

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T.E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Vergleichende Untersuchung zur Gewinnung
vom partikuliertem Knochen im Rahmen von
enossalen Implantationen*

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tarek Kweider
aus Aachen

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T.E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*Vergleichende Untersuchung zur Gewinnung vom
partikuliertem Knochen im Rahmen von
enossalen Implantationen*

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tarek Kweider
aus Aachen

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert*

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretischer Teil.....	3
3.1 Knochen.....	3
3.1.1 Aufbau.....	3
3.1.2 Feinbau	3
3.1.3 Knochenwachstum und – umbau	5
3.1.4 Biologie des Knochenstoffwechsels: Osteoblastäre Marker	6
3.1.4.1 Alkalische Phosphatase (ALP).....	6
3.1.4.2 Osteocalcin	7
3.2 Knochengewinnung	7
3.2.1 Methoden der Knochengewinnung.....	8
3.2.1.1 Gefilterte Knochenspäne.....	8
3.2.1.2 Knochengewinnung mit Einmalbohrern.....	11
3.2.1.3 Knochengewinnung mit Safescraper und Micros	12
3.2.2 Typen autologer Knochentransplantate.....	12
3.2.3 Mögliche Nachteile der konventionellen Knochenspanmethoden .	13
3.2.3.1 Übermäßige Erhitzung des Knochens	13
4 Material und Methoden.....	14
4.1 Materialien und Instrumente	14
4.1.1 Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium).....	16
4.1.2 Chlorhexidin (CHX)	16
4.2 Probenentnahme	17
4.3 Vorbehandlung der Proben.....	18
4.3.1 Zentrifuge Biofuge Stratos® der Firma Heraeus	18
4.4 Kulturverfahren für die gesammelten Knochenspäne	21
4.5 Morphologische und histologische Analyseverfahren	22
4.5.1 Morphologie der Proben im Rasterelektronenmikroskop (REM) ...	22

4.5.2	Vitalitätsmessung der Proben	23
4.5.3	Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP)	24
4.5.4	Bestimmung der Osteoklastengenese mittels <i>tartrate resistant acid phosphatase</i> (TRAP)- Färbung	25
4.5.5	Kollagenfärbung mit Picro-Siriusrot (PSR) nach Puchtler	25
5	Ergebnisse	27
5.1	Morphologie der Bohrspäne.....	27
5.2	Osteoblastennachweis in kultivierten Bohrspänen.....	28
5.3	Vitalitätsmessung in kultivierten Bohrspänen.....	29
5.4	Vitalitätsuntersuchung der Proben nach Chlorhexidin Behandlung	30
5.5	Histologische Verteilung von Kollagen Typ 1	32
5.6	Ergebnisse der TRAP Färbung.....	33
6	Diskussion	35
6.1	Effektivität einer präoperativen Chlorhexidin- Spülung zur Vorbeugung der bakteriellen Kontamination von Knochenspänen.....	36
6.2	Überhitzung des Knochens.....	38
7	Zusammenfassung	40
	Anhang	VI
8	Randomisierungsliste	VI
9	Einverständniserklärung	VII
10	Literaturverzeichnis	VIII
11	Lebenslauf	XVI
12	Danksagung	XVII
13	Eidesstaatliche Erklärung	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

MMP	Matrixmetalloproteinase
ALP	alkalische Phosphatase
OC	Osteocalcin
MK	metallische Kugelfräse
rpm	revolutions per minute
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nährmedium)
FBS	fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
Gla- Rest	γ - Carboxyglutaminsäure
BC	Bone Collector
BS	Bohrspäne (Trockenbohrung)
REM	Rasterelektronenmikroskop
BSE	Back Scatter Detektor
SE	Sekundär- Elektronen
CHX	Chlorhexidin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung des Knochens	4
Abbildung 2: Auf dem Markt befindliche Knochenfilter (Teil 1)[Dent Implantol Journal 2/2004].	9
Abbildung 3: Auf dem Markt befindliche Knochenfilter(Teil 2) [Dent Implantol Journal 2004].	10
Abbildung 4: Wital Formbohrer, zylindrisch, für Schraubenimplantate	11
Abbildung 5: Material und Methoden: alle herangezogene Utensilien	15
Abbildung 6: Biofuge stratos [®] der Firma Heraeus	18
Abbildung 7: Reinheit der Bohrspäne	19
Abbildung 8: Costar [®] 6-Well-Kulturplatten der Firma Corning	20
Abbildung 9: HERAcell [®] der Firma Heraeus	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterelektronenmikroskops (Ludwig)	22
Abbildung 11: WST-1 Cell Proliferation Assay nach Roche	23
Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bohrspänen	27
Abbildung 13: Nachweis von Osteoblastenaktivität (1)	28
Abbildung 14: Nachweis von Osteoblastenaktivität (2)	29
Abbildung 15: Vitalitätsmessung der Knochenspäne	30
Abbildung 16: Vitalitätsmessung der mit CHX behandelten Knochenspäne	31
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit CHX behandelten Bohrspäne.	31
Abbildung 18: histologische Analyse der Kollagen-Verteilung (1)	32
Abbildung 19: histologische Analyse der Kollagen-Verteilung (2)	33
Abbildung 20: TRAP- Färbung unter dem Rasterelektronenmikroskop	34

**Meinen Eltern
Hwaida Kabbani und Dr. med. (Syr.) Mouafak Kweider
in großer Dankbarkeit
gewidmet.**

Das Leben der Eltern ist das Buch, in dem die Kinder lesen.

Augustinus Aurelius, (354 - 430)

1 Einleitung

Zu den Ursachen, die zu einem Verlust von Kieferknochen führen können, gehören beispielsweise eine fortschreitende Parodontitis, Verlust von Zähnen bei Unfällen, unzureichend abgestützter Zahnersatz, Altersatrophie und Tumore. Die Folge ist meist eine präprothetisch ungünstige Situation. Ist eine Implantatversorgung vorgesehen, liegt oft ein unzureichendes knöchernes Implantatlager vor. In der zahnärztlichen Implantattherapie wird daher häufig Knochen zur lokalen Augmentation benötigt. Dafür stehen dem implantierenden Operateur verschiedene Methoden zur Verfügung, beispielsweise laterale sowie vertikale Kieferaugmentationen oder der sogenannte Sinuslift. Als Augmentat kommt Eigenknochen des Patienten (Knochentransplantation) oder ein Knochenersatzmaterial infrage.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Veröffentlichungen zu diesem hochaktuellen Thema. Eine Medline-Abfrage unter den Suchbegriffen „*Implant and Augmentation*“ ergibt 630.000 Treffer für 2008, 602.000 für 2009, 794.000 für 2010, über 4 Millionen Treffer für 2011 und bisher ca. 6 170.000 für 2012 [Stand Januar 2012] (google 2012).

Bei kleineren Defekten hat sich körpereigener Knochen des Patienten sehr gut bewährt. Hierzu kann oft genügend Material im Bereich der Mundhöhle gewonnen werden. Eine gängige Methode, den Knochen zu gewinnen, besteht darin, die beim Fräsen des Implantatlagers anfallenden Bohrspäne mit Hilfe eines Filtersystems („Knochenfalle“) in einer Absauganlage abzufangen. Hierzu wurden spezielle Kollektoren entwickelt (s.u.). Um das Risiko einer bakteriellen Kontamination des gewonnenen Knochenmaterials im Filter möglichst gering zu halten, kann der übrige Speichel mit einem gesonderten Sauger abgefangen werden. Einige Autoren empfehlen zudem, den gewonnenen Knochen mit einer handelsüblichen Chlorhexidinlösung zu spülen, um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu reduzieren (Kuttenberger, Hardt et al. 2005)

Eine andere, jedoch bisher noch wenig erforschte Möglichkeit ist, eine direkte Knochensammlung während niedertouriger Fräsung ohne Wasserkühlung durchzuführen, um ein Wegspülen des Knochens zu verhindern und einen Kontakt desselben mit bakteriell kontaminiertem Speichel zu vermeiden. Allerdings besteht dabei die Gefahr einer thermischen Belastung des zu gewinnenden Knochens.

Daneben gibt es spezielle Instrumente, etwa im Sinne eines kleinen Hobels („safescraper und micross“) oder auch Ultraschallmesser („piezosurgery“), die oberflächlichen Knochen abspanen, um ihn transplantieren zu können.

Mit der vorliegenden Untersuchung wollen wir die Qualität des mit zwei unterschiedlichen Methoden gewonnenen Knochens verifizieren.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Menge und Wertigkeit (Vitalität) des Knochenmaterials zu vergleichen, das bei zwei verschiedenen Gewinnungsmethoden anfällt.

Es werden in beiden Fällen die beim Fräsen des Implantatlagers anfallenden Bohrspäne gewonnen und evaluiert. Einerseits geschieht dies hochtourig mit den Originalfräsern unter Kühlung mit isotonischer Lösung mit Hilfe des Knochenkollektors (BONE TRAP®, Fa. ASTRA). Zum anderen wird das Material durch direkte Knochenspansammlung mit dem Implantatlager-Spiralbohrer während niedertouriger Fräsung bei höchstens 300 rpm ohne Wasserkühlung gewonnen (Wahlmann 2009). Zur weiteren Untersuchung wird das so aufgefangene Knochenmehl gewogen, in eine Nährlösung gebracht, beurteilt und in einer Zellkultur behandelt.

Die Vitalität des aufgefangenen Knochens, die für die klinische Anwendung bedeutsam erscheint, wird anhand verschiedener Parameter nach einer Anzüchtung von vier Wochen in der Zellkultur bestimmt. Die exakte Spezifizierung der angewandten Methodik ist im Methodenteil angegeben. Ziel der Untersuchung ist es, eventuelle Unterschiede in der Zusammensetzung, Menge und Wertigkeit der Proben darzustellen. Gegenstand einer weiteren Untersuchung ist es, die Wirkung von Chlorhexidin hinsichtlich der Vitalität der Knochenspäne zu erfassen.

Abschließend werden die Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen verglichen, um die Ergebnisse dieser Studie kritisch zu werten.

3 Theoretischer Teil

3.1 Knochen

Der Knochen (lateinisch *Os*, englisch *bone*) ist eine Form des skelettbildenden Stützgewebes aller Wirbeltiere, welches die Eigenschaft hat, besonders hart und stabil zu sein.

3.1.1 Aufbau

Die Bindegewebshaut, die Knochenhaut (Periost) umgibt den Knochen und liegt ihm eng an. Dabei besteht das Periost aus zwei Schichten. Die innere knochenbildende Schicht, das Stratum Osteogenicum enthält beim jugendlichen Knochen reichlich Osteoblasten, die im Erwachsenenalter noch kaum vorhanden sind. Die äußere Faserschicht hingegen, besteht aus zugfesten Fasern, die dem Knochen Stabilität, Härte und Steifigkeit verleiht.

Bestandteil der eigentlichen Knochensubstanz ist zum einen die äußere Substantia corticalis (Substantia compacta), die eine unterschiedliche Dicke aufweist und zum anderen die innere Substantia spongiosa, die wiederum aus einem schwammartigen Gerüst feiner Knochenbälkchen gegliedert wird. Im Inneren ist bei langen Knochen (Röhrenknochen) die Markhöhle (Cavitas medullaris) ausgebildet. Das Blutgefäßsystem vollstreckt sich durch die ganze Markhöhle und das Knochenmark (Medulla ossium) befindet sich in den Zwischenräumen der Spongiosa. Das Knochenmark wird im Alter allmählich durch gelbes Fettmark ersetzt und kann nur noch in wenigen Knochen wie Brustbein, Wirbelkörper, Rippen, Becken, Hand- und Fußwurzelknochen und in den platten Schädelknochen nachgewiesen werden. (Lippert 2006)

3.1.2 Feinbau

Die Knochensubstanz wird von den Knochenzellen, den Osteozyten gebildet, welche in die sogenannte „Knochenmatrix“ eingebettet sind. Die Knochenmatrix besteht aus 70% anorganischem Material, 20% organischem Material und 10 % Wasser. Das anorganische Material setzt sich aus Hydroxylapatit-Kristalle zusammen, die aus 85% Kalziumphosphat, 10% Kalziumcarbonat, 1,5% Magnesiumphosphat und 0.3 % Kalziumfluorid

bestehen. Knochenkollagen v. a. Kollagenfasern Typ I, Lipide und Proteine sind im organischen Material vertreten.

Bei den Knochenzellen werden die reifen Osteozyten, die Osteoblasten von den Osteoklasten unterschieden. Die Osteoblasten produzieren nicht-mineralisierte organische Knochenmatrix und bauen somit den Knochen auf, während die Osteoklasten das Knochengewebe abbauen.

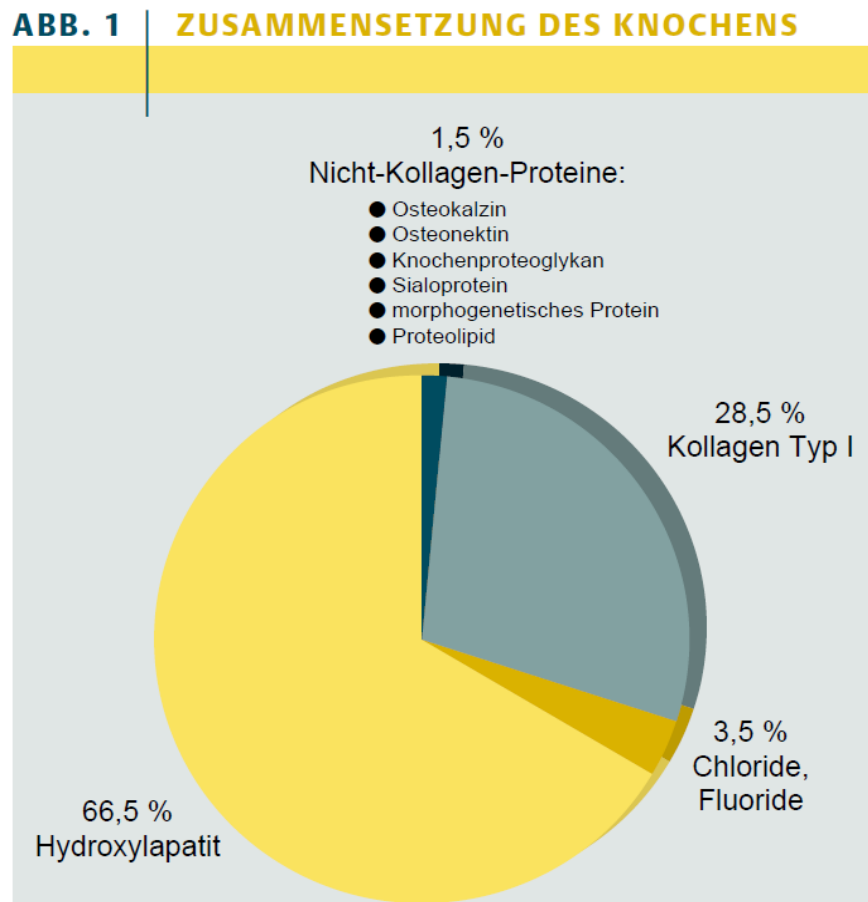


Abbildung 1: Zusammensetzung des Knochens [Prof. Felsenberg, Dieter, Pharmazie in unserer Zeit, November 2001, S. 488]

Die Osteoblasten stammen ursprünglich aus Stammzellen, den sogenannten Osteoprogenitorzellen. Das Osteoid wird zusammen aus Kollagen und der Grundsubstanz des Knochens (Glykoproteine) gebildet, die von den Osteoblasten sezerniert werden. Anschließend erfolgt die Verkalkung, die ebenfalls durch die Osteoblasten reguliert wird. Die Ablagerung und Mobilisation von Kalzium im Knochen und die damit verbundene Regulation des Kalziumspiegels im Blut mit Hilfe der Hormone Calcitonin und Parathormon, wird durch Osteozyten ("eingemauerte Osteoblasten") gesteuert.

