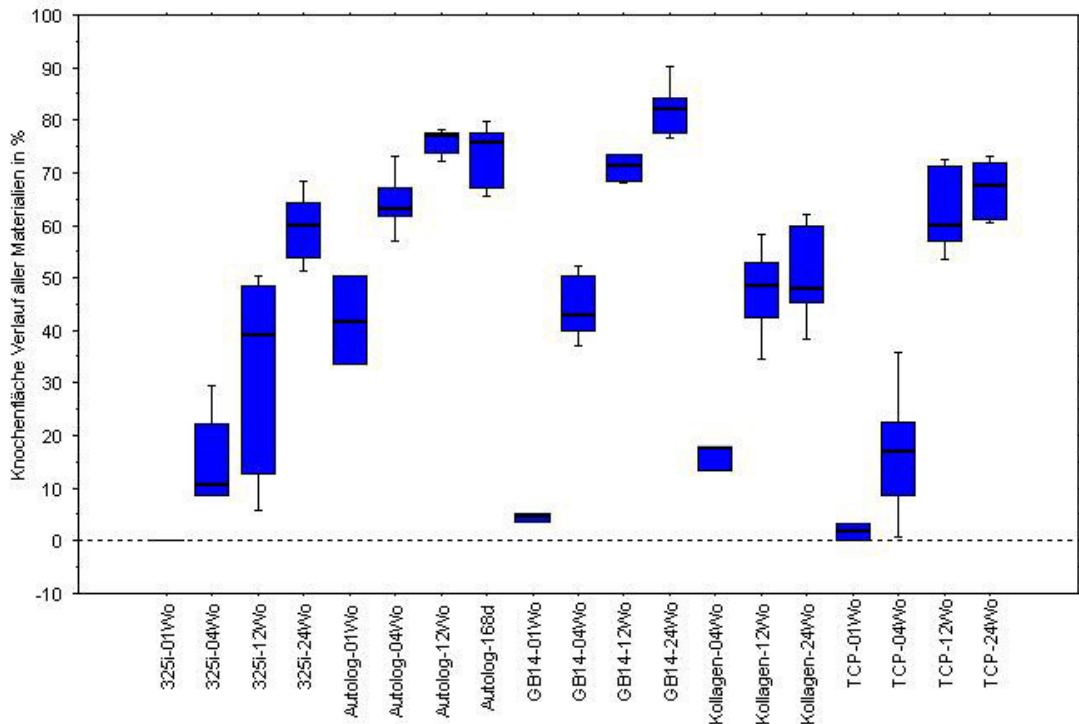
Erstmals überzeugte 325i bei der immunhistologischen Betrachtung und stach gegenüber den weiteren untersuchten Proben hervor. Da es bei 325i über die letzten 12 Wochen zu verstärkten Knochenumbau- und Degradationsvorgängen kam und der angelegte Defekt inzwischen von 60,29% Knochen durchbaut war, sollte dies eine plausible Begründung für das immunhistologische Ergebnis sein und umgekehrt natürlich auch für den Knochenzuwachs. In Bezug auf die prozentualen Knochenflächen,  $\beta$ -TCP (67,57%), 325i (60,29%) und den Leerdefekt (47,98%), war GB14 (82,33%) wiederholt signifikant stärker von Knochen durchbaut. Der Leerdefekt zeigte trotz guter immunhistologischer Werte den geringsten Knochenzuwachs (Abb.63).



**Abb. 63:** Boxplotgrafik mit Darstellung der prozentualen Knochenfläche innerhalb der Defektfläche nach 24 Wochen Liegezeit.

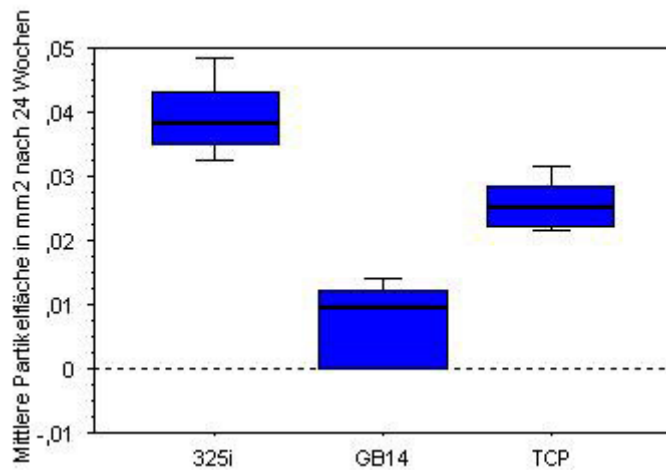
Die Veränderung der prozentualen Knochenflächen und deren unterschiedliche Zunahmen über alle betrachteten Liegezeiten im Vergleich sind in der Abb. 64 veranschaulicht. 325i verzeichnete eher einen linearen und langsamen Anstieg der Knochenfläche über die 24 Wochen, wobei nach 4 und 12 Wochen eine starke Streuung zu bemerken war. GB14 hingegen beeindruckte vorerst durch einen immensen Anstieg des neugebildeten Knochens zwischen 1 und 4 Wochen. Im weiteren Verlauf stellte sich ein linearer Anstieg ein, dessen Meßpunkte durch erhebliche Differenzen charakterisiert und signifikant waren. Bei Betrachtung des Verlaufs von  $\beta$ -TCP begann es mit einer vorerst schleppenden Zunahme des Knochens zwischen der 1. und 4. Woche. Danach zeigte sich eine deutliche Änderung der Dynamik zwischen 4. und 12. Woche, die einen erheblichen Knochenzuwachs nach sich zog. Im weiteren Verlauf kam es, ähnlich den ersten 4 Wochen, zu einer Reduktion der Dynamik, was mit einer eher moderaten Knochenzunahme zwischen der 12. und 24. Woche verbunden war. Der Leerdefekt zeigte einen dem  $\beta$ -TCP vergleichbaren Verlauf, überzeugte in seiner Knochenzunahme mit 47,98% nach 24 Wochen jedoch nicht. Die Knochenumbauvorgänge bzw. die Knochenzunahme war beim autologen Knochen anfangs geprägt durch deutlich höhere Werte als bei allen anderen Materialien. Zwischen der 1. und 12. Woche zeichnete sich ein linearer Anstieg der gemessenen Knochenfläche ab, was für gleichmäßige dynamische Umbauvorgänge spricht. Das änderte sich jedoch nach der 12. Woche. Die

