

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie
Direktor: Prof. Dr. mult. Robert Sader

**Histologische und histomorphometrische
in-vivo-Untersuchung der zellulären Reaktion
auf ein xenogenes Knochenersatzmaterial**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Johannes Eichelbaum

aus Bad Soden am Taunus

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. mult. Shahram Ghanaati
Korreferent:	Prof. Dr. Johannes Frank
Tag der mündlichen Prüfung:	18. November 2020

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	6
1 Einleitung	9
1.1 Atrophie des Kieferknochens	10
1.2 Knochenersatzmaterialien	12
1.2.1 Autologes Knochenimplantat	12
1.2.2 Allogener Knochenersatz	14
1.2.3 Xenogener Knochenersatz	14
1.2.4 Alloplastischer (Synthetischer) Knochenersatz	15
1.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	16
1.4 Grundbedingungen der Knochenneubildung	17
1.4.1 Osteogenese	17
1.4.2 Osteoinduktion	17
1.4.3 Osteokonduktivität	18
1.4.4 Physikalische Eigenschaften des Knochenersatzmaterials	18
1.5 Prozesse der Knochenregeneration und Einheilung	19
1.5.1 Allgemeine Aspekte der Wundheilung	20
1.5.2 Biomaterial-induzierte inflammatorische Geweberreaktion und Vaskularisierung	21
1.5.3 Zusammenwirken von Degradation und Neogenese	22
1.5.4 Materialspezifische Eigenschaften als Faktoren für den Heilungsprozess	24

1.5.5	Der Einfluss von Barrieremembranen/Kollagennetzen	26
1.5.6	Beispiele für unterschiedlich gesinterte bovine Knochenersatzmaterialien	27
1.6	Zielsetzung	29
2	Materialien und Methoden	30
2.1	Hypro-Oss®	31
2.1.1	Materialzusammensetzung	31
2.1.2	Herstellungsprozeß	31
2.2	Tiermodell	32
2.2.1	Versuchsordnung des subkutanen Implantationsmodells	32
2.2.2	Subkutane Implantation	33
2.2.3	Gewebepräparation des Implantationsareals	33
2.3	Histochemische Färbemethoden	35
2.3.1	HE-Färbung	35
2.3.2	Azan	37
2.3.3	Masson-Goldner	38
2.3.4	TRAP-Färbung	40
2.4	Immunhistologische Färbung: CD-68	42
2.5	Qualitativ-histologische Analyse	44
2.6	Quantitativ-histologische Analyse der Histomorphometrie	45
2.7	Statistische Analyse	47

3	Ergebnisse	48
3.1	Ex-vivo-Auswertung des Biomaterials	48
3.2	In-vivo-Auswertung des Biomaterials	49
3.2.1	Qualitative Untersuchung	49
3.2.2	Quantitative Untersuchung	56
3.2.2.1	Quantifizierung der Multinukleären Zellen	56
3.2.2.2	Vaskularisation	57
3.2.2.3	CD-68-positive Mononukleäre Zellen	58
3.2.2.4	CD-68-Expression Multinukleäre Zellen	59
4	Diskussion	60
4.1	Die Rolle von Makrophagen in der Wundheilung	61
4.2	Biomaterial-induzierte Bildung von Multinukleären Riesenzellen	62
4.3	Differenzierung von Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten	63
4.4	Korrelation zwischen Biomaterial-induzierter Bildung Multinukleärer Riesenzellen und Vaskularisation	65
4.5	Biomaterialeigenschaften als wichtige Faktoren für die Intensität der Fremdkörperreaktion	68
4.6	Einfluss der Herkunft des Biomaterials	72
4.7	Atelopeptidierung und Verzicht auf thermische Behandlung als Alleinstellungsmerkmal von Hypro-Oss®	73

5	Zusammenfassung	79
6	Summary	81
7	Verzeichnis der Quellen	84
7.1	Fachliteratur	84
7.2	Sonstige Quellen	88
8	Schriftliche Erklärung	89
9	Danksagung	90
10	Lebenslauf	91

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
BG:	Blutgefäße
BiG:	Bindegewebe
BMP:	engl. <i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BSE:	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CD:	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
DFDBA:	engl. <i>Demineralized Freeze-dried Bone Allograft</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FDBA:	<i>Freeze-dried Bone Allograft</i>
FG:	Fettgewebe
GBR:	engl. <i>Guided Bone Regeneration</i>
GG:	Granulationsgewebe
GTR:	engl. <i>Guided Tissue Regeneration</i>
HA:	Hydroxylapatit
HE:	Hämatoxylin und Eosin
MNGC(s):	Multinukleäre Riesenzelle(n)
p.i.	<i>post implantationem</i>
P-Wert:	von engl.: <i>Probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
SEM:	engl. <i>Scanning Electron Microscope</i>
TCP:	Trikalziumphosphate
TRAP:	Tartrat-resistente saure Phosphatase
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Atrophiestadien im Unterkiefer	11
Abbildung 2: Graphische Darstellung der Atrophiestadien im Oberkiefer	11
Abbildung 3: Einteilung der Knochenersatzmaterialien nach Herkunft	12
Abbildung 4: Hypro-Oss®-Granulat 1 – 2 mm	30
Abbildung 5: A: Tissue Processor, B: Rotationsmikrotom	34
Abbildung 6: Histomorphometrische Messung des Riesenzellenaufkommens	46
Abbildung 7: Granulatstruktur mittels Stereomikroskop	48
Abbildung 8: Granulatstruktur mittels Lichtmikroskop	49
Abbildung 9: Tag 3 <i>post implantationem</i>	51
Abbildung 10: Tag 15 <i>post implantationem</i>	53
Abbildung 11: Tag 30 <i>post implantationem</i>	55

Abbildung 12: Histomorphometrische Quantifizierung der MNGCs/mm ²	56
Abbildung 13: Vaskularisation an Tag 3, 15 und 30	57
Abbildung 14: CD-68 (Makrophagen)	58
Abbildung 15: CD-68-Expression von Multinukleären Riesenzellen	59
Abbildung 16: Differenzierung von Makrophagen	63
Abbildung 17: Phagozytotische Funktion von Makrophagen	70

Tabellen:

Tabelle 1: Atrophiestadien und Morphologie des Kieferkamms nach Cawood und Howell	10
Tabelle 2: Die verbreitetsten bovinen Knochenersatzmaterialien im Überblick	27
Tabelle 3: Protokoll der Gewebeaufbereitung	34
Tabelle 4: Protokoll der Entparaffinierung	35
Tabelle 5: Protokoll der HE-Färbung	36
Tabelle 6: Protokoll der Azan-Färbung	37
Tabelle 7: Protokoll Masson-Goldner-Trichom-Färbung	38
Tabelle 8: Protokoll TRAP-Färbung	41
Tabelle 9: Protokoll für die Herstellung von Tris-Malein-Puffer	41
Tabelle 10: A: Protokoll der CD-68-Färbung	43
Tabelle 10: B: Protokoll der CD-68-Gegenfärbung	44
Tabelle 11: MNGC- u. Gefäßbildung in Abhängigkeit von der Sintertemperatur	74

1 Einleitung

Ausgangspunkt für die Verwendung von Knochentransplantat und Knochenersatzmaterialien in der Medizin und der Zahnmedizin ist das Vorhandensein von Knochendefiziten als Folge von Knochenabbauprozessen oder chirurgischen Eingriffen, aber auch im Rahmen des Knochenaufbaus zur Schaffung einer Leitstruktur, z. B. vor einer Implantatinserterion, welche dem regenerierenden Knochengewebe eine Leitstruktur bietet⁶ und eine dauerhafte und feste Verankerung im Knochenfundament ermöglicht. So ist z. B. ein Zahnverlust Auslöser einer Alveolarkammatrophy: das Fehlen von abwechselnder Zug- und Druckbelastung des Alveolarknochens schwächt die Fasern des Zahnfachs und löst einen fortschreitenden Knochenabbauprozess aus. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Inaktivitätsatrophy mit der Folge resorptiver Prozesse, die sich in horizontaler und vertikaler Richtung vollziehen⁵⁸. Im Oberkiefer verläuft die Resorption in zentripetaler, im Unterkiefer in zentrifugaler Dimension¹⁵.

Insbesondere Druckkräfte wirken knochensubstanzaufbauend, Zugkräfte fördern die Bindegewebsbildung¹⁹. Die erfolgreiche Wiederherstellung der Kaufunktionen ist ganz wesentlich davon abhängig, wie schnell eine Implantatinserterion nach einem Zahnverlust erfolgt. Weitere Einflussfaktoren sind u.a. Geschlecht, Ober- oder Unterkiefer, Störungen des Hormonhaushalts, entzündliche Vorgänge, Knochendichte und der altersbedingte Pneumatisierungsgrad des Sinus maxillaris⁷⁵.

Ziel jeder Knochenersatztherapie ist letztendlich die erfolgreiche ossäre Integration, wie sie als Osteogenese bei autologem Knochentransplantat beobachtet werden kann und dort die besten Ergebnisse liefert.

1.1 Atrophie des Kieferknochens

Nach Zahnverlust durchläuft das Hart- und Weichgewebe einen intra- und extraalveolären Anpassungsprozess, welcher aufgrund fehlender Zug- und Druckkräfte zu einer Rückbildung des betroffenen Kieferkammabschnitts und damit zu einer Inaktivitätsatrophie führt⁸².

Die Resorptionsgeschwindigkeit ist in der Anfangsphase unmittelbar nach Zahnverlust am Größten⁵ und verläuft im Oberkiefer langsamer als im Unterkiefer⁴⁸. Im Oberkiefer expandiert dabei der Sinus maxillaris durch eine fortgesetzte Pneumatisierung in die leeren Alveolarfortsätze und höhlt diese bisweilen vollständig aus. Ein zügiger Knochenaufbau ist für die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung des Kauvermögens insofern alternativlos.

Cawood und Howell haben 6 Atrophie- (Resorptions-) Klassen definiert, die sich nach dem Umfang des Knochenangebots im Kieferkamm unterscheiden:

Tabelle 1: Atrophiestadien und Morphologie des Kieferkamms nach Cawood und Howell¹⁵

Atrophiestadien	Morphologie des Kieferkamms
1	Bezahnter Kieferkamm vor Extraktion
2	Leere Alveole unmittelbar nach Extraktion
3	Hoher, breiter, abgerundeter, verheilter Alveolarrand
4	„Messerschneidenförmiger“ (scharfer), hoher Rand
5	Abgerundeter, höhenverringertes Alveolarrand
6	Vollständig resorbierter, hochatropher Kieferkamm

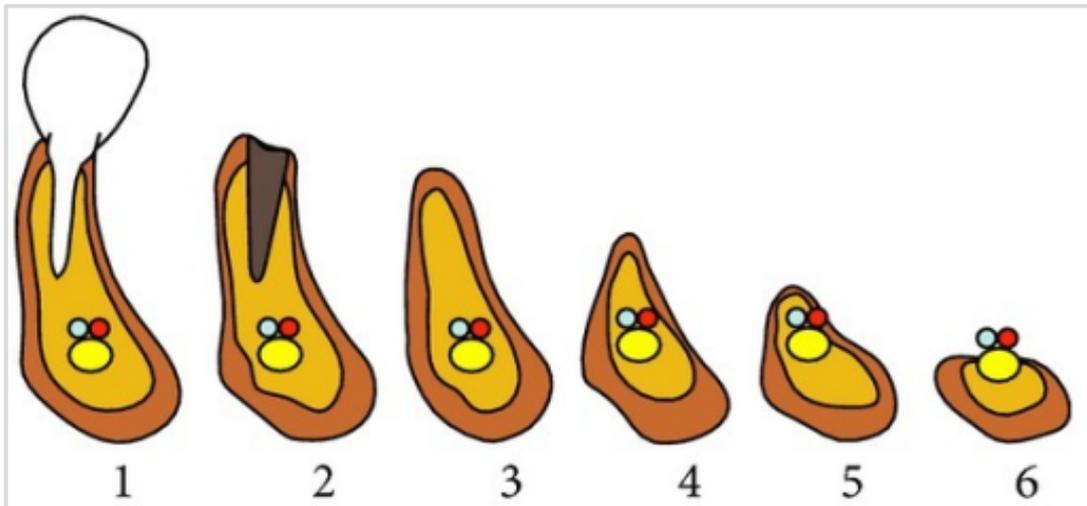


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Atrophiestadien im Unterkiefer^{16 17}

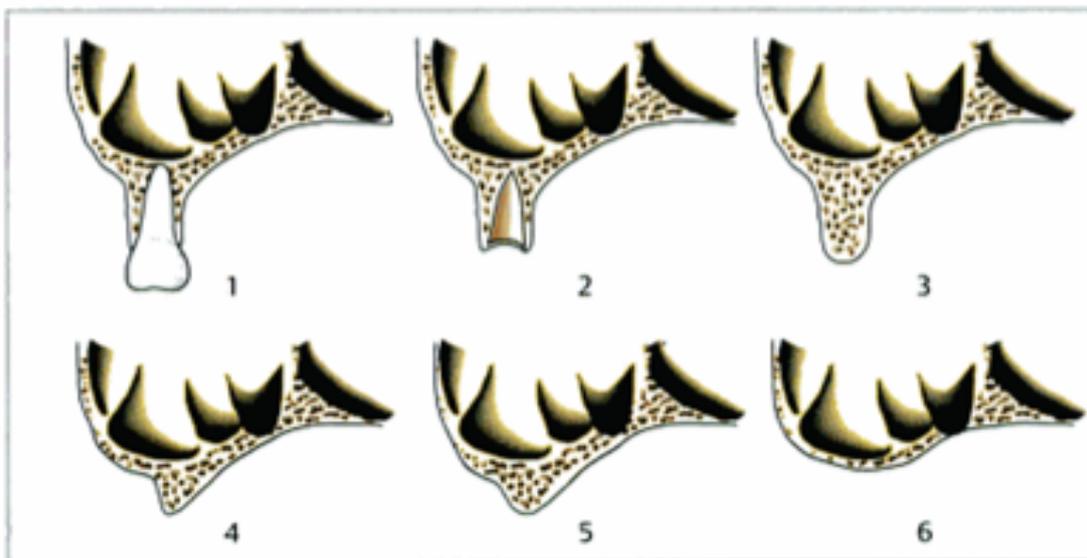


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Atrophiestadien im Oberkiefer⁶⁸

Prothetische Maßnahmen können aufgrund fehlender Zug- und reduzierter Druckbelastung eine Resorption der Knochensubstanz nicht verhindern. Aus diesem Grund wird heutzutage im Zusammenhang mit prothetischen Maßnahmen i.d.R. auf einen Knochenaufbau verzichtet.

Knochenersatzmaterialien spielen eine immer wichtigere Rolle in der modernen Oralchirurgie⁶³ und werden seit Jahrzehnten zunehmend angewendet und

erforscht. Sie finden z. B. Anwendung im Bereich der sogenannten Gesteuerten Gewebe- und Knochenregeneration (engl. *Guided Tissue / Bone Regeneration (GTR/GBR)*⁶⁶, zur Füllung kritischer Größendefekte⁶⁷ zum Erhalt von Implantaten, zum Knochenaufbau als Basis für neue Implantate und zur Sinusboden-Elevation.

1.2 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien lassen sich immunologisch in autologe, allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien unterscheiden⁴⁸.

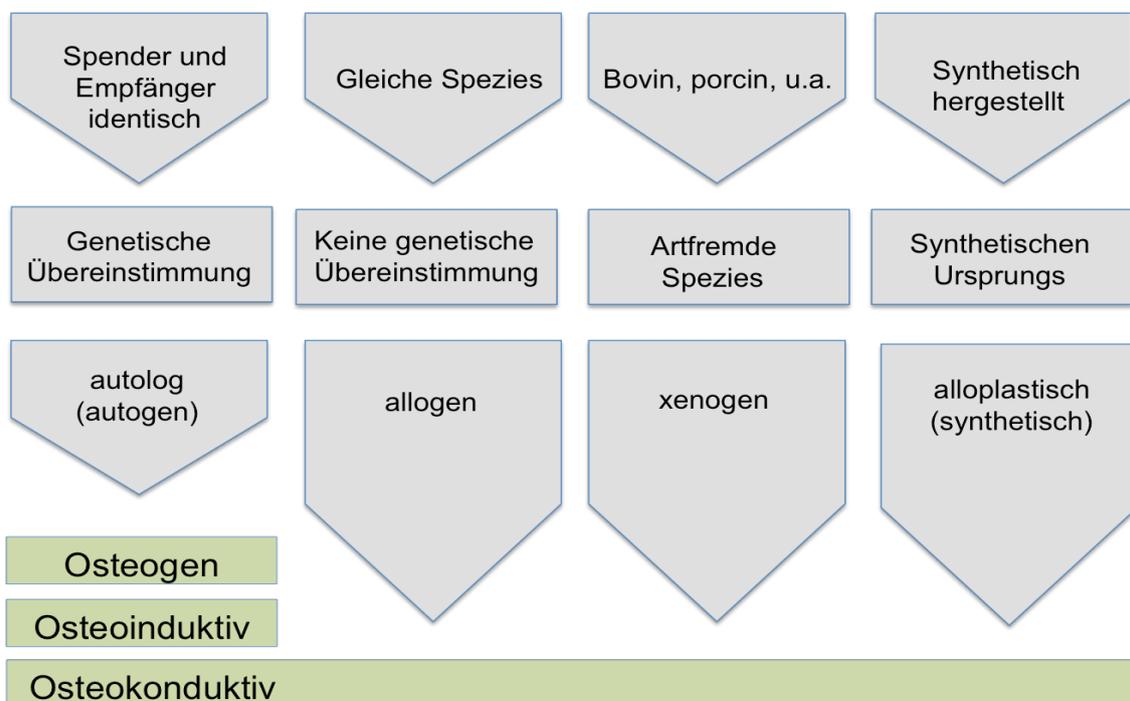


Abbildung 3: Einteilung der Knochenersatzmaterialien nach Herkunft

1.2.1 Autologes Knochenimplantat

Autologes Knochenimplantat ist kein Knochenersatz im eigentlichen Sinne, da es sich um vitale, körpereigene Knochensubstanz handelt, bei der Spender und Empfänger identisch sind, somit aufgrund fehlender Antigenität

immunologisch unbedenklich, d.h. es besteht kein Risiko einer Infektion oder einer immunologischen Implantatabstoßung. Entnahmebereiche in der Oralchirurgie sind z.B. Kieferwinkel und Kinn. Dabei werden auch pluripotente Vorläuferzellen und Osteoblasten, die sich im transplantierten Gewebe befinden, mit übertragen. Osteoblasten sind in der Lage, eigenständig die Neubildung von Knochen anzustoßen, wobei insbesondere spongiösen, kortikospongiösen und mikrovaskulären Transplantaten eine hohe osteogene Potenz zugeschrieben wird⁷². Autologes Gewebe enthält weiterhin für die Knochenbildung wichtige Matrixproteine, welche die Vaskularisierung positiv beeinflussen und damit auch osteoinduktiv und –konduktiv wirken⁶.

Aufgrund der idealen Eigenschaften autologen Knochentransplantats auf die Knochenregeneration spricht man in diesem Zusammenhang auch vom *Goldstandard*⁷⁷. Die Gewinnung autologen Knochenmaterials bedingt jedoch die Eröffnung eines weiteren Operationsgebiets mit den damit verbundenen Risiken und Komplikationen⁵³. Dieses Verfahren ist insbesondere bei kleineren Entnahmen von Knochensubstanz – z.B. aus dem Unterkiefer - wenig problematisch. Enoral steht allerdings nur eine limitierte Menge an Knochentransplantat zur Verfügung, weshalb die Anforderung ausreichender Verfügbarkeit nicht erfüllt ist. Aus diesem Grund wird zunehmend an anderen Ersatzmaterialien geforscht. Aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit ist es u.U. sinnvoll, autologe Knochensubstanz mit anderen Knochenersatzmaterialien zu vermischen.

Von Knochenersatzmaterialien im eigentlichen Sinne spricht man dagegen in Bezug auf nicht-körpereigene Substanzen, welche strukturelle Elemente und deren Funktionen ersetzen und den Knochenheilungsprozess fördern⁶⁴. Diese Materialien sind zudem in beliebigen Mengen verfügbar, weshalb sich der Fokus der Forschung und Anwendung zunehmend auf allogene, xenogene und synthetische Ersatzmaterialien richtet. Das Knochenersatzmaterial sollte idealerweise den Eigenschaften autologer Knochensubstanz entsprechen, und zwar in Bezug auf Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion (vgl. 1.4).

1.2.2 Allogener Knochenersatz

Allogenes Knochenersatzmaterial wird aus Gewebe von Spendern der gleichen Spezies gewonnen, aber nicht vom selben Individuum. Dies bedingt die Möglichkeit einer immunologischen Reaktion bis hin zur Abstoßung. Aus diesem Grund wenden die verschiedenen Hersteller unterschiedliche Aufreinigungsprozesse an, bei denen das Material auf physikalischem und chemischem Weg – je nach Hersteller auf unterschiedliche Weise - immunologisch neutralisiert wird³⁴. Dabei wird jedoch auch die biologische Fähigkeit zur Osteogenese zerstört. Allogenes Knochenersatzmaterial besitzt initial das gleiche osteoinduktive Potential wie das autologe⁷². Allerdings besteht das Risiko einer Immunreaktion sowie das einer Übertragung von Infekten, weshalb weitere Aufbereitungsschritte erfolgen, die aber die osteoinduktiven Eigenschaften und die Funktion der Osteoblasten einschränkt, was wiederum die Einheilung konterkariert³⁴. Die Verfügbarkeit ist jedoch besser als bei autologem Ursprung (z. B. unter Nutzung von Organspenden oder Knochenbanken). Auch entfallen die Risiken der Transplantation und das sogenannte *Donor's-Dilemma*, welches die möglichen adversen Effekte für den Spender umschreibt³⁹.

1.2.3 Xenogener Knochenersatz

Xenogener Knochenersatz ist dagegen tierischen Ursprungs. Spender gehören einer anderen Species an, wie z. B. Rinder, Schweine oder Pferde. Sämtliche zellulären Bestandteile müssen über Aufreinigungsprozesse wie z.B. Lyophilisation entfernt werden, um Abstoßungsreaktionen und Infektionen weitestgehend zu vermeiden. Damit einher geht auch die Eliminierung vitaler, knochenbildender Zellen; übrig bleibt lediglich der anorganische Teil der Knochensubstanz, in den neuer Knochen einwachsen kann. Xenogenes Knochenersatzmaterial hat insofern nur osteokonduktive Eigenschaften⁷², da bei der Aufbereitung auch die osteoinduktiven Matrixproteine zerstört werden.

Xenogenen Knochenmaterialien wird allgemein eine gute Langzeitverträglichkeit, fehlende Abstoßungs- und allergische Reaktionen sowie osteokonduktive Eigenschaften zugeschrieben⁷². Letztendlich werden durch die Aufreinigung sowie die chemisch-physikalische Behandlung sämtliche organischen Gewebestandteile entfernt: es verbleibt lediglich eine anorganische Knochenhartschubstanz⁴⁹.

Heute werden insbesondere Rinderknochen als Ausgangsmaterial verwendet, wobei in der bovinen Peer-Gruppe bevorzugt Hypro-Oss[®], Bio-Oss[®], BEGO OSS[®] und SmartBone[®] zur Anwendung kommen.

1.2.4 Alloplastischer (Synthetischer) Knochenersatz

Während natürliche Biomaterialien (wie z.B. allogene und xenogene) die Makro- und Mikrostrukturen weitgehend vorgeben und an ihnen zur Unterbindung von möglichen Immunreaktionen aufwendige Aufreinigungen vorgenommen werden müssen, fokussieren sich Wissenschaft und Anwendung mehr und mehr auf synthetische Materialien, die sich ohne *de novo*-Synthese quasi „maßschneidern“ lassen²⁴. Alloplastischer Knochenersatz ist synthetischen Ursprungs auf Basis von Verbindungen, die in ihren Eigenschaften chemisch und physikalisch der Knochenhartschubstanz ähneln und ebenso osteokonduktiv wirken sollen. Die Basis bildet meist Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP), Glaskeramik oder Mischungen der verschiedenen Substanzen wie z. B. von HA und β -TCP aus der Materialgruppe der biphasischen Kalziumphosphatkeramiken. Vorteil ist das Ausbleiben antigener Reaktionen, und das Material lässt sich aufgrund seiner synthetischen Herkunft hinsichtlich der spezifischen physiko-chemischen Eigenschaften individuell konfektionieren. Synthetischer Knochenersatz ist in verschiedenen Anwendungsformen (Paste, Granulat, Block) unbegrenzt verfügbar, leicht zu verarbeiten und vergleichsweise kostengünstig.