Osteoklasten differenzieren sich aus Monozyten des peripheren Blutes. Durch Produktion von Säure werden anorganische Anteile aufgelöst und anschließend das organische Material enzymatisch aufgebaut. (Lüllmann-Rauch 2003)

3.1.3 Knochenwachstum und – umbau

Nachdem die Osteoblasten das weiche Osteoid, die noch unverkalkte Knochengrundsubstanz, gebildet haben, wird im alkalischen Milieu Hydroxylapatit ausgeschieden. Erst durch diese Einlagerung von Kalziumphosphat wird der Knochen hart und stabil.

Nach neueren Untersuchungen von Noonan et al. handelt es sich beim Knochenwachstum nicht immer um einen kontinuierlichen Prozess, der gleichmäßig über Tag und Nacht verteilt stattfindet. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Knochen hauptsächlich nachts wachsen, wenn kein Druck auf ihnen lastet (Noonan, Farnum et al. 2004). Die Theorie wird durch die Tatsache bestätigt, dass Wachstumsschmerzen hauptsächlich nachts auftreten können.

Man kann zwei verschiedene Arten der Knochenentwicklung (Ossifikation) unterscheiden. Die desmale Ossifikation, die die Entwicklung von Knochen aus einer bindegewebigen Vorstufe widerspiegelt und die chondralen Ossifikation, bei der sich aus einem hyalinen Knorpelskelett Knochengewebe entwickelt. Letztere spielt periimplantär keine Rolle.

Der Knochen ist kein starres Gebilde, sondern unterliegt einem permanenten Umbau, dem sogenannten *Remodelling*. Mit Hilfe von verschiedenen lytischen Enzymen (Cathepsin K, MMP-3 und -9, ALP) wandern Osteoklasten im Laufe dieses Umbaus in die Knochenmatrix ein und bilden Resorptionslakunen (Howshipsche Lakunen). Im Anschluss dieser Resorption wird von den Osteoblasten in großen Feldern von wenigstens 50 Zellen neues kollagenes Knochengrundgerüst (Osteoid) sezerniert. Im weiteren Verlauf wird dieses Knochengrundgerüst nach und nach kalzifiziert und somit neuer Knochen bildet. Einige der Osteoblasten werden hierbei von der mineralisierenden Matrix eingeschlossen und differenzieren im weiteren Verlauf zu Osteozyten (Porras, Holland et al. 1999). Auf diese Weise wird der Knochen des Körpers nach lokalen mechanischen und biologischen Erfordernissen von Zeit zu Zeit erneuert (sogenanntes *Remodelling*). Störungen in Signalwegen von Transkriptionsfaktoren, die für das *Remodelling* verantwortlich sind, können zu schweren Erkrankungen des Knochens (wie z. B. Osteoporose) führen. (Lüllmann-Rauch 2003)

Das Verständnis von molekularen und biochemischen Mechanismen, die die Stabilität und Integrität des Knochens ermöglichen, ist daher von wesentlicher Bedeutung für die Planung therapeutischer Strategien in allen Bereichen der regenerativen Medizin und der Zahnmedizin (Proff and Romer 2009).

3.1.4 Biologie des Knochenstoffwechsels: Osteoblastäre Marker

Durch die Isolierung und Charakterisierung der zellulären und extrazellulären Bestandteile der Knochenmatrix konnten in den letzten Jahren spezifische molekulare Marker des Knochenstoffwechsels identifiziert werden.

Als wichtigste molekulare Marker des Knochenanbaus gelten dabei die **alkalische Phosphatase (ALP)** und das **Osteocalcin (OC)**.

3.1.4.1 Alkalische Phosphatase (ALP)

ALP ist ein Enzym, welches an die Zellmembran durch einen carboxy-terminalen Glykosylphosphatidylinositol-Anker angeheftet ist (Gundberg 2000). Mehrere Isoformen der ALP sind in Leber, Niere, Knochen und Plazenta beschrieben worden. Die im Knochen gebildete ALP ist an der Plasmamembran lokalisiert und wird während der Knochenapposition von den Osteoblasten in größeren Mengen synthetisiert (Garnero and Delmas 1997). Obwohl der genaue Wirkmechanismus der ALP bis heute noch nicht vollständig geklärt worden ist, spielt das Enzym eine wichtige Rolle in der Mineralisation der Knochengrundsubstanz. Hydroxylapatit präzipitiert im alkalischen Milieu unter Vermittlung der ALP. Nennenswert wären der Anstieg des anorganischen Phosphats, Spaltung von Monophosphatester, Transport von kalziumbindendem Protein und eine tyrosinspezifische Phosphoproteinphosphatase –Aktivität. (Whyte 1994) Es konnte auch beschrieben werden, dass beim Fehlen der ALP oder bei einem Defekt des Enzyms eine Hypomineralisation des Knochengewebes zu beobachten ist, welche wiederum das Krankheitsbild der Hypophosphatasie hervorruft (Whyte 1994). Der Nachweis von ALP-Aktivität kann mittels ALP Färbung durch im Handel erhältliche Kits (s.u.) bestimmt werden.

3.1.4.2 Osteocalcin

Ein weiterer Parameter des Knochenanbaus ist Osteocalcin, welches als häufigstes Knochenprotein neben den Odontoblasten primär von Osteoblasten synthetisiert wird (Gallop, Lian et al. 1980; Garnero and Delmas 1997). Das aus insgesamt 49 Aminosäuren bestehende Protein besitzt drei Vitamin-K-abhängige gamma-Carboxyglutaminsäurereste und wird daher auch als „*bone Gla protein*“ bezeichnet (Hauschka, Lian et al. 1989; Hauschka and Wians 1989). OC wird kurz vor der Knochenreifung von den Osteoblasten gebildet und gilt daher als später osteoblastärer Differenzierungsmarker. Das OC wird in die Knochenmatrix eingelagert, wo es Vitamin-K-abhängig direkt mit dem Hydroxylapatit durch seine Gla- Reste interagiert (Gallop, Lian et al. 1980). Es ist Teil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix. Bei Fehlen des OC oder bei einem Defekt dieses Proteins wurde in einem Experiment bei Mäusen, eine abnorm erhöhte Knochenmineralisierung und Zunahme der Knochensubstanz bei gleichzeitig verminderter Bruchfestigkeit und Einengung des Markraumes, ein Merkmal der Osteoporose, festgestellt (Dowd, Rosen et al. 1994).

3.2 Knochengewinnung

Das augmentative Knochenregenerationsverfahren zeigte in den letzten Jahren vielversprechende Erfolge, sodass sich der Indikationsbereich nicht nur in der Implantologie, sondern auch in der parodontalen Chirurgie erweitert hat. Dabei hat sich autologer Knochen als von sich aus biokompatibles Material zur Augmentation bewährt (H. Kienapfel 1992; Hürzeler 1996). Ihn zeichnet zum einen das Ausbleiben immunlogischer Abwehrreaktionen aus (Bauer and Muschler 2000) zum anderen belegen Untersuchungen, dass bei autologen Knochentransplantaten eine frühere Revaskularisation stattfindet und somit vitale Knochenzellen vorhanden sind (Zins and Whitaker 1983; Friedlaender 1987; Goldberg and Stevenson 1987; Johnson and Stein 1988; Gross, Jinnah et al. 1991; Virolainen, Vuorio et al. 1993). Die Gewinnung von Eigenknochen des Patienten zur lokalen Augmentation während der Implantattherapie ist eine relativ naheliegende und einfache Methode. Dabei werden üblicherweise die anfallenden Knochenspäne durch Knochenfilter gesammelt oder es werden die bei der Aufbereitung des Implantatbettes anfallenden Knochenspäne, die am Bohrer haften, aufgehoben. Im Folgenden werden beide Methoden kurz vorgestellt.

3.2.1 Methoden der Knochengewinnung

3.2.1.1 Gefilterte Knochenspäne

Bei der Präparation des Implantatlagers wird ein sogenannter „Bone Collector“ verwendet; dabei handelt es sich um ein an die Absauganlage anschließbares, gekapseltes Sieb, welches die anfallenden Knochenspäne von Spülwasser, Speichel und Blut abtrennt. Es wurden von verschiedenen Herstellern spezielle Knochenkollektoren entwickelt, mit denen Knochenspäne unterschiedlich gut gesammelt werden können. Kainulainen et al verglichen im Jahre 2006 sechs verschiedene Bone Collectoren und kamen zu dem Ergebnis, dass zwar alle in Form und Technik unterschiedlich entwickelten Knochenspankollektoren verwendbar seien, sie sich aber in der Effektivität drastisch unterscheiden. Dabei spielt der Durchmesser der Membranporen, das Material, die Aufnahmefähigkeit (Kainulainen, Kainulainen et al. 2006) eine große Rolle. Das Verstopfen des Auffangsiebs bereitete Young et al. während der Knochengewinnung in einer Versuchsreihe große Schwierigkeiten. Sie verglichen zwei Bone Collectoren auf Effektivität und stellten fest, dass die Reinigung des verstopften Auffangsiebs viel Zeit in Anspruch nimmt und die Sterilität der Proben fraglich sei (Young, Worthington et al. 2002). Um eine übermäßige Kontamination durch Speichel und Blut zu vermeiden, wurde von Young und seiner Arbeitsgruppe zudem empfohlen, zwei verschiedene Sauger einzusetzen (Young, Worthington et al. 2002). Außerdem konnte man in mehreren Studien feststellen, dass die gesammelte Gewebemasse von der Porengröße, Aufnahmefähigkeit und dem Material der Knochenfilter beeinflusst wird und damit ihre klinische Anwendbarkeit, als auch die histologische Zusammensetzung der Knochenspäne variiert. Dabei gilt, dass je feiner der Filter ist, die Menge an abgetrenntem Knochen zunimmt, wobei der feine Filter schneller verstopft. (Young, Worthington et al. 2002; Kainulainen, Kainulainen et al. 2006; Graziani, Cei et al. 2007) In weiteren Studien konnte wiederum gezeigt werden, dass das gesammelte Knochenvolumen unabhängig von Entnahmeort und Zeitpunkt (Maxilla oder Mandibula), Alter oder Geschlecht des Probanden im Schnitt gleich bleibt (Savant, Smith et al. 2001).

Auf dem Markt befindliche Knochenfilter sind im Journal für Oralchirurgie (Implantology 2004) im Vergleich aufgeführt.

Knochenfilter	ASTRA TECH	FRIADENT
		
Modellname/Typ	Bone Trap®	FRIOS® Bone Collector
Hersteller	Astra Tech	FRIADENT GmbH
Sammlerart	Einweg-Sammler	Mehrweg-Sammler
Absaugkanüle	Einweg	Einweg
Auffangsieb	Einweg	Einweg, herausnehmbar
Material des Auffangsieb	Kunststoff	Metall
Durchmesser der Siebfläche	8mm inneres Durchmesser	23,4mm
Größe der Siebporen	keine	0,3x0,4mm
Material Knochenfilter	Kunststoff	Metall
Knochenfilter	nicht sterilisierbar	sterilisierbar
Gewicht des Filters	6g	geringes Gewicht durch Titan
Maß des Filters	Länge 4cm, Durchmesser 8mm	Länge 7cm, Durchmesser 4mm
Herkunftsland	Schweden	Deutschland
Markteinführung Deutschland	2000	1997
Garantie	Ersatzgarantie	gesetzlich festgelegt
Preis(ohne MwSt.)	21,95 €	329 €

Knochenfilter	USTOMED	HESS
		
Modellname/Typ	USTOMED "Knochenfalle"	Schlumbohm KF-T2 und KF-T3
Hersteller	Ulrich Storz GmbH&Co.KG	Fa. Schlumbohm OHG
Sammlerart	Mehrweg-Sammler	Mehrweg-Sammler
Absaugkanüle	sterilisierbar	Einweg
Auffangsieb	sterilisierbar, herausnehmbar	Einweg, herausnehmbar
Material des Auffangsieb	Kunststoff	Metall
Durchmesser der Siebfläche	17mm	40mm
Größe der Siebporen	engmaschig bis 150 micron	0,3mm
Material Knochenfilter	Metall	Metallgehäuse, Filter: Edelstahl
Knochenfilter	sterilisierbar	sterilisierbar
Gewicht des Filters	60g	60g
Maß des Filters	60mm, Durchmesser 25mm	Durchmesser 55mmx45mm
Herkunftsland	Deutschland	Deutschland
Markteinführung Deutschland	1992	1995
Garantie	5 Jahre	1 Jahr
Preis(ohne MwSt.)	187,45€ komplett	325 €

Abbildung 2: Auf dem Markt befindliche Knochenfilter(Teil 1) [Dent Implantol Journal 2004].



Knochenfilter	OMNIA	ORALTRONICS
		
Modellname/Typ	OSTEOTRAP	Bone Collector nach Dr. Böttcher
Hersteller	OMNIA SRL	Oraltronic GmbH
Sammlerart	Einweg-Sammler	Mehrweg-Sammler
Absaugkanüle	Einweg	sterilisierbar
Auffangsieb	Einweg	Einweg, herausnehmbar
Material des Auffangsieb	Kunststoff	Kunststoff
Durchmesser der Siebfläche	49mm	26mm
Größe der Siebporen	300µm	180µm, 200µm
Material Knochenfilter	Kunststoff	Metall
Knochenfilter	nicht sterilisierbar	sterilisierbar
Gewicht des Filters	12g	65g
Maß des Filters	Durchmesser 51mm	Länge 9cm, Durchmesser 30mm
Herkunftsland	Italien	Deutschland
Markteinführung Deutschland	2001	1997
Garantie	5 Jahre	halbes Jahr
Preis(ohne MwSt.)	8,00 €	Filter 325€, Sieb 3,50€

Abbildung 3: Auf dem Markt befindliche Knochenfilter(Teil 2) [Dent Implantol Journal 2004].

Vorteile der Knochenfilter sind die einfache Handhabung und die Zeitersparnis während der Operation. Größter Nachteil ist die mögliche bakterielle Kontamination. Auf die mikrobiologische Analyse der durch Knochenfilter gewonnenen Knochenspäne, wird in einem separaten Kapitel eingegangen. Auch eine mögliche Keimreduktion durch 0,12 %ige Chlorhexidinlösung und die Auswirkungen auf die Vitalität der Knochenspäne wird noch näher diskutiert werden (s.u.).