Zunahme an Knochen im angelegten Defekt schien zu stagnieren, wodurch dieser nach 24 Wochen weniger neugebildete Knochenfläche im Vergleich zu dem mit GB14 implantierten Defekt aufwies.



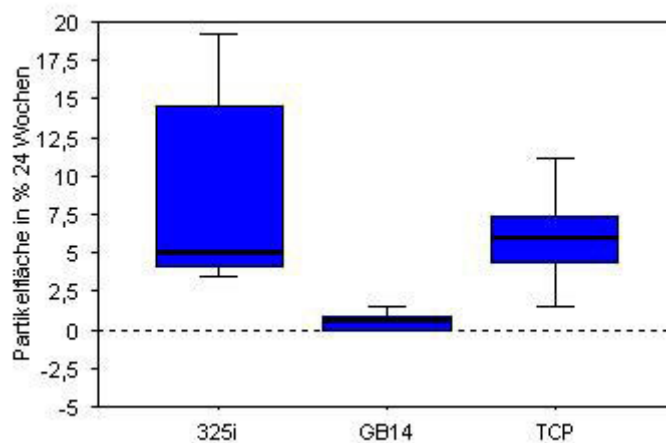
**Abb.64:** Boxplotgrafik mit Darstellung der prozentualen Knochenflächen aller Materialien innerhalb der Defektfläche über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Die Auswertung der mittleren Partikelgröße nach 24 Wochen kann eigentlich nur noch mit  $\beta$ -TCP und 325i durchgeführt werden, da bei GB14 in zwei der fünf Präparate keine und in den restlichen Präparaten teils nur Anhäufungen von Osteoblasten den Ort der kürzlich noch vorhandenen Partikel vermuten ließen. Es wurde dennoch versucht, diesen Bereich anhand der sich abzeichnenden immunhistochemischen Färbung (Abb.24) zu vermessen und die gewonnenen Werte mit in die statistische Auswertung einfließen zu lassen, wie in Abb.65 zu sehen ist.



**Abb.65:** Boxplotgrafik mit Darstellung der mittleren Partikelfläche nach 24 Wochen Liegezeit.

Abgesehen von den signifikanten Unterschieden zeigte sich, dass  $\beta$ -TCP eine doppelte und 325i sogar eine noch vierfach größere mittlere Partikelfläche im Vergleich zu GB14 besaß. Betrachtet man nun die Partikelfläche prozentual im Defekt, wie in Abb.66 dargestellt, wurde die Differenz ausgeprägter.