Im Gegensatz zu autologen Knochentransplantaten haben alle genannten alternativen Knochenersatzmaterialien keine osteoinduktiven und osteogenen

Eigenschaften und erfüllen somit lediglich eine osteokonduktive Funktion. Autologes Knochentransplantat hat im übrigen den Vorteil, dass es in das umgebende Gewebe integriert wird, während nicht-autologes Knochenersatzmaterial lediglich eine Platzhalterfunktion ausübt: das Biomaterial wird nur temporär integriert, später jedoch im Zuge der Fremdkörperreaktion degradiert und Schritt für Schritt durch körpereigene Knochensubstanz ersetzt.

Es gibt aber eine Reihe von Gründen, die eine Suche nach Alternativen zu autologem Knochentransplantat nahe legen: begrenzte Verfügbarkeit, Notwendigkeit eines zweiten, mit zusätzlichen Risiken behafteten chirurgischen Eingriffs und der möglichen Folge von Wundheilungsstörungen, Infektionen und Morbidität an der Entnahmestelle^{25 56}.

Allogener, xenogener oder synthetischer Knochenersatz hat zwar ähnliche Eigenschaften wie autologes Knochentransplantat, allerdings ohne dessen osteogenetische und osteoinduktive Funktion, da es vor Verwendung aufgereinigt wird. Anderenfalls ergeben sich Risiken aus der Antigenität und der Übertragung von Krankheiten³⁴, z.B. von Prionen als Auslöser von BSE.

Es gibt 2 grundsätzliche Methoden der Aufreinigung: FDBA (Freeze-dried bone allograft) und DFDBA (Demineralized freeze-dried bone allograft)⁴⁴. FDBA bildet ein osteokonduktives Gerüst für Knochenwachstum, DFDBA induziert die mesenchymale Zellmigration und die Osteogenese. Es enthält knochenmorphogenetische Wachstumsfaktoren (engl. BMP = *bone morphogenetic proteins*), welche die Osteoinduktion stimulieren⁷¹.

1.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sollen dazu dienen, atrophische Knochendefekte zu reparieren, das lokale Knochenangebot zu erhöhen und eine Basis zu schaffen für das Einbringen von Implantaten⁷⁹. Knochenersatzmaterialien sollten im wesentlichen folgende Eigenschaften aufweisen:

- Biokompatibilität: keine immunologischen (Abstoßungs-) Reaktionen, milde Fremdkörperreaktion
- gute Integration in die vorhandene Knochensubstanz:
 - Osteoinduktivität • Osteokonduktivität • Osteogenese
- Aufweisen hoher Festigkeit
- Resorbierbarkeit
- Porosität
- leichte Verfügbarkeit
- einfache Anwendung

Da bisher kein Knochenersatzmaterial gefunden werden konnte, welches all diese Anforderungen in sich vereinigt, befasst sich die wissenschaftliche Forschung im wesentlichen damit, Materialien und Methoden zu finden, die den einzelnen Anforderungskriterien in ihrer Gesamtheit am ehesten entsprechen. Der Erforschung der einzelnen Materialien nach ihrem Ursprung kommt dabei große Bedeutung zu.

1.4 Grundbedingungen der Knochenneubildung

1.4.1 Osteogenese

Unter Osteogenese versteht man ganz allgemein den Prozess der Knochen(neu)bildung durch Osteoblasten im Transplantat³⁷, d.h. die Fähigkeit, eigenständig Knochen zu bilden. Insbesondere multipotente Vorläuferzellen aus dem Knochenmark können zu knochenbildenden Zellen ausreifen. Die Osteogenität nimmt jedoch mit zunehmendem Lebensalter ab.

1.4.2 Osteoinduktion

Osteoinduktion umfasst die Neubildung von Knochen aus pluripotenten Reservezellen (Stammzellen), die im perivaskulären Bindegewebe und im Knochen vorkommen und durch morphogene Faktoren aktiviert werden

können⁸⁰. Dies erfolgt durch Stimulierung der Differenzierung knochenbildender Zellen mittels osteoinduktiver Proteine wie z. B. BMP und anderer Zytokine. BMP sind Teil der organischen Knochensubstanz, deren Antigenität durch Aufreinigungsprozesse reduziert wird. Osteoinduktive Wachstumsfaktoren können die Defektregeneration beschleunigen, können aber eine nicht-ausreichende Vaskularisierung zur Folge haben, und es gibt noch keine ausreichenden Erfahrungen bezüglich der optimalen Zytokinkonzentration⁷⁴.

Voraussetzung für einen osteoinduktiven Prozess ist eine Demineralisation des devitalen Knochens, in dessen Folge osteoinduktiv wirksamen Proteine aus der Knochenmatrix diffundieren und eine Zelldifferenzierung einleiten können⁸¹. Die osteoinduktiven Proteine bewirken eine Differenzierung pluripotenter Mesenchymzellen des Implantatlagers in Knorpel- und Knochenzellen⁸¹.

1.4.3 Osteokonduktivität

Osteokonduktivität beschreibt die Eigenschaft eines Materials, eine Basisstruktur für das Einwachsen neuer Knochensubstanz bereitzuhalten. Damit erfüllt das Ersatzmaterial eine Platzhalterfunktion als passives Gerüst für die Verankerung von Knochenzellen⁶⁰. Gleichzeitig verhindert es das frühzeitige Einwachsen von Weichteilgewebe in das Implantatgebiet². Osteokonduktivität schafft also die Voraussetzungen für die Ansiedlung neuer Knochensubstanz (osteopromotive Wirkung). Nicht-autologe Knochenersatzmaterialien verfügen aufgrund ihrer Zellfreiheit lediglich über osteokonduktive Eigenschaften.

1.4.4 Physikalische Eigenschaften des Knochenersatzmaterials

Ghanaati et al.²⁶ haben den Einfluß von Granulatgröße, -form und -porosität von Knochenersatzmaterialien auf die Gewebsreaktion untersucht und nachgewiesen, dass eine Veränderung der physikalischen Eigenschaften des Knochenersatzmaterials einen großen Einfluß auf die Entzündungsreaktion, die Vaskularisierung und die Integration des Biomaterials hat.

Poren vergrößern die Oberfläche und schaffen damit die Voraussetzungen für eine durchgehende Vaskularisierung eines Defektes. Porosität ist insofern Synonym für die von Knochenersatzmaterial angebotene Materialoberfläche: eine höhere Porosität und damit eine größere Fläche erleichtert die Anlagerung neuen Knochens⁷⁴.

Ein weiteres Kriterium für das Einwachsen neuen Knochens in das Material ist die Größe der Poren²⁰. Noch ist nicht vollständig geklärt, welche Porengröße optimale Voraussetzungen für die Knochenbildung in Ersatzmaterialien bietet. Bei zu geringen Porengrößen bleibt das Einwachsen von Knochen aus, weil kein Osteoid synthetisiert wird, Porengrößen von 300 – 500 μ m werden als ideal angesehen⁷⁴. Neben der Porengröße sind auch die interkonnektierenden Porositäten, d.h. die Querverbindungen zwischen den Poren, für die Prozesse des Auf-, Ab- und Umbaus von Bedeutung⁷⁴.

Je nach Herkunft des Ausgangsmaterials zeigen Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien unterschiedliche osteokonduktive, osteoinduktive und osteogenetische Eigenschaften.

1.5 Prozesse der Knochenregeneration und Einheilung

Ausgangspunkt jeglicher Zellbildung sind mesenchymale, undifferenzierte Stammzellen, die in den verschiedenen Geweben des Körpers vorkommen und durch die Sekretion von Signalmolekülen Heilungsprozesse auslösen. Mesenchymale Stammzellen kommen im Knochenmark, im Periost und im Muskelgewebe vor und können aufgrund ihrer Multipotenz in Zellen der verschiedensten Zelllinien differenzieren¹⁴.

1.5.1 Allgemeine Aspekte der Wundheilung

Als Wunde gilt jegliche Unterbrechung der anatomischen und physiologischen Funktion von Körpergewebe¹². Wundheilung zielt insofern darauf ab, diese Funktionen wieder herzustellen – idealerweise *ad integrum*.

Dabei unterscheidet man die Primäre (Wunde nicht infiziert, ohne sichtbare Entzündung, minimale Narbenbildung, schnelle Heilung) und Sekundäre Wundheilung (meist infektiös, Gewebeneubildung, längerer Heilungsverlauf, Entstehung von Narbengewebe).

Hinsichtlich der Ursache unterscheidet man zwischen traumatisch, iatrogen und chronisch.

Der zeitliche Ablauf der sekundären Wundheilung vollzieht sich in mehreren Phasen⁶²:

- Reinigungs- oder Exsudationsphase: Abtransport von Geweberesten und Verunreinigungen, Bildung eines Fibringerüsts: es zeigen sich die typischen Entzündungszeichen: *Dolor, Calor, Tumor, Rubor* und *Functio laesa*.
- Inflammatorische Phase, in der u.a. Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten aktiv werden.
- Proliferations- oder Granulationsphase: neues Gewebe wird gebildet. In dieser Phase ist die Wunde insbesondere durch mechanische Reizung und Infektion gefährdet.
- Reparative Phase mit Wundverschluß und Epithelisierung, d.h. Bildung von gefäßfreiem Oberflächengewebe, das sich durch Diffusion vom darunter liegenden Bindegewebe ernährt. Die Funktion des Epithelgewebes besteht in der Bildung einer Barriere, der Resorption und der Sekretion. In der Maturationsphase reifen Kollagenfasern aus, es entsteht zell- und gefäßarmes Narbengewebe, die Wundkontraktion führt zu einer Verkleinerung der Narbe.

Letztendlich wird durch die Gefäßverletzung, die jeder Insertion von Knochenersatzmaterial vorausgeht, eine Kaskade von Gewebsreaktionen und Vaskularisierungsprozessen ausgelöst: am Gewebe-Materialübergang bildet sich eine fibrin-dominierte provisorische Matrix.

1.5.2 Biomaterial-induzierte inflammatorische Gewebereaktion und Vaskularisierung

Nach Einbringung eines Knochenersatzmaterials nicht-autologen Ursprungs vollziehen sich im Implantationsbett als Folge einer Fremdkörperreaktion parallel verschiedene Prozesse, die die Geweberegeneration bis zur angestrebten *restitutio ad integrum* einleiten sollen. Dabei werden 2 Arten von Gewebereaktion unterschieden: einmal die physiologische Zellreaktion der Wundheilung auf Basis der Existenz von Mononukleären Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten, zum anderen die biomaterialinduzierte Fremdkörperreaktion auf die Einbringung körperfremden Materials durch Multinukleäre Riesenzellen (MNGCs)².

Die inflammatorische Gewebeantwort ist die Reaktion auf die Implantation eines Biomaterials, wodurch eine Migration und Anlagerung u.a. von Monozyten und Makrophagen induziert wird, die teilweise zu Multinukleären Riesenzellen (MNGCs) fusionieren können^{28 59 76}.

Makrophagen und MNGCs erfüllen dabei eine doppelte Funktion im Rahmen zweier gegenläufiger Prozesse: auf der einen Seite sind sie an der Degradation des Biomaterials beteiligt und schaffen damit osteokonditiv Platz für neu zu bildende Knochensubstanz. Andererseits induzieren sie die Bildung von VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) als Auslöser für die Bildung von Endothelzellen und den Prozess der Vaskularisierung. Damit schaffen sie wiederum eine Grundlage für das Wirken von Osteoblasten, die eigenständig VEGF sezernieren⁶. Die knochenbildenden Zellen sind damit in der Lage, den zuvor osteokonditiv geschaffenen Platz mit neugebildetem Knochengewebe zu füllen.

Das Ausmaß der Bildung von MNGCs wird u.a. von der Form und Größe der Knochenersatzgranulate, der Porosität, der chemischen Zusammensetzung²⁷ und der Sintertemperatur bei der Aufreinigung beeinflusst⁷, wobei vermutet wird, dass eine höhere Sintertemperatur zu einer steigenden Anzahl von MNGCs und einer schnelleren Degradation des Knochenersatzmaterials führt⁶⁷.

Die Fremdkörperreaktion ist insofern die Antwort des Körpers auf die Einbringung körperfremden Materials²⁶ und steht am Beginn eines sich selbst in Gang haltenden und beschleunigenden Kreislaufs von Degradation, Vaskularisierung und Neogenese bis hin zur angestrebten Knochenheilung. MNGCs erfüllen so eine wichtige Funktion für die Substitution des Knochenersatzes durch körpereigenes Knochengewebe⁶: sie sind einerseits entzündungsfördernd, was für die Degradation von Bedeutung ist, andererseits exprimieren sie auch entzündungshemmende und heilungsfördernde Moleküle wie VEGF⁸, auch wenn bis heute noch nicht vollständig geklärt zu sein scheint, welches Ausmaß der Biomaterial-induzierten inflammatorischen Gewebereaktion eine optimale (Knochen-) Geweberegeneration ermöglicht⁶.

1.5.3 Zusammenwirken von Degradation und Neogenese

Auch im Prozeß der Osteogenese stehen ganz am Anfang mesenchymale Stammzellen, die über die Sekretion von Signalmolekülen Knochenheilungsprozesse auslösen. Im Bereich der Knochenneubildung haben Caplan und Bruder¹⁴ das Potential der Differenzierung pluripotenter Stammzellen über Osteoblasten und Osteozyten zu Knochensubstanz beschrieben.

Die hochdifferenzierte Trockenmasse des Knochengewebes besteht aus organischen (ca. 1/3) und anorganischen Bestandteilen, primär Kalzium, das mit Hilfe von Vitamin D in das Knochengewebe eingebaut wird. Zu Beginn des Ossifikationsprozesses steht die Bildung von diffusem Geflechtknochen, welcher sich über den Umbau der Fibrillen in Lamellenknochen verwandelt, bei dem die Kollagenfasern parallel ausgerichtet sind. Darin enthalten sind die

Osteozyten, welche später die Bildung osteoidproduzierender Osteoblasten induzieren. Sie bilden sich schichtweise in der Nähe der Knochenoberfläche und lagern Knochenmatrix an⁴²; dabei bilden und mineralisieren sie Osteoid und werden zu Osteozyten, die über sogenannte *caniculi* aus dem Blutsystem versorgt werden. Weiterhin findet man bei diesem integrierenden Prozeß auch zahlreiche Wachstumsfaktoren wie BMP⁷². Für die Mineralisierung ist das Vorhandensein von Calcium und Phosphor im Blutplasma notwendig. Eine ausreichende Blutversorgung ist deshalb Grundbedingung für die Produktion von Knochenmatrix⁴⁵.

Osteoklasten sind Teil des Makrophagensystems und entstehen durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen. Osteoklasten durchlaufen in ihrer Reifung 4 Stadien: Proliferation, Differenzierung, Fusion und Aktivierung. In der Differenzierungsphase hören die Zellen auf, sich zu teilen, werden TRAP-positiv (TRAP = engl. *Tartrat Resistant Acid Phosphatase*) und fusionieren danach zu Multinukleären Riesenzellen¹⁸. Die TRAP-Expression ist insofern sowohl ein Marker für Osteoklasten als auch Multinukleäre Riesenzellen.

Osteoklasten sind in der Lage, auf enzymatischem Weg Knochengewebe abzubauen, sorgen für den Ab- und Umbauprozess und bieten somit die osteokonduktiven Voraussetzungen für die An- und Einlagerung neuen Knochengewebes⁶⁴. Zwischen substanzaufbauenden Osteoblasten und substanzabbauenden Osteoklasten, die scheinbar gegensätzlich agieren, bestehen insofern eine Vielzahl von Wechselwirkungen. Die Balance zwischen osteoklastischer Resorption und osteoblastischer Synthese wird auch als *coupling* bezeichnet⁵⁷.

Osteokonduktives Knochenersatzmaterial bildet die Basis für Endothelien u.a. zur Integration in die vorgegebene Leitstruktur. Ziel ist der biologische Abbau des Knochenersatzmaterials und dessen Ersatz durch neu gebildete Knochensubstanz (*remodelling*). Dies vollzieht sich in drei Phasen: In der Aktivierungsphase (1) werden die Zellen der Osteoblastenlinie und Osteoklastenvorläuferzellen aktiviert. Es folgt die Phase (2) der Resorption durch Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Osteoklasten.

In der Phase (3) der Knochenbildung wird durch Osteoblasten der Knochen je nach Bedarf wiederaufgebaut oder angepasst⁵⁰. Die resorptive Funktion von Osteoklasten schafft also den Platz für Osteoblasten, die daraufhin Osteoid sezernieren und die neue Knochensubstanz mineralisieren. Die Resorption durch Osteoklasten ist insofern ein wichtiges Kriterium für die Auswertung eines Knochenersatzmaterials⁵⁰.

Die Prozesse der Resorption des Knochenersatzmaterials und des Aufbaus körpereigenen Knochens sollten im Idealfall im Gleichschritt erfolgen, da es sonst zur Ausbildung von bindegewebigen, biomechanisch minderwertigen Strukturen kommt⁷⁴. Degradation und Neogenese sind insofern gegenläufige Prozesse, wobei die Gewebereinheilung in einem schleichenden Prozeß sukzessive das Knochenersatzmaterial osteokonduktiv ersetzt.

Voraussetzung für eine vollständige Geweberestitution ist eine sukzessive Degradation der Knochenersatzmaterialien⁶. Deshalb gilt es, ein Knochenersatzmaterial zu finden, das ein Gleichgewicht zwischen Substanzverlust und Osteointegration (*coupling*) sicherstellt. Ein zu schneller Knochenabbau durch Osteoklasten kann zu Knochenverlust führen, umgekehrt ergibt sich ein Zuwachs an Knochengewebe⁴⁰. Letztendlich ist die erfolgreiche Regeneration defekten oder fehlenden Gewebes ein komplexer Prozeß der Interaktion zwischen implantiertem Biomaterial und peri-implantärem Gewebe, der noch nicht vollständig geklärt ist⁴⁷.

1.5.4 Materialspezifische Eigenschaften als Faktoren für den Heilungsprozeß

Ghanaati et al.²⁶ haben die Zusammenhänge zwischen materialspezifischen Eigenschaften auf die Bildung von Multinukleären Riesenzellen und die Vaskularisierung qualitativ und quantitativ untersucht. Granulatgröße, Form und Porosität können großen Einfluß auf die immunologische Gewebereaktion haben, über deren Kombination aufgrund der unterschiedlichen

Materialeigenschaften die Bildung von MNGCs und damit die Materialvaskulierung und -degradation beeinflusst, im Idealfall sogar gesteuert werden kann.

Daneben sind auch die materialspezifischen Eigenschaften des Knochenersatzmaterials essentielle Voraussetzung für eine durchgängige Integration und Vaskularisierung des Knochenersatzmaterials, um die Besiedlung durch knochenbildende Zellen zu ermöglichen⁴⁹, so u.a. die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien. Einer dieser Faktoren ist die Porosität des Knochenersatzmaterials: größere Porosität erhöht die Materialoberfläche und verbessert Ein- und Anlagerung neuen Knochens, reduziert jedoch die Belastungsstabilität und Festigkeit. Die Poren ermöglichen die Adhäsion und Ausbreitung der Osteoblasten⁶⁴. Während autologes, vitales Knochenersatzmaterial bereits zur Knochenbildung befähigte Osteoblasten und Vorläuferzellen sowie eine schon vorhandene Vaskulatur enthält, sind diese Voraussetzungen bei nicht-autologem Knochenmaterial nicht vorhanden.

Auch in anderen Studien⁶ wurde aufgezeigt, wie die Granulatgröße die Bildung von MNGCs beeinflusst: in der Anfangsphase nach Implantation induzierten insbesondere die kleineren Granulate (die aber in einer späteren Phase nicht mehr zu finden waren) die Bildung von MNGCs, während sich an der Oberfläche der größeren Granulate, die länger Bestand hatten, primär mononukleäre Zellen, aber nur geringe Anzahlen an MNGCs gefunden wurden.

Verschiedene Anbieter arbeiten dabei mit den unterschiedlichsten Aufreinigungsmethoden: so spielt bei vielen Herstellern allogener und xenogener Knochenersatzmaterialien die Sinterisierung eine Rolle, bei der das Ausgangsmaterial unterschiedlich hoch erhitzt wird. Eine hohe Sintertemperatur, so wird vermutet, führt zu einer verstärkten Bildung von Multinukleären Riesenzellen⁷ und verhindert eine immunologische Reaktion beim Empfänger. Eine höhere Sintertemperatur von bis zu 1.250°C scheint mit einer höheren Materialdichte und –festigkeit zu korrelieren. Witte et al.⁷⁸ kommen zu dem Schluß, dass durch eine Hochtemperaturbehandlung eine

höchstmögliche Sicherheit vor Krankheitsübertragung gegeben ist und sich gleichzeitig durch eine höhere Sintertemperatur eine größere Anzahl an Multinukleären Riesenzellen bildet, was einerseits eine bessere Vaskularisierung und letztlich die Knochenheilung begünstigen kann, andererseits jedoch auch zu einer ungewünschten (überschiessenden) Vaskularisierung führen könnte.

Mit den unterschiedlichen Behandlungsmethoden ändern sich auch die biomechanischen und chemischen Eigenschaften. Die chemische und thermische Aufbereitung des Ausgangsmaterials resultiert in einer anorganischen Matrix, die hauptsächlich aus Hydroxylapatit besteht, welches physiologischerweise in Knochen zu ca. 40%, in Dentin zu 70% und im Enamelum zu 97% enthalten ist⁸³. Es ist deshalb auch wichtiger Bestandteil vieler Knochenersatzprodukte und findet ebenso bei synthetischen Knochenersatzmaterialien zusammen mit β -Trikalziumphosphat Verwendung. Hydroxylapatit ist nicht toxisch⁶⁴, verursacht keine immunologische Reaktion⁷³ und ist dem im menschlichen Körper vorkommenden biologischen Apatit sehr ähnlich. Deshalb ist es heute aufgrund seiner hohen Biokompatibilität Bestandteil der wichtigsten Knochenersatzstoffe. Hersteller sind bemüht, durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse die Bindungsfähigkeit und das biologische Verhalten in Bezug auf Integration und Resorptionsfähigkeit zu optimieren²¹.

1.5.5 Der Einfluss von Barrieremembranen / Kollagennetzen

Weichteilgewebe hat die Eigenschaft, im Verhältnis zur Knochensubstanz schneller zu wachsen. Um ein unkontrolliertes und damit unerwünschtes, raumgreifendes Einwachsen des umliegenden Weichteilgewebes in den Regenerationsbereich zu verhindern, werden im Rahmen der membrangestützten Knochenregeneration zumeist Membranen verwendet, die aufgrund ihrer Resorbierbarkeit einen Zweiteingriff unnötig machen und damit Infektions- und Wundheilungsrisiken reduzieren können^{36 51}.

1.5.6 Beispiele für unterschiedlich gesinterte bovine Knochenersatzmaterialien

Es gibt heutzutage eine Vielzahl von nicht-autologen Knochenersatzmaterialien verschiedener Anbieter, die sich primär hinsichtlich des Ausgangsmaterials und des Herstellungsverfahrens unterscheiden. In dieser Untersuchung sollen vornehmlich Knochenersatzmaterialien der bovinen *Peer*-Gruppe des hier analysierten Hypro-Oss[®] betrachtet werden, innerhalb derer insbesondere Bio-Oss[®], BEGO OSS[®] und SmartBone[®] Verwendung finden⁷⁸.

Die unterschiedlichen Herstellungsverfahren beinhalten Verarbeitungs- bzw. Aufreinigungsschritte zur Unterbindung immunogener Abstoßungsreaktionen und der Übertragung von Krankheiten, wie z.B. BSE. Dabei kommen unterschiedliche Desinfektionstechniken zur Anwendung wie beispielsweise das Plasmasterilisationsverfahren auf Niedrigtemperaturbasis oder die Thermodesinfektion mit Ethyloxid³⁸. Aufgrund dieser Vorbehandlungen gehen jedoch alle osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften verloren.

Hinsichtlich der Sintertemperatur unterscheidet man zwischen nicht, wenig und hocherhitzen Knochenersatzmaterialien. Um Prionen zuverlässig zu eliminieren, erfolgen bei geringer erhitzten Materialien weitere chemisch-physikalische Bearbeitungsschritte wie z.B. die Behandlung mit Natriumhydroxid (NaOH). So wurde beobachtet, dass mit steigender Sintertemperatur die Dichte und Festigkeit des Materials zunimmt³³.