3.2.1.2 Knochengewinnung mit Einmalbohrern

Das direkte Sammeln der bei der Aufbereitung des Implantatlagers anfallende Knochenpartikel, die am Bohrer haften bleiben, ist eine einfache und günstige Methode. Die bakterielle Kontamination des gewonnenen Materials ist gegenüber der gefilterten Knochensubstanz erheblich gesenkt, da das Implantatbett während niedertouriger Fräsung ohne Wasserkühlung aufbereitet wird und die Späne nicht mit Speichel in Kontakt kommen. Dadurch wird die Eluation des Knochens und eine bakterielle Kontamination mit abgesaugtem Speichel vermieden. Ein Problem ist die mögliche erhöhte thermische Belastung des zu gewinnenden Knochens, die bis heute noch unzureichend erforscht wurde. Erste Bohrversuche ab dem Jahr 1968 mit anschließender Temperaturmessung und postoperative histologische Auswertung konnten beweisen, dass bei Temperaturen über 56 Grad Celsius eine thermische Schädigung des Knochens vorliegt (Bonfield 1968; Lundskog 1972; Matthews 1972; Eitenmüller 1978). Nach den Tierversuchsreihen, der sogenannten *bone growth chamber* von Eriksson und Arbeitskollegen in den Jahren 1982-1984 konnte wiederum gezeigt werden, dass ab einer physiologischen Temperaturgrenze von 47 °C über die Dauer von einer Minute eine Verschlechterung der Knochenregeneration auftreten kann und damit die angestrebte Einheilung des Implantates im umliegenden Knochen gefährdet wird. (Eriksson, Albrektsson et al. 1982; Eriksson and Albrektsson 1983; Eriksson and Albrektsson 1984)

In der vorliegenden Untersuchung benutzen wir Ein-Patienten-Bohrer, um sicherzustellen, dass optimal scharfe Bohrer ohne Kontamination vorliegen und damit das Risiko eines thermischen Traumas vermieden wird.

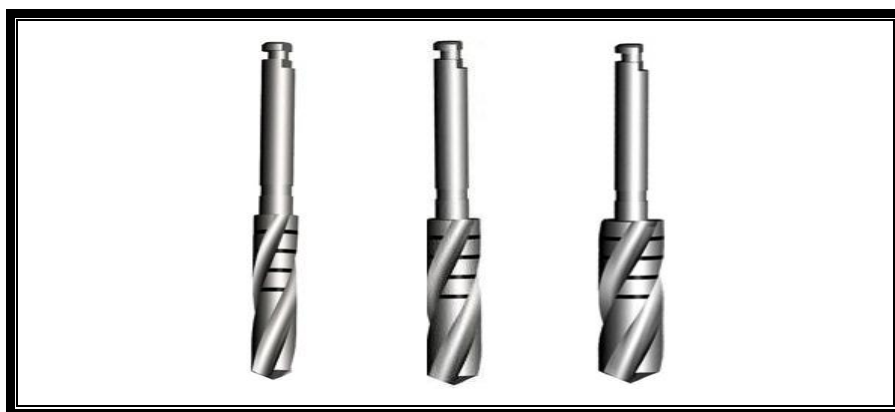


Abbildung 4: Wital Formbohrer, zylindrisch, für Schraubenimplantate
Durchmesser 3,5 mm - 4,3mm - 5,0mm (von links nach rechts)
(ProWital 2010).

3.2.1.3 Knochengewinnung mit Safescraper und Micros

Safescraper und Micros sind chirurgische Einmalinstrumente mit denen locker aufgewickelte Knochenspäne - ähnlich einem gehobelten Holzspan - gewonnen werden können. Die Klinge besteht aus Edelstahl. Ihre spezielle Form erlaubt die einfache und schnelle Gewinnung von Knochenspänen. Es handelt sich um kortikale, in sich gewickelte, mit Blut vermischte Spiralen (Locken), die im Instrument steril aufgenommen werden. Die Spiralform vergrößert das Volumen der Späne im Vergleich zum abgetragenen Knochen um das 5- bis 10-fache – nach Herstellerangaben ideal für regenerative Techniken.(Curasan 2010)

Bei der so genannten Piezosurgery wird anstelle eines rotierenden Bohrers mit Ultraschallschwingungen eines Instruments operiert, Zahnimplantate können so in den Kiefer eingesetzt werden, ohne ein Lager bohren zu müssen. Die Kombination von 3D Implantatnavigation mit Piezosurgery gestattet es angeblich, auch ältere Patienten oder Personen mit Blutgerinnungsstörungen zu behandeln, da durch diese schonenden Eingriffe nur kleine, fast unblutige Wunden entstehen sollen.(Truppe 2012)

3.2.2 Typen autologer Knochentransplantate

Autologe Knochentransplantate werden in der Zahnheilkunde entweder in Form von Knochenblöcken (Neukam, Schmelzeisen et al. 1990), Knochenspänen (Savant, Smith et al. 2001; Chiriac G 2004) oder in Kombination von Knochenblöcken und Knochenspänen entnommen und eingesetzt (Tinti, Parma-Benfenati et al. 1996; Chiapasco, Abati et al. 1999; Lindorf 2001; Lindorf 2002). Knochenblöcke können auch mit Hilfe einer Knochenmühle (Erpenstein, Diedrich et al. 2001; Springer, Terheyden et al. 2004) zerkleinert und zu Knochenspänen umgewandelt werden. Eine andere, häufig genutzte Möglichkeit ist der Einsatz einer Kugelfräse und eines Knochenfilters (Tinti, Parma-Benfenati et al. 1996; Lindorf 2002; Young, Worthington et al. 2002; Blay, Tunchel et al. 2003; Springer, Terheyden et al. 2004). Die kombinierte Verwendung autologer kortikospongiöser Knochenblöcke im Zentrum des Defektes und von Knochenspänen in den marginalen Arealen hat sich als Konzept der Arbeitsgruppe von Buser im Augmentationsverfahren bewährt (Buser, Dula et al. 1996), während Khoury et al. es bevorzu-

gen, mit Knochenplatten eine Art von Gehäuse zu bilden, in das partikuliertes Material eingebracht werden kann (Khoury 2009).

3.2.3 Mögliche Nachteile der konventionellen Knochenspanmethoden

Tierexperimentelle und klinische Studien haben gezeigt, dass die Entnahme autologer Knochenspäne mittels metallischer Kugelfräsen mögliche Nachteile aufweisen (Lundskog 1972; Eriksson and Albrektsson 1983; Nkenke, Schultze-Mosgau et al. 2001; Nkenke, Radespiel-Troger et al. 2002; Clavero and Lundgren 2003; Garcia, Mombiola et al. 2004; Hoegel, Mueller et al. 2004). Die wichtigsten sind die potentielle Übererwärmung des Knochens, die Kontamination durch metallische Abriebpartikel und die Verletzung von Weichgewebsstrukturen.

3.2.3.1 Übermäßige Erhitzung des Knochens

Beim Fräsen des Implantatlagers kann es bei einer unzureichenden Kühlung zu einem Temperaturanstieg im präparierten Knochen kommen, der wiederum zu einer lokalen Osteonekrose führen kann. Hauptgründe hierfür sind die durch Temperaturanstieg hervorgerufenen Veränderungen in der Proteinstruktur (Denaturierung), der veränderte Metabolismus, sowie Veränderungen in der enzymatischen Aktivität. So konnte festgestellt werden, dass eine Osteonekrose nach einer 5-minütigen Exposition des Knochens bei 46 Grad Celsius auftritt (Hoegel et al., 2004). Hauptgrund hierfür ist die hohe Sensibilität der kleinen intraossären Blutgefäße, die durch den Temperaturanstieg zerstört werden. Damit entfällt die Ernährungsgrundlage des Knochens (Lundskog, 1972). Eriksson und Albrektsson legen einen Grenzwert für die thermische Knochenschädigung bei 47 Grad Celsius und einer Expositionszeit von einer Minute fest (Eriksson and Albrektsson, 1983). Die Verwendung von stumpfen Bohrern in tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass damit höhere Temperaturen im präparierten Knochen entstehen (Ercoli et al., 2004). Andere Studien wiederum zeigen, dass klinisch schädliche Temperaturen bei Wasserkühlung erst ab einer Bohrtiefe von 15 mm feststellbar sind, und mit einer Abnahme der Bohreffizienz korrelieren (Garcia et al., 2004). Das erklärt man sich damit, dass ab einer Bohrtiefe von 15mm der Knochen nicht mehr ausreichend gekühlt werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien und Instrumente

Für die Versuche werden folgende Utensilien, Reagenzien und Nährlösungen verwendet: Eine elektrische Waage zur Messung des Gewichtes der angefallenen Knochenspäne. Außerdem wird eine Digitalkamera benutzt, um eine Dokumentation der Versuchsreihe sicher zu stellen. Das Knochennährmedium setzt sich hauptsächlich aus dem *minimum essential medium* der Firma Gibco, dem fötalem Kälberserum der Firma Sigma, 1 %ige Pen-Strep-Mix (Firma Sigma, Deutschland) und weiteren Bestandteilen zusammen (siehe Abbildung 5). Diese Kombination ist notwendig, um die bei der Aufbereitung des Implantatlagers gewonnenen Knochenspäne vital zu erhalten und vor bakterieller Kontamination *in vitro* zu schützen. Für den Transport wurden die Knochenspäne sofort nach Entnahme aus dem Implantatbettlager in 15 ml Probenröhrchen (BD FalconTM der Firma BD, USA) in Knochennährlösung überführt. Wie bereits beschrieben, werden die Knochenkollektoren für die Knochenspanentnahme mit Wasserkühlung (BC) und die Einmalpatientenbohrer für die Versuchsreihe ohne Wasserkühlung eingesetzt (BS). Die sterilen Zentrifugenröhrchen dienen dem Transport und vereinfachen das Zentrifugieren im Labor. Eine 0,12 %ige Chlorhexidinlösung wird für die mikrobiologische Untersuchung der Proben benötigt (ParoexTM der Firma Sunstar, Deutschland). Im Folgenden werden die verwendeten Utensilien in einer graphischen Anordnung mit Beschreibung und Abbildung dargestellt.









Materialbeschreibung	Abbildung	Beschreibung
benötigte elektrische Geräte		
Digitale Waage		dient zur Messung des Gewichtes der gesammelten Knochenspäne
Digitalkamera		dient zur Dokumentation der Versuchsreihe
Zusammensetzung des Knochennährmediums		
Minimum essential medium (MEM) (Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X), liquid from In-vitrogen/Fa. Gibco, Deutschland) 10 Vol.-% FKS (fötales Kälberserum, Fa. Sigma) Vol.-% PS (Penicillin-Streptomycin, Fa. Sigma) 100 nM Dexamethason (Fa. Fluka) 10mM b-Glycerolphosphat (Fa. Sigma) 50 g/ml Ascorbinsäure	 	wird als standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur benötigt dient der Zellkultivierung erzeugt eine antibakterielle Wirkung
Weitere benötigte Utensilien		
Bone Collector		sammelt die beim Bohren mit Wasserkühlung anfallende Knochenspäne
Einpatientenbohrer		wird für die Knochengewinnung ohne Wasserkühlung herangezogen
Sterile Zentrifugen		wird zur Aufbewahrung der Knochenspäne im Nährmedium benutzt
Chlorhexidin Lsg. 0,12%		enthält die antibakterielle Wirkung für die aus der Spongiosa gewonnenen Knochenspäne

Abbildung 5: Material und Methoden: alle herangezogene Utensilien

4.1.1 Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Ein standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur. Es bietet eine breite Verwendbarkeit für humane und verschiedene tierische Zellen.

4.1.2 Chlorhexidin (CHX)

CHX wird in der Zahnmedizin als Goldstandard der Mundantiseptika angesehen. Chlorhexidingluconat ist die am häufigsten angewendete Variante. Aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung, wird es hauptsächlich als Mundspüllösung, aber auch als ein auf die Zähne aufgetragener Lack verwendet (Sprays, - Gele und – Chips im Handel auch erhältlich). Aufgrund der langen Haftbarkeit auf Zähnen und Mundschleimhaut bietet es gegenüber anderen Antiseptika deutliche Vorteile. CHX liegt in Konzentrationen zwischen 0,03% bis 2% vor und wird bei folgenden Indikationen eingesetzt:

- perioperativ: vor oralchirurgischen Eingriffen zur Reduzierung der Bakterienzahl in der Mundflora und Vorbeugung einer Bakteriämie (Young, Korachi et al. 2002)
- postoperativ: da die Mundhygiene im Operationsgebiet beeinträchtigt ist, z. B. als unterstützende Begleittherapie nach chirurgischer Parodontalbehandlung (Sanz, Newman et al. 1989)
- unterstützend im Rahmen einer Parodontaltherapie (Faveri, Gursky et al. 2006)
- zur Kariesprävention (Hemmung der Neubildung von Zahnplaques) (Loe and Schiott 1970)
- zur Spülung von Wurzelkanälen im Rahmen einer endodontischen Wurzelkanalbehandlung (Ferraz, Gomes et al. 2007)

CHX wird auch häufig zur Kavitäten- Desinfektion vor der Füllungstherapie angewendet, um die kariesrelevanten Mikroorganismen (*S. mutans*, *S. sobrinus* und *L. acidophilus*) am Kavitätenboden bzw. in den Dentinkanälchen zu eliminieren (Emilson, Ericson et al. 1972). Schmalz und seine Arbeitsgruppe konnten wiederum mit Hilfe des so genannten *Standard Agar- Diffusions-Test* zeigen, dass Dentin als Barriere zwischen Kavität und Pulpa signifikant die antibakterielle Wirkung einer Chlorhexidin- Lösung, sowie anderen *bonding agents* reduziert (Schmalz, Ergucu et al. 2004).

4.2 Probenentnahme

Es werden 10 Patienten ausgewählt, die jeweils mindestens zwei Implantate im Unterkiefer benötigen, um einen direkten, intraindividuellen Vergleich bezüglich der Menge und Wertigkeit (Vitalität, makroskopischer Aspekt, Volumen etc.) des bei beiden Methoden anfallenden Knochenmaterials zu bekommen.

Es gilt die gleiche Ausgangssituation an beiden Lokalisationen, wobei die Zuteilung der Fräsungen so randomisiert wird, dass das weiter links eingebrachte Implantat im Unterkiefer jeweils einer der beiden Gruppen nach einer Randomisierungsliste zugeordnet wird [im Anhang]. Auf diese Weise soll eine Operator-spezifische Bevorzugung einer bestimmten Methode vermieden werden. Die Studie ist mit der Ethikkommission des Klinikums abgestimmt (Geschäftszeichen: 09-046).

Die Patienten wurden über den Versuch aufgeklärt [Patientenerklärung im Anhang]. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und wird nach vorab erfolgter Unterzeichnung einer Probandeneinverständniserklärung durchgeführt [im Anhang]

Einschlusskriterien für die Studienteilnahme:

- geplante chirurgische Aufbereitung eines Implantatlagers, bei dem die anfallenden Knochenspäne nicht für augmentative Zwecke benötigt wird
- guter Gesundheitszustand
- keine systemischen Erkrankungen, wie Osteopathien oder akute bzw. chronische Infektionskrankheiten oder Zustand nach Chemotherapie
- Mindestalter von 18 Jahren
- Schwangerschaft ausgeschlossen

Es werden insgesamt 20 Proben erfasst und im Labor zum Vergleich kultiviert. Zudem wird der makroskopische Aspekt, das Gewicht und damit das Volumen des Knochen erfasst. Zur mikrobiologischen Untersuchung werden mit 0,12 %iger Chlorhexidin-Lösung gespülte Proben und Kontrollen ohne Chlorhexidin kultiviert. Für die CHX-Spülung werden jeweils 3 ml CHX über den Bone Collector abgesaugt, oder die Probe

für max. 15 Sekunden mit CHX aufgefüllt und anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung abgespült.

Vor der Versuchsdurchführung und nach Probenbefüllung werden die mit dem Knochennährmedium gefüllten sterilen Behälter digital abgewogen, um die jeweils gewonnene Knochenmenge durch Differenzbildung zu erfassen.

Die während der Operation gesammelten Knochenspäne werden makroskopisch mit einer Digitalkamera dokumentiert, steril im Knochennährmedium gelagert und umgehend zur Kultivierung in das Biocer Institut nach Bayreuth versendet beziehungsweise zur Kultivierung im eigenen Kliniklabor bereitgestellt.