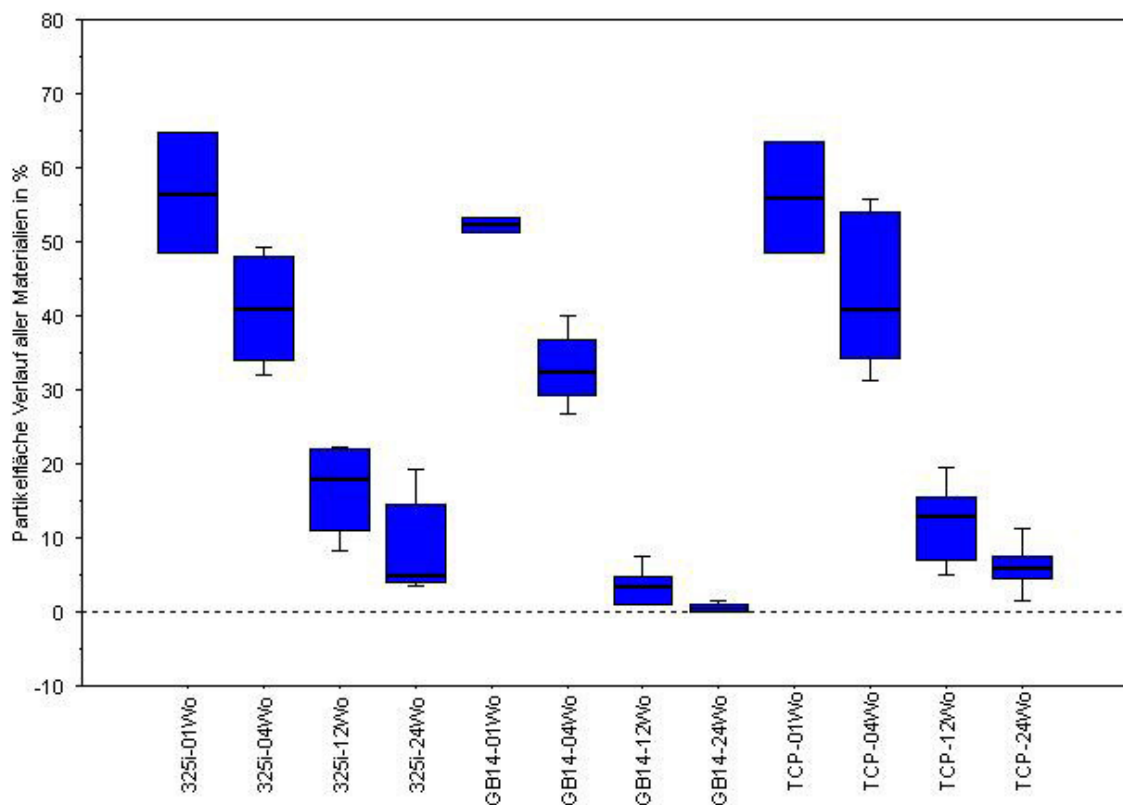


**Abb.66:** prozentualer Anteil der Partikelfläche innerhalb der Defektfläche nach 24 Wochen

Die Verlaufsgrafik über den gesamten Untersuchungszeitraum (Abb.67) für den prozentualen Anteil der Partikelfläche innerhalb der Defektfläche verdeutlicht erneut die schon beschriebenen Differenzen im Resorptions- und Degradationsverhalten der verschiedenen untersuchten



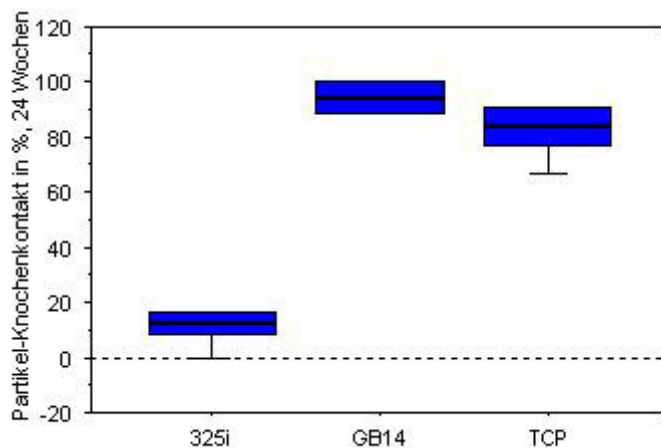
KEM. Dabei zeigte sich, dass 325i einen annähernd linearen Verlauf beschreibt,  $\beta$ -TCP hingegen lässt eine deutliche Abnahme der Partikelfläche zwischen der 4. und 12. Woche erkennen. Die Reduktion der Partikelfläche von GB14 war sogar zwischen 1. und 4. Woche schon erheblich und steigerte sich nochmals von der 4. bis zu 12. Woche Liegezeit, was die oben beschriebenen Beobachtungen wiederum bestätigt.



**Abb.67:** Prozentualer Partikelflächenanteil aller Materialien innerhalb der Defektfläche über den gesamten Beobachtungszeitraum.

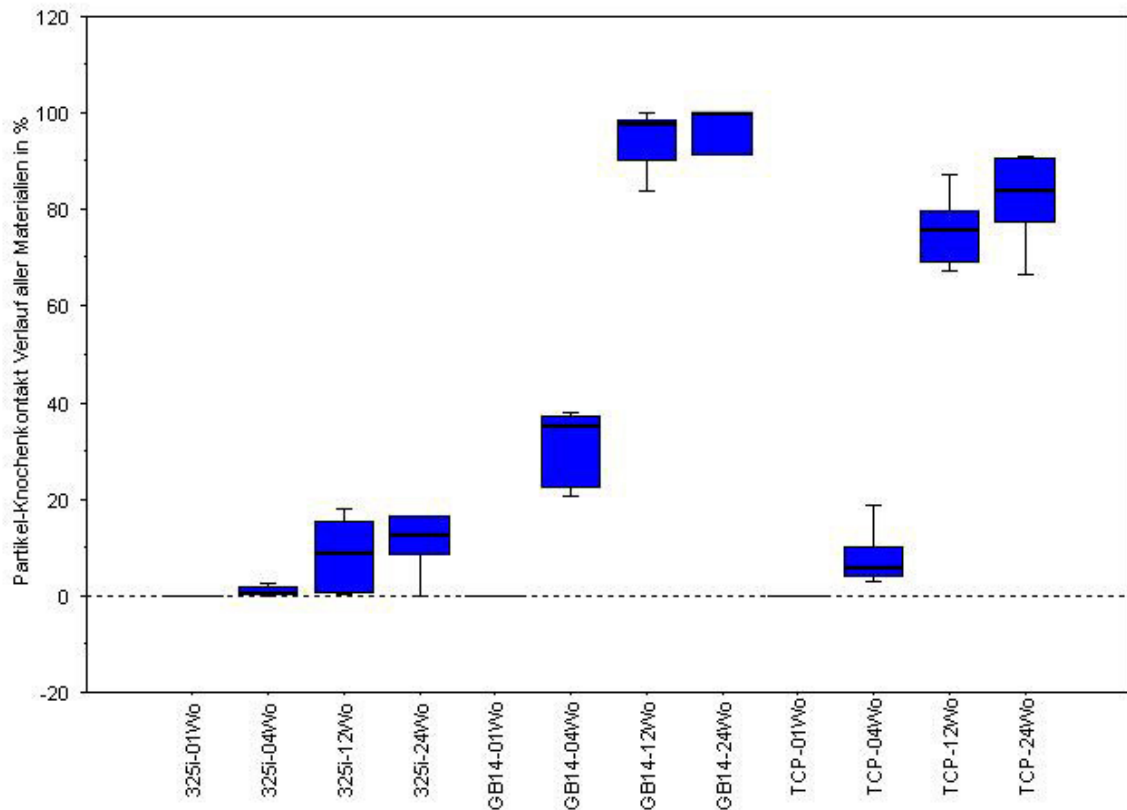
Die Betrachtung des Partikel-Knochenkontaktes unterstützt die Beobachtungen der Abnahme des Partikelflächenanteils und der resultierenden Zunahme des Knochenanteils nach 24 Wochen. In Abb.68 ist der Vergleich des Partikel-Knochenkontaktes nach 24 Wochen Liegezeit dargestellt. Deutlich war der hochsignifikante Unterschied zwischen 325i und  $\beta$ -TCP ( $p < 0,0001$ ). Der p-Wert und somit die Signifikanz konnten zwischen 325i und GB14, sowie zwischen  $\beta$ -TCP und GB14 nicht berechnet werden, da in nur drei von fünf GB14-Präparaten ge-