Tabelle 2: Die verbreitetsten bovinen Knochenersatzmaterialien im Überblick:

Knochenersatzmaterial	Sintertemperatur
Hypro-Oss [®]	nicht erhitzt
Bio-Oss [®]	ca. 300°C
BEGO OSS [®]	ca. 1.250°C
SmartBone [®]	Keine Information verfügbar

Bio-Oss® (Geistlich AG, Schweiz) ist ein xenogenes Knochenersatzmaterial aus deprotonierter Knochenmatrix bovinen Ursprungs (Australien). Organische Komponenten werden zur Vermeidung der Übertragung von Infekten während der Produktion durch eine chemisch-thermische Behandlung entfernt, sodass eine kalziumbasierte Knochenstruktur entsteht⁵⁴. Bio-Oss® besteht aus dem mineralischen Anteil des bovinen Knochens und gilt derzeit als eines der am besten dokumentierten Knochenersatzmaterialien. Die Aufreinigung erfolgt mit Niedrigtemperaturen um 300°C und weiteren chemischen Behandlungsschritten. Es ist osteokonduktiv und langzeitstabil. Die Struktur des natürlichen Knochens bleibt erhalten.

Bio-Oss® wird in den natürlichen Regenerationsprozess des körpereigenen Knochens integriert. Klinisch wird Bio-Oss® zur Stabilisierung des Blutkoagulums, der Förderung der Knochenregeneration, der peri-implantären Defektregeneration und zur Sinusaugmentation benutzt. Durch den Resorptionsschutz kann das augmentierte Volumen langfristig erhalten bleiben⁴⁷. Eine weitere Eigenschaft ist die Bildung einer dauerhaften Hartgewebebasis. Laut Hersteller verfügt Bio-Oss® über eine hochporöse Struktur mit einer großen inneren Oberfläche.

BEGO OSS® (BEGO Implant Systems GmbH, Bremen, D) wird aus der Spongiosa von Rinderknochen gewonnen. Dabei werden sämtliche organischen Gewebestandteile und Prionen aufgrund der hohen Sintertemperatur von ca. 1.250°C eliminiert. BEGO OSS® ist somit nach Herstellerangaben ebenfalls BSE-sicher, vollkommen proteinfrei, hat eine langfristige Volumenbeständigkeit und weist eine natürliche Knochenstruktur auf. Das Ausgangsmaterial stammt ebenso wie bei Bio-Oss® von Femurköpfen aus registrierten Schlachthöfen in BSE-freien Ländern wie Australien und Neuseeland. BEGO OSS® ist in Partikelgrößen von 0,5 – 1 mm und 1 – 2 mm verfügbar⁸⁴.

SmartBone® (IBI S.A., Schweiz) besteht nach Herstellerangaben⁸⁵ aus boviner mineralischer Matrix sowie synthetischen Polymeren und Derivaten des natürlichen bovinen Kollagens. Granulatgrößen sind von 0,25 bis 4,0 mm verfügbar.

Der Verzicht auf Sinterisierung von Hypro-Oss® ist ein Alleinstellungsmerkmal im Vergleich zu Produkten anderer Hersteller, bei denen das Biomaterial auf 300°C (Bio-Oss®) oder sogar bis auf 1.250°C (BEGO OSS®) erhitzt wird. Dadurch bleiben nach Herstellerangaben die erwünschten Eigenschaften des Kollagens erhalten und sollen die Regeneration, Wundheilung und Hämostase positiv beeinflussen⁸⁸. Atelo-Kollagen Typ I enthält native, osteoinduktive Proteine und Peptide, welche den Knochenstoffwechsel fördern. Dies wird als Vorteil gegenüber anderen, (hoch-) erhitzten, xenologen Knochenersatzmaterialien angesehen, welche aufgrund der Sinterisierung keine organischen Substanzen und Wachstumsfaktoren beinhalten²³.

1.6 Zielsetzung

In der Zahnmedizin kommen Knochenersatzmaterialien zur Anwendung, die sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften und hinsichtlich der Zellreaktion und Blutgefäßbildung im Implantationsareal z.T. deutlich unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine histologische und histomorphometrische Analyse der Gewebereaktion auf die subkutane Implantation eines xenogenen, bovinen Knochenersatzmaterials (Hypro-Oss®) in den interskapulären Bereich von Wistar-Ratten vorgenommen und mit den Ergebnissen einer *Sham*-Operation (d.h. ohne Einbringung eines Knochenersatzmaterials) qualitativ und quantitativ verglichen.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Zellreaktion auf die Implantierung des bovinen Knochenersatzmaterials Hypro-Oss® sowie des

Entzündungsmusters nach einer definierten Zeitspanne von 3, 15 und 30 Tagen. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit beziehen sich auf die Vaskularisierung des Implantationsgebiets und des implantierten Knochenersatzmaterials selbst sowie auf den Vergleich mit der Gewebereaktion auf die Einbringung anderer, marktgängiger boviner Knochenersatzmaterialien (BEGO OSS® und Bio-Oss®).

2 Materialien und Methoden

2.1 Hypro-Oss®

Hypro-Oss® ist ein steriles Medizinprodukt der Klasse III, ISO- und CE-zertifiziert⁷⁹. In Deutschland gelten xenogene Knochenersatzmaterialien wie Hypro-Oss® als Arzneimittel mit strengen Auflagen und Kontrollen. Hypro-Oss® ist ein natürliches, bovines Knochenersatzmaterial zur Füllung und Rekonstruktion von Knochendefekten. Bovine Spongiosa hat aufgrund der Similarität mit menschlicher Knochen substanz eine große Akzeptanz und ist aufgrund extensiver Forschung ein etabliertes Knochenersatzmaterial in der Oralchirurgie.



Abbildung 4: das xenogene (bovine) Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® in der Granulatgröße 0,5 – 1 mm (1-ml-Flasche)

2.1.1 Materialzusammensetzung

Das untersuchte Knochenersatzmaterial Hypro-Oss[®] wird gemäß Herstellerangaben aus der Spongiosa von veterinär untersuchten Rindern gewonnen^{79 86}. Die Granulatgröße von Hypro-Oss[®] beträgt 0,5 – 1,0 mm sowie alternativ 1,0 – 2,0 mm. Jedes Granulat besteht zu 30% aus organischem Atelo-Kollagen Typ I und zu 70% aus anorganischem Hydroxylapatit, welches einen hohen Härtegrad aufweist und den Hauptbestandteil der anorganischen Substanz in Knochen und Zähnen bildet. Hydroxylapatit wird von Osteoblasten aus Phosphat- und Calciumionen gebildet und in den menschlichen Knochen eingebaut. Dadurch kommt es zu einem nicht mehr abgrenzbaren Verbund von Knochen und Knochenersatzmaterial, der sogenannten Verbundosteogenese. Härte und Festigkeit des Knochens werden durch die Verbindung zwischen Hydroxylapatit und Kollagenfasern bestimmt⁴³.

Hydroxylapatit ist der wichtigste und quantitativ bedeutendste Bestandteil der Hartschubstanz von humanen Knochen und Zähnen¹³. Es handelt sich – ebenso wie bei der natürlichen Knochensubstanz - um eine bioaktive, calcium-phosphathaltige Keramik, die unlöslich ist und damit langfristig stabil bioaktive Eigenschaften hat, wodurch eine Osteointegration begünstigt wird⁶⁴.

2.1.2 Herstellungsprozeß

Das Knochenmaterial wird dabei mittels eines patentierten Atelo-peptidierungs- und Lyophilisationsprozesses hergestellt. Atelo-peptidierung beschreibt dabei eine Technik, mit der dem Material immunogene/antigene Telopeptide entzogen werden, wobei modifiziertes Atelo-Kollagen entsteht. Es soll keine Abwehrreaktionen beim Patienten auslösen. Die kristalline Mikrostruktur des Hydroxylapatits und des Atelo-Kollagens bleibt erhalten und eine Keramisierung des Knochens, die sich bei höheren Temperaturen ergibt, wird verhindert. Der Hersteller nimmt für sich in Anspruch, dass aufgrund der Atelo-peptidierung auf eine Erhitzung verzichtet werden könne, womit die Kollagen-Struktur weitgehend erhalten bliebe und das Material äußerst biokompatibel sei.

Lyophilisation ist ein Prozess der Gefriertrocknung, mit dem der Wassergehalt mittels Sublimation entfernt wird⁸⁷, wodurch die Molekularstruktur der beiden Komponenten ebenso erhalten bleiben soll. Dabei werden die Zellmembranen zerstört, wodurch das Gewebe seine antigenen Eigenschaften einbüßt. Lyophilisierung und biochemische Behandlung erzeugen jedoch eine höhere Sprödigkeit und mindern Druck- und Torsionsfestigkeit²². In manchen Ländern gibt es zudem religiöse oder kulturelle Bedenken gegen die Verwendung von xenogenen (z. B. bovinen, oder porcinen) Knochenersatzmaterialien.

2.2 Tiermodell

2.2.1 Versuchsanordnung des subkutanen Implantationsmodells

Diese Studie wurde vom Landesprüfungsamt für Tierversuche in Lehre und Forschung des Landes Hessen genehmigt. Die Tierversuche wurden auf der Basis einer Genehmigung durch das Landesprüfungsamt (Aktenzeichen FK/1023) und unter Einhaltung der Richtlinien des Landes Hessen (§ 8 Abs. 1 TierSchG) sowie in Übereinstimmung mit der ISO-Normenreihe 10993 zur biologischen Evaluation von Medizinprodukten durchgeführt.

Für die Durchführung der *in vivo*-Studie wurden 24 weibliche Wistar-Ratten im Rahmen einer standardisierten Versuchsanordnung eingesetzt. Dabei erfolgte die Haltung der Tiere unter Standardbedingungen (Frischwasser aus dem Leitungsnetz *ad libitum*, gängiges Rattenfutter, Kunstlicht unter Tag- und Nachtbedingungen im 12-Stunden-Rhythmus) in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

Dabei wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in 2 Versuchsgruppen aufgeteilt: bei 12 Tieren erfolgte eine subkutane Einbringung von Hypro-Oss®. Jeweils 4 Tiere wurden an den standardisierten Beobachtungszeitpunkten

(3, 15 und 30 Tage) entsprechend der Standardmethode untersucht. Weitere 12 Tiere dienten als Kontrollgruppe, bei der der Eingriff zur Verblindung ohne Materialeinbringung auf Basis eines *Sham*-Eingriffs durchgeführt wurde.

2.2.2 Subkutane Implantation

Die subkutane Implantation wurde entsprechend einer standardisierten, veröffentlichten klinischen Versuchsanordnung durchgeführt. Nach intraperitonealer Anästhesie mit Ketamin in Kombination mit Xylazin wurden 60 mg des Biomaterials unter sterilen Bedingungen implantiert. Dabei wurde rostral ein Schnitt gesetzt, die subkutane Tasche präpariert und das Biomaterial in die vorbereitete Gewebetasche subkutan im interskapulären Bereich eingebracht. Der Wundverschluss erfolgte unter Verwendung von Prolene 6.0 (Ethicon, Norderstedt, D). Der postoperative Verlauf zeigte keinerlei Auffälligkeiten.

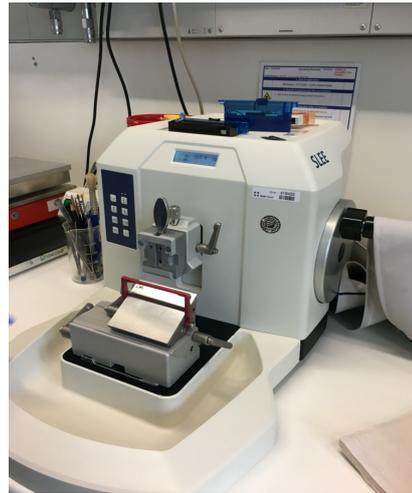
2.2.3 Gewebepräparation des Implantationsareals

Nach Euthanasierung der Versuchstiere mittels Überdosis der Anästhesie wurde das Biomaterial und das peri-implantäre Gewebe explantiert und weiterverarbeitet. Die Explantate wurden zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten für 24 Stunden in neutral gepufferter Formaldehydlösung (Roti® Histofix 4%; Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D.) fixiert.

Jede Gewebeprobe wurde 21 Tage lang unter Verwendung von 10%igem EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bei 37° im Ultraschallbad (Medite USE33, Burgdorf, D.) dekalzifiziert und in 4 Segmente identischer Größe geschnitten (Rand, Mitte, Mitte, Rand). Danach erfolgt die Prozessierung mittels vorprogrammiertem und vollautomatisiertem *Tissue Processor* (sh. Abb. 5A: TP1020, Leica, Wetzlar, D.) Bei diesem Prozess durchläuft das Gewebe eine Reihe von Alkoholbädern mit zunehmenden Konzentrationen und endet mit der Einbettung des Materials in Paraffin (sh. Tabelle 3):



A



B

Abbildung 5: A: Tissue Processor TP1020 (Leica, Wetzlar, D.)
 B: Rotations-Mikrotom (Leica, Wetzlar, D)

Tabelle 3: Protokoll der Gewebeaufbereitung

Durchgang	Reagenz	Dauer
01	Formalin 4%	-
02	Ethanol 70%	45 min
03	Ethanol 96%	45 min
04	Ethanol 96 %	60 Minuten
05	Ethanol 100%	45 min
06	Ethanol 100%	60 min
07	Ethanol 100%	60 min
08	Xylol	45 min
09	Xylol	45 min
10	Xylol	45 min
11	Paraffin	45 min
12	Paraffin	120 min

Gesamtzeit:  10 h 15 min

Anschließend wurde das in Paraffinblöcke eingebettete Material unter Verwendung eines Rotations-Mikrotoms (sh. Abb. 5B: Leica, Wetzlar, D) in 3 μ m dicke, fortlaufende Schnittserien von insgesamt 6 Schnitten geschnitten, zur Vorbereitung auf verschiedene Färbemethoden getrocknet und entparaffiniert:

Tabelle 4: Protokoll der Entparaffinierung:

Durchgänge	Reagenz	Dauer
3	Xylol	5 Minuten
2	100% Äthanol	3 Minuten
1	96% Äthanol	3 Minuten
1	70% Äthanol	3 Minuten
1	50% Äthanol	3 Minuten
1	DW	3 Minuten

Nach Entparaffinierung waren die Schnittpräparate für die nachfolgend beschriebenen histochemischen und immunhistochemischen Färbetechniken vorbereitet und wurden nach den Vorgaben der Färbearweisung – AG Ghanaati (U. Hilbig, Okt. 2008) entsprechend der Verfahrensanweisung Rezepturhandbuch, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz, auf Superfrost®-Plus Objektträgern (G. Menzel, Braunschweig, D.) durchgeführt.

2.3 Histochemische Färbemethoden

2.3.1 HE-Färbung

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine gängige histologische Untersuchungsmethode zur Darstellung von Gewebe- und Zellstrukturen bzw. -kernen. Der im Hämatoxylin enthaltene Farbstoff färbt die Zellkerne zunächst rötlich-braun, später bei Erhöhung des pH-Wertes auch violett-blau, Eosin das

umgebende Zytoplasma blassrot. Muskel- und Bindegewebe erscheinen rot, die Erythrozyten rötlich-orange und die Knorpelmasse bläulich¹. Die explantierten Gewebeblöcke werden entparaffiniert und zur Beurteilung der Anschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt.

Tabelle 5: Protokoll der HE-Färbung

Durchgänge	Reagenz	Dauer
1	Mayer's Hämalaun	10 Minuten
1	Bläuen in Wasser, spülen mit A. dest.	10 Minuten
1	Eosin (angesäuert)	5 Minuten
mehrfach	Spülen A. dest.	kurz
1	70% Isopropylalkohol	2 Minuten
1	96% Isopropylalkohol	2 Minuten
2	100% Isopropylalkohol	3 Minuten
3	Xylol, eind. mit Entellan	3 Minuten

Mayer's Hämalaun (Ready to use): 1 g Hämatoxylin-Monohydrat VWR 1.15938.0100) ad 1000 ml A.dest. heiß lösen, bis ein leichter Färbeumschlag nach violett erfolgt, über Nacht abkühlen lassen. 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat p.a. (VWR 1.01042.100) zufügen.

Ergebnis:

- Zellkerne: blau
- Zytoplasma und Bindegewebsfasern: rot
- Erythrozyten: rot-orange

2.3.2 Azan

Nach Entparaffinierung werden die explantierten Gewebeblöcke sukzessive mit den Ausgangssubstanzen Kernechtlösung, Phosphorwolframsäure und Azan-Gebrauchslösung eingefärbt. Mit dieser histologischen Übersichtsfärbung ist es möglich, Bindegewebsfasern und Zellbestandteile darzustellen.

Tabelle 6: Protokoll der Azan-Färbung

Durchgänge	Reagenz	Dauer
1	Kernechtlösung (fertige Lösung)	30 Minuten
2	spülen in Leitungswasser	kurz
1	spülen in A. dest.	kurz
1	Phosphorwolframsäure 5%	10 Minuten
1	abspülen mit A. dest.	kurz
1	Azan-Gebrauchslösung	5 Minuten
1	abspülen mit A. dest.	kurz
2	100 % Isopropanol	2 Minuten
3	Xylol, eindecken mit Entellan	3 Minuten

Knechtrotlösung (fertige Lösung): 0,2 g Knechtrot (VWR 15939), in 100 ml 5%iger wässriger Aluminiumsulfatlösung (5 g Al_2SO_3 Aluminiumsulfat (VWR 1102) ad 100 ml A. dest.), durch kurzes Aufkochen lösen, 5 Minuten sieden lassen, vor Gebrauch filtrieren.

Phosphorwolframsäure: 25 g Wolframatophosphorsäurehydrat (VWR 582) ad 500 ml A. dest.

Azan-Gebrauchslösung: 1 Teil Anilinblau-Orange-Gemisch (Stammlösung) + 3 Teile A. dest.

Azan-Stammlösung: 0,5 g Anilinblau (VWR 1275), 2,0 g Orange G (VWR 15925) in 100 ml A. dest. lösen, kurz aufkochen, 8 ml Eisessig (VWR 1.00063.1011) zugeben, vor Gebrauch filtrieren

Ergebnis:

- Zellkern: leuchtend rot,
- Zytoplasma: blassrosa
- kollagene Fasern, hyaliner Knorpel und Bindegewebe: scharf blau
- Elastische Fasern, Zellkerne, Muskelgewebe und Knochen: rot
- Erythrozyten: orange bis rot.

2.3.3 Masson-Goldner Trichrom-Färbung

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ermöglicht die Unterscheidung von mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochen und vermittelt Erkenntnisse über das Knochen-*Remodelling*⁵⁵. Mit der Masson-Goldner-Methode werden die Zellkerne nach Entparaffinierung verschiedenfarbig eingefärbt:

Tabelle 7: Protokoll der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Durchgänge	Reagenz	Dauer
1	Weigerts Hämatoxylin	5 Minuten
1	Fließendes Leitungswasser	10 Minuten
1	Spülen in A. dest.	1 Minute
1	Ponceau-Säurefuxin-Azophloxin-Färbelösung	10 Minuten
3	1 % Essigsäure	Spülen
1	Phosphorwolframsäure-Orange G-Gemisch (mikroskopische Kontrolle)	10 Minuten
3	1 %ige Essigsäure	Auswaschen
1	0,2 %ige Lichtgrün-Färbelösung	5 Minuten
3	1%ige Essigsäure	Auswaschen
3	100 % Isopropylalkohol	3 Minuten
2	Xylol, eind. mit Entellan	3 Minuten

Hämatoxylin nach Weigert: Lösung A: CHROMA 2E 032, Lösung B: CHROMA 2E 052 (zu gleichen Teilen)

Ponceau-Säurefuchsin-Lösung (=Masson-Lösung): 0,2 g Ponceau de Xylidine (Chroma 1B207), 0,1 g Säurefuchsin (VWR 223K18010831) ad 300 ml A. dest., kurz kochen, abkühlen lassen, 0,6 ml Eisessig (VWR 1.00063.1011), filtrieren

Azophloxin-Lösung: 0,5 g Azophloxin (Chroma 1B103), 100 ml A. dest., 0,2 ml Eisessig (VWR 1.00063.1011)

Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin-Färbelösung: 10 ml Masson-Lösung (Ponceau-Säurefuchsin-Lösung), 2 ml Azophloxin-Lösung, 88 ml 0,2 %ige Essigsäure (2 ml Eisessig ad 1000 ml A. dest.)

1 %ige Essigsäure: 10 ml Eisessig (VWR 1.00063.1011) ad 1000 ml A. dest.

Phosphorwolframsäure-Orange-G-Gemisch: 3 g Wolframatophosphorsäurehydrat (VWR 1.00582.0100), 2 g Orange G (VWR 15925 – 25 g), 100 ml A. dest.

Lichtgrün-Färbelösung: 0,2 g Lichtgrün SF (Chroma 1B211), 100 ml A. dest., 0,2 ml Eisessig (VWR 1.00063.1011)

Ergebnis:

- Zellkerne: dunkelblau bis schwarz
- Zytoplasma, Muskulatur: rötlich braun
- Erythrozyten: leuchtend orange
- Bindegewebe und saure Mukosubstanzen: grün
- mineralisierter Knochen: leuchtend grün
- Verkalkte Knorpelstruktur: hellgrün
- Unverkalkte Osteoidränder: rot

2.3.4 TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung (engl. *Tartrat-Resistant Acid Phosphatase*) ist eine häufig genutzte histochemische Methode, um Osteoklasten-ähnliche, multinukleäre Riesenzellen sichtbar zu machen, die am zellulären Abbau von Knochenersatzmaterialien beteiligt sind. Dabei wird die Eigenschaft der Osteoklasten-ähnlichen Zellen genutzt, das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) freizusetzen.

Die TRAP-Färbung macht dieses Enzym und damit die Osteoklasten-ähnlichen Zellen in einer kastanienbraunen Ausprägung farblich sichtbar. TRAP wurde erstmalig auf Osteoklasten nachgewiesen und ist auf ossären Oberflächen ein Marker für Osteoklasten-abhängige Knochenresorption, während sich die vorliegende Untersuchung auf die Einbringung von Biomaterial in ektopes (Weich-) Gewebe bezieht. Allerdings wird dieses Enzym auch von anderen Zellen wie Makrophagen exprimiert, die ebenfalls eingefärbt werden und in aktuellen Publikationen auch als Inflammationsmarker angesehen werden, so dass auch die Mehrkernigkeit als weiteres Kriterium für Osteoklasten-ähnliche Zellen herangezogen werden kann.

Nach Entparaffinierung (sh. Tabelle 4) wurden die Proben zur Identifikation der Tartrat-resistenten Sauren Phosphatase- (TRAP-) Aktivität eingefärbt. Ein Muster vorheriger Studien, welche TRAP-positive Zellen im subkutanen Gewebe von Wistar-Ratten zeigte, diente als positive Kontrolle für die TRAP-Färbung. Diese histochemische Färbemethode erfolgte zum Nachweis von Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP)-positiver osteoklastischer Zellen.

Tabelle 8: Protokoll der TRAP-Färbung:

Durchgänge	Reagenz	Dauer
1	TRAP-Färbelösung 37°C	150 Minuten lichtgeschützt einwirken
2	Spülen mit Leitungswasser	1 Minute
1	Spülen in A. dest.	1 Minute
1	Mayer's Häkalaun	5 Minuten
1	Spülen mit fließendem Leitungswasser	10 Minuten
1	Spülen mit A. dest.	3 Minuten
1	Aquatex	Eindecken

TRAP-Färbelösung: 0,5 ml hexazotierter Diazoniumlösung (100 ml 4 %ige Pararosanilin-Lösung ad 400 ml 4 %ige Na-Nitritlösung (min. 5 Minuten reagieren lassen), 50 ml Tris-Malein-Puffer, auf Raumtemperatur, 8 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (SIGMA NN 250), gelöst in 0,5 ml DMSO (VWR 8.02912.1000), 75 ml Weinsäure, gelöst in 0,9 ml 1 N NaOH.

Tabelle 9: Protokoll für die Herstellung von Tris-Malein-Puffer

Tris-Malein-Puffer:	2,9 g Maleinsäure (VWR 8.00380.0500)
	7,8 ml 1 N NaOH (VWR 109137.1000)
	ad 500 ml A.dest.
	pH 5,8 einstellen

2.4 Immunhistologische Färbung: CD-68

Der Begriff *Cluster of Differentiation* (Abk.: CD) umfasst die Klassifizierung von Molekülen nach ihren biochemischen und funktionellen Oberflächenmerkmalen. Sie entwickeln spezifische Expressionsmuster und erlauben so die Unterscheidung unterschiedlicher Zelltypen.