4.3 Vorbehandlung der Proben

4.3.1 Zentrifuge Biofuge Stratos® der Firma Heraeus

Zuerst einmal werden die gesammelten Proben in einer gekühlten Highspeed Tischzentrifuge, Biofuge stratos® der Firma Heraeus bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 250xg für 5 Minuten zentrifugiert.



Abbildung 6: Biofuge stratos® der Firma Heraeus

Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten wird der Überstand aus den Proben entfernt und die Knochenspäne werden mit einer Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered

Saline, Firma **PAA**[™]) Lösung ohne Calcium, Magnesium und ohne Natriumbicarbonat ausgewaschen.

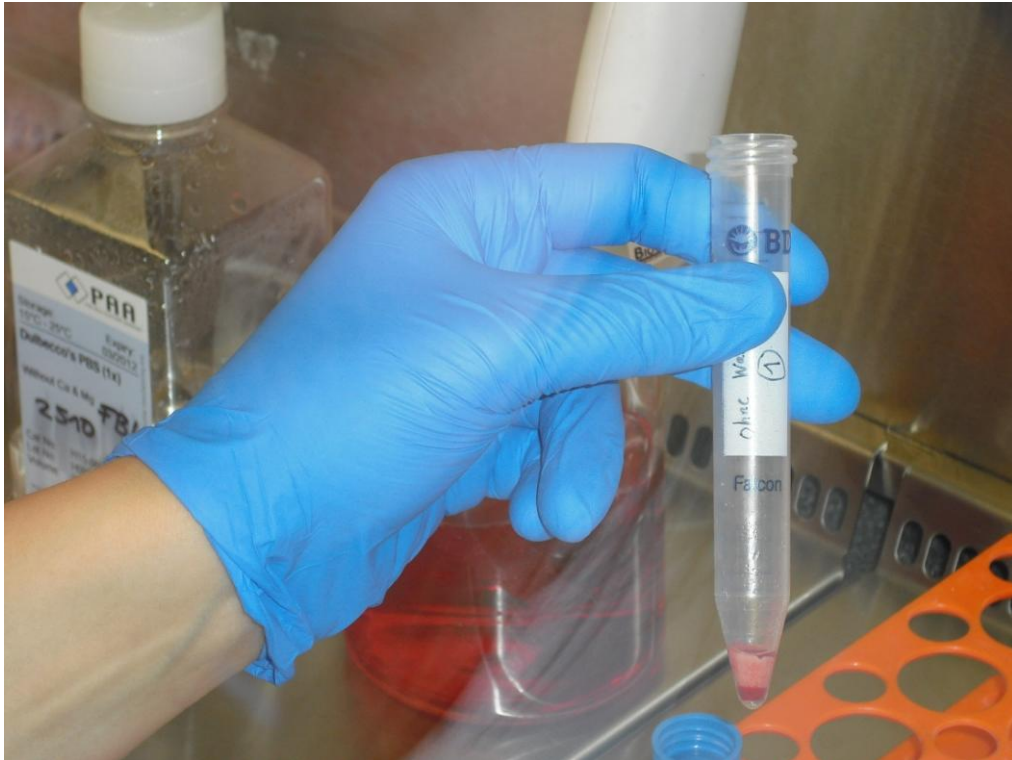


Abbildung 7: Reinheit der Bohrspäne
Nach dem Zentrifugieren werden die Überstände der Proben entfernt und die verbliebenen Knochenspäne mittels PBS der Firma PAA ausgewaschen.

Nun werden die Proben noch einmal bei 250xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand aus den Proben entfernt.

Anschließend werden die Proben mit den verbleibenden Knochenspänen in ein osteogenes Nährmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 %igem fötalem Kälberserum (FBS) gegeben. Dieses Nährmedium ist ein standardisiertes Nährmedium, das durch den Hauptbestandteil an fötalem Kälberserum zur Aufzucht und Kultivierung von Zellen in der Zellkultur benötigt wird. Außerdem wird diesem Nährmedium eine 1 %ige Pen/Strep- Premix- Lösung hinzugefügt. Diese Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und Natriumchlorid als Stabilisator dient der Beseitigung und Prävention von bakteriellen Kontaminationen in der Zellkultur. Penicillin inhibiert dabei die Zellwandbiosynthese in gram-positiven Bakterien und das Streptomycin entwickelt den antibiotischen Effekt in gram-negativen Bakterien durch die

Inhibition der Translation. Die nun für die Kultivierung fertig vorbereiteten Nährmedien mit den Knochenspänen werden in 6-Well-Kulturplatten (Costar® der Firma Corning) der Firma pipettiert. Dabei werden je 4-6 Proben für die ohne Wasserkühlung und je 4-6 Proben für die mit Wasserkühlung gewonnenen Knochenspäne angesetzt.



Abbildung 8: Costar® 6-Well-Kulturplatten der Firma Corning

Auf den 6-Well Kulturplatten werden die geernteten Knochenspäne für die Kultivierung mit einem sterilen Spatel unter Augenmaß gleichmäßig verteilt. (links BC, rechts BS)

Die Kultivierung erfolgt in einem Zell-Inkubator, (HERAcell® der Firma Heraeus) bei 37 °C, 5 %tigem Kohlenstoffdioxid über 4 Wochen. Im Inkubator ist gewährleistet, dass die Zellkulturen gleichmäßiger Bedingungen ausgesetzt werden und physiologische Gegebenheiten simuliert werden können.



Abbildung 9: HERAcell® der Firma Heraeus
 Im Inkubator werden die geernteten Knochenspäne über 28 Tage bei 37 °C und 5 %igem Kohlenstoffdioxid kultiviert.

4.4 Kulturverfahren für die gesammelten Knochenspäne

An jedem dritten Tag werden ein Mediumwechsel und eine anschließende mikroskopische Kontrolle der Zellen durchgeführt, um ein Wachstum unerwünschter nicht-adhärenter Zellen zu vermeiden.

Nach der Kultivierung der isolierten Zellmengen in osteogenem Medium für 28 Tage werden die Knochenspäne morphologisch und histologisch analysiert. Dabei wird die Mitochondrienaktivität, die Kollagen Typ 1-, sowie die alkalische Phosphatase-Färbung betrachtet:

1. Morphologie der Bohrspäne (Rasterelektronenmikroskop)
2. Messung der Vitalität (Mitochondrienaktivität) mittels WST- 1 (Roche)
3. Histologische Analyse der Verteilung von Kollagen Typ 1, alkalischer Phosphatase (ALP) und TRAP mittels Färbung

4.5 Morphologische und histologische Analyseverfahren

4.5.1 Morphologie der Proben im Rasterelektronenmikroskop (REM)

Durch das REM wird ermöglicht, dass Bilder von Objektoberflächen in einer hohen Schärfentiefe dreidimensional abgebildet werden können. Im Vergleich zu einem konventionellen Lichtmikroskop liegt der Vergrößerungsfaktor theoretisch bei 1000000:1. Abbildung 10 zeigt die schematische Darstellung eines REMs. Im REM werden, im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop Elektronen in einem Elektronenstrahl über das vergrößert abzubildende Objekt gerastert. Die Elektronen werden damit zur Sichtbarmachung des Objekts verwendet. Diese treten mit dem Objekt in Wechselwirkung, und so ein Bild des Objektes erzeugt

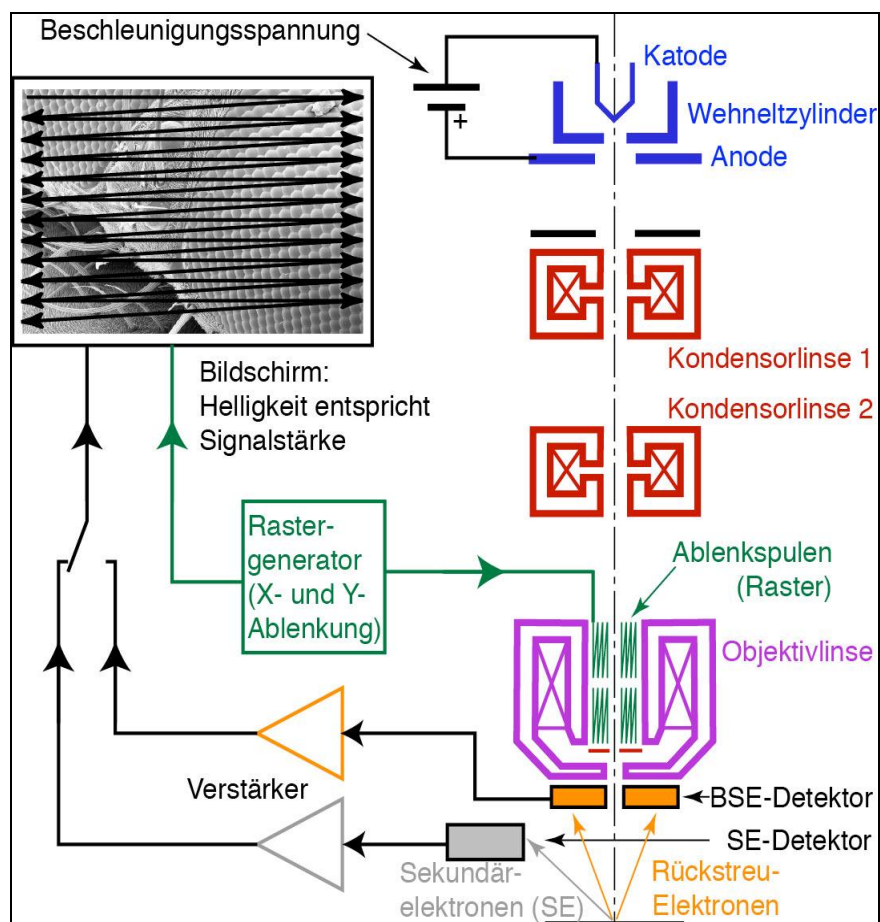


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Rasterelektronenmikroskops (Ludwig)

4.5.2 Vitalitätsmessung der Proben

Zur Erfassung der Zellproliferation wird die Extinktion des von Zellen metabolisierten Tetrazolium gemessen. Dieses wird mittels der mitochondrialen Succinatdehydrogenase zu Formazan metabolisiert (Abbildung 11), dessen Lichtabsorption wiederum in einem photometrischen Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge zwischen 420 nm und 480 nm gemessen werden kann. Das WST-1 Reagenz wird nach Kultivierung der Knochenzellen in einer der 6-Wellplatten zugesetzt. Nach 3 h Inkubationszeit wird die Probe im Mikroplattenleser (Biotek, USA) bei 430 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Extinktion ist dabei proportional zum Substratumsatz und somit ein Maß für die Mitochondrienaktivität/Vitalität beziehungsweise Zellproliferation.

Zusätzlich werden die mit 0,12 %iger Chlorhexidin- Lösung vorbehandelten Proben auch einem WST- 1 Assay unterzogen, um auch hier die Mitochondrienaktivität bzw. indirekt die Vitalität der Knochenspäne zu untersuchen.

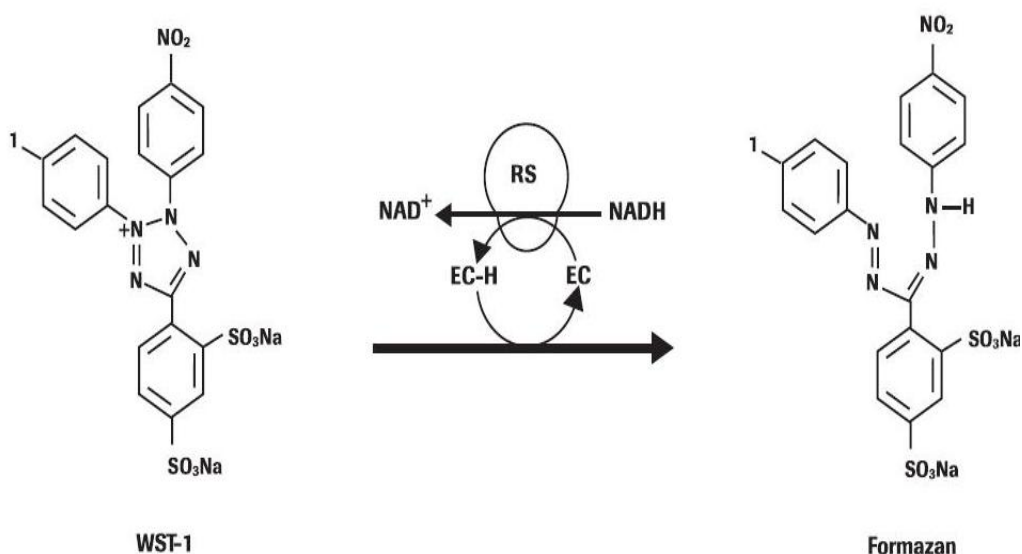


Abbildung 11: WST-1 Cell Proliferation Assay nach Roche

Die Abbildung zeigt die chemische Umsetzung des roten Tetrazolium in das gelbe Formazan durch die Succinyldehydrogenase

4.5.3 Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP)

Die alkalische Phosphatase ist ein Isoenzym, das die Hydrolyse von Phosphorsäureestern katalysiert. Sie kommt sowohl als mikrosomales ungebundenes Enzym, als auch an die Zellmembran gebunden in Zellen mit hoher sekretorischer Aktivität vor (Anh, Dimai et al. 1998). Der Nachweis von Osteoblasten kann somit durch eine spezifisch hohe Aktivität von ALP indirekt durchgeführt werden, da Differenzierungsstadien der Osteoblastenentwicklung erkennbar sind.

Das Prinzip der ALP-Färbung beruht auf der Umsetzung eines löslichen Substrates in einen bläulichen, unlöslichen Farbstoffkomplex durch die ALP. Dort, wo aktives Isoenzym vorhanden ist, schlägt sich der blaue Farbstoff nieder. Vor allem auf der Außenseite der Zellmembran der Osteoblasten ist dies erkennbar.

Die Bestimmung der ALP-Aktivität erfolgt anhand der Färbung mit dem *Testkit* der Firma Sigma-Aldrich (Deutschland):

1. Herstellung der Färbelösung erfolgt gemäß dem Protokoll des Sigma Kits
 - Mischung von 1 ml Natriumnitritlösung und 1 ml FRV-Alkaline-Lösung
 - 2-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
 - Zugabe von 45 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) und 1 ml Naphtol AS-BI-Phosphat-Lösung
2. Vorbereitung der Knochenspäne für die Färbung
 - Nach Erreichen der Zellkonfluenz werden die aus den Knochenspänen ausgewachsenen Zellen in einem Volumen von 1 ml auf Zellkulturobjektträger ausgesät und mit 4% Formaldehyd 45 Sekunden lang fixiert.
3. ALP-Färbung
 - Nach Zusatz der Färbelösung und 15-20 minütiger Inkubation unter Lichtschutz erfolgt die histochemische Reaktion; danach dreimaliges Waschen mit Aqua dest.
 - Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt für 5 Minuten mit 6% Hämatoxylin; danach erfolgt eine letzte kurze Spülung mit Aqua dest,
 - Im Lichtmikroskop stellt sich dies im Zytoplasma ALP-positiver Zellen als diffuser, blauer Niederschlag dar

4.5.4 Bestimmung der Osteoklastengenese mittels *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP)- Färbung

Die TRAP als wichtiger Osteoklasten-Marker wird angewandt, um Osteoklasten von anderen Zellen, TRAP-negativen Zellen, zu unterscheiden. Eine Zelle mit drei oder mehr Zellkernen wird als ein TRAP- positiver Osteoklast gewertet.