ringförmig Partikel gefunden wurden. Dennoch soll die in Abb.68 dargestellte Kontaktsituation mit verarbeitet werden, um die nahezu komplette Einschheidung der GB14-Partikel durch Knochen und somit die hervorragende Knochenbindung zu verdeutlichen. Die  $\beta$ -TCP-Partikel waren zu 85% und die 325i-Partikel nur zu 14,3% umsäumt.



**Abb.68:** Boxplotgrafik des Partikel-Knochenkontaktes nach 24 Wochen Liegezeit.

Bei der Verlaufsbetrachtung der gemessenen Partikel-Knochenkontakte über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden annähernd Proportionalitäten zur Abnahme des Anteils der Partikelfläche deutlich. Eindrucksvoll war einerseits der starke und stetige Anstieg des Knochenkontaktes bei GB14, andererseits auch der mangelnde Anstieg bei 325i. Bezogen auf die oben betrachteten Änderungen der Partikelfläche ergab sich ein umgekehrt proportionales Bild, wonach bei GB14 die Partikelgröße stetig und rapide abnahm, bei 325i hingegen sehr langsam. Die Werte von GB14 erreicht  $\beta$ -TCP wie bei allen histomorphometrischen Betrachtungen nicht, liegt aber unmittelbar dahinter. Bezogen auf den Partikel-Knochenkontakt hatte  $\beta$ -TCP einen hochsignifikanten Unterschied zu 325i mit  $p < 0,0001$  nach 24 Wochen (Abb.69).



**Abb.69:** Grafische Darstellung des Partikel-Knochenkontaktes aller Materialien über den gesamten Beobachtungszeitraum.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Ergebnisse

#### 4.1.1. Diskussion der Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Beurteilung der untersuchten Materialien ( $\beta$ -TCP, GB14, 325i) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 1 – 24 Wochen zeigte, dass es sich um biokompatible und bioaktive Materialien handelt, was die Ergebnisse vieler vorhergehender Studien bestätigt (Buser et al. 1998, Ignatius et al. 2001b, Knabe et al. 1998, Niedhart et al. 2004). Entzündliche Reaktionen traten bei keinem der Materialien auf, ebenso wenig wie TRAP-positive Osteoklasten. Bei den untersuchten 325i-Partikeln kam es zur Bildung einer peripheren calciumphosphatreichen Schicht, der sogenannten Apatit-Schicht (Kokubo et al. 1990, Kitsugi et al. 1989), die den entsprechenden Kontakt zum Knochen herstellt. Die  $\beta$ -TCP-Partikel zeigten keine derartigen Apatit-schichten, wie auch schon in vorhergehenden Untersuchungen festgestellt wurde (Kotani et al. 1991, Neo et al. 1993), sondern stehen möglicherweise durch die Ca-Appositionen intrapartikulär in den Substrukturen und peripher auf der Oberfläche in direktem Kontakt zum Knochen (Neo et al. 1993, Posner 1985). Die genauen Bindungsmechanismen sind dabei jedoch noch nicht abschließend geklärt. In vorhergehenden in vitro Studien wurde die verbesserte Löslichkeit von GB14 gegenüber TCP dargestellt (Ignatius et al. 2001b, Knabe et al. 1998). Die damit verbundene Calcium- und Phosphatkonzentration spiegelte sich in den lichtmikroskopischen Ergebnissen wieder. Einerseits wird dies durch die schwarze Streifung an der Peripherie der GB14-Partikel deutlich und andererseits anhand der Binnenstruktur (siehe Abb.11 und 12). Diese als charakteristisch zu bewertende Zeichnung in von Kossa-Paragon-Färbung (vKPF) hob sich von denen bei 325i und  $\beta$ -TCP ab. Insbesondere die Ca-Deposition in den Substrukturen der Partikel führte scheinbar zu einer verstärkten Leitschienenfunktion und somit zu beschleunigten Umbauprozessen. Die Resorption der untersuchten Materialien durch TRAP-positive Osteoklasten konnte in dieser in vivo Studie nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass  $\beta$ -TCP, GB14 und 352i durch physikochemische Dissolutionsphänomene und nicht durch zelluläre os-

teoklastäre Aktivität degradieren. Dies bestätigen die Beobachtungen vorausgegangener Studien (Knabe et al. 2008, Suba et al. 2004, Zerbo et al. 2005b, Peters & Reif 2004, Zerbo et al. 2001).