CD-68-Moleküle sind Oberflächen-Moleküle und dienen über eine braune Ausprägung als Marker für den immunhistologischen Nachweis von Monozyten und Makrophagen. Allerdings weisen auch MNGCs ein ähnliches Markerprofil auf, so dass sich die Differenzierung dieser Zelltypen als schwierig erweist.

Nach Entparaffinierung (sh. Tabelle 4) erfolgt eine Hitzevorbehandlung mit Citrat pH6 Puffer für 20 Minuten im 96°C Wasserbad, anschließend Abkühlung unter fließendem A. dest. für 10 Minuten, dann Equilibrierung der Schnitte in TBS-T-Puffer (engl. *Tris-buffered saline with Tween20*).

Die immunhistochemische Färbung erfolgte unter Nutzung eines Lab Vision® 360-2D Färbeautomaten (ThermoFisher Scientific, D.). Dabei wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mittels einer 4 %igen H₂O₂-Methanol-Lösung geblockt. Mittels Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, USA) wurden endogene Avidin- und Biotin-bindende Proteine deaktiviert, wodurch alle anderen Proteine blockiert werden, außer die CD68-Moleküle.

Der primäre Antikörper (Bio-Rad MCA341GA; 1:800) markiert die Struktur, indem er CD68 bindet, der sekundäre Antikörper bindet sich dann an den ersten Antikörper, umfasst den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, ThermoFisher Scientific, D.) und erlaubt die farbliche Differenzierung bzw. Visualisierung von Zellen der Monozyten/Makrophagenreihe, welche in rot dargestellt werden (Gegenfärbung, engl.: *Counter Staining*). Das Mouse Anti-Rat-CD68 wird von Makrophagen exprimiert und ist somit ein Makrophagen-Marker. Eine Negativkontrolle erfolgte über eine immunhistologische Färbung zweier Gewebeschnitte ohne Primär-Antikörper.

Tabelle 10A: Protokoll der CD-68- Färbung

Schritt	Reagenz	Dauer	Schnitte
1	UV-Block	7 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	TBS-T	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
2	1.AK Anti-rat CD68 1:800 verdünnt in Diluent	30 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	TBS-T	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
3	Amplifier	10 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	TBS-T	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
4	H ₂ O ₂ Block (Peroxidase)	7 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	TBS-T	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
5	Polymer-HRP	10 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	TBS-T	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
6	AEC (C ₁₄ H ₁₄ N ₂)	20 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	H ₂ O	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
7	Hämatoxinilin	5 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	H ₂ O	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
8	Bläuung	5 Minuten	7,6 ml/36 Schnitte
	H ₂ O	spülen	7,6 ml/36 Schnitte
9	Aquatex	eindecken	7,6 ml/36 Schnitte

5,2 l Waschpuffer TBS/T/36 Schnitte

2,2 l H₂O/36 Schnitte

Tabelle 10B: Protokoll der CD-68-Gegenfärbung

Reagenz		Hersteller
Mouse Anti-rat-CD68 Antikörper	0,1 mg	Biorad MCA341GA
H ₂ O ₂ Block (Peroxidase)	125 ml	TFS TA-125-H2O2Q
UltraVision Quanto Kit	Amplifier, UV-Block, HRP-Polymer	TFS TL-125-QHD
Antibody Diluent OP Quanto	125 ml	TFS TA-125-ADQ
AEC (C ₁₄ H ₁₄ N ₂)	60 ml	TFS TA-060-SA
Mayers Hämatoxilin	1 l	AppliChem A4840
Bläuungsreagenz	3,8 l	TFS 7301
TBS-T Waschpuffer	20x	TFS TA-999-TT
Kochpuffer Citrat pH6	100x	TFS TA-050-PM1X
Aquatex	50 ml	eindecken

2.5 Qualitativ-histologische Analyse

Die histopathologische Untersuchung erfolgte zwecks Bestimmung der Wechselwirkung von Gewebe und Biomaterial und dem Ausmaß der durch das Biomaterial ausgelösten Entzündungsreaktion in einem frühen und späten Stadium. Zwei voneinander unabhängige Untersucher haben die Analyse unter Verwendung eines konventionellen diagnostischen Mikroskops (Eclipse 80i, Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt, um das gesamte Implantationsbett und das peri-implantäre Gewebe jeder Probe zu untersuchen. Die Entzündungsreaktion wurde auf Basis der nachfolgenden Parameter bestimmt: Integrationsmuster der Biomaterial-Granulate, Fibrose des Gewebes, (Nach-) Bluten, Vaskularisierung, CD-68-Expression, Makrophagen, Multinukleäre Riesenzellen und TRAP-positive Osteoklasten-ähnliche Riesenzellen.

2.6 Quantitativ-histologische Analyse: Histomorphometrie

Die histomorphometrische Analyse wurde auf Basis einer standardisierten und etablierten Versuchsanordnung durchgeführt. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde die NIS-Elements AR Software (Version 4.10.03, Nikon, Tokio, Japan) verwendet. Die Bildaufzeichnung erfolgte mithilfe eines Computer-basierten Systems in Kombination mit einer DS-Fi1 Digitalkamera, eines Eclipse 80i Mikroskops für die Untersuchung von histologischen Präparaten (Nikon, Tokio, Japan) sowie einer automatischen Scan-Vorrichtung (Prior Scientific, Rockland, MA, USA). Die Aufnahmen erfolgten mit einer Auflösung von 2560 x 1920 Pixel und a x 100. Die Aufnahme der Biopsie des Implantationsbettes erfolgte als „*total scan*“, bestehend aus dem Gebiet des untersuchten Biomaterials sowie dem peri-implantären Gewebe der untersuchten 100 bis 200 ausgewerteten histologischen Bildaufnahmen, d.h. durch digitales Zusammenfügen der Einzelaufnahmen, wodurch eine Untersuchung des gesamten Gebiets (*total scan*) der Gewebeschnitte erfolgen konnte.

Die Aktivität der Riesenzellen wurde nach Digitalisierung der TRAP-gefärbten Gewebeschnitte über eine Auszählung der TRAP-negativen Multinukleären Riesenzellen sowie der TRAP-positiven Osteoklasten-ähnlichen Riesenzellen mit Hilfe der NIS-Elements Software analysiert. Im Anschluss wurden alle gefärbten und ungefärbten Multinukleären Riesenzellen manuell gezählt und auf ein Implantationsareal von 1 mm² umgerechnet.

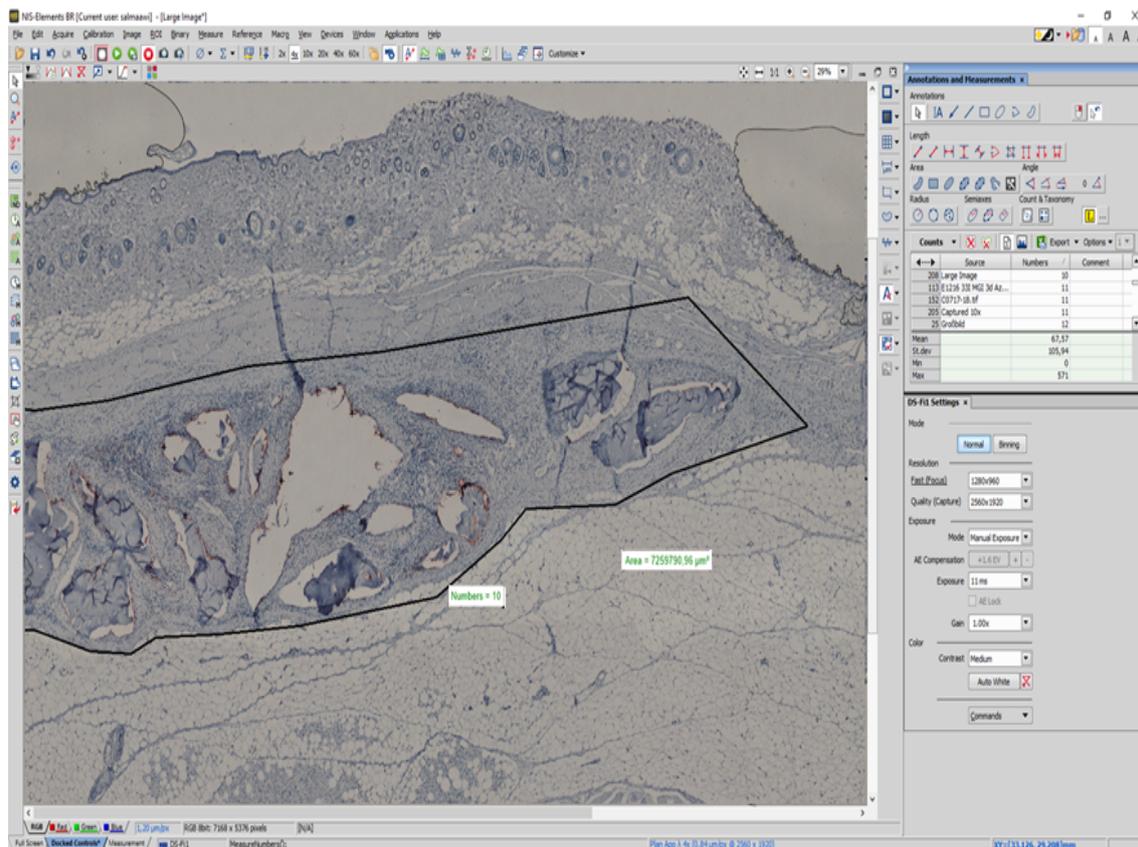


Abbildung 6: zeigt exemplarisch die histomorphometrische Messung des Riesenzellenaufkommens innerhalb des Implantationsareals des Knochenersatzmaterials Hypro-Oss®. Mittels NIS-Elements Software wurde das Implantationsbett in der Fläche definiert und die Multinukleären Riesenzellen im Implantationsbett mit 10/7259790,96 μm^2 MNGCs erfasst.

Die Messung der Vaskularisierung an den digitalisierten Präparaten wurde ebenfalls mittels der Software NIS Elements durchgeführt, wobei die Anzahl der Gefäße pro mm^2 über die Gesamtfläche des Implantationsareals manuell ausgezählt wurde.

2.7 Statistische Analyse

Im Rahmen der quantitativ-histomorphologischen Analyse der Auswertungsdaten wurden pro Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt und statistisch verglichen. Dabei wurde auf Basis der ANOVA-Vorgaben (ANOVA, engl.: *Analysis of Variance*) eine Varianzanalyse durchgeführt, welche aufzeigte, ob es zwischen Test- und Kontrollgruppe signifikante Unterschiede gab. Zur Berechnung der statistischen Abweichungsrelevanz wurde anschließend die GraphPad Prism Software (Prism 6 V6.01, GraphPad Software Inc., La Jolla, Calif.) verwendet und die statistische Abweichung wie folgt eingestuft:

- * = P-Wert < 0,05
- ** = P-Wert < 0,01
- *** = P-Wert < 0,001

(P-Wert / P-value, von engl. *Probability*)

wobei ein P-Wert von *P < 0,05 als signifikant, ein P-Wert von ***P < 0,001 als hochsignifikant eingestuft wurde. Die ermittelten Daten wurden graphisch als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt (sh. Punkt 4.2.2 Quantitative Analyse).

3 Ergebnisse

3.1 Ex-vivo-Auswertung des Biomaterials

Das untersuchte Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® besteht aus Granulaten mit unterschiedlichen, unregelmäßigen Formen und zeigt eine noch erhaltene trabekuläre, längliche, splitterförmige Makrostruktur mit z.T. gebrochenen Kanten und mit Mikro- und Makroporen unterschiedlicher Größe sowie eine kristalline Mikrostruktur (sh. Abbildung 7 A/B), welche zu oralchirurgischen Zwecken verwendet wird.

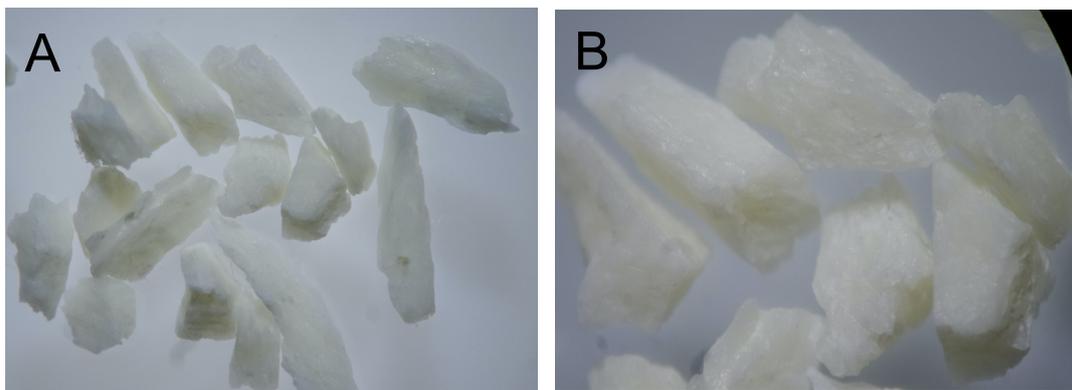


Abbildung 7: Granulatstruktur des untersuchten xenogenen Knochenersatzmaterials Hypro-Oss® (Stereomikroskop, A: 40-fache Vergrößerung, B: 100-fache Vergrößerung)

Das Granulat wurde überprüft, das Material war gut aufgereinigt und frei von Zellresten, die Osteozytenlakunen erkennbar und leer.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse der Materialuntersuchungen mittels HE-Färbung (sh. Abb. 8 A/B), dass aufgrund der Aufreinigungsprozesse von Hypro-Oss® alle organischen Gewebeanteile eliminiert wurden und histologisch mineralisiertes Gewebe ohne organische Anteile erkennbar ist, so dass das Ziel der Aufreinigung auch tatsächlich erreicht wurde.

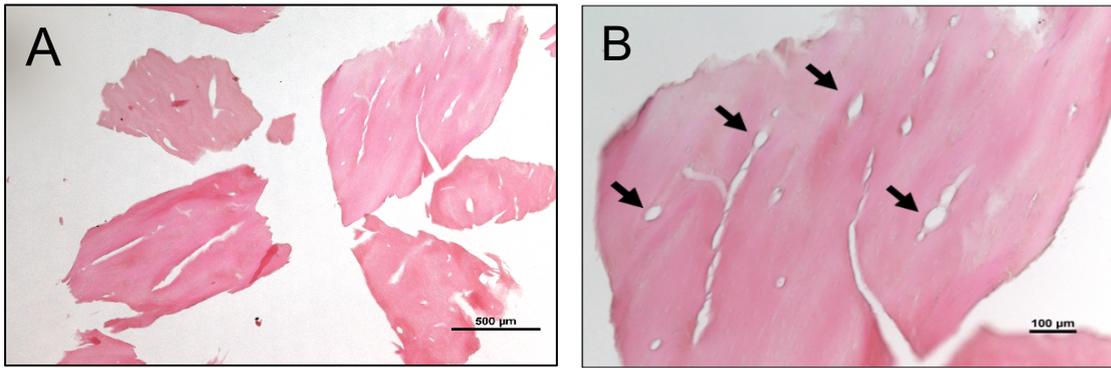


Abbildung 8 A und B: zeigt die Struktur der Granulate von Hypro-Oss® (histologisches Lichtmikroskop, HE-Färbung, A: 40-fache Vergrößerung (Maßstabsbalken = 500 μ m), B: 100-fache Vergrößerung (Maßstabsbalken = 100 μ m)).

Erkennbar ist die splitterförmige Granulatstruktur des untersuchten xenogenen Knochenersatzmaterials Hypro-Oss®. Die Pfeile zeigen leere Osteozyten-Lakunen.

3.2 In-vivo-Auswertung des Biomaterials

Alle Versuchstiere überlebten die Experimente und zeigten im Beobachtungszeitraum keine Anzeichen von Wundheilungsstörungen. Auch Mobilitäts-einschränkungen konnten in dieser Zeit nicht beobachtet werden.

3.2.1 Qualitative Untersuchung

An **Tag 3** nach subkutaner Implantation zeigt sich das bovine Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® bei der histologischen Untersuchung umgeben von peri-implantärem Gewebe, das den zentralen Raum noch nicht erreicht hat. Das Biomaterial ist deutlich auffindbar; teilweise sind kleine, angrenzende Abschnitte von Granulationsgewebe erkennbar. Die Zellen sind nicht akkumuliert, die Zellkerne manifestieren sich als kleine, dunkle Punkte. Blutgefäße sind im Implantationsbett von Hypro-Oss® noch nicht erkennbar

(Abbildung. 9 A). In der HE-Färbung sind die Granula rötlich eingefärbt erkennbar, durchzogen von Haversschen Kanälen (Abbildung 9 B). Das Knochenersatzmaterial ist umgeben von unorganisiertem Granulationsgewebe, Fibrin und lockeren Bindegewebsfasern. Auf der Biomaterial-Oberfläche haben sich zwischen den Granulaten einige wenige mononukleäre Zellen gebildet; das umgebende Bindegewebe zeigt eine beginnende Durchdringung mit Blutgefäßen (Abbildung 9 C).

Im Granulationsgewebe sind an Tag 3 viele mononukleäre Zellen erkennbar, von denen einige wenige über eine rötlich-braune Ausprägung eine positive Expression von CD-68 zeigen und als Marker für den immunhistologischen Nachweis von Makrophagen dienen (Abbildungen 9 D und E).

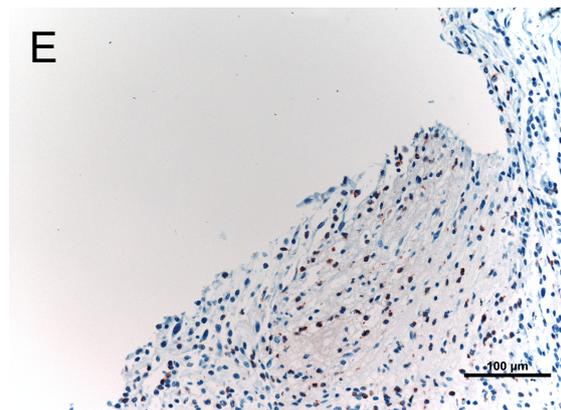
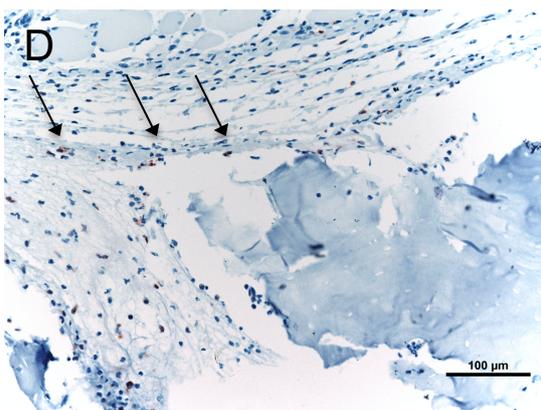
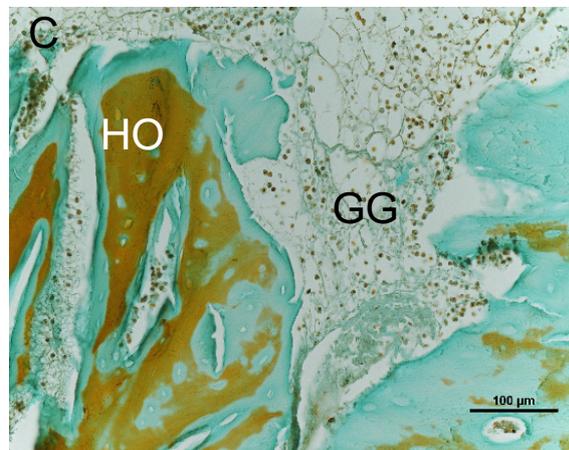
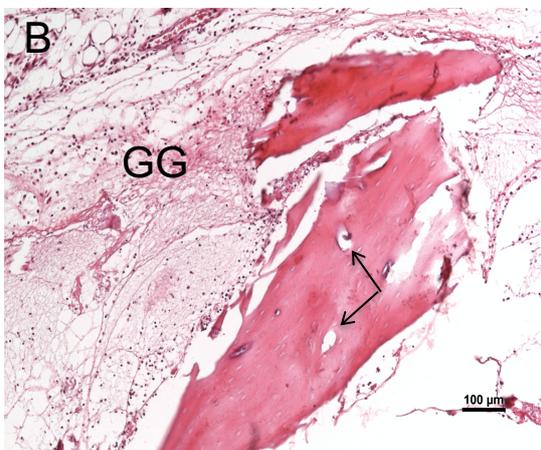
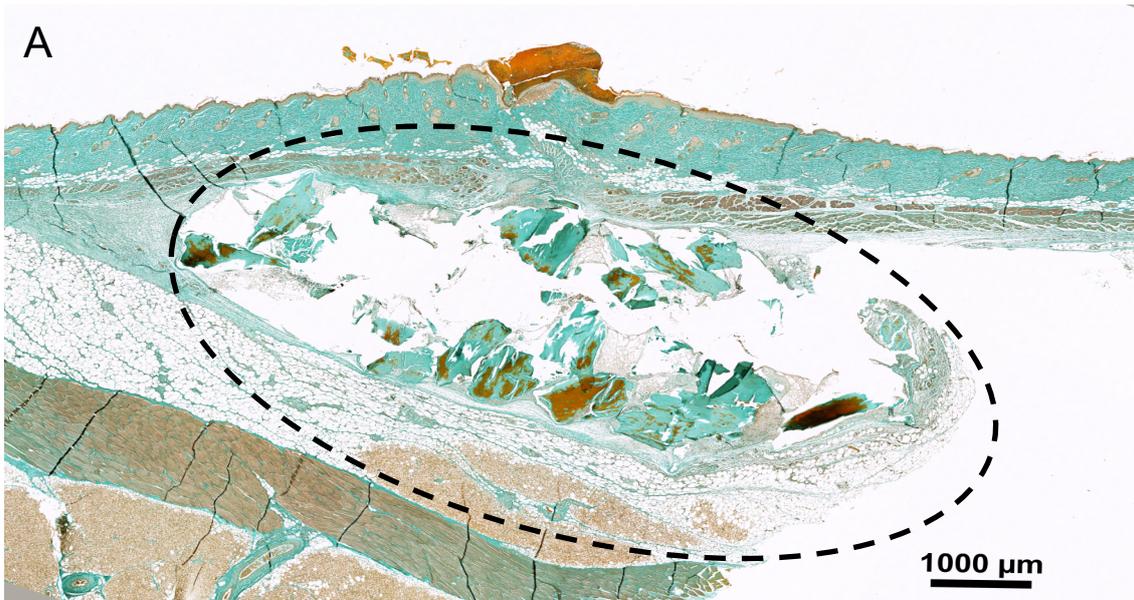


Abbildung 9: Tag 3 post implantationem

A: Masson-Goldner X 40 total scan: das Biomaterial ist deutlich sichtbar
B: HE-Färbung X 100 zeigt die Zellstrukturen und Zellkerne in unmittelbarer Nähe des Knochenersatzmaterials, die Pfeile verweisen auf die Haversschen Kanäle, **C:** Masson-Goldner X 200: schwarz-braune mononukleäre Zellkerne und beginnende Bildung von Blutgefäßen, **D und E:** CD-68 X 200: CD-68-Expression als Hinweis auf Makrophagen (GG = Granulationsgewebe, HO = Hypro-Oss®, HK = Haverssche Kanäle)

An **Tag 15** waren die Hypro-Oss[®]-Granulate nunmehr in ein zell- und gefäßreiches Bindegewebe eingebettet (sh. Abb. 10 A). Das Knochenersatzmaterial ist als mineralisiertes Knochengewebe deutlich erkennbar. Im Vergleich zu Tag 3 sind mehr mononukleäre Zellen auffindbar. Bindegewebe ist rötlich eingefärbt (sh. Abb. 10 B). Das Bindegewebe ist organisierter/fester als an Tag 3, das Biomaterial ist in ein aktives Granulations- und Bindegewebe integriert, in dem eine deutliche Blutgefäßbildung erkennbar ist, umgeben von subkutanem Fettgewebe (sh. Abb. 10 C). Der intergranuläre Raum ist mit faserigem, bereits stärker organisiertem Bindegewebe gefüllt und zeigt im Gegensatz zu Tag 3 eine ausgeprägte Vaskularisierung (sh. Abb. 10 D). Auf der Biomaterial-Oberfläche haben sich nunmehr auch multinukleäre Zellen gebildet, die TRAP-negativ sind (sh. Abb. 10 E). Biomaterial-adhärenente Zellen befinden sich im direkten Anschluss an das eingebrachte Knochenersatzmaterial. Auf der Biomaterial-Oberfläche sind MNGCs erkennbar (sh. Abb. 10 F). Die positive CD68-Expression indiziert die Anlagerung von MNGCs am Biomaterial (sh. Abb. G).