1. Versuchsanordnung

- Wie bei der ALP- Färbung werden die Kulturen auf Deckgläsern in 6-Well-Mikrotiterplatten pro Substanzkonzentration erstellt.

2. Zellfixierung

- Spülung der Deckgläser mit PBS
- Fixierung der Zellen mit 10 %iger Formaldehydlösung für 4 Minuten
- Nochmaliges Waschen mit PBS
- Lagerung der Platten bei 4 Grad Celsius

3. Färbung

- Vorinkubation der Zellen mit TRAP-Puffer bei 37 °C
- Behandlung mit Aceton/Ethanol (1:1) für ca. 30 Sekunden
- Färbung der Zellen mit Färbelösung bei 37 C für ca. 5-10 Minuten. Spülung mit aqua dest.

4. Auswertung

- Die gefärbten Osteoklasten, mit mindestens drei Zellkernen, werden dargestellt.

4.5.5 Kollagenfärbung mit Picro-Siriusrot (PSR) nach Puchtler

Kollagen Typ I ist ein wesentlicher Bestandteil der Knochenmatrix, außerdem in Haut, Faszien und Sehngewebe auffindbar. Mit Hilfe der PSR Färbung nach Puchtler kann man die Synthese von Kollagen Typ I und damit indirekt die Kultivierung neuer Knochenzellen nachweisen.

1. Herstellung der Färbelösung

- Picro-Siriusrot (PSR): 0,1% Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäure (Morphisto, Deutschland))
- Coelestineblau-Lösung: 2,5g Ammoniumeisen-III-sulfat werden über Nacht in 50ml Aqua dest. gelöst; 0,25 g Coelestineblau wird zugegeben, für 30 Minuten gekocht und anschließend filtriert, zum Schluss werden 7 ml Glycin hinzugegeben

2. Vorbereitung der Knochenspäne

Die Fixierung der Knochenspäne erfolgt für 10 Minuten in 70 %igem Ethanol

3. Durchführung der Färbung

- Präparate werden für 7 Minuten lang in Coelestineblau gefärbt
- Anschließend kurz in 1% HCL getaucht
- Zum Bläuen werden die Zellen in Aqua dest. gespült und gereinigt
- Nach der Spülung werden die Präparate 1 Stunde lang in Picro-Sirius-Rot-Lösung gelegt und anschließend 3 mal je 2 Minuten in absoluten Alkohol gereinigt und entwässert.
- Am Ende werden die Zellen 3 mal je 5 Minuten in Tissue Clear (Sakura Finetek, Germany), ein Xylolersatz zur Entparaffinierung der Objektträger gewaschen

4. Lichtmikroskop

- Unter polarisiertem Licht erscheint dicht gepacktes Kollagen Typ I rot und die Zellkerne blau

5 Ergebnisse

5.1 Morphologie der Bohrspäne

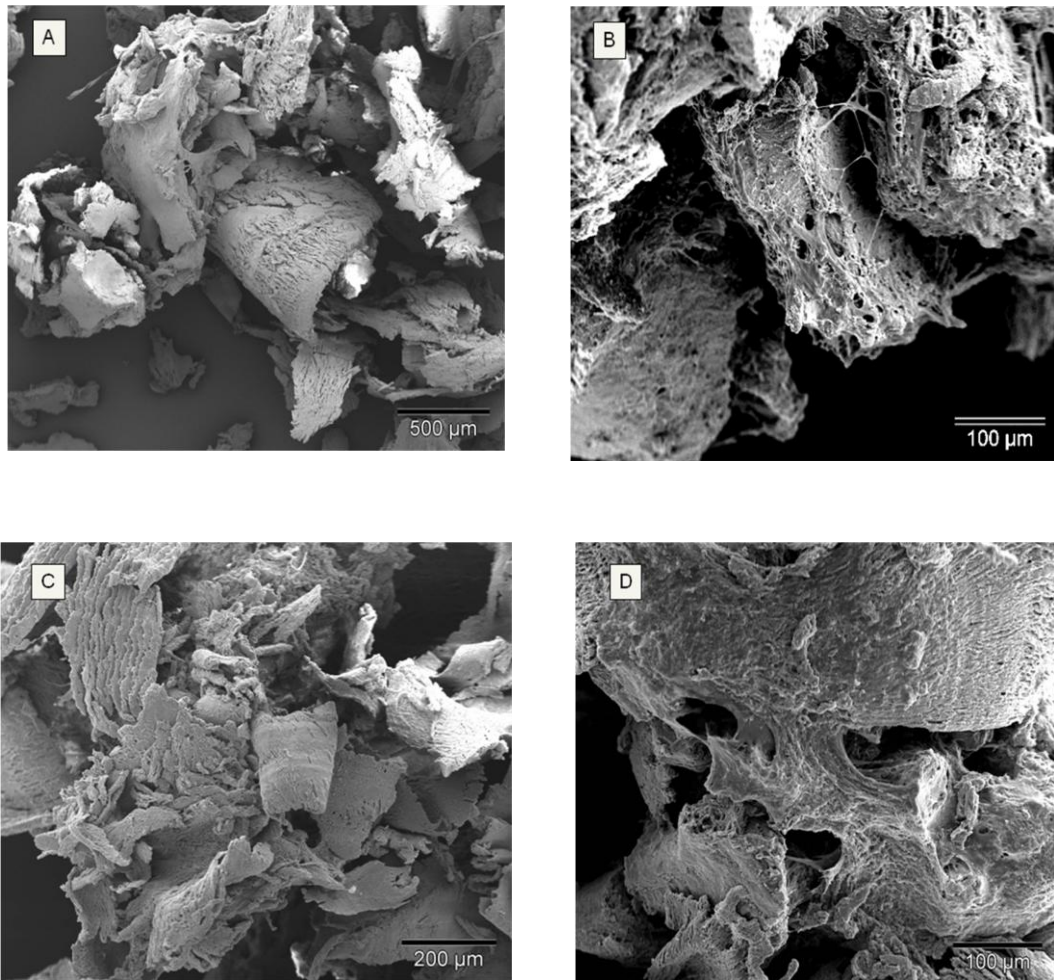


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Bohrspänen ohne Wasserkühlung (A,B) mit 30, bzw.150-facher Originalvergrößerung (B) und Bohrspäne mit Wasserkühlung (C,D) mit 75 bzw. 150-facher Originalvergrößerung nach 28 Tagen.

Abbildung 12 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Knochenspänen nach Kultivierung, die jeweils mit Wasserkühlung (Abbildung 12 A und B) und ohne Wasserkühlung (Abbildung 12 C und D) gebohrt wurden. In der vergrößerten Aufnahme in Abbildung 12 B zeigt sich eine Überlagerung faseriger Strukturen, bei denen es sich möglicherweise um eine vermehrte Ablagerung von Kollagenfasern handelt. Abbildung

12 D hingegen weist keinerlei derartige Strukturen auf, sondern zeigt eine relativ glatte Oberflächenbeschaffenheit. Diese morphologischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass wasserkühlungsfreie (ungespülte) Bohrungen einen positiven Effekt auf die Regeneration der Knochenspäne bewirken.

5.2 Osteblastennachweis in kultivierten Bohrspänen

Um Osteblasten in den kultivierten Bohrspänen nachzuweisen, wurden Färbungen von alkalischer Phosphatase (ALP-Färbung) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen in einem Großteil der Kulturen eine positive Färbung (Abbildung 13). In wenigen Fällen war jedoch kein Osteblastennachweis möglich (Abbildung 14).

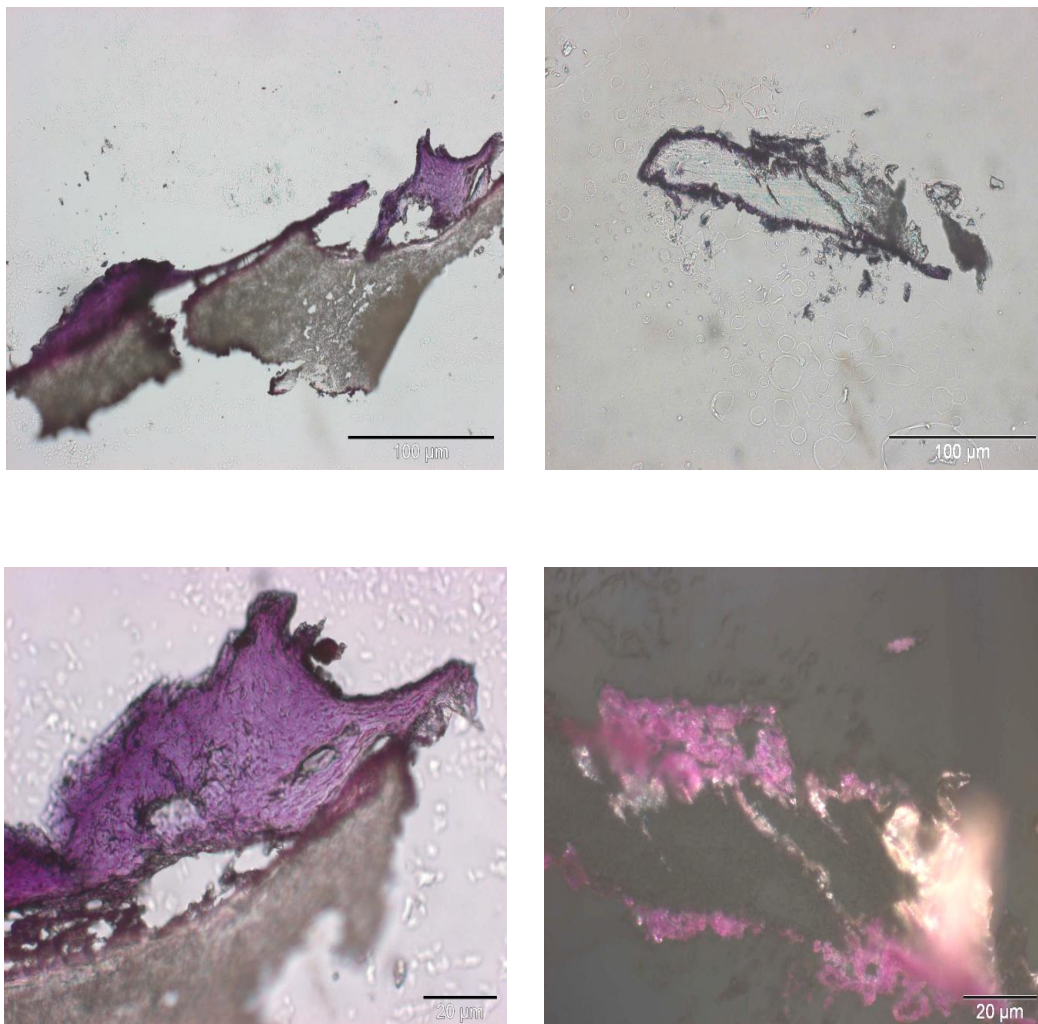


Abbildung 13: Nachweis von Osteblastenaktivität (1)

Bei beiden Entnahmemethoden zeigt sich nach Kultivierung der Knochenspäne eine positive ALP Färbung (BC linke Spalte, BS rechte Spalte)

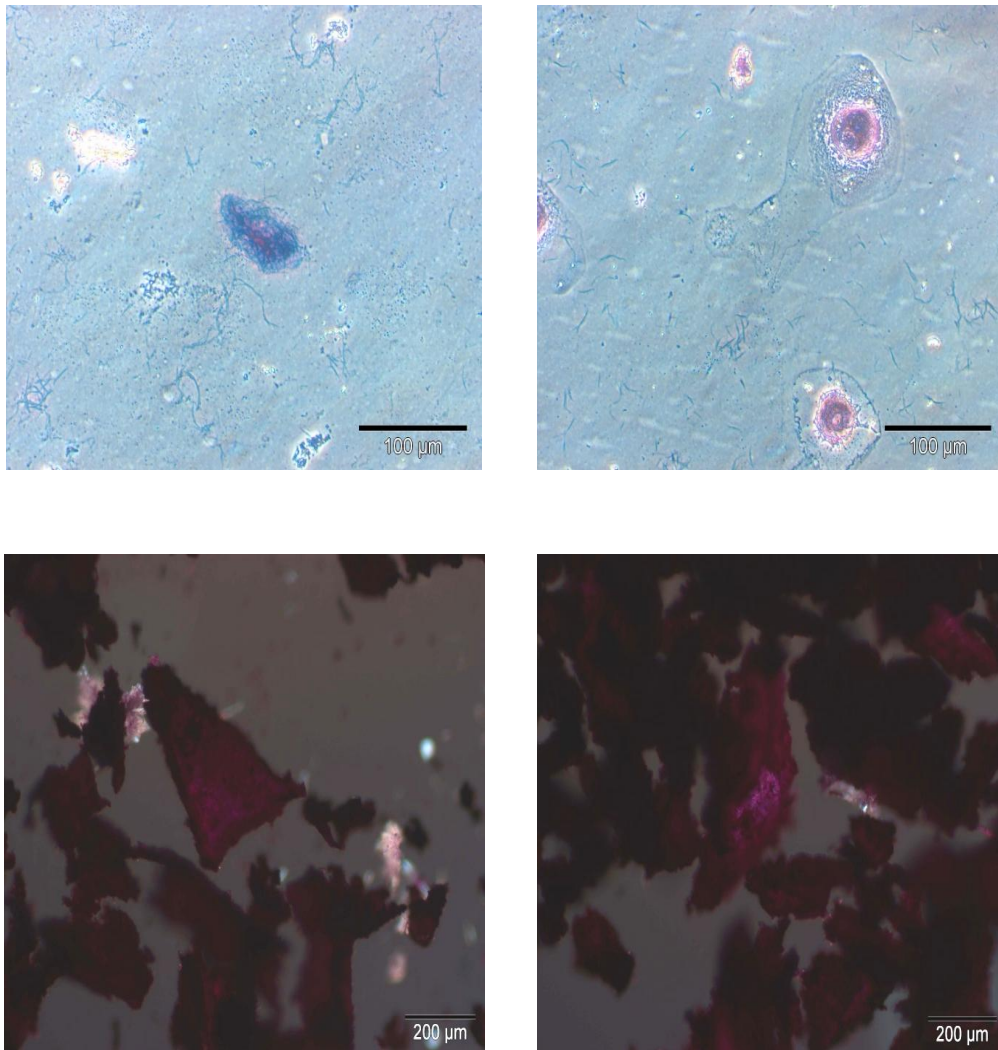


Abbildung 14: Nachweis von Osteoblastenaktivität (2)

Unter dem Lichtmikroskop, sowie unter dem Rasterelektronenmikroskop konnten keine ausgewachsenen Zellen beobachtet werden (BC linke Spalte, BS rechte Spalte). Es konnten keine Osteoblasten nachgewiesen werden (ALP negativ)

5.3 Vitalitätsmessung in kultivierten Bohrspänen

Um nachzuweisen, mit welcher der durchgeführten Methoden (BC *versus* BS) eine verbesserte Knochenregeneration erfolgt, wurde in Osteoblasten-positiven Kulturen eine Vitalitätsmessung durchgeführt.

Die Vitalitätsmessung mit WST- 1 (Roche, Deutschland) ergab, dass bei kultivierten Knochenspänen, welche durch den Bone Collector (BC) entnommen worden waren deutlich weniger vitale Zellen vorhanden sind. Im Vergleich dazu erscheinen Knochen-

späne vitaler, die durch Einmal-Patientenbohrer (BS) entnommen wurden. In Abbildung 15 wurde die Vitalität der Knochenspäne von BS auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu zeigt BC circa 9% Vitalität.