#### **4.1.2. Diskussion der Immunhistochemie und Histomorphometrie**

Die Ergebnisse der immunhistochemischen und histomorphometrischen Untersuchung offenbarten vergleichbare Verläufe und Zusammenhänge im Rahmen der Knochenneubildung über den gesamten Beobachtungszeitraum, so dass eine gemeinsame Diskussion dieser sinnvoll erscheint. Die Zunahme der Knochenflächen in den angelegten Defekten verlief in unterschiedlichen Mustern. Beim autologen Knochen stieg die Knochenneubildung ab der 1. bis zur 12. Woche stetig linear an. Beginnend mit 42% nahm die Knochenfläche zur 12. Woche hin auf 72% zu und erreichte hier scheinbar ein Gleichgewicht, das sich zur 24. Woche bei 76% eingestellt hatte. Bei Betrachtung der Leerdefekte, die gefüllt mit einem Kollagenschwamm zur Stabilisierung und als Kontrolldefekte dienten, zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Nach 12 und ebenso nach 24 Wochen Liegezeit waren 48% neugebildeten Knochens vorzufinden. Quantitativ betrachtet konnten diese Defekte durch die geringe Zunahme an neugebildetem Knochen nicht überzeugen. Im Gegensatz dazu waren die Defekte mit den untersuchten Knochenersatzmaterialien auch nach der zwölften Woche in Umbau begriffen. Sie unterschieden sich vorwiegend in der Fläche neugebildeten Knochens (Abb.59), den persistierenden Partikeln (Abb.60) und korrelierend dazu der semiquantitativ bestimmten Menge und somit Intensität an osteogenen Markern (Abb.58). Die gemessenen Knochenflächen offenbarten nach 1 Woche Liegezeit keine signifikanten Unterschiede ( $\beta$ -TCP = 1,8%; 325i = 0,1%; GB14 = 4,4%). In vorangegangenen Studien wurde eine erhöhte Löslichkeit von GB14 (Berger et al. 1995, Ignatius et al. 2001b, Knabe et al. 1998) gegenüber den anderen Materialien aufgezeigt und kann anhand der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Eine gegenüber  $\beta$ -TCP ( $p=0,0001$ ) und 325i ( $p=0,0001$ ) hoch signifikante Abnahme der mittleren Partikelfläche (Abb.60) nach 12 Wochen verdeutlichte das beeindruckend. Gleichmaßen lässt die signifikant bessere Knochenneubildung von GB14 gegenüber den weiteren untersuchten Materialien ei-

ne verbesserte Osteokonduktivität vermuten. Diese Tendenz wurde in einem vorhergehenden in vitro Versuch gegenüber TCP (Knabe et al. 2004a) gezeigt. Mit 71,5% Knochenfläche nach 12 Wochen Liegezeit ergab sich bei GB14 ein inzwischen sehr gut knöchern durchbauter Defekt. 325i machte dabei mit 48% einen eher moderaten Eindruck. Mit 59,8% hatte  $\beta$ -TCP eine erhebliche Knochenzunahme zwischen der 4. und 12. Woche zu verzeichnen. Diese gegenüber 325i verstärkte Knochenneubildung bei  $\beta$ -TCP bestätigte die Erkenntnisse nach einer Untersuchung von Teramoto et al. (Teramoto et al. 2005) der Glaskeramiken und Tricalciumphosphate verglich. Ähnlich gute Ergebnisse für  $\beta$ -TCP nach einem Zeitraum von 12 Wochen ergaben verschiedene in vivo Studien (Artzi et al. 2004, Buser et al. 1998).

Anhand der gemessenen Knochenflächen und der zur selben Liegezeit bestimmten Intensitäten der osteogenen Marker wird die unterschiedliche Wirkung der Materialien auf die umliegenden Gewebe und Zellen deutlich. Die gegenüber  $\beta$ -TCP und 325i stärkere Ausprägung von Kollagen I (Col I) und Bone Sialoprotein (BSP) bei GB14 nach 4 Wochen Liegezeit im Bereich der Osteoblasten, Fibroblasten und dem Osteoid korreliert mit der starken Knochenzunahme zu diesem Betrachtungszeitpunkt (Abb.54). Weiterhin zeigte GB14 eine intensivere Färbung der für die extrazelluläre Matrixmineralisation wichtigen osteogenen Marker wie Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP) und Osteonectin (ON). Interessant erscheint auch der nahezu gleiche Kurvenverlauf von GB14 und dem autologen Knochen, das zu diesem Zeitpunkt eine signifikant höhere Knochenfläche gegenüber allen anderen untersuchten Materialien aufwies. Die deutliche Knochenzunahme von  $\beta$ -TCP, sowie bei GB14 zwischen der vierten und 12. Woche offenbarte sich ebenfalls im Kurvenverlauf der osteogenen Marker (Abb.58). Beide Kurven waren geprägt durch intensive Färbungen von Col I, BSP in den Fibroblasten, OP und ON, was einerseits für erhebliche Aktivitäten im Bereich der extrazellulären Matrixseznierung, aber auch für verstärkte Vorgänge bei der Mineralisation der extrazellulären Matrix sprach. Nach 24 Wochen vollzog sich ein beeindruckender Wandel. GB14 wies mit 82,3% gegenüber dem autologen Knochen mit 75,6% mehr Knochen auf. Es handelte sich hierbei nicht um einen signifikanten Unterschied, sollte jedoch als