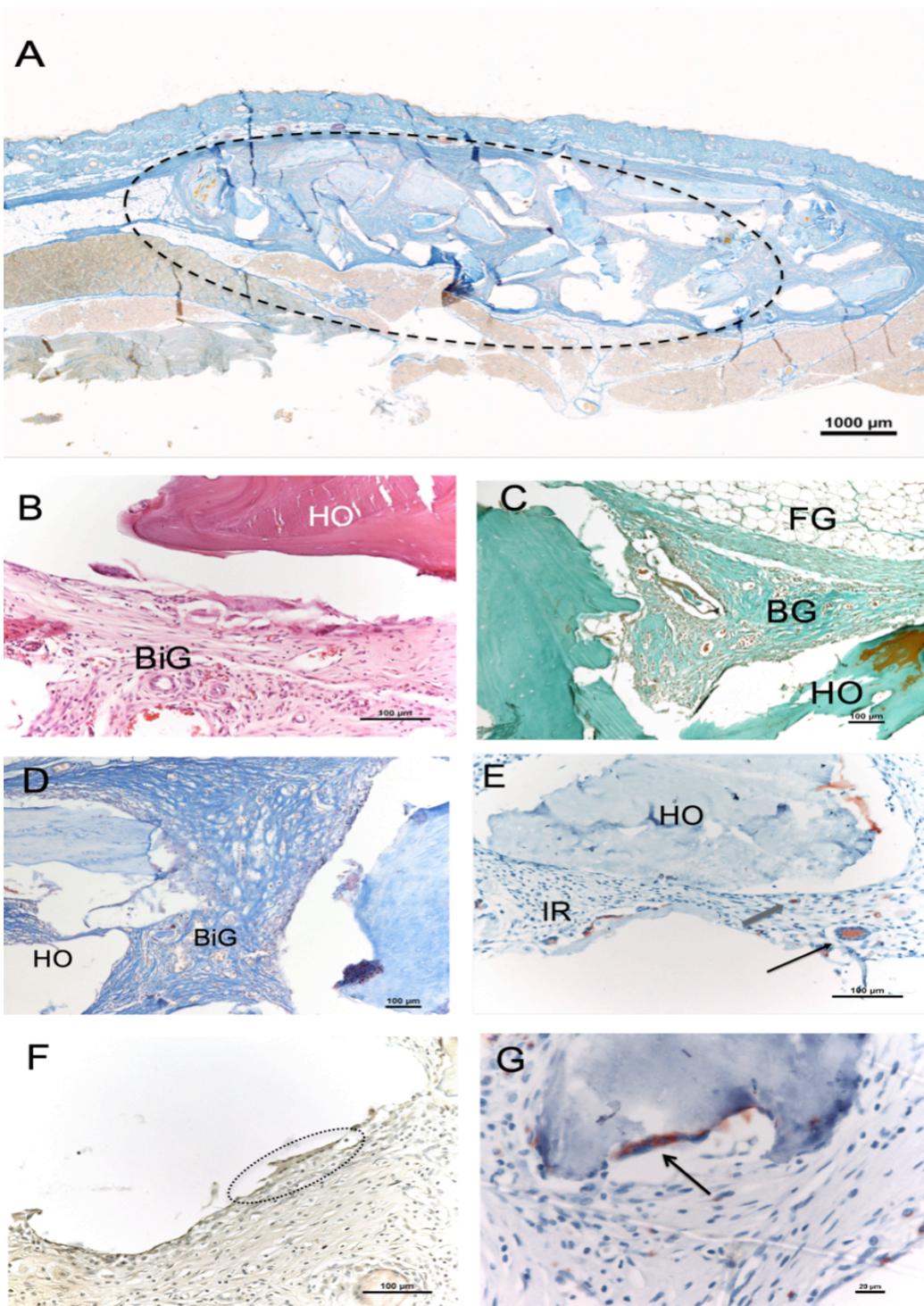


Abbildung 10: Tag 15 post implantationem

A: Azan X 40 (total scan): Biomaterial (gestrichelter Kreis) umgeben von kollagenen Fasern und Bindegewebe **B:** HE X 200: Binde- und Muskelgewebe rötlich eingefärbt **C:** Masson-Goldner X 100: Bindegewebe blassgrün, mineralisiertes Knochengewebe dunkelgrün **D:** Azan X 100: Blutgefäße deutlich erkennbar, **E:** CD-68 X 200: der Blockpfeil zeigt eine CD68-positive Makrophage, der Pfeil eine CD68-positive Riesenzelle, das Biomaterial ist deutlich sichtbar, **F:** TRAP X 200: MNGC auf Biomaterial-Oberfläche (gestrichelter Kreis), **G:** CD-68 X 400: der Pfeil zeigt eine am Biomaterial angelagerte Riesenzelle mit positiver CD-68-Expression. (FG = Fettgewebe, BiG = Bindegewebe, BG = Blutgefäße, IR = Intergranulärer Raum, HO = Hypro-Oss®)

An **Tag 30** sind im peri-implantären Raum die größeren Materialgranulate weiterhin auffindbar (sh. Abb. 11 A). Im Vergleich zu Tag 3 und 15 zeigt sich an Tag 30 eine deutliche Durchsetzung des intergranulären Raums mit festen Gewebefasern zwischen den einzelnen Granula, die sich gut integriert zeigen, das Bindegewebe scheint hoch vaskularisiert zu sein, erkennbar an den Gefäßstrukturen, die mit Erythrozyten gefüllt sind (Abb. 11 B). Die Haversschen Kanäle sind mit Zellkernen gefüllt (sh. Abb. 11 C). Die Masson-Goldner-Färbung visualisiert das Einwachsen von Bindegewebe in das Implantationsbett. Der intergranuläre Raum ist mit angelagertem Gewebe gefüllt, Erythrozyten zeigen eine orangefarbene Ausprägung (sh. Abb. 11 C);

Das Knochenersatzmaterial ist auffindbar, die Zellkerne sind aktiv. Im intergranulären Raum ist Zytoplasma blassrosa sowie Kollagengewebe in blau sichtbar (sh. Abb. 11 D). Um die Hypro-Oss[®]-Granula haben sich eine Vielzahl von Blutgefäßen sowie mit Erythrozyten gefüllte Gewebsstrukturen gebildet (sh. Abb. 11 E). Es sind Multinukleäre Riesenzellen mit negativer TRAP-Expression erkennbar (sh. Abb. 11 F). Des Weiteren haben die MNGCs eine CD68-Aktivität gezeigt (Abb. 11 G).

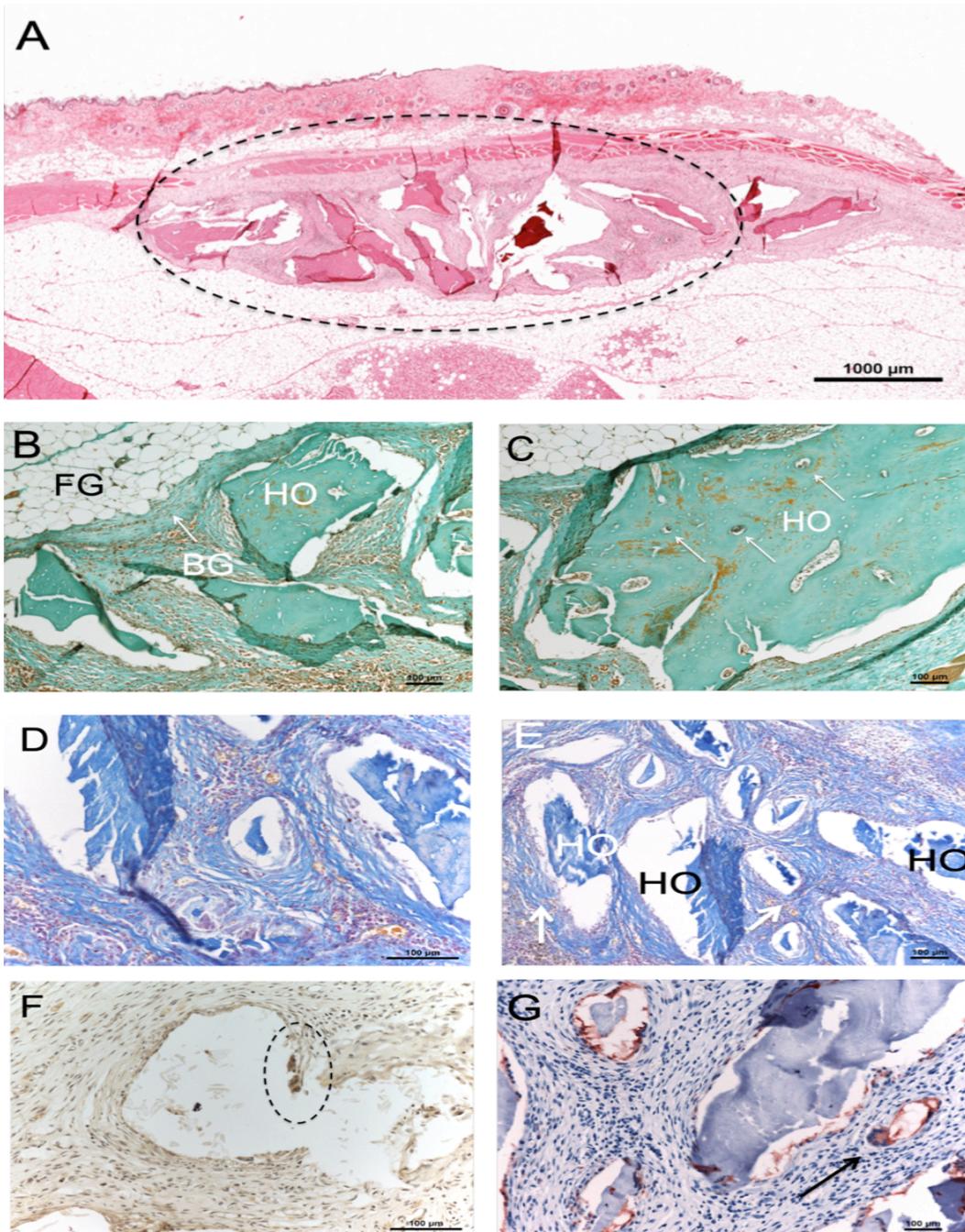


Abbildung 11: Tag 30 post implantationem

A: HE X 40 (total scan): im Vergleich zu Tag 3 und 15 ist der intergranuläre Raum stärker von festeren Gewebefasern durchdrungen, das Biomaterial ist sichtbar und gut integriert. **B:** Masson-Goldner X 100 zeigt ein Einwachsen des Bindegewebes in den intergranulären Raum; **C:** Masson-Goldner X 100: die Haversschen Kanäle sind von Zellkernen besiedelt. Hypro-Oss®-Granula deutlich sichtbar, orangefarbene Anteile sind Erythrozyten. **D:** Azan X 200: im intergranulären Raum ist Zytoplasma (rötlich) und Kollagengewebe (blau) mit deutlicher Vaskularisierung des Bindegewebes und um das Biomaterial erkennbar, **E:** Azan X 200 zeigt deutliche Durchdringung des Bindegewebes mit Blutgefäßen, Pfeile zeigen auf mit Erythrozyten gefüllte Gefäßstrukturen im Bindegewebe, **F:** TRAP-Färbung X 200: TRAP-negative Zellen auf der Oberfläche des Knochenersatzmaterials sind mit einem gestrichelten Kreis gekennzeichnet, **G:** CD-68 X 200: der Pfeil zeigt eine CD68-positive MNGC auf der Oberfläche eines Granulats. (FG = Fettgewebe, HO = Hypro-Oss®, BG = Blutgefäße, MNGCs = Multinukleäre Riesenzellen)

3.2.2 Quantitative Untersuchung

3.2.2.1 Quantifizierung der Multinukleären Riesenzellen

Im Rahmen der quantitativen Analyse wurde zunächst die Anzahl der Multinukleären Riesenzellen im Implantationsbett in der Fläche ermittelt und in der nachfolgenden Abbildung 12 auf 1 mm² umgerechnet:

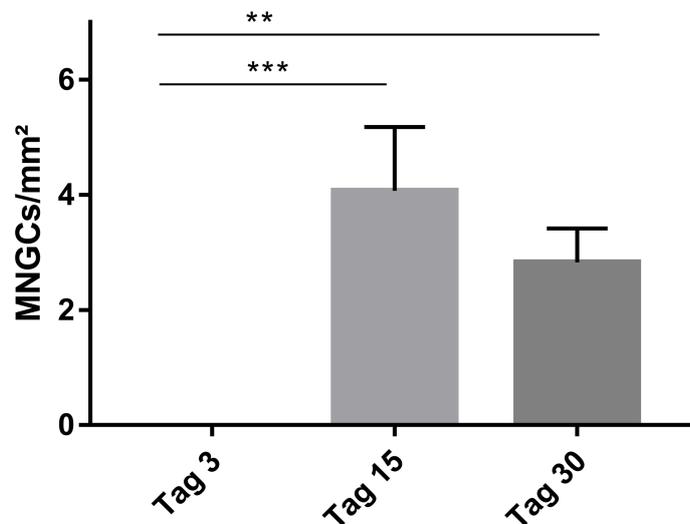


Abbildung 12: Histomorphometrische Quantifizierung der MNGCs/mm² mit hochsignifikantem Anstieg der Zahl von MNGCs von Tag 3 auf Tag 15, welche sich auch an Tag 30 im Vergleich zu Tag 3 signifikant erhöht zeigt.

(*/**/*** > intraindividuelle statistische Signifikanzen der Testgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, vgl. 3.7 Statistische Analyse)

Für die Kontrollgruppe wurden zu keinem Zeitpunkt Multinukleäre Zellen gefunden; sie fanden deshalb für die statistische Auswertung keine Berücksichtigung.

Während an Tag 3 keine MNGCs gefunden wurden, erreichten diese an Tag 15 einen hoch signifikanten Anstieg (***) auf einen maximalen Wert von 4,07 MNGCs/mm², der sich an Tag 30 auf 3,50 MNGCs/mm²

zurückbildete. Trotz des Rückgangs der MNGCs von Tag 15 auf Tag 30 ist jedoch der Unterschied zwischen Tag 3 und Tag 30 weiterhin signifikant (**P < 0,01).

3.2.2.2 Vaskularisation

Die histomorphometrische Analyse beinhaltete die manuelle Erfassung der Anzahl der Gefäße pro mm² über die Gesamtfläche des Implantationsareals:

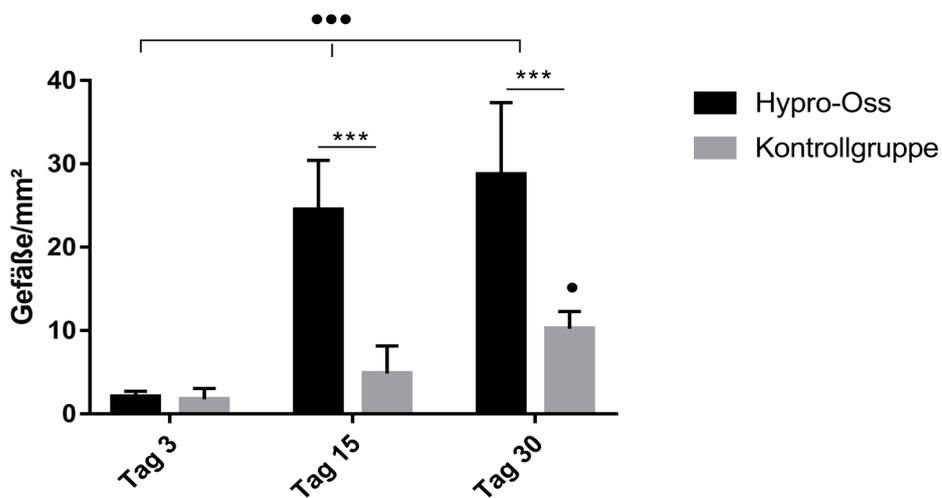


Abbildung 13: Vaskularisation des Implantationsareals an Tag 3, 15 und 30: die Gefäßdichte zeigte von Tag 3 bis Tag 30 für die Hypro-Oss®-Gruppe intra- und interindividuell (im Vergleich zur Kontrollgruppe) einen hochsignifikanten Anstieg.

(Abbildung 13 > interindividuelle (*/**/***) und intraindividuelle statistische Signifikanzen (·/·/··/···) zwischen Test- und Kontrollgruppe, vgl. 3.7 Statistische Analyse)

Die histomorphometrische Auswertung zeigt die Unterschiede der Vaskularisation als Ergebnis der physiologischen Zellreaktion im Zuge der Wundheilung der Kontrollgruppe im Vergleich zur biomaterial-assoziierten Zellreaktion aufgrund der Einbringung von Hypro-Oss® im intraindividuellen und interindividuellem Vergleich.

Während an Tag 3 nach Implantation so gut wie keine Blutgefäße gemessen wurden und interindividuell kein Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe erkennbar ist, zeigt sich an Tag 15 und noch einmal verstärkt an Tag 30 bei der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein hochsignifikanter Unterschied der Gefäßbildungsaktivität ($P^{***} < 0,001$) als Resultat der Zellreaktion auf das implantierte Knochenersatzmaterial.

Intraindividuell ist im Zeitablauf innerhalb der Kontrollgruppe ein Anstieg der Vaskularisation zu beobachten, der aber von Tag 3 zu Tag 15 zunächst nicht signifikant, von Tag 15 zu Tag 30 signifikant ($P^{***} < 0,05$) ansteigt. Dagegen zeigt die Testgruppe von Tag 3 auf Tag 15 und erneut von Tag 15 auf Tag 30 intraindividuell einen hoch signifikanten Anstieg der Gefäßbildungsaktivität ($P^{***} < 0,001$).

3.2.2.3 CD-68-positive Mononukleäre Zellen

Monozyten und Makrophagen exprimieren in der immunhistochemischen Färbung CD-68-Antigene und wurden manuell auf Basis der Anzahl der Zellen pro mm^2 unter Verwendung der NIS-Elements AR Software ermittelt:

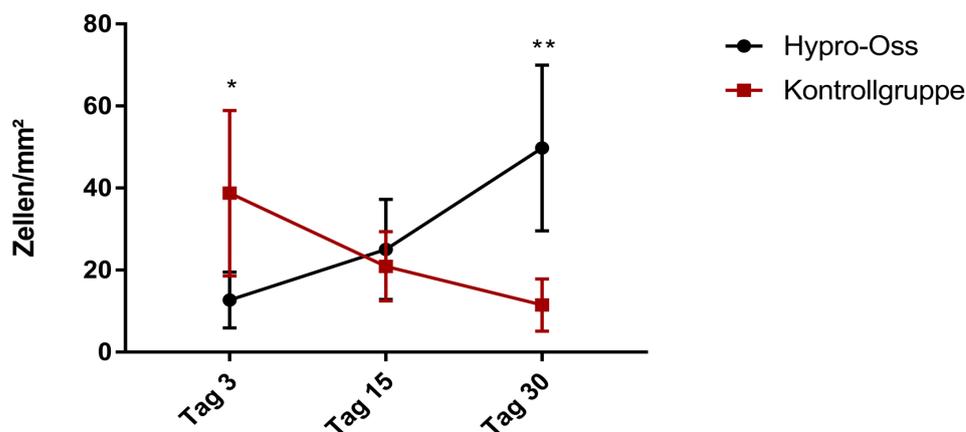


Abbildung 14: CD-68-Expression von Makrophagen an Tag 3, 15, und 30 mit signifikantem intraindividuellem Anstieg der Hypro-Oss®-Gruppe und rückläufiger Entwicklung für die Kontrollgruppe

Abbildung 14 zeigt die Entwicklung der Bildung von CD-68-positiven Mononukleären Zellen (Makrophagen) an Tag 3, 15 und 30. In beiden Gruppen wurden CD-68-positive Mononukleäre Zellen gefunden, deren Anzahl an Tag 3 für die Kontrollgruppe signifikant höher war als für die Testgruppe. Die Anzahl der Zellen stieg jedoch für die Testgruppe von Tag 3 bis Tag 15 kontinuierlich an und erreichte an Tag 30 einen Höhepunkt, während sie für die Kontrollgruppe von Tag 3 bis Tag 30 stark rückläufig war. Intraindividuell reduzierte sich die Anzahl der Zellen in der Kontrollgruppe von Tag 3 über Tag 15 bis zu Tag 30 von ca. 40 auf ca. 10 Zellen/mm², während in der Testgruppe ein signifikanter Anstieg von 12 auf 50 Zellen/mm² beobachtet wurde (P** < 0,01).

3.2.2.4 CD-68-Expression - Multinukleäre Riesenzellen

Multinukleäre Zellen exprimieren ebenso wie Makrophagen CD-68 und wurden zu jedem Beobachtungszeitpunkt unter Verwendung der NIS-Elements AR Software manuell als Anzahl der Zellen pro mm² ermittelt:

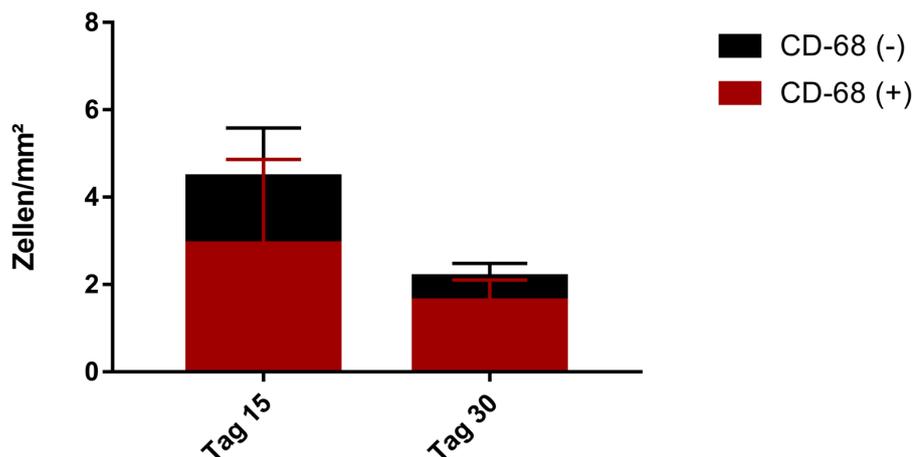


Abbildung 15: Die CD-68-Expression von Multinukleären Riesenzellen zeigt an Tag 15 eine Höhepunkt und ist bis Tag 30 wieder rückläufig

Abbildung 15 zeigt die Expression von CD-68 in MNGCs. Da an Tag 3 keine MNGCs auffindbar waren, wurden diese in der Darstellung nicht berücksichtigt. Von Tag 15 auf Tag 30 hat sich die Gesamtzahl der MNGCs über die gesamte definierte Fläche (vgl. Abbildung 5) im Schnitt in etwa halbiert. Die Mehrheit der Zellen war an beiden Beobachtungszeitpunkten CD-68-positiv. Ab Tag 15 haben die Riesenzellen stark CD-68 (+) exprimiert, wobei sich das Verhältnis von CD-68 (+) und CD-68 (-) an Tag 30 zugunsten von CD-68 (+) verändert hat.

4 Diskussion

Knochenersatztherapien auf Basis xenogener Materialien sind heutzutage aufgrund vielfacher Einsetzbarkeit und relativ einfacher Handhabung Standardmethoden zur Regeneration von Knochendefekten, wenn auf körpereigene Knochentransplantate verzichtet werden soll oder muss.