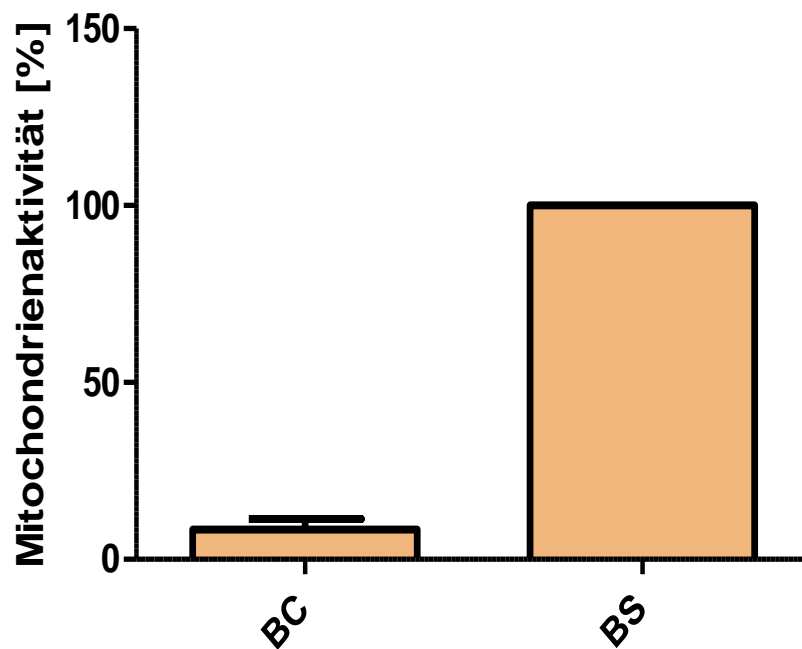


Abbildung 15: Vitalitätsmessung der Knochenspäne
Der WST-1-Assay zeigt die durchschnittliche Mitochondrienaktivität (Vitalitätsmessung) der kultivierten Knochenspäne nach Entnahme durch BC *versus* BS (n=10).

5.4 Vitalitätsuntersuchung der Proben nach Chlorhexidin Behandlung

Um zu analysieren, wie die Mundspüllösung Chlorhexidin (CHX) auf die Vitalität der entnommenen Bohrspäne wirkt, wurden jeweils vier randomisierte Proben vor der Kultivierung für max. 15 Sekunden mit einer 0,12 %tigen CHX-Spülung behandelt. Die Behandlung führt laut dieser Messung zu einem fast kompletten Vitalitätsverlust der Knochenspäne. Alle vier Proben, die mit Chlorhexidinlösung durchgespült wurden, zeigen gegenüber den Kontrollproben (ohne Chlorhexidin, auf 100% gesetzt) nur eine sehr gering messbare Mitochondrienaktivität in Höhe von circa 8% (Abbildung 16). Auch die lichtmikroskopische Untersuchung der CHX behandelten Späne zeigt nach Kultivierung keine lebenden Zellen (Abbildung 17).

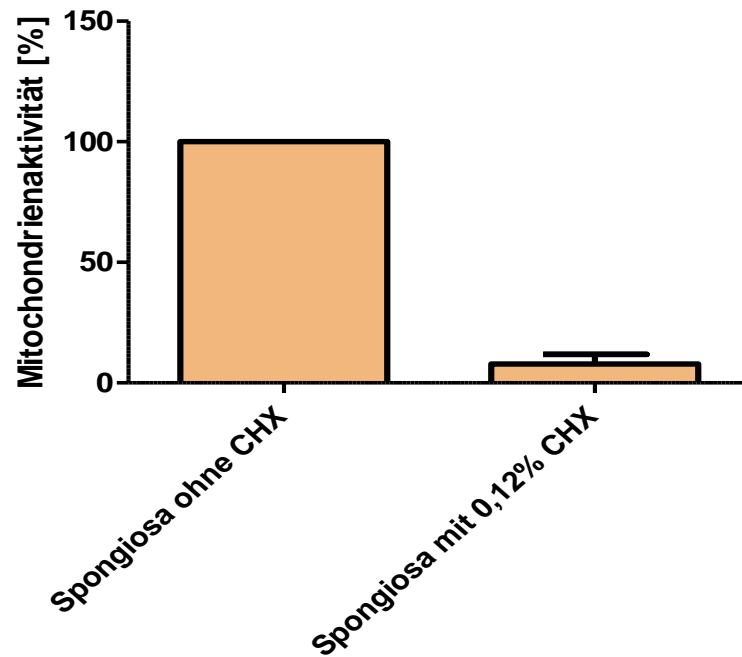


Abbildung 16: Vitalitätsmessung der mit CHX behandelten Knochenspäne
Die Vitalitätsmessung mit Hilfe von WST-1 zeigt eine deutlich geringere Aktivität in CHX behandelter Spongiosa (n=4)

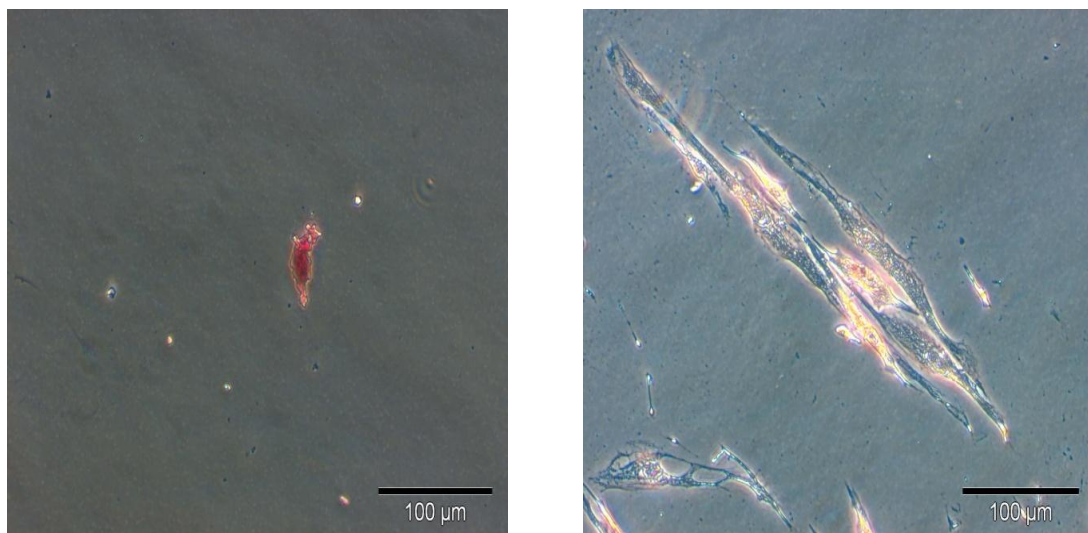


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit CHX behandelten Bohrspäne.
Nach der Behandlung der Proben mit 0,12 %iger Chlorhexidin- Lösung und anschließender Kultivierung sind keine ausgewachsenen Zellen im Lichtmikroskop erkennbar.

5.5 Histologische Verteilung von Kollagen Typ 1

Da die Synthese von Kollagen Typ I einen indirekten Nachweis für die Kultivierung neuer Knochenzellen darstellt, wurde zusätzlich eine Kollagen-spezifische Färbung nach Puchtler durchgeführt. Bei der Bestimmung der histologischen Verteilung von Kollagen durch die PSR nach Puchtler konnte kein aussagekräftiges Ergebnis ermittelt werden. Sowohl in BS, als auch in BC konnte in insgesamt 20 Gesamtproben lediglich eine geringe Menge positiver Kollagenfärbung ermittelt werden (Abbildung 18). In der Mehrheit der Gesamtproben konnte nach der Kultivierung der Knochenspäne (BC *versus* BS) keine Kollagenfärbung der ausgewachsenen Zellen ermittelt werden. Der Zelltyp war nicht eindeutig bestimmbar (Abbildung 19). Es könnte sich um Gewbezellen, wie z.B. Fibroblasten, Osteoblasten oder um mesenchymale Stammzellen handeln.

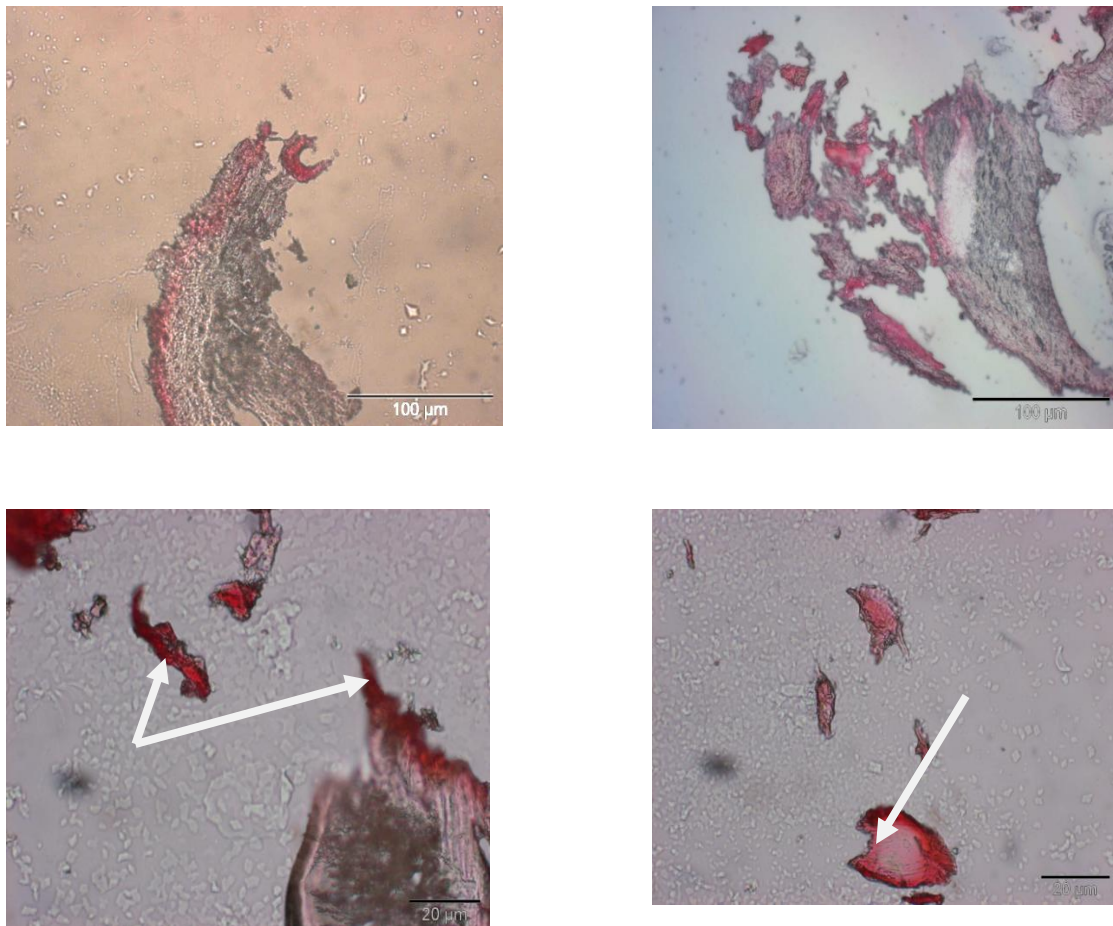


Abbildung 18: histologische Analyse der Kollagen-Verteilung (1)

Die PSR nach Puchtler zeigt positive Kollagen Färbung bei beiden Varianten der Knochenentnahme (BC linke Spalte und BS rechte Spalte). Die weißen Pfeile zeigen auf Kollagen Typ I.

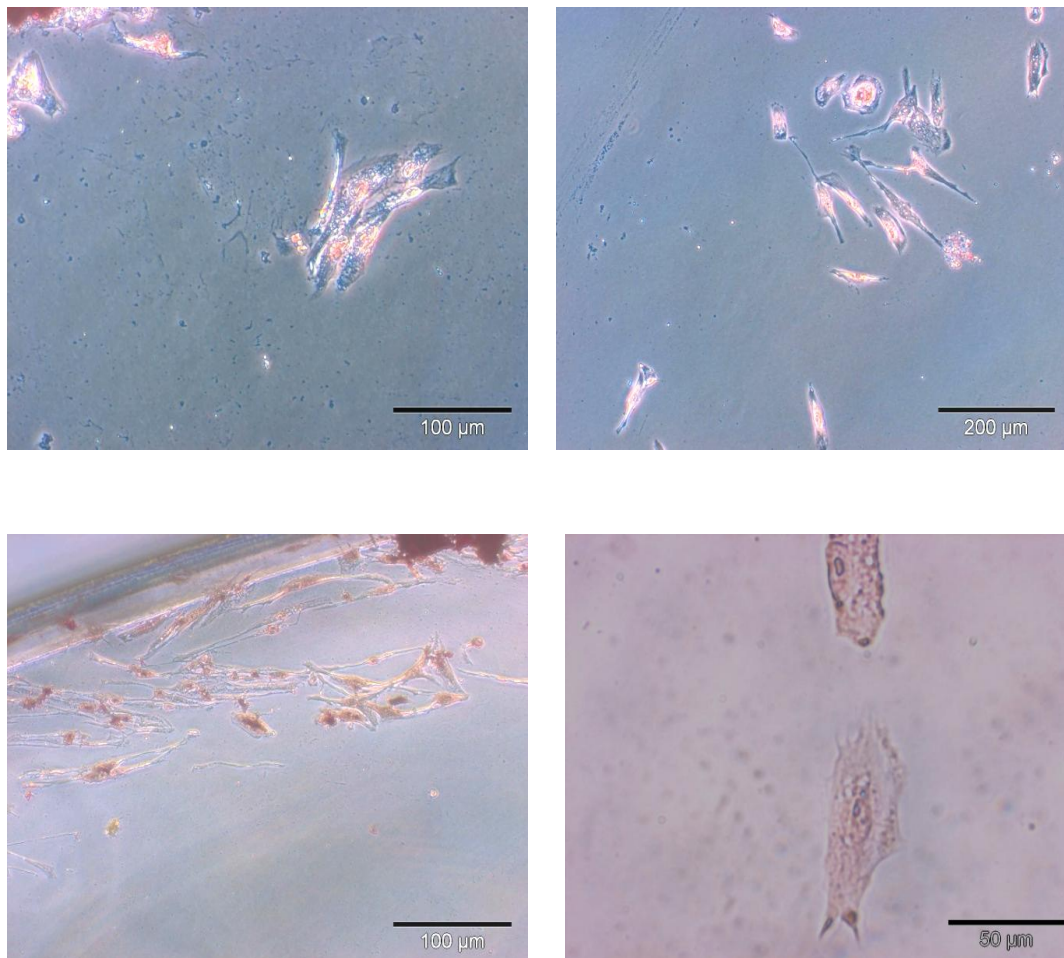


Abbildung 19: histologische Analyse der Kollagen-Verteilung (2)
 Die PSR nach Puchtler zeigt keine eindeutige Kollagenfärbung nach Entnahme durch Bone Collector oder durch Trockenbohrung; daher konnte der Zelltyp nicht ermittelt werden; die Späne weisen optisch keinen Unterschied auf (BC linke Spalte und BS rechte Spalte)

5.6 Ergebnisse der TRAP Färbung

Da Osteoklasten ein wichtiger Marker für Knochenresorption und Remodelling sind, wurde eine *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP-) Färbung durchgeführt. Diese Färbung ist ein indirekter Nachweis für Osteoklastenaktivität. Es wurden in keiner der 20 kultivierten Gesamtproben TRAP positive Zellen gefunden (Abbildung 5.9).