interessante Tendenz berücksichtigt bleiben. Mit 67,6% Knochenfläche erfüllte  $\beta$ -TCP die Erwartungen. Die prozentuale Knochenfläche bei 325i mit 60,3% erschien noch nicht ausreichend, insbesondere im Hinblick auf die reichlich persistierenden Partikelreste (8,9%). Bei der Betrachtung der immunhistochemischen Ergebnisse nach 24 Wochen Liegezeit ergaben sich ebenfalls interessante Entwicklungen (Abb.62). Die Tatsache, dass sich zu diesem Zeitpunkt die Intensitäten im Bereich der Fibroblasten und fibrösen Matrix bei  $\beta$ -TCP, 325i und auch beim Leerdefekt erheblich verstärkt haben zeigte, dass erst jetzt Umbauraten erreicht wurden, die beim autologen Knochen und GB14 schon nach 12 Wochen zu finden waren. Somit wird die Knochenneubildung und der Abbau der persistierenden Partikel noch einige Zeit mehr in Anspruch nehmen, wodurch die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt wurden, in denen z.B.  $\beta$ -TCP erst nach ca. 24 Monaten komplett resorbiert ist (Artzi et al. 2004). Schlussfolgernd konnte festgestellt werden, dass es sich bei 325i und  $\beta$ -TCP um biokompatible, degradierbare Materialien handelt, die in Bezug auf ihre Resorption und Löslichkeit Defizite aufwiesen und in diesen Eigenschaften noch verbesserungswürdig erscheinen. Ebenso weist 325i erheblich mehr Weichgewebkontakte als  $\beta$ -TCP und GB14 auf, was auf ein defizitäres Knochenbindungsverhalten und eine deutlich schlechtere Degradation der Partikel zurückzuführen ist. Die chemische Zusammensetzung könnte daher in der Form verändert werden, dass sich ebenso gute Partikel-Knochenkontakte ergeben, wie sie in der vorliegenden Studie bei GB14 auftraten (Abb.57; 61; 68). GB14 hingegen zeigte vielversprechende Ergebnisse. Zuerst beeindruckte die überzeugende Anzahl Osteoid im Bereich der Partikel (Abb.56) nach 4 Wochen Liegezeit. Nach 24 Wochen Liegezeit kam es zu einer erhöhten prozentualen Knochenfläche gegenüber dem autologen Knochen, d.h. gegenüber dem derzeitigen Goldstandard. Anhand der neuen immunhistochemischen Nachweismethode (Knabe et al. 2006) ergaben sich über alle Beobachtungszeiträume ähnliche Kurvenverläufe der Färbungsintensitäten bzw. Expression der osteogenen Marker (Abb.53; 58; 62) und somit resultierend nahezu gleiche Knochenumbauraten und -prozesse zwischen dem autologen Knochen und GB14. Mit GB14 steht somit ein schnell resorbierbares KEM zur Verfü-

gung, welches den Vorstellungen von einem dem autologen Knochen gleichwertigen Material recht nahe kommt. Ebenfalls erscheint die Überprüfung und Untersuchung der Dichtigkeit, Festigkeit und Belastbarkeit des neugebildeten Knochens, speziell im Hinblick auf postaugmentative Implantationen, sinnvoll. Ferner befassen sich weiterführende Forschungsvorhaben mit weiteren von GB14 abgeleiteten Applikationsformen. Einerseits sind dies resorbierbare Knochenersatzzemente auf der Basis von Calciumalkaliorthosphaten, welche für die Rekonstruktion von osseären Konturdefekten verwendet werden könnten. Andererseits wäre denkbar, daß GB14 mit der Herstellung dreidimensionaler Blockaugmentate für die knöchernen Gewebssteuerung zur Rekonstruktion ausgedehnter segmentaler Knochendefekte eingesetzt werden könnte.



## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden in vivo Studie wurden an 34 Merino-Schafen zwei neue Knochenersatzmaterialien, Calciumalkaliorthosphatkeramiken eine mit der Hauptkristallphase  $\text{Ca}_{10}[\text{K}/\text{Na}](\text{PO}_4)_7$  (325i) und eine mit der Hauptkristallphase  $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$  (GB14), im Vergleich mit Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), autologem Knochen als derzeitigem Goldstandard und einem kollagenschwammgefüllten Defekt als Leerdefekt zur Kontrolle, verglichen. Nach jeweils 1, 4, 12, und 24 Wochen Liegezeit wurden die augmentierten Knochendefekte lichtmikroskopisch, immunhistologisch und histomorphometrisch untersucht. Hierzu wurden vorher im Unterkiefer beidseits Critical Size Defekte angelegt die dann mit den genannten Materialien augmentiert wurden. Die lichtmikroskopische Auswertung belegte die Biokompatibilität, Bioaktivität, Degradierbarkeit und Löslichkeit der verwendeten KEM, die jedoch in differierender Quantität und auch Qualität auftraten. 325i zeigte in Bezug auf die Degradierbarkeit und Knochenneubildung die schlechtesten Ergebnisse. Bei  $\beta$ -TCP ergaben sich nach anfänglich mangelhaften Ergebnissen dann doch ausreichend gute Werte nach 24 Wochen, die denen anderer Studien vergleichbar sind. Als in dieser Studie herausragendes Material präsentierte sich GB14 über alle untersuchten Liegezeiten. Partikelresorption, Partikel-Osteoidkontakt, Knochenneubildung und Partikel-Knochenkontakt waren im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien ( $\beta$ -TCP, 325i) überzeugend und größtenteils von signifikanten Unterschieden ( $p < 0,001$ ) geprägt. Als besonders interessant ist hierbei die gemessene prozentuale Knochenfläche nach 24 Wochen Liegezeit im augmentierten Bereich von 82,3% im Vergleich zu 75,6% beim autologen Knochen festzuhalten. Es handelt sich dabei nicht um einen signifikanten Unterschied, jedoch um ein bemerkenswertes Ergebnis. Bei vergleichender Auswertung der osteogenen Marker zwischen dem autologen Material und GB14 zeigten sich ähnliche Kurvenverläufe in den Diagrammen die den Schluss zulassen, dass GB14 im Hinblick auf die Knochenneubildung in zeitlicher und molekularer Hinsicht nahezu dieselben Prozesse durchlaufen. GB14 ist daher als vielversprechendes, bioaktives Material anzusehen, dessen Einsatz im Bereich präimp-