Allerdings lassen sich xenogene Knochenersatzmaterialien nicht so komplikationslos einsetzen wie autologes Transplantat, weil zunächst alle organischen (potenziell allergenen und infektiösen) Komponenten entfernt werden müssen⁷⁴. Die damit einhergehende Eliminierung vitaler (Vorläufer-) Zellen hat jedoch zur Folge, dass ein Knochenersatzmaterial wie das hier untersuchte Hypro-Oss® lediglich eine osteokonduktive Leitstruktur für den neu gebildeten Knochen bereitstellt. Wissenschaft und Anwendung sind jedoch zunehmend bemüht, über unterschiedliche Kombinationen von Materialzusammensetzung, Materialstruktur und physiko-chemischen Eigenschaften Knochenersatzmaterialien zu entwickeln, die eine Fähigkeit zur Osteoinduktivität aufweisen³⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde das bovine Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® in das subkutane Gewebe von 12 weiblichen Wistar-Ratten (Testgruppe) implantiert, bei 12 weiteren Tieren erfolgte eine *Sham*-Operation ohne Materialeinbringung (Kontrollgruppe). Bei beiden Gruppen wurde die Gewebereaktion über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet, danach das

Gewebe explantiert und histologisch und histomorphometrisch untersucht. Ziel der Untersuchung war die Analyse der Zellreaktion auf das Biomaterial Hypro-Oss[®], des Materialab- und Umbaus sowie der möglichen Knochenneubildung. Die Eignung eines Knochenersatzmaterials in der klinischen Anwendung wird dabei durch dessen Fähigkeit bestimmt, über die Materialzusammensetzung und –struktur eine ganz spezifische, gewünschte Gewebsreaktion auszulösen²⁹. Ein weiterer Fokus lag auf der Beobachtung der Fremdkörperreaktion als Folge der Bildung von MNGCs im Implantationsbett.

4.1 Die Rolle von Makrophagen in der Wundheilung

Zu diesem Zweck wurde das Biomaterial in der vorliegenden Untersuchung *in vivo* qualitativ und quantitativ ausgewertet. Dabei waren in der histologischen Betrachtung bereits an Tag 3 und noch einmal verstärkt an Tag 15 mononukleäre Zellen erkennbar, die eine positive Expression von CD-68 zeigten, ein Glycoprotein, das auch von Makrophagen exprimiert wird und daher auch als Marker für Makrophagen angesehen wird. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der histomorphometrischen Beobachtung, wobei in der Hypro-Oss[®]- (Test-) Gruppe von Tag 3 über Tag 15 bis Tag 30 ein signifikanter Anstieg ($P^{**} < 0,01$) der Anzahl von CD-68-positiven mononukleären Zellen (Makrophagen) beobachtet werden konnte, während sich für die Kontrollgruppe ein kontinuierlicher Rückgang der Makrophagenzahl zeigte.

Makrophagen kommen als Monozyten aus dem Knochenmark und gelangen über Chemotaxis als Makrophagen zum Entzündungsort, wo sie im Rahmen der physiologischen Wundheilung beim Abbau von Biomaterial, der Geweberegeneration und der Vaskularisierung beteiligt sind⁶⁹. Dieser Prozess vollzieht sich im Rahmen der unmittelbaren, angeborenen Immunreaktion (*first line of defense*) ausschließlich unter Mitwirkung von Makrophagen, wobei man pro- (M1) und anti-inflammatorische (M2) Makrophagen unterscheidet; erstere spielen eine größere Rolle bei der Fremdkörperreaktion (z.B. in Bezug auf die Phagozytose), letztere haben eher reparative Funktionen im Rahmen der

Wundheilung⁶⁹, wobei sie zwischen beiden Phänotypen wechseln können (Plastizität). Im Zuge der Wandlung zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen spielt Interleukin (IL-4 und IL-13) eine wichtige Rolle⁴⁷. Die unterschiedliche Wirkung der M1- und M2-Makrophagen war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und bedürfte einer weitergehenden Untersuchung in einem anderen Rahmen.

4.2 Biomaterial-induzierte Bildung von Multinukleären Riesenzellen

Makrophagen sind aber nicht nur an der physiologischen Wundheilung beteiligt, sondern ebenso als Vorläuferzellen von Multinukleären Riesenzellen, die ebenso wie Makrophagen CD-68 exprimieren, so dass man vermuten kann, dass die Makrophagen im Rahmen ihrer Fusion zu MNGCs dieses Merkmal weitergeben.

In der hier vorgelegten Studie zeigen sich in der histologischen Betrachtung an Tag 15 und Tag 30 zusätzlich zu dem beobachteten Anstieg der mononukleären Zellen nunmehr auch (TRAP-negative, CD-68-positive) mehrkernige Riesenzellen. Dies findet in der histomorphometrischen Analyse durch einen signifikanten Anstieg der MNGCs an Tag 15 auf 4,07 MNGCs/mm² eine Bestätigung, die in der Mehrzahl TRAP-positiv waren, während an Tag 3 keine MNGCs nachweisbar waren (Abbildungen 12 und 15). Für die Kontrollgruppe wurden dagegen zu keinem Zeitpunkt MNGCs gefunden.

Unsere Untersuchung indiziert insofern einen Zusammenhang zwischen der Einbringung von Hypro-Oss[®], der vermehrten Bildung von Makrophagen sowie der Entstehung von Multinukleären Riesenzellen: während die Kontrollgruppe (ohne Einbringung des Biomaterials) die typischen Charakteristika einer physiologischen Wundheilung allein mittels mononukleärer Zellen wie Makrophagen zeigte, induzierte die Einbringung von Hypro-Oss[®] die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen.

4.3 Differenzierung von Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten

Studien über Knochenersatztherapien befassen sich im wesentlichen mit der Wirkungsweise von 2 Ausprägungen Multinukleärer Riesenzellen: zum einen der Osteoklasten, zum anderen der Fremdkörper-Riesenzellen, die sich in ihrer Entstehung wie folgt unterscheiden:

Monozyten als Vorläuferzellen von Osteoklasten kommen aus dem Knochenmark und differenzieren sich primär unter Mitwirkung des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha\beta3$ auf ossären Oberflächen zu Osteoklasten. Diese spielen im Rahmen von Knochenregeneration und *Remodelling* eine wichtige Rolle, indem sie ganz allgemein und permanent am kontinuierlichen Prozess des Knochenab- und Umbaus beteiligt sind (*Coupling*).

Dagegen lösen Monozyten mittels von Lymphozyten ausgeschüttetem Interleukin (IL-4 und IL-13) und Integrin $\beta 1$ und $\beta 2$ auf Biomaterial-Oberflächen die Aktivierung von Makrophagen und deren Fusion zu Fremdkörper-Riesenzellen aus (Abbildung 16):

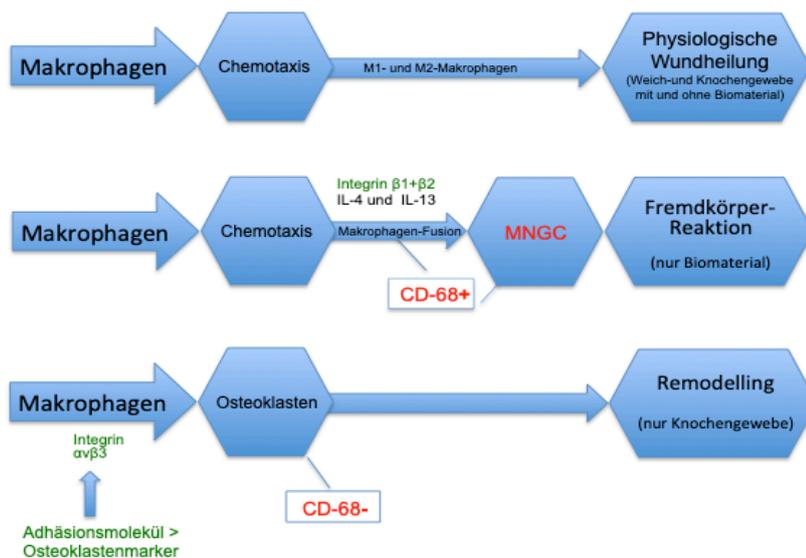


Abbildung 16: Differenzierung von Makrophagen³

Multinukleäre Riesenzellen – sofern sie nicht auf einer infektiösen Entzündung beruhen - reflektieren im Gegensatz zu Osteoklasten eine ganz spezifische und zeitlich begrenzte Fremdkörperreaktion auf die Einbringung eines Biomaterials, indem sie entweder an dessen Degradation beteiligt sind oder über eine fibrotische Verkapselung das Biomaterial sukzessive einschließen (nützliche Entzündungsreaktion), was allerdings die Gefahr beinhaltet, dass es zu einer persistenten (überschießenden und damit schädlichen) Entzündungs-(Fremdkörper-) -reaktion kommen kann, die eine fortgesetzte Bildung von MNGCs anstößt⁴⁷. Insofern stellt sich die Frage, ob es sich bei den in unserer Untersuchung vorgefundenen Multinukleären Riesenzellen um Osteoklasten oder aber um Fremdkörperriesenzellen handelt.

Einige Makrophagen und Multinukleäre Riesenzellen haben die Eigenschaft, Tartrat-Resistente Saure Phosphatase (TRAP) zu exprimieren, welches bei der Degradation von Biomaterial beteiligt ist und auch von Osteoklasten exprimiert wird⁸, weshalb man früher auch von Osteoklasten-ähnlichen Multinukleären Zellen sprach, da man glaubte, dass alle Multinukleären Riesenzellen, die TRAP exprimieren, Osteoklasten sind. Allerdings ist die Unterscheidung von beiden auf Basis der TRAP-Färbung nicht eindeutig möglich, so dass in der Vergangenheit auch morphologische Charakteristika von Osteoklasten herangezogen wurden wie z.B. das Vorhandensein eines Faltsaums (engl.: *ruffled border*).

Unsere Arbeitsgruppe² hat jedoch die Zuverlässigkeit der rein morphologischen Differenzierung in Frage gestellt und auf immunhistologischer Basis untersucht: darin wurde gezeigt, dass die CD-68-Expression in Riesenzellen, so wie sie auch in der hier vorliegenden Studie vorgefunden wurde, auf den Zelltyp einer Fremdkörperriesenzelle im Rahmen einer Entzündungsreaktion hindeutet, während Jackson et al.⁴¹ darauf hinweisen, dass Osteoklasten dieses *Cluster of Differentiation* nicht tragen. In Übersichtsarbeiten unserer Gruppe² wurden weitere Differenzierungsmerkmale herausgestellt, wie z.B. über den Nachweis von Integrinen, wobei β 1 und β 2 auf Fremdkörperriesenzellen hindeuten, β 3 dagegen auf Osteoklasten (vgl. Abbildung 16). Ebenso erlaubt der Nachweis

einer CD-206-Expression die Identifikation von Fremdkörperriesenzellen, welche in der zitierten Übersichtsarbeit für Osteoklasten negativ ausgefallen ist. Der pathologische Charakter wird im übrigen an gleicher Stelle daraus abgeleitet, dass auch Riesenzellen vom Typ Langerhans, wie sie z.B. bei Sarkoidose gefunden werden, CD-68 exprimieren und damit einen pathologischen Charakter der Fremdkörperriesenzellen indizieren.

Ghanaati et al.³⁰ unterscheiden deshalb hinsichtlich der Zellreaktion zwischen physiologischer Wundheilung allein auf Basis von mononukleären Zellen und pathologischer Zellreaktion unter Mitwirkung von Fremdkörper-Riesenzellen. Zwar sind auch im Rahmen einer physiologischen Wundheilung Riesenzellen – nämlich Osteoklasten – auffindbar. Da wir aber nunmehr festgestellt haben, dass die für die Testgruppe vorgefundenen Biomaterial-induzierten MNGCs Fremdkörper-Riesenzellen sind, unterstreicht dies den pathologischen Charakter dieser Zellen.

4.4 Korrelation zwischen Biomaterial-induzierter Bildung Multinukleärer Riesenzellen und Vaskularisation

Im Rahmen dieser Untersuchung von Hypro-Oss® haben die histomorphometrischen Daten hochsignifikante interindividuelle Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe hinsichtlich der Bildung von Multinukleären Riesenzellen und der Vaskularisierung gezeigt, was für die Testgruppe auf eine pathologische Entzündungsreaktion hindeutet.

Auch die histologischen Ergebnisse zeigen an Tag 15 und Tag 30 TRAP-negative Multinukleäre Riesenzellen und liefern damit ebenfalls den Hinweis, dass auf die Einbringung von Hypro-Oss® eine Fremdkörperreaktion stattgefunden hat. Die Hypro-Oss®-Granulate zeigen zu diesen Zeitpunkten eine Eingliederung in das peri-implantäre Gewebe.

Die histomorphometrische Untersuchung der vorliegenden Studie hat damit gezeigt, dass die Bildung von MNGCs durch die Einbringung des Biomaterials induziert wurde. Die immunhistologische Analyse brachte dann den Nachweis,

dass es sich bei diesen Multinukleären Riesenzellen um Fremdkörper-Riesenzellen im Rahmen einer pathologischen Wundheilung handelt.

Lorenz et al.⁵² verweisen darauf, dass Multinukleäre Riesenzellen - insbesondere TRAP-positive MNGCs - als Manifestation einer fortgesetzten Fremdkörperreaktion auf Biomaterialien nicht-biologischen Ursprungs angesehen werden können und eine wichtige Rolle bei der Degradation eines Biomaterials spielen⁵². Die in dieser Untersuchung beobachtete TRAP-negative Expression der von Hypro-Oss®-induzierten Gewebereaktion kann insofern eher als eine moderate Fremdkörperreaktion gedeutet werden, wie sie bei Biomaterialien natürlichen Ursprungs auch in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe² beobachtet wurde.

Witte et al.⁷⁸ sehen die Durchblutung des Implantatbettes als wichtigen Faktor der Knochengewebeheilung. Eine suffiziente Blutversorgung gilt allgemein als eine Grundvoraussetzung für die Knochenregeneration³¹. Nachfolgend wird deshalb die Auswirkung der Einbringung von Hypro-Oss® (Testgruppe) auf die Vaskularisation des Implantationsareals histomorphometrisch analysiert und mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe abgeglichen. Dabei zeigte die Zellreaktion für die Testgruppe am Tag 15 nach Implantation einen hochsignifikanten, intraindividuellen Anstieg der Vaskularisierung des Implantationsbettes ($P^{***} < 0,001$), der sich bis Tag 30 fortsetzte und auch in der interindividuellen Betrachtung (d.h. im Vergleich zur Kontrollgruppe) hochsignifikante Unterschiede zeigte ($P^{***} < 0,001$, sh. Abb. 13). Der hochsignifikante Anstieg der Anzahl der Blutgefäße von Tag 3 auf Tag 30 von 2,06 Gefäßen/mm² auf 28,72 Gefäßen/mm² entspricht einem prozentualen Anstieg von 1.294 %. Lorenz et al.⁵² haben für das ebenfalls bovine Knochenersatzmaterial Bio-Oss® 180 Tage nach Implantation einen Anstieg der Anzahl der Blutgefäße auf 10,42 Gefäße/mm² ermittelt, während das dort ebenfalls untersuchte synthetische Knochenersatzmaterial Nanobone® einen Anstieg auf 28,69 Gefäße/mm² aufwies, so dass das hier analysierte Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® nach 30 Tagen mit einem Anstieg um 1.294 % eine mit dem synthetischen Nanobone® vergleichbare Gefäßbildungs-Reaktion zeigte und damit ebenfalls

deutlich über dem bovinen *Peer*-Produkt Bio-Oss® lag. Im Vergleich zu BEGO OSS® (15,19 Gefäße/mm²) weist Hypro-Oss® mit 24,73 Gefäßen/mm² am selben Beobachtungszeitpunkt von 30 Tagen p.i. einen um 62,8 % höheren Wert auf.

Diese histomorphometrischen Ergebnisse spiegeln auch die histologisch beobachtete Zunahme der Bildung von Blutgefäßen und deren Einwachsen in das Bindegewebe ab Tag 15 wider (sh. Abb. 10C) und bestätigen auch die Erkenntnisse von Ghanaati et al.²⁶, wonach die Bildung von MNGCs und das Ausmaß der Vaskularisierung Maßstab für die Intensität der Fremdkörperreaktion auf die Insertion von Biomaterialien sind: dabei wurde immunhistologisch nachgewiesen, dass Riesenzellen VEGF freisetzen und damit einen Hinweis auf die Korrelation der Bildung von MNGCs und Vaskularisation lieferten.

Andere Studien⁹ zeigen, dass die Anzahl Multinukleärer Riesenzellen nicht das einzige Indiz für das Ausmaß der Vaskularisation darstellt, da auch mononukleäre Zellen wie z.B. Makrophagen über die Ausschüttung von VEGF und proinflammatorischer Enzyme eine verstärkte Vaskularisierung auslösen können. Insofern ist ein Anstieg der Vaskularisierung nicht notwendigerweise ausschließlich auf das Vorhandensein Multinukleärer Riesenzellen zurückzuführen. Wenn also sowohl Makrophagen als auch Multinukleäre Riesenzellen über die Sekretion von VEGF die Blutgefäßbildung anstoßen können, diese aber bei Existenz von Multinukleären Riesenzellen wesentlich stärker ausfällt, könnte daraus geschlossen werden, dass Multinukleäre Zellen die Ausschüttung von VEGF und anderer pro-inflammatorischer Enzyme stärker induzieren als dies allein durch Makrophagen geschieht, wobei anti-inflammatorische M2-Makrophagen möglicherweise weniger VEGF sekretieren als pro-inflammatorische M1-Makrophagen.

4.5 Biomaterialeigenschaften als wichtige Faktoren für die Intensität der Fremdkörperreaktion

Mehr Vaskularisation bedeutet jedoch nicht notwendigerweise auch eine schnellere Knochenregeneration, da diese auch von den physiko-chemischen Eigenschaften wie z.B. der Granulat-Größe, Form, Porosität⁶⁵ und Oberflächenbeschaffenheit des Biomaterials abhängt. Hypro-Oss® wird in den Granulatgrößen 0,5 – 1,0 mm sowie 1,0 – 2,0 mm vertrieben. Der in dieser Untersuchung beobachtete Anstieg der Anzahl Multinukleärer Riesenzellen bis Tag 15 und der anschließende Rückgang (sh. Abbildung 12) könnte ein Hinweis darauf sein, dass insbesondere kleinere Granula zu diesem Zeitpunkt bereits degradiert waren und die Entzündungsreaktion sich deshalb anschließend zurückbildete, so dass die MNGCs als die wesentlichen Determinanten für den phagozytotischen Prozess angesehen werden könnten.

Unsere Arbeitsgruppe² hat diesen Zusammenhang auch für andere Biomaterialien bestätigt. Eine fortgesetzte Aktivität von MNGCs dürfte allerdings das Einsetzen der reparativen Phase der Wundheilung aufgrund einer persistenten pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Stimulation in der Nähe des Biomaterials verhindern, was letztlich die angestrebte Regeneration gefährden könnte. An gleicher Stelle wird sogar die Frage gestellt, ob die Entstehung Biomaterial-induzierter MNGCs als pathologische Gewebeantwort überhaupt positiv zu bewerten ist oder ob sie nicht eher als adverse Reaktion zu betrachten wäre.

Ein weiterer Grund für den Rückgang der MNGCs könnte aber auch sein, dass ein Teil des Biomaterials, welches nicht phagozytiert werden konnte, im Rahmen einer fibrotischen Verkapselung⁴ bereits soweit vom umgebenden Gewebe isoliert wurde, dass der Stimulus für die Fusion von Makrophagen zu MNGCs ebenso nachgelassen hat, was auf einen stabilen Materialeinbau hindeuten würde. Ghanaati et al.²⁶ haben gezeigt, dass größere Granulate initial nicht in gleicher Weise die Bildung von Multinukleären Riesenzellen induzieren wie kleinere, dafür aber eine längere Standzeit aufweisen. Daraus ließe sich schließen, dass sich die Anzahl der Multinukleären Riesenzellen proportional

zur verbliebenen (Rest-) Menge und Größe des noch nicht degradierten Biomaterials entwickelt hat.

Dies entspricht dem Ziel eines gleichgewichtigen Materialab- und umbaus: ein zu schneller Abbau des Biomaterials wäre insofern kontraproduktiv, als es dadurch zu einem zu schnellen Einwachsen von Bindegewebe kommen kann, wodurch die osteokonduktive Platzhalterfunktion nicht mehr gegeben wäre.

Umgekehrt lassen die Ergebnisse anderer Studien den Schluss zu, dass auch ein zu langsamer Materialabbau nicht wünschenswert ist, da eine Einlagerung neugebildeter Knochensubstanz ohne signifikante Degradation nicht zu einem Zustand der *restitutio ad integrum* zu führen scheint⁷.

Viele Biomaterial-Hersteller beschäftigen sich auch mit dem Verständnis der Eigenschaften der Biomaterial-Oberfläche. Die erfolgreiche Anlagerung der Makrophagen an die Biomaterial-Oberfläche ist wichtig für deren Überleben. Die Adhäsion sowie deren anschließende Interaktion sind wichtige Faktoren für die Fusion von Makrophagen zu Multinukleären Riesenzellen, um eine Fremdkörperreaktion zu induzieren, wofür ein geeignetes Spektrum von Proteinen notwendig ist.

Wenn Makrophagen mittels Phagozytose oder extrazellulärer Degradation in der chronischen Entzündungsphase nicht in der Lage sind, allein größere Biomaterial-Granulate zu internalisieren (frustrierte Phagozytose), fusionieren sie zu Riesenzellen, lagern sich an das Biomaterial an und sind dort solange aktiv, wie das Biomaterial noch nicht vollständig abgebaut ist⁶⁹ (sh. Abb. 17).

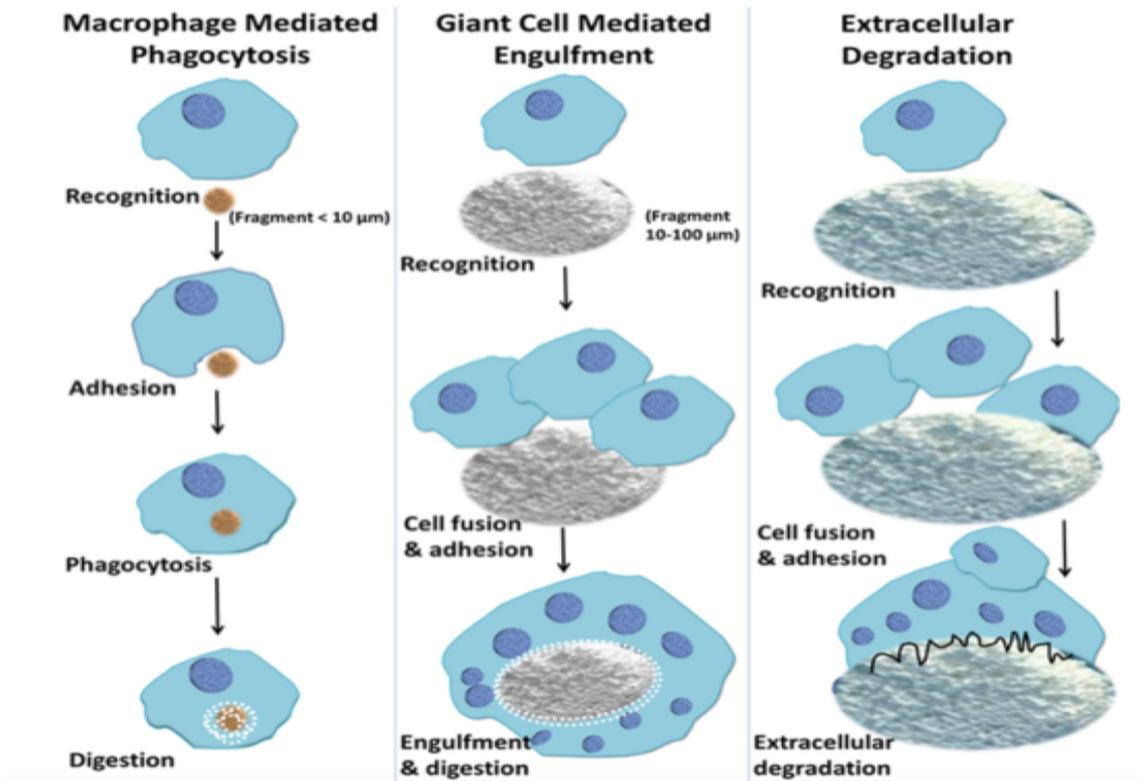


Abbildung 17: Phagozytotische Funktion von Makrophagen⁷⁰

MNGCs haben insofern vermutlich größere phagozytotische Fähigkeiten als Makrophagen allein, so dass deren Fusion zu Multinukleären Riesenzellen einer Bündelung und damit Verstärkung der phagozytotischen Kräfte entspricht¹⁰. Analog könnte man deshalb vermuten, dass MNGCs aufgrund ihrer positiven Auswirkung auf die Blutgefäßbildung in der Lage sind, größere Mengen an VEGF zu sezernieren als Makrophagen, womit wiederum auch die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten gefördert wird. Dadurch wird letztendlich das regenerative Knochenwachstum stimuliert, was als wesentliche Voraussetzung der Neoangiogenese und damit der Osteoinduktion angesehen wird¹⁰.