Lichtmikroskopisch zeigen BS und BC Kulturen keinen Unterschied. Es ist keine spezifische TRAP- positive Färbung belegbar. Damit liegt kein Nachweis für Osteoklastenaktivität vor.

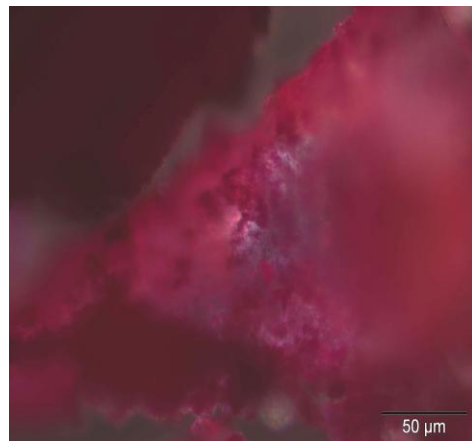
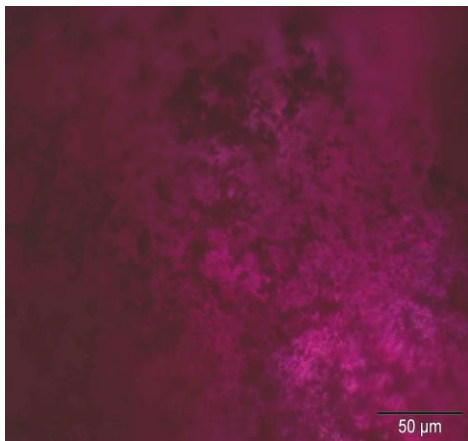
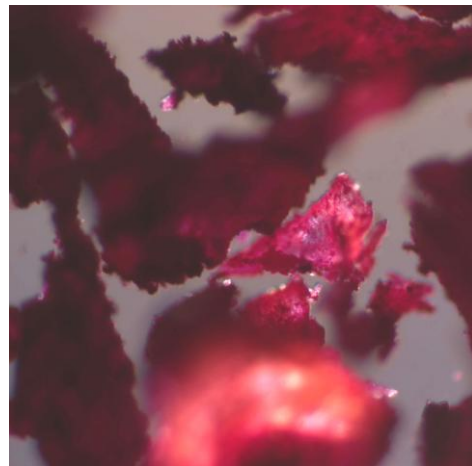
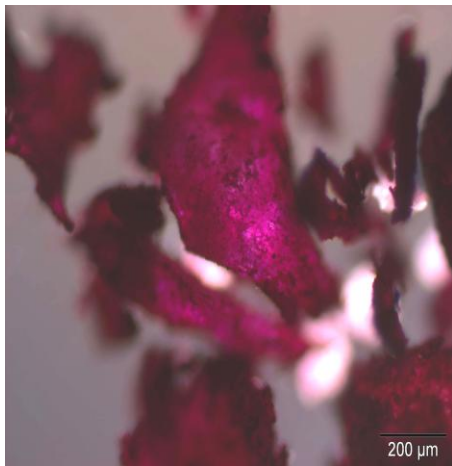


Abbildung 20: TRAP- Färbung unter dem Rasterelektronenmikroskop
Im REM ist optisch kein Unterschied der Knochenzellen erkennbar (linke Spalte BC; rechte Spalte BS). Es ist keine spezifische TRAP- Färbung nachweisbar.

6 Diskussion

Aus den erhobenen Befunden ergibt sich folgendes Gesamtbild.

Einerseits konnten wir mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass wasserkühlungsfreie Bohrspäne im Vergleich zu den mit Wasserkühlung geernteten Knochenspänen vermehrte Ablagerung von Kollagenfasern aufweisen. Das lässt die Vermutung zu, dass wasserspülungsfreie Bohrungen einen positiven Effekt auf die Knochenregeneration ausüben. Zudem ergab die Vitalitätsmessung mittels *WST- 1 Cell Proliferation Assay* (Roche, Deutschland) in Osteoblasten positiven Kulturen, dass Knochenspäne, welche durch den Bone Collector (BC) entnommen wurden, wenige vitale Zellen hervorbrachten. Das deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Graziani, die nur bei der Hälfte aller mit Filtern gesammelten Knochenspäne vitales Material beobachten konnten. Diesen Umstand führte man zum einen auf die bakterielle Kontamination und zum anderen auf die Zellzerstörung aufgrund lokaler Überhitzung des Knochens zurück (Graziani, Cei et al. 2007).

Im Vergleich dazu erscheinen Knochenspäne vitaler, die durch Einmal-Patientenbohrer (BS) entnommen wurden. Andererseits konnte bei der kollagenspezifischen Färbung nach Puchtler kein eindeutiges Ergebnis der Kollagen-Typ I-Produktion ermittelt werden. Der beobachtete Zelltyp war in beiden Fällen nicht eindeutig bestimmbar. Es könnte sich um Gewebezellen, wie z. B. Fibroblasten, Osteoblasten oder um mesenchymale Stammzellen handeln. Auch die TRAP- Färbung lieferte im Vergleich kein eindeutig aussagekräftiges Resultat. Die Schwierigkeit besteht darin, die entnommenen Knochenspäne bzw. Knochenzellen in einem geeigneten Medium so zu kultivieren, dass neue Knochenzellen auswachsen können, ohne dass unerwünschte Parameter, wie Bakterien, Pilzsporen, Viren, die Ergebnisse verfälschen (siehe Punkt 6.1). Zwar hat sich im Bereich der oralen Chirurgie die Verwendung von intraoral gewonnenem Knochenmaterial bewährt, nur stehen immer noch einige Punkte zur Diskussion. Die Kontamination der Knochenspäne mit Bakterien und Speichel, sowie die potentielle lokale Überhitzung des Knochens beim Präparieren des Implantatlagers stellen immer noch ein großes Problem dar. In der hier vorgelegten Studie konnte also nicht eindeutig gezeigt werden, welche der zwei Methoden der Knochengewinnung (BC *versus* BS) präferiert werden sollte. Beide Methoden scheinen ihre Berechtigung zu besitzen.

6.1 Effektivität einer präoperativen Chlorhexidin- Spülung zur Vorbeugung der bakteriellen Kontamination von Knochenspänen

Um zu analysieren, wie die Mundspüllösung Chlorhexidin (CHX) auf die Vitalität der entnommenen Bohrspäne wirkt, wurden jeweils vier randomisierte Proben (BC *versus* BS) vor der Kultivierung mit einer 0,12 %tigen CHX-Spülung behandelt. Die Behandlung führte laut dieser Messung zu einem fast kompletten Vitalitätsverlust der Knochenspäne. Alle vier Proben (egal ob es sich um mit oder ohne Wasserkühlung gewonnene Bohrspäne handelte), die mit Chlorhexidinlösung durchgespült wurden, zeigten gegenüber den Kontrollproben nur eine sehr gering messbare Mitochondrienaktivität. Auch die lichtmikroskopische Untersuchung der mit Chlorhexidin behandelten Späne zeigte nach Kultivierung keine lebenden Zellen.

Die präoperative Chlorhexidin- Spülung wird aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung in verschiedenen Bereichen der Zahnmedizin sehr oft eingesetzt. Bereits in den 70er Jahren konnten Schiott et al in einer Versuchsreihe mit Studenten zeigen, dass eine zweimalige Spülung mit 0,2 %iger Chlorhexidinlösung pro Tag eine deutliche Reduktion der Bakterien in der Mundflora bewirkt. Ab dem 5. Tag konnte eine 95 %ige Reduktion der Bakterienkolonie gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden. Zusätzlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Spülung mit Chlorhexidin zusätzlich die Plaqueentstehung gehemmt werde (Schiott, Loe et al. 1970). Lambert und Arbeitskollegen untersuchten die präoperative Wirkung von 0,12% Chlorhexidinlösung vor Implantatinserktion und beobachteten, dass die Komplikationsrate bei der Einheilung des Knochens nach Implantatinserktion stark gesenkt werden konnte (Lambert, Morris et al. 1997). Kuttenger et al konnten im Jahre 2005 bei der Implantation von mit einem Kollektor gewonnen Knochenmaterial nachweisen, dass dieses in 34 von 39 Proben bakteriell kontaminiert war. Nach einmaliger Spülung des Knochenkollektors mit einer 1 %igen Chlorhexidinlösung konnte eine signifikante Reduktion der bakteriellen Kontamination gezeigt werden (Kuttenger, Hardt et al. 2005). Young et al konnten 2001 und 2002 mit einem strikten Absaugprotokoll, bei dem mit zwei Saugvorrichtungen jeweils Knochenspäne separat vom Speichel geerntet werden zeigen, dass die bakterielle Kontamination stark gesenkt, aber niemals ausgeschlossen werden kann (Young, Korachi et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse legten Glaser et al im Jahre 2004 vor (Glaser, Hodel et al. 2004). In allen 50 Proben konnten sie trotz striktem Absaugprotokoll nach aerober und anaerober Inkubation Bakterienkolonien nachweisen. Auch Kürkcü und

seine Arbeitsgruppe konnten in ihrer Studie mit 25 Probanden zeigen, dass eine präoperative Spülung mit 0,2 %iger Chlorhexidinlösung die Bakterienzahl der Mundflora reduziert, aber sie berichteten im Gegensatz zu Young et al., dass trotz strikten Absaugprotokoll keine Effektivität der Spülung gegenüber Anaerobiern und gegenüber dem fakultativ anaeroben *Streptococcus salivarius* beobachtet wurde (Kurkcu, Oz et al. 2005). Tezulas et al. behaupteten sogar im Jahre 2008, dass zwar ein striktes Absaugprotokoll, eine präoperative Chlorhexidin-Spülung und eine Antibiotikaprophylaxe zur Bakterienreduzierung eingesetzt werden können, aber dennoch keine der Methoden in der Lage ist, eine Dekontamination der gesammelten Knochenspäne zu erreichen oder das Risiko einer Infektion auszuschließen (Tezulas and Dilek 2008). Bis heute liegen keine gesicherten Quellen vor, welche Auswirkungen eine Chlorhexidinlösung auf den Knochen direkt hat. Es wurde nicht gezielt untersucht, welchen Einfluss die CHX-Spülung auf die Vitalität der Knochenspäne besitzt. Lee et al. präsentierten 2010 ihre Ergebnisse, die sie bei der Untersuchung von Osteoblasten festgestellt hatten. Ihre Versuchsreihe beschäftigte sich mit dem zytotoxischen Effekt, den CHX auf Osteoblasten ausübt. Dabei stellten sie fest, dass CHX das Zellwachstum, die Proliferation und die Kollagensynthese inhibiert. Außerdem soll CHX ein signifikantes Potenzial für periapikale Toxizität aufweisen (Lee, Hu et al. 2010).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Chlorhexidin bereits im Jahre 1970 von Loe und Schiött für seine unspezifische antimikrobielle Wirksamkeit, vor allem für den plaquehemmenden Effekt bekannt wurde (Loe and Schiott 1970; Schiott, Loe et al. 1970). Es zeigt eine bakteriostatische und bakterizide Wirkung gegen grampositive Bakterien (Jhamb, Nikhil et al.; Young, Korachi et al. 2002) und bakterizide Wirkung gegen einige gramnegative Spezies in höheren Konzentration ab 0,2 % (Hellwig, Klimek et al. 2003). Zum Wirkspektrum gehören auch einige Viren (Park and Park 1989; Bernstein, Schiff et al. 1990; Baqui, Kelley et al. 2001), sowie auch Pilze wie *Candida albicans* (Olsen 1975; Tobgi, Samaranayake et al. 1987). In einigen wenigen In-vitro Studien konnten aber auch zytotoxische Eigenschaften des Chlorhexidins gegenüber Osteoblasten, Endothel-Zellen sowie Fibroblasten gezeigt werden (Pucher and Daniel 1992; Giannelli, Chellini et al. 2008; Lee, Hu et al. 2010). Dieses aber wurde in vivo bisher nicht belegt.

Unsere Ergebnisse lassen die Hypothese vermuten, dass Chlorhexidin zwar die bakterielle Kontamination senkt, aber Knochenspäne nach Chlorhexidin-Kontakt avital werden können (siehe Ergebnisse).

6.2 Überhitzung des Knochens

Ein weiteres Problem stellt die lokale Hitzeentwicklung beim Aufbereiten des Implantatlagers dar. Zum einen ist eine möglichst schonende Aufbereitung des Implantatbettes erforderlich, um eine Osseointegration des späteren Implantats zu gewährleisten, zum anderen sollten die Bohrspäne schonend gesammelt werden. Es gibt viele Studien, die die Überhitzung des Knochens genauer untersucht haben. So konnten Lundskog et al im Jahre 1972 schon feststellen, dass eine Hitzenekrose von der Temperatur und der Einwirkzeit abhängig ist. Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Temperaturerhöhung des Knochens auf über 60 °C für eine kurze Zeit schon zu bleibenden Schäden führt (Lundskog 1972). Resultate weiterer Studien von Matthews et al und Bonfield et al im Jahre 1972 belegen, dass ab einer Temperatur von über 56 Grad Celsius zur Schädigung des Knochen kommt, da bei dieser Temperatur die alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I denaturiert (Bonfield 1968; Matthews 1972). Nach den Studien von Eriksson und Arbeitskollegen in den Jahren 1982-1984, der sogenannten *bone growth chamber* konnte wiederum gezeigt werden, dass ab einer physiologischen Temperaturgrenze von 47 Grad Celsius über die Dauer von 1 Minute eine Verschlechterung der Knochenregeneration auftreten kann. In den Versuchen wurde mittels einer vitalmikroskopischen Technik Kaninchen ein Titanimplantat in die proximale Tibiametaphyse eingepflanzt, das über fixierte Glasstäbchen die Beobachtung eines, in einen Hohlraum eingewachsenen Knochenareals in vivo erlaubte. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten, dass bei einer Erhitzung des Knochens auf 47 °C für 1 Minute eine Knochenresorption von 10 % und für 5 Minuten sogar von 30 % auftrat. (Eriksson, Albrektsson et al. 1982; Eriksson and Albrektsson 1983; Eriksson and Albrektsson 1984). Diese Versuche bezogen sich immer auf Bohrungen mit entsprechender Wasserkühlung. Die Hypothese, dass der Knochen bei ungekühlten niedertourigen Bohrungen nicht geschädigt wird und der Vorteil besteht, dass die resultierenden Knochenspäne so gering wie möglich mit Speichel und Bakterien kontaminiert werden, wurde bis dato noch unzureichend untersucht. Die Qualität der Knochenspäne ist abhängig von der Bohrmethode, der Geschwindigkeit, dem Kraftaufwand beim Auf-

bereiten des Implantataltagers und von der Art bzw. dem Vorhandensein des Kühlsystems. Das war die Schlussfolgerung von Jeong et al. nach Bohrversuchen am Rinderknochen. Es wurden 2 Gruppen A und B gebildet. Dabei wurden in der Gruppe A Bohrungen mit 1500 rpm und in Gruppe B Bohrungen mit 800 rpm durchgeführt. Als Ergebnis wurde festgehalten, dass es zum einen keinen Unterschied in der Form bzw. Größe der gesammelten Knochenspäne gegeben hat, zum anderen wiesen die Proben keinen Unterschied in der Qualität in Bezug auf Vitalität, bzw. Nekrose auf (Jeong, Kim et al. 2009). Kim et al 2010 führten *in vitro* niedrigtourige Bohrungen an Schweinerippen mit 50 rpm ohne Wasserkühlung durch mit dem Ergebnis, dass keine lokale Überhitzung des Knochens festgestellt werden konnte und damit keine Nekrosen bzw. Denaturierungen ersichtlich wurden (Kim, Yoo et al.). Auch Wahlmann und Detsch konnten im Jahre 2008 in unveröffentlichten Vorversuchen an der Schweinehüfte zeigen, dass niedrigtourige Bohrungen ohne Wasserkühlung, vitale Bohrspäne hervorbringen (Wahlmann and Detsch 2008). Reichert und Wahlmann präsentierten im Sommer 2008 beim „Implantologischen Nachmittag“ des Zahnärztlichen Bezirksverbandes Oberpfalz am Universitätsklinikum Regensburg in einem gemeinsamen Vortrag erste Studienergebnisse über den Nachweis von Osteoblasten aus Knochenspänen unterschiedlicher Gewinnungsmethoden (Reichert, Wahlmann et al. 2008).