lantologischer Augmentationen vorteilhaft zu sein scheint. Weiterführende klinische Studien zur Bestätigung dieser Ergebnisse erscheinen demzufolge sinnvoll, ebenso Forschungsvorhaben zur Entwicklung weiterer Applikationsformen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Artzi, Z., Weinreb, M., Givol, N., Rohrer, M.D., Nemcovsky, C.E., Prasad, H.S. & Tal, H. (2004) Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int.J.Oral Maxillofac.Implants.* 19: 357-368.
- Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L. & Gupta, A.K. (1995) Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17: 77-83.
- Aubin, J.E., Turksen, K. & Heersche, J.N.M. (1993) Osteoblastic cell lineage. In: *Noda Med.Cellular and Molecular Biology of Bone.Academic Press.New York* 1-45.
- Berger, G., Gildenhaar, R. & Ploska, U. (1995) Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates. *Biomaterials* 16: 1241-1248.
- Berger, G., Gildenhaar, R. & Ploska, U. (1999) Solubility investigations of bone substitution materials based on calcium phosphates.
- Buser, D., Hoffmann, B., Bernard, J.P., Lussi, A., Mettler, D. & Schenk, R.K. (1998) Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin.Oral Implants.Res.* 9: 137-150.
- Cordioli, G., Mazzocco, C., Schepers, E., Brugnolo, E. & Majzoub, Z. (2001) Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin.Oral Implants.Res* 12: 270-278.
- De Aza, P.N. & Luklinska, Z.B. (2003) Effect of glass-ceramic microstructure on its in vitro bioactivity. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 14: 891-898.
- Ducheyne, P. & Qiu, Q. (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303.
- Fujishiro, T., Bauer, T.W., Kobayashi, N., Kobayashi, H., Sunwoo, M.H., Seim, H.B., III & Turner, A.S. (2007) Histological evaluation of an impacted bone graft substitute composed of a combination of mineralized and demineralized allograft in a sheep vertebral bone defect. *J.Biomed.Mater.Res.A* 82: 538-544.
- Gosain, A.K., Riordan, P.A., Song, L., Amarante, M.T., Kalantarian, B., Nagy, P.G., Wilson, C.R., Toth, J.M. & McIntyre, B.L. (2005) A 1-

- year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: III. Comparison with autogenous bone graft for facial augmentation. *Plast.Reconstr.Surg.* 116: 1044-1052.
- Gross, U. & Strunz, V. (1985) The interface of various glasses and glass-ceramics with a bony implantation bed. *J.Biomed.Mater.Res.* 19: 251-271.
- Gross, U.M. & Strunz, V. (1977) Surface staining of sawed sections of undecalcified bone containing alloplastic implants. *Stain Technol.* 52: 217-219.
- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC & Greenlee TK (1971) Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. pp. 117-142.
- Holand, W., Vogel, W., Naumann, K. & Gummel, J. (1985) Interface reactions between machinable bioactive glass-ceramics and bone. *J.Biomed.Mater.Res.* 19: 303-312.
- Hollinger, J.O. & Battistone, G.C. (1986) Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin.Orthop.Relat Res.* 290-305.
- Hollinger, J.O. & Kleinschmidt, J.C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J.Craniofac.Surg.* 1: 60-68.
- Hyakuna, K., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Kakutani, Y., Kitsugi, T., Takagi, H., Oka, M. & Kokubo, T. (1989) The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J.Biomed.Mater.Res.* 23: 1049-1066.
- Ignatius, A.A., Betz, O., Augat, P. & Claes, L.E. (2001a) In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J.Biomed.Mater.Res.* 58: 701-709.
- Ignatius, A.A., Schmidt, C., Kaspar, D. & Claes, L.E. (2001b) In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass-ceramics for bone substitutes. *J.Biomed.Mater.Res.* 55: 285-294.
- Kitsugi, T., Yamamuro, T., Nakamura, T. & Kokubo, T. (1989) The bonding of glass ceramics to bone. *Int.Orthop.* 13: 199-206.
- Klein, C.P., Abe, Y., Hosono, H. & de, G.K. (1984) Different calcium phosphate bioglass ceramics implanted in rabbit cortical bone. An interface study. *Biomaterials* 5: 362-364.
- Knabe, C., Berger, G., Gildenhaar, R., Howlett, C.R., Markovic, B. & Zreiqat, H. (2004a) The functional expression of human bone-