Der in dieser Arbeit histomorphometrisch beobachtete Höhepunkt der Anzahl Multinukleärer Riesenzellen an Tag 15 und der leichte Rückgang bis Tag 30 wird in anderen Studien²⁹ als Parameter für die Fremdkörper-Antwort als defensive Reaktion auf die Einbringung eines körperfremden Biomaterials angesehen und spiegelt dessen Biodegradation wider. Dies gibt einen Hinweis

auf den phagozytotischen Charakter dieser Zellen, deren Existenz Ausdruck einer pathologischen (Entzündungs-) Reaktion des Körpers ist. In der Kontrollgruppe waren dagegen erwartungsgemäß keine Multinukleären Zellen zu beobachten. Die vorliegende Untersuchung scheint auch für Hypro-Oss® eine positive Korrelation zwischen der Anzahl multinukleärer Riesenzellen, dem Ausmaß der Vaskularisierung und der Degradation von Knochenersatzmaterialien zu bestätigen, was als eine zentrale Voraussetzung für den Prozess der Knochenheilung gewertet wird⁷⁸.

Biomaterialien zeigen jedoch je nach Anwendung und Verarbeitung unterschiedliche Reaktionsmuster. So hat unsere Arbeitsgruppe² in einer Übersichtsarbeit nachgewiesen, dass die Insertion völlig identischer kollagenbasierter Biomaterialien (porcine Barriere-Membranen) in Abhängigkeit von den Oberflächeneigenschaften unterschiedliche Gewebereaktionen induzieren kann, nämlich einmal durch Mononukleäre Zellen, bei denen eine Fremdkörperreaktion ausblieb, zum anderen durch MNGCs mit der möglichen Folge überschießender Vaskularisierung und Desintegration.

Sheikh et al.⁶⁹ betonen ebenso die Bedeutung der Oberflächenbeschaffenheit des Biomaterials als einen wichtigen Faktor für die Anlagerung von Proteinen an das Biomaterial und die nachfolgende Fusion von Makrophagen zu Multinukleären Riesenzellen, weisen aber darauf hin, dass die Mechanismen für die Fremdkörpererkennung noch nicht vollständig erforscht sind. Man vermutet, dass Proteine, die sich auf der Biomaterialoberfläche anlagern, eine Makrophagen-Reaktion induzieren. Da sich diese Proteine aus dem Blutplasma bereits innerhalb weniger Sekunden nach Implantation an das Biomaterial anlagern, spielt die Beschaffenheit dieser provisorischen Matrix vermutlich eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden Gewebe-Biomaterial-Interaktion, da die involvierten Zellen mit eben dieser Proteinmatrix interagieren und nicht mit dem eigentlichen Biomaterial⁴⁷. Allerdings lassen sich die Beobachtungen der Fremdkörperreaktion auf kollagen-basierte Barriermembranen wohl nicht ohne weiteres auf Knochenersatzmaterialien wie das hier untersuchte Hypro-Oss® übertragen.

4.6 Einfluss der Herkunft des Biomaterials

Lorenz und Ghanaati^{28 54} haben den Zusammenhang mit der Materialherkunft dahingehend dargestellt, dass synthetisches im Vergleich zu xenogenem Knochenersatzmaterial eine erhöhte Bildung von MNGCs und eine ausgeprägtere Vaskularisierung innerhalb des Implantationsbettes zeigte, was auf einen stärkeren zellulären Abbau des Knochenersatzmaterials hindeuten würde, während sich xenogenes Knochenersatzmaterial stärker in das Implantationsgebiet zu integrieren scheint, ohne einem ebenso starken zellulären Abbau zu unterliegen. Barbeck¹⁰ hat dagegen für ein phycogenes Knochenersatzmaterial (Algipore[®]) über einen fast vollständigen Materialabbau durch MNGCs nach 6 Jahren berichtet. Andere Untersuchungen² haben ergeben, dass sich Multinukleäre Riesenzellen unabhängig vom Ursprung des Biomaterials bilden und ähnliche materialspezifische Reaktionscharakteristika zeigen, wenn auch diese Zusammenhänge noch nicht vollständig geklärt zu sein scheinen. Die Resorptions- und Degradationsmuster, sowie die unterschiedlichen Standzeiten der verschiedenen Knochenersatzmaterialien waren jedoch nicht Gegenstand dieser Untersuchung und bedürfen insofern weiter Forschung¹⁰.

Für das hier untersuchte Hypro-Oss[®] kann jedoch der hochsignifikante Anstieg der Vaskularisierung zwischen Tag 3 und Tag 30 sowie die auch histologisch beobachtete Zunahme der Bildung von Blutgefäßen und deren Einwachsen in das Bindegewebe als Indiz dafür gewertet werden, dass eine Fremdkörperreaktion und ein Materialabbau stattgefunden haben.

4.7 Atelopeptidierung und Verzicht auf thermische Behandlung als Alleinstellungsmerkmal von Hypro-Oss®

Xenogene Knochenersatzmaterialien basieren im Gegensatz zu synthetischen Biomaterial auf natürlichem Ursprungsgewebe und bedürfen der Aufreinigung, um immunologische Abwehrreaktionen auszuschalten. Die verschiedenen Aufreinigungsmethoden sind jedoch immer wieder Grund zur Diskussion, wonach eine sichere Unterbindung einer Abwehrreaktion nur über eine thermische Behandlung möglich sein könnte⁷⁸. In der *ex-vivo*-Untersuchung von Hypro-Oss® zeigte sich dieses jedoch trotz Verzichts auf Sinterung als gut aufgereinigt und frei von Zellresten. Auch *in vivo* zeigen sich die Granula bis Tag 30 gut integriert in das peri-implantäre Gewebe und gut durchsetzt mit festen Gewebefasern, was für eine intensive Integration des Biomaterials und den Erhalt der natürlichen Mikrostruktur spricht. Eine Abstoßungsreaktion war nicht erkennbar, was auch ohne thermische Behandlung für eine zuverlässige Aufreinigung spricht.

Ghanaati et al.²⁸, Goller et al.³³ und Barbeck et al.⁷ haben einen Zusammenhang zwischen hohen Sintertemperaturen (> 700° C), den physikochemischen Eigenschaften, der Induzierung von MNGCs und der Vaskularisierung nachgewiesen, wonach eine höhere Sintertemperatur bei bovinen Knochenersatzmaterialien eine erhöhte Materialdichte zum Ergebnis hat und damit eine verstärkte Bildung von MNGCs und Vaskularisierung bewirkt, wobei vermutet werden kann, dass eine höhere Erhitzung die Eigenschaften der natürlichen Knochensubstanz so verändert, dass sie eher als „unnatürlich“ erkannt wird und deshalb eine erhöhte Entzündungsreaktion auslöst. Auch in anderen Studien¹¹ wurde aufgezeigt, dass xenogene Knochenersatzmaterialien, die bei geringeren Temperaturen aufgereinigt wurden, eine geringere Entzündungsreaktion, relativ weniger MNGCs und eine niedrigere Vaskularisierung zeigten. Die Studien lassen jedoch offen, ob die höhere Zahl von MNGCs eine schnellere Degradation des Knochenersatzmaterials bewirken oder ihre Verweildauer erhöhen.

Hypro-Oss® wird im Gegensatz zu anderen bovinen Knochenersatzmaterialien bei der Aufreinigung nicht erhitzt, so dass nachfolgend überprüft werden soll, ob und inwieweit es durch den Verzicht auf eine Sinterung zu keiner Bildung von MNGCs kommt, weil das Biomaterial ohne Erhitzung möglicherweise als natürlich erkannt wird. Unsere histomorphometrische Untersuchung hat aber gezeigt, dass sich auch ohne thermische Behandlung Multinukleäre Zellen gebildet haben (Abbildung 12) und auch die Vaskularisierung im intra- und interindividuellen Vergleich signifikant gestiegen ist (Abbildung 13), was auf die Atelopeptidierung zurückgeführt werden könnte, die bei Hypro-Oss® ein Alleinstellungsmerkmal bildet, zu der aber der Hersteller auf Anfrage keine Informationen zur Verfügung gestellt hat. Dieses Verfahren ersetzt nach Herstellerangaben⁸⁸ die Hochtemperaturesinterung und vermeidet eine Keramisierung des Knochens, wobei die natürliche Mikrostruktur erhalten bleibt.

Barbeck et al.⁷ (BEGO OSS®) und Lorenz et al.⁵² (Bio-Oss®) haben in Vergleichsstudien für xenogenes Knochenersatzmaterial, welches mit unterschiedlichen Temperaturen aufgereinigt wurde, folgende Werte für die Anzahl der MNGCs/mm² und der Blutgefäße/mm² ermittelt, die sich mit Hypro-Oss® wie nachfolgend dargestellt vergleichen:

Tabelle 11: MNGC- u. Gefäßbildung in Abhängigkeit von der Sintertemperatur

Produkt	Sintertemperatur	MNGCs/mm ²	Gefäße/mm ²
BEGO OSS®	1.250°	23,59	15,19
Bio-Oss®	300°	8,36	10,42
Hypro-Oss®	nicht erhitzt	4,07	24,73

Vergleich der Anzahl der MNGCs und der Gefäßbildung von Hypro-Oss® an Tag 15 p.i. mit marktgängigen xenogenen Knochenersatzmaterialien in Abhängigkeit von der Sintertemperatur (Daten (Mittelwerte) für BEGO-OSS® an Tag 15 p.i. aus Barbeck et al.⁷ und für Bio-Oss® an Tag 180 p.i. aus Lorenz et al.⁵²)

Tabelle 11 bestätigt den postulierten Zusammenhang zwischen der Höhe der Sinter Temperatur und der Bildung Multinukleärer Zellen, indem Hypro-Oss® als nicht erhitztes Biomaterial an Tag 15 *post implantationem* die geringste Bildung von MNGCs zeigt, während das hocherhitzte BEGO-OSS® zum selben Beobachtungszeitpunkt den höchsten Wert aufweist und damit um 480% über dem Wert für Hypro-Oss® liegt.

Diese positive Korrelation bestätigt sich in unserer Untersuchung jedoch nicht für die Gefäßbildung, da Hypro-Oss® trotz geringerer Anzahl Multinukleärer Riesenzellen eine höhere Vaskularisation induziert als die untersuchten Vergleichsmaterialien. Da die Blutgefäßbildung aber im wesentlichen durch die Freisetzung von Enzymen wie VEGF induziert wird und die Atelozeptidierung bei Hypro-Oss® das wichtigste Alleinstellungsmerkmal bei der Aufreinigung als Ersatz für eine Sinterung bildet, könnte man vermuten, dass eben diese Atelozeptidierung eine verstärkte Sezernierung von VEGF auslöst als sie allein aufgrund der Bildung von MNGCs zu erwarten gewesen wäre. Da vom Hersteller aber keine Hinweise zum Prozess der Atelozeptidierung in Erfahrung zu bringen waren, kann dieser Teilaspekt hier nicht weiter analysiert werden.

Unsere Arbeitsgruppe hat in einer Übersichtsanalyse² für verschiedene Biomaterialien unterschiedliche Reaktionsmuster gefunden, mit dem Ergebnis, dass bovine Knochenersatzmaterialien auf Multinukleäre Zellen nicht in gleicher Weise mit einer überschießenden Entzündung und Desintegration reagieren wie z.B. kollagen-basierte bovine Biomaterialien. Diese Übersichtsarbeit ergab, dass hochtemperaturgesintertes bovines Knochenersatzmaterial eine starke Fremdkörperreaktion auslöste: nach 10 Tagen zeigte sich eine hohe Zahl von MNGCs, von denen die meisten eine TRAP-Expression zeigten. Diese Fremdkörperreaktion blieb bis Tag 60 relativ konstant, ohne dass die Zahl der MNGCs wesentlich zurückging. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde dabei eine signifikant höhere Vaskularisierung beobachtet, ohne dass sich dabei ein klarer Hinweis auf eine Verkapselung oder eine signifikante Degradation zeigte. Dagegen zeigte sich für ein bei niedrigen Temperaturen erhitztes,

deproteiniertes Knochenersatzmaterial nur initial bis Tag 10 ein Anstieg der Anzahl der MNGCs und danach ein signifikanter Rückgang². Dies spiegelt die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit wider, wonach die Einbringung von Hypro-Oss[®] bis Tag 15 ein Maximum an MNGCs induzierte, sich danach jedoch sukzessive zurückbildete, wobei die Mehrheit der MNGCs TRAP-negativ waren, was eher auf eine temporäre, moderate Fremdkörperreaktion hindeutet.

Die chemische Zusammensetzung eines Knochenersatzmaterials beeinflusst maßgeblich dessen Fremdkörperreaktion. Rueger⁴⁶ unterscheidet 4 Klassen von Verbindungen: 1: biologisch-organische Materialien, 2: synthetische, anorganische Substanzen, 3: synthetische, organische Materialien, und 4: Komposite (Verbindungen der Klassen 1 – 3). Vergleichsstudien unserer Arbeitsgruppe⁵² zwischen der Fremdkörperreaktion auf die Implantation eines allogenen und eines xenogenen Knochenersatzmaterials zeigten eine signifikant höhere Vaskularisierung und Bildung von MNGCs für synthetische Knochenersatzmaterialien, obwohl beide hinsichtlich der Bildung neuer Knochensubstanz vergleichbare Ergebnisse lieferten. D.h. je körperfremder ein Biomaterial ist, desto höher scheint das inflammatorische Potential und die Entzündungsintensität zu sein. Die erwähnte Studie zeigt, dass eine erhöhte Bildung Multinukleärer Riesenzellen keinen zwingenden Einfluss auf die Degradation eines Biomaterials zu haben scheint, da bei dem dort untersuchten bovinen Knochenersatzmaterial (Bio-Oss[®]) im Rahmen eines Sinus-Lifts kein zellulärer Abbau beobachtet wurde, sondern das Biomaterial sich in das Augmentationsgebiet integrierte, mit dem Ergebnis, dass Multinukleäre Riesenzellen zwar die Vaskularisierung fördern, aber nicht notwendigerweise die Degradation und damit die Gewebe- bzw. Knochenneubildung beeinflussen, sodass die zelluläre Degradation durch MNGCs keine *conditio sine qua non* für die Knochenneubildung wäre⁵⁵. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass die in dieser Untersuchung vorgefundenen Riesenzellen eine ähnliche Funktion wie M2-Makrophagen haben, wie z.B. die Reinigung und Vorbereitung der Oberfläche für die Anlagerung von Knochen, und weniger die Funktion des Abbaus von Biomaterial.

Daraus ließe sich schließen, dass die erfolgreiche Insertion von Knochenersatzmaterial zwei alternative Prozesse zur Voraussetzung hat, nämlich zum einen eine zeitlich begrenzte pathologische Entzündungsreaktion mit Hilfe von Multinukleären Riesenzellen, welche das Biomaterial eher degradiert und damit Platz für die Bildung von neuer Knochensubstanz (Platzhalterfunktion) schafft. Zum anderen über eine physiologische Wundheilungs-Reaktion nur mit Hilfe von mononukleären Zellen über einen weitgehenden Einbau des implantierten Knochenersatzmaterials in die sich neu bildende Knochensubstanz, ohne dass das Biomaterial notwendigerweise komplett ersetzt wird; diese Reaktion sowie insgesamt eine sehr geringe und langsamere Resorption wurde insbesondere bei Biomaterialien „natürlichen“ Ursprungs beobachtet⁵⁵, wozu eben xenogene Knochenersatzmaterialien wie Hypro-Oss® zählen.

Der starke Anstieg der Anzahl Multinukleärer Riesenzellen bis Tag 15 dürfte ursächlich sein für den beobachteten starken Anstieg der Vaskularisierung über die Ausschüttung von VEGF als wesentliche Voraussetzung der Neoangiogenese²⁶. Solange die Degradation und Knochenneubildung jedoch gleichgewichtig verlaufen, lässt sich allein über die Höhe der Anzahl der vorgefundenen Multinukleären Riesenzellen wohl keine Aussage über den zu erwartenden Erfolg der Insertion eines Biomaterials treffen, wobei Knochenersatzmaterialien wie Hypro-Oss® aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften wesentlich robuster zu sein scheinen als beispielsweise sensible, kollagen-basierte Barrieremembranen. Idealerweise verlaufen Degradationsfortschritt und Regeneration im Einklang. Eine frühzeitige Degradation kann für bestimmte klinische Indikationen jedoch durchaus auch nachteilig sein, während bei anderen Indikationen eine schnelle Abbaubarkeit wünschenswert wäre. Deshalb ist das Verständnis der Biomaterial-induzierten Zellreaktion und der Degradationsmechanismen für die klinische Anwendung von großer Wichtigkeit.

Dabei werden unterschiedliche Typen von Biomaterial-bezogenen MNGCs vermutet: sogenannte „persistente“ MNGCs mit einer klassischen Fremdkörperreaktion mit Verkapselung, sowie mehr inflammatorisch wirkende

MNGCs, die nur kurzfristig aktiv sind. Sie sind auf einen schnellen Abbau des Biomaterials programmiert und unterliegen danach der Apoptose. Eine Geführte Geweberegeneration (GBR) bedarf jedoch einer gewissen Standzeit des Knochenersatzmaterials, um die Platzhalterfunktion zu erfüllen, so dass ein zu schneller Abbau des Biomaterials die längerfristige Geweberegeneration konterkariert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Bildung von MNGCs vom implantierten Biomaterial induziert wird, weshalb keine MNGCs in der Kontrollgruppe gefunden wurden, welche eine physiologische Wundheilung durchlief. Frühere Annahmen stellten in Frage, ob die Bildung von MNGCs eine physiologische Reaktion auf die Resorption des Biomaterials ist. Da aber in einer Vielzahl von Untersuchungen MNGCs auch im Implantatbett anderer Biomaterialien wie z.B. synthetischen oder xenogenen Ursprungs gefunden wurden²⁹, zeigen die Biomaterial-induzierten Multinukleären Riesenzellen eher pathologische Charakteristika, womit der Zusammenhang der Einbringung von Biomaterial mit der Bildung Multinukleärer Zellen bestätigt zu sein scheint.

In einer Übersichtsarbeit unserer Gruppe² wird allerdings die grundsätzliche Frage gestellt, ob eine pathologische Entzündungsreaktion über die Bildung von MNGCs überhaupt erstrebenswert ist oder ob man nicht darauf zielen sollte, biologische Konzepte zu verfolgen, die sich auf Biomaterialien fokussieren, die eine mononukleär-basierte, physiologische Gewebereaktion induzieren, um eine optimale Zellregeneration zu ermöglichen. In diesem Kontext wird diskutiert, ob MNGCs überhaupt einen Beitrag zum Regenerationsprozess leisten und man sie deshalb im Implantationsbett tolerieren sollte. Während eine physiologische, mononukleär basierte Zellreaktion eine vollständige Biomaterial-Integration zeigte und dabei die Funktion und Struktur erhalten blieben, stellt sich die Frage nach dem Nutzen einer pathologischen Degradation mit Hilfe von MNGCs. Unsere Arbeitsgruppe sieht diesbezüglich weiteren Forschungsbedarf².

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass die Einbringung des xenogenen Knochenersatzmaterials Hypro-Oss® im Rahmen einer pathologischen

Fremdkörper-Reaktion die Bildung Multinukleärer Riesenzellen induziert hat, mit der Folge einer Stimulation der Blutgefäßbildung, die jedoch stärker ausgefallen ist als es aufgrund anderer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die sich ebenfalls mit Knochenersatzmaterialien xenogenen Ursprungs befassten, zu erwarten gewesen wäre. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind insofern als vorklinischer Beitrag für das Verständnis der Zellreaktionen auf die Einbringung von Knochenersatzmaterialien zu verstehen, da bestimmte Biomaterialien für ganz bestimmte Indikationen besonders geeignet sein können. Es bliebe jedoch zu untersuchen, welche Ergebnisse das untersuchte Biomaterial in der klinischen Anwendung zeigt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde das bovine, Hydroxylapatit-basierte, Knochenersatzmaterial Hypro-Oss® zunächst *ex vivo* überprüft, anschließend subkutan in den interskapulären Bereich von 12 weiblichen Wistar-Ratten (Testgruppe) eingebracht; bei 12 weiteren Tieren erfolgte eine *Sham*-Operation ohne Einbringung von Biomaterial (Kontrollgruppe). Anschließend wurde die Gewebereaktion über 30 Tage beobachtet und die Explantate jeweils nach Tag 3, 15 und 30 histologisch und histomorphometrisch untersucht.

Die histologische Analyse zeigte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 30 Tagen eine störungsfreie Eingliederung der Hypro-Oss®-Granula in das umliegende Gewebe. Bereits 3 Tage nach Einbringung des Biomaterials waren mononukleäre Zellen erkennbar, die bis Tag 30 weiter zunahmen. Ab diesem Zeitpunkt zeigten sich auch TRAP-positive, CD-68-negative Multinukleäre Zellen, die das Ergebnis einer Fusion von Makrophagen sind und eine Fremdkörperreaktion indizierten. Nach 30 Tagen zeigten sich die Granula histologisch stabil integriert ohne Anzeichen einer immunologischen Abstoßungsreaktion.

Die CD-68-Expression der aufgefundenen Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen bildete ein Kriterium zur Unterscheidung der MNGCs von Osteoklasten, die ebenfalls mehrkernig sind, aber dieses *Cluster of Differentiation* nicht tragen. Dies charakterisiert die vorgefundenen MNGCs als Fremdkörper-Riesenzellen, da sie ebenso wie die pathologischen Riesenzellen vom Typ Langerhans CD-68 exprimieren.

Dieses Bild bestätigte sich für die Hypro-Oss®-Gruppe in der histomorphometrischen Betrachtung über eine kontinuierliche Zunahme von überwiegend CD-68-positiven Makrophagen bis zum Tag 30, während sie für die Kontrollgruppe über die gesamte Zeit rückläufig waren. Die Multinukleären Zellen erreichten dagegen bereits an Tag 15 ihren Höhepunkt, während in der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum erwartungsgemäß keine MNGCs gefunden wurden.

Der hoch signifikante Anstieg der MNGC-Zahl der Testgruppe bis Tag 15 korreliert positiv mit den Vaskularisationsdaten, was darauf hindeutet, dass die Multinukleären Zellen durch die Einbringung des Biomaterials induziert wurden und über die Sekretion des Signalmoleküls VEGF einen wesentlichen Faktor für die Blutgefäßbildung bilden

Eine Auffälligkeit hat sich jedoch in Bezug auf das Alleinstellungsmerkmal von Hypro-Oss® gezeigt, welches bei der Aufreinigung nicht erhitzt wird. Diverse Studien haben einen Zusammenhang der Höhe der Sintertemperatur mit der Bildung von MNGCs nachgewiesen, wonach für Hypro-Oss® eine geringe Induzierung von MNGCs zu erwarten gewesen wäre als für vergleichbare, höher erhitzte bovine Knochenersatzmaterialien. Dagegen zeigten die Vaskularisationsdaten unserer Untersuchung für Hypro-Oss® im Vergleich zu 2 anderen bovinen Knochenersatzmaterialien (Bio-Oss® und BEGO OSS®) jedoch signifikant höhere Werte für die Blutgefäßbildung als dies aus der Korrelation von Sintertemperatur mit der Anzahl Multinukleärer Riesenzellen zu erwarten gewesen wäre.

Aufgrund der relativ kurzen Dauer der Beobachtung lassen sich keine belastbaren Ergebnisse in Bezug auf den zu erwartenden Materialabbau und die ossäre Integration von Hypro-Oss® feststellen, welche einer längerfristigen Analyse bedürften als es in dieser Untersuchung möglich war. Es gibt aber klinische Erfahrungsberichte²³ hinsichtlich Handling, Heilungsverlauf und Materialintegration von Hypro-Oss® bei Sinusbodenelevation und *Guided Bone Regeneration*, die auch in der Langfristbetrachtung positive Ergebnisse zeigten. Offen bleibt, ob nicht eine physiologische Wundheilung nur mittels Makrophagen einer pathologischen Wundheilung unter Mitwirkung Multinukleärer Riesenzellen überlegen ist: zumindest robustere Knochenersatzmaterialien wie z.B. das hier untersuchte Hypro-Oss® scheinen dabei weniger sensibel auf Multinukleäre Riesenzellen zu reagieren.

6 Summary

The present study has examined the bovine, hydroxyapatite-based bone substitute material Hypro-Oss® *ex vivo*, followed by subcutaneous implantation into the interscapular region of 12 female Wistar rats (test group). Further 12 animals underwent sham surgery without insertion of any biomaterial (control group). Subsequently, the tissue reaction has been histologically and histomorphometrically examined on days 3, 15, and 30.

The histological analysis showed undisturbed integration of the Hypro-Oss® granules into the surrounding tissue within the observation period of 30 days. Already 3 days after the insertion of the biomaterial, mononuclear cells were visible, further increasing by day 30. Also, TRAP-positive, CD-68-negative multinuclear cells were detected, indicating a foreign body reaction as a result of macrophage fusion. After 30 days, the granules showed stable integration without any signs of an immune rejection.

The CD-68 expression of the observed macrophages and multinuclear giant cells allowed to distinguish the MNGCs from osteoclasts which are also

multinuclear, but do not carry this cluster of differentiation. This characterized the detected MNGCs as foreign body giant cells, since they express CD-68, similar to pathological giant cells of the Langerhans type.

The histomorphometric observations confirm these findings for the Hypro-Oss® group as a result of a steady increase of mostly CD-68-positive mononuclear cells by day 30, whereas the control group showed a decreasing trend over the whole observation period. The number of multinucleated giant cells already peaked on day 15, whereas for the control group no MNGCs at all were found, as expected.

The histomorphologically highly significant increase of the number of MNGCs for the test group by day 15 correlates positively with the vascularisation data, which indicates that the multinuclear cells have been induced by the insertion of the biomaterial as a decisive factor for vascularisation by means of the secretion of the signalling molecule VEGF.

A distinctive feature for Hypro-Oss® is, that it is not being processed/purified by means of sintering. Several studies and reviews have shown a correlation between the applied temperature level and the formation of MNGCs, inducing a lower number of multinuclear giant cells for unsintered biomaterials such as Hypro-Oss® compared to similar bovine bone graft materials undergoing heat treatment. However, contrary to what was to be expected from the correlation of the sintering temperature and the formation of multinuclear giant cells, the vascularisation results of our study showed a significantly higher outcome for the vascularisation for Hypro-Oss®, when compared to 2 other bovine bone substitute materials (Bio-Oss® and BEGO OSS®).

Based on the relatively short observation period no conclusive results can be deducted with a view to the expected material degradation and osseous integration of Hypro-Oss®, which would require a longer-term investigation not falling within the scope of the present study. However, clinical field reports²³ with regard to handling, healing process and material integration have shown

positive long-term results for sinus floor elevation and *Guided Bone Regeneration*. It remains to be seen, whether a physiological wound healing involving only macrophages is superior to a pathological wound healing by means of multinuclear giant cells. At least the more robust bone substitute materials such as the analyzed Hypro-Oss® seem to react less sensitively to multinucleated giant cells.

7 Verzeichnis der Quellen

7.1 Fachliteratur

- ¹ Aescht, E., van Boom, F., Büchl-Zimmermann, S., Burmester, A., et al., Maria Mulisch, Ulrich Welsch (Hrsg.): Romeis Mikroskopische Technik, 18. Auflage, S. 198 ff
- ² Al-Maawi, S., Anna Orłowska, A., Sader, R., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: In vivo cellular reactions to different biomaterials - Physiological and pathological aspects and their consequences, Seminars in Immunology 29/2017
- ³ Modifiziert nach: Al-Maawi, S., Orłowska, A., Sader, R., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: In vivo cellular reactions to different biomaterials—Physiological and pathological aspects and their consequences, Seminars in Immunology 29/2017, 49-61
- ⁴ Anderson, J. M.: Biological responses to materials. Annual Rev Materials Research 31, Inst. Of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio
- ⁵ Atwood, D.A., Coy, W.A. (1971): Clinical, cephalometric, and densitometric study of reduction of residual ridges; IN: J Prosthet Dent 26 (3)
- ⁶ Barbeck, M.: Histologische und histomorphometrische Charakterisierung der Gewebereaktionen gegenüber Knochenersatzmaterialien und Kollagenmembranen unter besonderer Berücksichtigung des Aufkommens multinukleärer Riesenzellen und der Implantatbettvaskularisierung, Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, Februar 2015
- ⁷ Barbeck, M., Udeabor, S., Lorenz, J., Schlee, M., Grosse Holthaus, M., Raetscho, N., Choukroun, J., Sader, R., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: High temperature sintering of xenogenic bone substitutes leads to Increased multinucleated giant cell formation: In vivo preliminary clinical results, Journal of Oral Implantology Vol. XLI/No. Five/2015
- ⁸ Barbeck, M., Motta, A., Migliaresi, C., Sader, R.A., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: Heterogeneity in biomaterial-induced multinucleated giant cells: possible importance for the regeneration process? J. Biomed. Mater. Res. – Part A104/2 (2016) 413 -418
- ⁹ Barbeck, M., Dard, M., Kokkinopoulou, M., Markl, J., Booms, P., Sader, R.A. Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: (2015): Small-sized granules of biphasic bone substitutes support fast implant bed vascularization, Biomater, 5:1, e1056943, DOI: 10.1080/21592535.2015.1056943
- ¹⁰ Barbeck, M., Najman, S., Stojanovic, S., Mitic, Z., Zivkovic, J.M., Choukroun, J., Kovacevic, P., Sader, R.A., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: Addition of blood to a phycogenic bone substitute leads to increased in vivo vascularisation, IOP Publishing, Biomed. Mater. 10 (2015), 055007, doi:1088/1748-6041/10/5/055007R.
- ¹¹ Barbeck, M. et al.: High-Temperature Sintering of Xenogenic Bone Substitutes Leads to Increased Multinucleated Giant Cell Formation: In Vivo and Preliminary Clinical Results, Journal of Oral Implantology Vol. XLI/No. Five/2015
- ¹² Bruck, J.C.: Die infizierte Wunde – Grundsätze zur Behandlung aus klinischer Sicht, GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2007, Vol. 2(2)
- ¹³ Buddecke, E.: Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin (1981), Walter de Gruyter, S. 7
- ¹⁴ Caplan, A.I., Bruder, S.P.: Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends MolMed. 2001 6/2001;7(6):259-264
- ¹⁵ Cawood, J.I., Howell, R.A.: Reconstructive preprosthetic surgery. In: Anatomical considerations (1991). In: Int J Oral Maxillofacial Surgery 20 (2), S. 75 – 82

- ¹⁶ Cawood, J.I., Howell, R.A.: A classification of the edentulous jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1988; 17:232-236
- ¹⁷ Graphische Darstellung der Atrophiestadien im Unterkiefer nach Cawood und Howell (1988), zitiert bei: Gasparini, G., Boniello, R., Saporano, G., Marianetti, TM, Foresta E, Torroni A, Longo G, Azzuni C, Cervelli D, Pelo S - *Biomed Res Int (2014):* Long term follow-up in inferior alveolar nerve transposition: our experience; Maxillofacial Surgery Unit, Complesso Integrato Columbus, Università Cattolica del Sacro Cuore, Rom, Italien
- ¹⁸ Chambers, T.J., The Regulation of Osteoclast Development and Function, *Ciba Found Symp* 1988, 136, S. 92 – 107
- ¹⁹ Chao, E.Y., Inoue, N.: Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and selling. *EurCell Mater* 6, (2003), 72 – 84
- ²⁰ Cornell, C.N.: Osteoconductive Materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts, IN: *Orthop. Clin North Am* 1999, Oct. 30(4):591-8
- ²¹ Costantino, D.D., Friedman, C.D. (1994), zitiert bei: Vergleichende Analyse eines kristallinen Knochenersatzmaterials basierend auf Siliziumdioxid und Hydroxylapatit und eines Knochenersatzmaterials basierend auf porösem β -Tricalciumphosphat (β -TCP) in Muskelgewebe von Ziegen, Diss. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, vorgel. von Oliver Künzel 2015, S. 19
- ²² Figueiredo A, Silva O, Cabrita S.: Inflammatory reaction post implantation of bone graft materials. *Exp. Pathol Health Sci* 2012; 6:15-8
- ²³ Gazmave, A.: Sinus Augmentation with atelo-collagenated bovine bone graft Hypro-Oss™, IN: *Industry Report, implants 2*, 2014, S. 36
- ²⁴ Ghanaati, S., Schlee, M., Webber, M.J., Willershausen, I., Barbeck, M., Balic, E., et al., (2011): Evaluation of the Tissue Reaction to a new bilayered collagenmatrix *in vivo* and its translation to the clinic, *Biomed. Mater.* 6:015010, doi: 101088/1748/6041/6/1/015010
- ²⁵ Ghanaati, S., Udeabor, S.E., Bain, G.I.: Implantation of silicone dioxide-based nanocrystalline hydroxyapatite and pure phase β -tricalciumphosphate bone substitute granules in caprine muscle tissue does not induce new bone formation. *Head Face Med* 2013; 9:1
- ²⁶ Ghanaati, S., Barbeck, M., Orth, C., Willershausen, I., Thimm, B.W., Hoffmann, C., Rasic, A., Sader, R.A., Unger, R.E., Peters, F., Kirkpatrick, C.J.: Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction *in vivo*, IN: *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4476 – 4487
- ²⁷ Ghanaati, S., Barbeck, M., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J.: *In vivo* biomaterial testing – what to consider? *BIOMaterialien AbstractsBMV09*, 21
- ²⁸ Ghanaati, S., Barbeck, M., Detsch, R., Deisinger, U., Hilbig, U., Rausch, V., et al.: The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions *in vivo*: Histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater* 2012;7: 015005
- ²⁹ Ghanaati, S., Orth, C., Barbeck, M., Willershausen, I., Thimm, B.W., Booms, P., Stübinger, S., Landes, C., Sader, R.A., Kirkpatrick, C.J.: Histological and histomorphometrical analysis of a silica matrix embedded nanocrystalline hydroxyapatite bone substitute using the subcutaneous implantation model in Wistar rats, *Biomed. Mater.* 5 (2010) 035005 (11pp), IN: *IOP PUBLISHING BIOMEDICAL MATERIALS*, S
- ³⁰ Ghanaati, S.: Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularisation rates for their integration within the implantation bed: a paradigm shift, *Acta Biomater.* 8 (2012), 3061 – 3072, , <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.041>
- ³¹ Ghanaati, S., Lorenz, J., Sader, R.A., Kubesch, A.: Histologische, histomorphometrische und klinische Analyse des Einflusses der Einheilzeit eines synthetischen Knochenersatzmaterials bei der Sinusbodenaugmentation, IN: *Dentale Implantologie und Parodontologie*, 04.12.2014
- ³² Goller, G. et al., zitiert bei: Barbeck, M. et al.: High-Temperature Sintering of Xenogenic Bone Substitutes Leads to Increased Multinucleated Giant Cell Formation: *In Vivo* and Preliminary Clinical Results, *Journal of Oral Implantology* Vol. XLI/No. Five/2015

- ³³ Goller, G., Oktar, F.N., Agathopoulos, S., et al. , Effect of sintering temperature on mechanical and microstructural properties of bovine hydroxyapatite (BHA). *J Sol-Gel Sci Techn.* 2006; 37:111-115
- ³⁴ Grover, V., Kapoor, A., Malhotra, R., Sachdeva, S.: Bone allografts: A review of safety and efficacy. *Indian J Dent Res* 2011, 22:496
- ³⁵ Habibovic, P., Yuan, H., van der Walk, Ch. M., Meijer, G., van Blitterswijk, C.A., de Groot, K. (2005): 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials, *IN: Biomaterials* 26 (17), 3565-3575
- ³⁶ Hellwig, E., Klimek, J., Attin, T.: Einführung in die Zahnerhaltung, Deutscher Ärzteverlag (2009), S. 562
- ³⁷ Herfert, E.: Die Wirkung von multipotenten Knochenmarkszellen auf die Knochenregeneration und die Osseointegration von Zahnimplantaten nach Sinusbodenelevation unter besonderer Berücksichtigung einer klinischen Pilotstudie, Promotion an der Medizinischen Universität Graz
- ³⁸ Hofmann, A., Hofmann, C. et al. (2000): "[Effect of various bone disinfection and sterilization methods on osteoblast function. A comparative in vitro study]." *Unfallchirurg* 103 (5): S. 380-8
- ³⁹ Holtan, S.G., Weisdorf, D.J.: The donor's dilemma, in: *Blood* 2014 123:3538-3539; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-571661>
- ⁴⁰ Horch, H.: Zahnärztliche Chirurgie, Urban & Fischer Verlag, München, Jena (2003)
- ⁴¹ Jackson, M.F., Scatena, M., Giachelli, C.M.: Osteoclast Precursors do not express CD68: Results from CD68 promoter-driven RANK transgenic mice, *FEBS Lett.*591 (2017) 728–736
- ⁴² Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M., and Jansen, J.A.: Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20:185–206, 2009
- ⁴³ Junqueira, L.C., Carneiro, J.: Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg
- ⁴⁴ Kao, S.T., Scott, D.D.: A review of bone substitutes , *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007; 19(4):513 521
- ⁴⁵ Kanczler J.M., Oreffo, R.O.C. (2008): Osteogenesis and Angiogenesis: the potential for engineering bone, *In: EurCellMater* 15, 100-114
- ⁴⁶ Rueger, J.M.: Knochenersatzmittel, *Hefte Unfallheilkunde* 213 (1992), S. 17-19
- ⁴⁷ Klopffleisch, R., Jung, F.: The pathology of the foreign body reaction against biomaterials, Institute of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Straße 15, Berlin 14163, Germany Institute of Biomaterial Science and Berlin-Brandenburg, Center for Regenerative Therapies, Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Teltow, Germany , Received 27 June 2016; revised 13 October 2016; accepted 1 November 2016 Published online 25 November 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.35958
- ⁴⁸ Koeck, B., Ackermann, K. (2005): Implantologie. Studienausgabe der 2. Auflage 2004. München: Elsevier, Urban & Fischer (Praxis der Zahnheilkunde)
- ⁴⁹ Künzel, O.: Vergleichende Analyse eines kristallinen Knochenersatzmaterials basierend auf Siliziumdioxid und Hydroxylapatit und eines Knochenersatzmaterials basierend auf porösem β - Tricalciumphosphat (β -TCP) in Muskelgewebe von Ziegen, Diss. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, (2015)
- ⁵⁰ Löw, J., Die Generierung axial vaskularisierten Knochengewebes im arteriovenösen Gefäßschleifenmodell des Schafes, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.) durch die Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig (2011), S.9
- ⁵¹ Lorenz, J., Lerner, H., Sader, R.A., Ghanaati, S., Investigation of peri-implant tissue conditions and peri-implant tissue stability in implants placed with simultaneous augmentation procedure: a 3-year retrospective follow-up analysis of a newly developed bone level implant system, in: *Int J Implant*, Dec. 3, 2017: 41

- ⁵² Lorenz, J., Kubesch, A., Korzinskas, T., Barbeck, M., Landes, C., Sader, R.A., Kirkpatrick, C.J., Ghanaati, S.: TRAP-positive Multinucleated Giant Cells Are Foreign Body Giant Cells Rather Than Osteoclasts: Results From a Split-Mouth Study in Humans, *Journal of Oral Implantology* Vol. XLI/No. Six/2015, e258
- ⁵³ Lorenz, J., Barbeck, M., Schlee, M., Lerner, H., Teller, A., Sader, R.A., Ghanaati, S.: Anwendungsbeobachtung einer β -TCP-basierten Knochenersatzmaterialpaste, in: *Implantologie Journal* 6/2015, S. 24f
- ⁵⁴ Lorenz, J.M.: Histologische, histomorphometrische und klinische Vergleichsanalyse eines synthetischen und eines xenogenen Knochenersatzmaterials zur Sinusbodenaugmentation bei ehemaligen Tumorpatienten; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2014
- ⁵⁵ Lorenz, J.M., Ghanaati, S.: Analyse: Knochenersatzmaterialien ehemaliger Tumorpatienten, IN: ZPW Online 11.08.2014
- ⁵⁶ Moore, W.R., Graves, S.E., Bain, G.I.: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71:354-61
- ⁵⁷ Ng, K.W., Romas, E., Donnan, L., et al.: Bone biology, *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11 (1997), 1-22; zitiert bei: Radetzki, F., Untersuchungen des In-vitro-Verhaltens von osteokonduktiven Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin (Dr. med.) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2009)
- ⁵⁸ Neukam, F.W., Wichmann, M., Wiltfang, J.: Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen, Georg Thieme Verlag (2007) S. 11
- ⁵⁹ Oliveira, R., El Hage, M., Carrel, J.P., Lombardi, T., Bernard, J.P.: Rehabilitation of the edentulous posterior maxilla after sinus floor evaluation using deproteinized bovine bone: A 9 year clinical study. *Implant Dent* 2012;21:422-6.
- ⁶⁰ Pak, B., Hess, P.: Knochenersatzmaterialien in der oralen Implantologie, IN: ZPW online, *Implantologie* 28.2. 2011
- ⁶¹ Peters, K.M., König, D.P. (Hrsg): Fortbildung Osteologie 3, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2019
- ⁶² Peters, B.: Narbentherapie, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, S. 19
- ⁶³ Pryor, S.L., Gage, E., Langevin, C.J., Herrera, F., Breithaupt, A.D., Gordon, C.R., Afifi, A.M., Zins, J.E., Meltzer, H., Gosman, A., Cohen, S.R., Holmes, R.: Review of Bone Substitutes, *Craniomaxillofac Trauma Rec* (2009), PMC US National Library of Medicine, National Institutes of Health
- ⁶⁴ Radetzki, F.: Untersuchungen des In-vitro-Verhaltens von osteokonduktiven Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin (Dr. med.) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2009)
- ⁶⁵ Riachi, F., Naaman, N., Tabarani, C., Aboelsaad, N., Aboushelib, M., Berberi, A., Salameh, Z.: Influence of Material Properties on Rate of Resorption of Two Bone Graft Materials after Sinus Lift Using Radiographic Assessment, *Int J Dent* 2012: 737262, 31.7. 2012
- ⁶⁶ Salata, L.A., Craig, G.T., Brook, I.M.: Bone Healing Following the Use of Hydroxyapatite or Ionomeric Bone Substitutes Alone or Combined With a Guided Bone Regeneration Technique: An Animal Study, *Int J Oral Maxillofac Implants* (1998 Jan/Feb, 13(1), 44-51
- ⁶⁷ Schlegel, K.A., Lang, F.J., Donath, K., Kulow, J.T., Wiltfang, J.: The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials, US National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831666#>
- ⁶⁸ Schwenzler N., Ehrenfeld M., (Hrsg): Zahnärztliche Chirurgie, Zahn-, Mund-, Kiefer-Heilkunde, Georg Thieme Verlag AG (2009), 3. Akt. und erweiterte Ausgabe
- ⁶⁹ Sheikh, Z., Brooks, P.J., Barzilay, O., Fine, N., Glogauer, M.: Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials, Faculty of Dentistry, Matrix Dynamics Group, University of Toronto, 150 College Street, Toronto, ON M5S 3E2, Canada; IN: *Materials* 2015, 8, 5671-5701; doi:10.3390/ma8095269, 28 August 2015

- ⁷⁰ Sheikh, Z., Abdallah, M., Hanafi, A.A., Misbahuddin, S., Rashid, H., Glogauer, M.: Mechanisms of *in Vivo* Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials, Review, MDPI, Materials 2015, 8, 7917, doi:10.3390/ma8115430, www.mdpi.com/journal/materials
- ⁷¹ Shigeyama, Y., D'Errico, J., Stone, R., Somerman, M.: Commercially prepared allograft material has biological activity *in vitro*. J Periodontol 1995;66:478-87
- ⁷² Siegmund, D.: Bovine prozessierte Spongiosa in der Wirbelsäulen Chirurgie“ (Retrospektive Verlaufsstudie), Diss. vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena, 5.4. 2011
- ⁷³ Silva, R.V., Camilli, J.A., Bertran, C.A., et al.: The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. Int J Oral Maxillofacial Surg 34 (2005)
- ⁷⁴ Smeets, R., Kolk, A.: Osteokonduktive und –induktive Knochenersatzmaterialien, In: ZMK Zahnheilkunde, Management, Kultur (2010), akt. 10.3.2016, https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/implantologie/story/osteokonduktive-und--induktive-knochenersatzmaterialien__271.html
- ⁷⁵ Solar, P., Aro, G., Ulm, C.H., Bernhart, T.: Die Auswirkungen des Zahnverlustes auf die Anatomie der Maxilla, Schweiz Monatsschrift Zahnmed, Vol 108, 9/1998
- ⁷⁶ Tapety, F.I., Amizuka, N., Uoshima, K., Nomura, S., Maeda, T. A.: Histological evaluation of the involvement of Bio-Oss™ in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. Clin Oral Implants Res 2004; 15:315-24
- ⁷⁷ Terpelle, T.: Autologe Knochentransplantate, Erfolgreiche Entnahme- und Augmentationstechniken, in: http://www.fachzahnarzt.de/pdf/publikationen/Implantologie_Journal_4_2009.pdf
- ⁷⁸ Witte, F., Barbeck, M., et al.: Xenogene Knochenersatzmaterialien, ZPW Online, 7.6. 2017, Dental Tribune Austrian Edition 4/17

7.2 Sonstige Quellen

- ⁷⁹ <https://www.bioimplon.de/hypro-oss-dental> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸⁰ Osteoinduktive Substanzen und Faktoren in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Wissenschaftliche Stellungnahme, Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Osteoinduktive_Substanzen.pdf (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸¹ International Medical Collage, Knochenersatzmaterialien, Einführung und Terminologie, <http://www.med-college.hu/de/wiki/artikel.php?id=84&lan=2> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸² https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/mzk/Prothetik/heicudent/der_zahnlose_unterkiefer_atrophie_und_anatomie.html (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸³ Lumitos AG, Fachportal, <http://www.chemie.de/lexikon/Hydroxylapatit.html> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸⁴ https://www.bego.com/fileadmin/user_downloads/Mediathek/Implants/Std_Downloads_global/01_82422_17_PK_2017-18_ohnePreis.pdf (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸⁵ <http://www.ibi-sa.com/wp-content/uploads/2012/07/IBI-SmartBone-IFU-Rev4.pdf> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸⁶ Klasse III. CE und ISO: <https://www.bioimplon.de/hypro-oss-dental> (letzter Zugriff 9.3. 2019)
- ⁸⁷ <http://www.bioimplon.de/lyophilisation> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)
- ⁸⁸ <http://www.bioimplon.de/atelozeptidierung> (letzter Zugriff am 9.3. 2019)

8 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Histologische und histomorphometrische in-vivo-Untersuchung der zellulären Reaktion auf ein xenogenes Knochenersatzmaterial

am Zentrum für Chirurgie der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. mult. Shahram Ghanaati mit Unterstützung durch Frau Dr. med. dent. Sarah Al-Maawi ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main,

(Johannes Eichelbaum)

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. mult. Shahram Ghanaati danke ich für die Überlassung des Themas und für seine fachliche Begleitung und Motivation über die Jahre.

Frau Dr. med. dent. Sarah Al-Maawi danke ich für Ihr Interesse, Ihren unermüdlichen Einsatz bei der Erstellung der Dissertationsschrift, ihre maßgebliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit sowie dafür, dass Sie jederzeit für meine Fragen ansprechbar war.

Beim Team des FORM-Lab (Frankfurt Orofacial Regenerative Medicine) möchte ich mich für die geduldige Betreuung der *in-vivo*-Untersuchungen und der bildlichen Dokumentation der Analyse-Ergebnisse bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung und Motivation.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johannes Eichelbaum
Wohnhaft: Sperberstrasse 60a
65812 Bad Soden/Ts
Geburtsdatum, -ort: 9. Dezember 1988 in Bad Soden/Ts
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

01/2016 – heute Ang. / Subst. Zahnarzt
09/2010 – 03/2015 Studium der Zahnmedizin an der Universität Witten-
Herdecke, Witten
01/2009 – 09/2009 Zivildienst Main-Taunus-Kliniken, Bad Soden/Ts
Kardiologie
09/2005 – 06/2008 Gymnasium Dr. Richter, Kelkheim/Ts
Abschluß: Abitur
09/1998 – 09/2005 Albert-Einstein-Gymnasium, Schwalbach/Ts
09/1994 – 09/1998 Theodor-Heuss-Schule, Bad Soden/Ts

Frankfurt am Main,

(Johannes Eichelbaum)