- derived cells grown on rapidly resorbable calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 25: 335-344.
- Knabe, C., Berger, G., Gildenhaar, R., Klar, F. & Zreiqat, H. (2004b) The modulation of osteogenesis in vitro by calcium titanium phosphate coatings. *Biomaterials* 25: 4911-4919.
- Knabe, C., Berger, G., Gildenhaar, R., Meyer, J., Howlett, C.R., Markovic, B. & Zreiqat, H. (2004c) Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *J.Biomed.Mater.Res.A* 69: 145-154.
- Knabe, C., Gildenhaar, R., Berger, G., Ostapowicz, W., Fitzner, R., Radlanski, R.J. & Gross, U. (1997) Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 18: 1339-1347.
- Knabe, C., Koch, C., Rack, A. & Stiller, M. (2008) Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials* 29: 2249-2258.
- Knabe, C., Kraska, B., Koch, C., Gross, U., Zreiqat, H. & Stiller, M. (2006) A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections. *Biotech.Histochem.* 81: 31-39.
- Knabe, C., Ostapowicz, W., Radlanski, R.J., Gildenhaar, R., Berger, G., Fitzner, R. & Gross, U. (1998) In vitro investigation of novel calcium phosphates using osteogenic cultures. *J.Mater.Sci.Mater.Med.* 9: 337-345.
- Kokubo, T. (1991) Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12: 155-163.
- Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z.T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. (1990) Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J.Biomed.Mater.Res.* 24: 331-343.
- Köster, K. (1976) Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Kalziumphosphatkeramik. *Langenbecks Arch.Chir.* 341 77-86.
- Köster, K., Heide, H. & König, R. (1977) Resorbierbare Kalziumphosphatkeramik im Tierexperiment unter Belastung. *Langenbecks Arch.Chir.* 343 173-181.
- Kotani, S., Fujita, Y., Kitsugi, T., Nakamura, T., Yamamuro, T., Ohtsuki, C. & Kokubo, T. (1991) Bone bonding mechanism of beta-tricalcium phosphate. *J.Biomed.Mater.Res.* 25: 1303-1315.

- Leniz, P., Ripalda, P. & Forriol, F. (2004) The incorporation of different sorts of cancellous bone graft and the reaction of the host bone. A histomorphometric study in sheep. *Int.Orthop.* 28: 2-6.
- MacNeill, S.R., Cobb, C.M., Rapley, J.W., Glaros, A.G. & Spencer, P. (1999) In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J.Clin.Periodontol.* 26: 239-245.
- Moimas, L., Biasotto, M., Di, L.R., Olivo, A. & Schmid, C. (2006) Rabbit pilot study on the resorbability of three-dimensional bioactive glass fibre scaffolds. *Acta Biomater.* 2: 191-199.
- Neo, M., Nakamura, T., Ohtsuki, C., Kokubo, T. & Yamamuro, T. (1993) Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: a comparative study by transmission electron microscopy. *J.Biomed.Mater.Res.* 27: 999-1006.
- Niedhart, C., Maus, U., Piroth, W., Miltner, O., Schmidt-Rohlfing, B. & Siebert, C.H. (2004) Evaluation of a resorbable, in situ setting bone substitute in a sheep model. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 71: 123-129.
- Ogose, A., Hotta, T., Kawashima, H., Kondo, N., Gu, W., Kamura, T. & Endo, N. (2005) Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J.Biomed Mater Res B Appl.Biomater.* 72: 94-101.
- Peters, C.L., Hines, J.L., Bachus, K.N., Craig, M.A. & Bloebaum, R.D. (2006) Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects. *J.Biomed.Mater.Res.A* 76: 456-462.
- Peters, F. & Reif, D. (2004) Funktionelle Materialien zur Knochenregeneration aus Beta-Tricalciumphosphat. *Mat.-wiss.u.Werkstofftech* 35 No. 4: 203-207.
- Posner, A.S. (1985) The mineral of bone. *Clin.Orthop.Relat Res.* 87-99.
- Schepers, E.J. & Ducheyne, P. (1997) Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J.Oral Rehabil.* 24: 171-181.
- Suba, Z., Hrabak, K., Huys, L., Coulthard, P., Maiorana, C., Garagiola, U. & Szabo, G. (2004) Histologic and histomorphometric study of bone regeneration induced by beta-tricalcium phosphate (multicenter study). *Orv.Hetil.* 145: 1431-1437.
- Tadjoedin, E.S., de Lange, G.L., Holzmann, P.J., Kulper, L. & Burger, E.H. (2000) Histological observations on biopsies harvested

following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin.Oral Implants.Res.* 11: 334-344.

Tadjoedin, E.S., de Lange, G.L., Lyaruu, D.M., Kuiper, L. & Burger, E.H. (2002) High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin.Oral Implants.Res.* 13: 428-436.

Tan, K.K., Tan, G.H., Shamsul, B.S., Chua, K.H., Ng, M.H., Ruszymah, B.H., Aminuddin, B.S. & Loqman, M.Y. (2005) Bone graft substitute using hydroxyapatite scaffold seeded with tissue engineered autologous osteoprogenitor cells in spinal fusion: early result in a sheep model. *Med.J.Malaysia* 60 Suppl C: 53-58.

Teramoto, H., Kawai, A., Sugihara, S., Yoshida, A. & Inoue, H. (2005) Resorption of apatite-wollastonite containing glass-ceramic and beta-tricalcium phosphate in vivo. *Acta Med.Okayama* 59: 201-207.

Zerbo, I.R., Bronckers, A.L., de Lange, G.L., van Beek, G.J. & Burger, E.H. (2001) Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. *Clin.Oral Implants.Res* 12: 379-384.

Zerbo, I.R., Bronckers, A.L., de, L.G. & Burger, E.H. (2005a) Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 26: 1445-1451.

Zerbo, I.R., Bronckers, A.L., de, L.G. & Burger, E.H. (2005b) Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 26: 1445-1451.

## **Danksagung**

In erster Linie gilt mein Dank Herrn PD Dr. Dr. Michael Stiller, der trotz seiner gering vorhandenen Zeit stets bereit war Fragen zu beantworten und zu erläutern und der sich dennoch oft Zeit für Korrekturen und Veränderungen nahm.

Weiterhin danke ich Frau PD Dr. Christine Knabe für Ihre kompetente Unterstützung, auch wenn sie meist am anderen Ende der Welt war.

Meiner Mutter möchte ich ebenfalls danken. Sie hielt mir insbesondere zu Beginn dieser Arbeit und speziell bei den Tierversuchen den Rücken frei.



## **Lebenslauf**

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