Unsere vorgelegte Studie ist die erste *in vivo* Studie, die mit niedrigtouriger Bohrung gesammelten Knochenspäne auf Vitalität untersucht. Deshalb ist ein Vergleich mit anderen Studien in dieser Hinsicht nicht möglich. Wir konnten zwar zeigen, dass kühlungsfreie Bohrungen vermehrte Ablagerung von kollagenfaserigen Strukturen aufweist und deutlich höhere Anteile an vitalen Zellen im Vergleich zu mit Bone Collectoren gewonnen Knochenspäne besitzen. Die Problematik, dass eine große Anzahl von Proben aus beiden Gruppen kein Zellwachstum und somit kein Anzeichen der Vitalität nach 28-tägiger Kultivierung aufwiesen, lässt aber keine eindeutige Aussage formulieren. Diese Tatsache könnte man, wie bereits erwähnt, zum einen auf die bakterielle oder Pilz-Kontamination, zum anderen auf die lokale Überhitzung des Knochenbettes zurückführen. Es könnte aber auch, und das ist wahrscheinlicher, bedeuten, dass es nicht gelungen ist, die Knochenzellen anzuzüchten bzw. vorhandene Vitalität in allen Proben nachzuweisen. Die einzige Hypothese, die diese Arbeit erlaubt ist, dass durch niedrigtourige Trockenbohrung entnommene Knochenspäne ähnlich gut verwendbar sind, wie die

durch den Bone Collector gefilterten bei konventionellem Bohrprotokoll. Beide Entnahmetechniken sind somit für die Knochengewinnung geeignet.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie ist die vergleichende Untersuchung zur Gewinnung vom partikulierten Knochen im Rahmen von enossalen Implantationen. Dabei soll die Wertigkeit (Vitalität, Kollagen I Synthese, ALP- Aktivität) des bei beiden durchgeführten Methoden anfallenden Bohrspäne verglichen werden. Die bei der Implantatbettaufbereitung anfallenden Bohrspäne werden gewonnen und evaluiert. Einerseits geschieht dies hochtourig mit den Originalfräsern unter Kühlung durch isotonische Lösung und mit Hilfe des Knochenkollektors (BONE TRAP[®], Fa. ASTRA). Zum anderen wird das Material durch direkte Knochenspansammlung mit einem Einmalbohrer während niedertouriger Fräsung bei 300 rpm ohne Wasserkühlung gewonnen. Zu diesem Zweck wird das aufgefangene Knochenmehl gewogen, in eine Nährlösung verbracht, beurteilt und in einer Zellkultur behandelt. Die Vitalität des aufgefangenen Knochens, die für die klinische Anwendung bedeutsam erscheint, wird anhand verschiedener Parameter nach vier Wochen Anzüchtung in der Zellkultur bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bohrspäne bezüglich Vitalität und Differenzierung bei beiden Gewinnungsmethoden gleichwertig zu betrachten sind. Bei der Kultivierung der Knochenspäne wurde auch die Problematik ersichtlich, dass trotz prophylaktisch getroffener Maßnahmen (z.B. Antibiotikazusatz im Nährmedium) unerwünschte Faktoren (Bakterien, Pilzsporen Blutzellen), die Ergebnisse beeinflussen können. Gegenstand einer weiteren Untersuchung ist es, die Wirkung von Chlorhexidin hinsichtlich der Vitalität der Knochenspäne zu erfassen. Die Evaluation der Bohrspäne nach Chlorhexidinbehandlung lässt uns die Vermutung aufstellen, dass zwar durch CHX die Kontamination der Knochenzellen mit Bakterien reduziert wird, aber die Knochenzellen dadurch avital werden können.

Anhang

8 Randomisierungsliste

Randomliste 1

Nr.	Therapie für das Implantat auf der linken Seite	Datum der Randomisation	Unterschrift
1	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
2	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
3	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
4	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung	__ __ 20 __	
5	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
6	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
7	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung	__ __ 20 __	
8	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung	__ __ 20 __	
9	Implantatbohrer mit Wasserkühlung	__ __ 20 __	
10	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung	__ __ 20 __	

Randomliste 2

Nr.	Therapie für das Implantat auf der linken Seite	Datum der Randomisation	Unterschrift
1	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung mit Chlorhexidin	__ __ 20 __	
2	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung mit Chlorhexidin	__ __ 20 __	
3	Einmalbohrer ohne Wasserkühlung mit Chlorhexidin	__ __ 20 __	
4	Implantatbohrer mit Wasserkühlung mit Chlorhexidin	__ __ 20 __	

9 Einverständniserklärung

Universitätsklinikum Regensburg
Klinik und Poliklinik für MKG-Chirurgie
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93053 Regensburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, _____, geb. am _____ mich dazu bereit,
dass die beim Fräsen des Implantatlagers anfallenden Bohrspäne für wissenschaftli-
che Zwecke gesammelt und verarbeitet werden können.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass diese Untersuchungen nur bei Patienten
durchgeführt werden, bei denen das anfallende Knochenmaterial nicht für augmenta-
tive Zwecke (Knochenaufbau) benötigt wird und es eigentlich über die Sauganlage
mit dem abgesaugten Speichel und Blut aufgesammelt und medizinisch entsorgt
wird.

(Datum und Unterschrift des Patienten)

10 Literaturverzeichnis

1. Anh, D. J., H. P. Dimai, et al. (1998). "Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors." Calcif Tissue Int **62**(4): 332-40.
2. Baqui, A. A., J. I. Kelley, et al. (2001). "In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type 1." J Clin Periodontol **28**(7): 610-6.
3. Bauer, T. W. and G. F. Muschler (2000). "Bone graft materials. An overview of the basic science." Clin Orthop Relat Res(371): 10-27.
4. Bernstein, D., G. Schiff, et al. (1990). "In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse." J Dent Res **69**(3): 874-6.
5. Blay, A., S. Tunchel, et al. (2003). "Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study." Pesqui Odontol Bras **17**(3): 234-40.
6. Bonfield, W., Li, C.H. (1968). "the temperature dependences of the deformation of bone." J Biochem **1** (4): 323-329.
7. Buser, D., K. Dula, et al. (1996). "Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients." J Oral Maxillofac Surg **54**(4): 420-32; discussion 432-3.
8. Chiapasco, M., S. Abati, et al. (1999). "Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges." Clin Oral Implants Res **10**(4): 278-88.
9. Chiriac G, H. M., Rothamel D, Becker J (2004). "Einsatz eines Knochenfilters zur Gewinnung autologer Knochentransplantate " Oralchirurgie Journal **2**: 31-35.
10. Clavero, J. and S. Lundgren (2003). "Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications." Clin Implant Dent Relat Res **5**(3): 154-60.

11. Curasan. (2010). "safescraper und Micros." from [http://www.curasan.de/webEdition/we_cmd.php?we_cmd\[0\]=show&we_cmd\[1\]=1065&we_cmd\[4\]=205](http://www.curasan.de/webEdition/we_cmd.php?we_cmd[0]=show&we_cmd[1]=1065&we_cmd[4]=205).
12. Dowd, T. L., J. F. Rosen, et al. (1994). "The displacement of calcium from osteocalcin at submicromolar concentrations of free lead." Biochim Biophys Acta **1226**(2): 131-7.
13. Eitenmüller, J., Eisen, W., Reichmann, W. (1978). Temperaturbedingte Veränderungen und Reaktionen des Knochens beim Anlegen von Bohrlöchern zur Durchführung von Osteosynthesen, Leitz.Mitt.Wiss.Techn. 7 4:104-110, 1978.
14. Emilson, C. G., T. Ericson, et al. (1972). "Effect of chlorhexidine on human oral streptococci." J Periodontal Res **7**(2): 189-91.
15. Eriksson, A., T. Albrektsson, et al. (1982). "Thermal injury to bone. A vital-microscopic description of heat effects." Int J Oral Surg **11**(2): 115-21.
16. Eriksson, A. R. and T. Albrektsson (1983). "Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit." J Prosthet Dent **50**(1): 101-7.
17. Eriksson, R. A. and T. Albrektsson (1984). "The effect of heat on bone regeneration: an experimental study in the rabbit using the bone growth chamber." J Oral Maxillofac Surg **42**(11): 705-11.
18. Erpenstein, H., P. Diedrich, et al. (2001). "Preparation of autogenous bone grafts in two different bone mills." Int J Periodontics Restorative Dent **21**(6): 609-15.
19. Faveri, M., L. C. Gursky, et al. (2006). "Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial." J Clin Periodontol **33**(11): 819-28.
20. Ferraz, C. C., B. P. Gomes, et al. (2007). "Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants." Braz Dent J **18**(4): 294-8.
21. Friedlaender, G. E. (1987). "Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications." J Bone Joint Surg Am **69**(5): 786-90.

22. Gallop, P. M., J. B. Lian, et al. (1980). "Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K." N Engl J Med **302**(26): 1460-6.
23. Garcia, O. G., F. L. Mombiela, et al. (2004). "The influence of the size and condition of the reamers on bone temperature during intramedullary reaming." J Bone Joint Surg Am **86-A**(5): 994-9.
24. Garnero, P. and P. D. Delmas (1997). "Bone markers." Baillieres Clin Rheumatol **11**(3): 517-37.
25. Giannelli, M., F. Chellini, et al. (2008). "Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation." Toxicol In Vitro **22**(2): 308-17.
26. Glaser, B., Y. Hodel, et al. (2004). "[Bacterial contamination of bony particles from the bone collection trap]." Schweiz Monatsschr Zahnmed **114**(4): 337-41.
27. Goldberg, V. M. and S. Stevenson (1987). "Natural history of autografts and allografts." Clin Orthop Relat Res(225): 7-16.
28. google (2012). implant and augmentation.
29. Graziani, F., S. Cei, et al. (2007). "A systematic review of the effectiveness of bone collectors." Int J Oral Maxillofac Implants **22**(5): 729-35.
30. Gross, T. P., R. H. Jinnah, et al. (1991). "The biology of bone grafting." Orthopedics **14**(5): 563-8.
31. Gundberg, C. M. (2000). "Biochemical markers of bone formation." Clin Lab Med **20**(3): 489-501.
32. Hauschka, P. V., J. B. Lian, et al. (1989). "Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone." Physiol Rev **69**(3): 990-1047.
33. Hauschka, P. V. and F. H. Wians, Jr. (1989). "Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone." Anat Rec **224**(2): 180-8.
34. Hellwig, E., J. Klimek, et al. (2003). Therapie der entzündlichen Parodontopathien. Einführung in die Zahnerhaltung. München, Jena, Urban und Fischer: 407 und 457-458.
35. Hoegel, F., C. A. Mueller, et al. (2004). "Bone debris: dead matter or vital osteoblasts." J Trauma **56**(2): 363-7.

36. Hürzeler, M. B. (1996). "Erleichterung der autologen Knochenaugmentation nach Implantation mittels eines neuen Filtersystems." Quintessenz **47**(2): 275-280.
37. Implantology, D. (2004). "auf dem Markt befindliche Knochenfilter." Dent Implantol **8**: 534-541.
38. Jeong, C., D. Kim, et al. (2009). "the effect of implant drilling speed on the composition of particle collected during site Preparation." J Korean Acad Periodontal **2009** **39**: 253-259.
39. Jhamb, S., V. Nikhil, et al. "An in vitro study of antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis." Indian J Dent Res **21**(4): 512-4.
40. Johnson, A. L. and L. E. Stein (1988). "Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog." Am J Vet Res **49**(1): 101-5.
41. Kainulainen, V. T., T. J. Kainulainen, et al. (2006). "Performance of six bone collectors designed for dental implant surgery." Clin Oral Implants Res **17**(3): 282-7.
42. Khoury (2009). Augmentative Verfahren in der Implantologie, Quintessenz Verlag.
43. Kienapfel, H., D. S., J. Galante (1992). "Vergleich zwischen dem Effekt von autogener und allogener Knochenspongiosa auf das Knocheneinwachsverhalten poröser Oberflächenimplantate." Orthop Praxis **10**: 708-713.
44. Kim, S. J., J. Yoo, et al. "Temperature change in pig rib bone during implant site preparation by low-speed drilling." J Appl Oral Sci **18**(5): 522-7.
45. Kurkcu, M., I. A. Oz, et al. (2005). "Microbial analysis of the autogenous bone collected by bone filter during oral surgery: a clinical study." J Oral Maxillofac Surg **63**(11): 1593-8.
46. Kuttenger, J. J., N. Hardt, et al. (2005). "[Bone collected with a bone collector during dental implant surgery]." Mund Kiefer Gesichtschir **9**(1): 18-23.

47. Lambert, P. M., H. F. Morris, et al. (1997). "The influence of 0.12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success." J Oral Maxillofac Surg **55**(12 Suppl 5): 25-30.
48. Lee, T.-H., C.-C. Hu, et al. (2010). "cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels." International Endodontic Journal **43**: 430-435.
49. Lindorf (2001). "Die gebündelte Sacklochbohrung Teil 1: Ein Verfahren zur Knochengewinnung mittels Knochenspannkollektor aus dem Kieferbereich." ZMK **17**.
50. Lindorf (2002). "Die gebündelte Sacklochbohrung Teil 2: Knochengewinnung mittels Knochengewinnung mittels Knochenspannkollektor im Kieferbereich." ZMK **18**.
51. Lippert, H. (2006). Allgemeine Anatomie. Lehrbuch Anatomie. München, Elsevier GmbH. **7. Auflage**: 32-39.
52. Loe, H. and C. R. Schiott (1970). "The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man." J Periodontal Res **5**(2): 79-83.
53. Ludwig, T. "Kapitel 4: Rasterelektronenmikroskop." from <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~hb6/labor/rem/REM-kurzes-Skriptum.pdf>.
54. Lüllmann-Rauch, R. (2003). Knochen (Knochenumbau und Knochenentwicklung). Histologie Kiel, Thieme: 131-140.
55. Lüllmann-Rauch, R. (2003). Knochen (Zellen des Knochens). Histologie Kiel, Thieme: 122-129.
56. Lundskog, J. (1972). "Heat and bone tissue. An experimental investigation of the thermal properties of bone and threshold levels for thermal injury." Scand J Plast Reconstr Surg **9**: 1-80.
57. Matthews, L. H. (1972). "Temperatures measured in human cortical bone when drilling." J Joint Bone Surg. **54**: 297-308.

58. Neukam, F. W., R. Schmelzeisen, et al. (1990). "[Plastic-reconstructive measures with free microvascular bone transplants in combination with implants]." Fortschr Kiefer Gesichtschir **35**: 79-82.
59. Nkenke, E., M. Radespiel-Troger, et al. (2002). "Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study." Clin Oral Implants Res **13**(5): 514-21.
60. Nkenke, E., S. Schultze-Mosgau, et al. (2001). "Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study." Clin Oral Implants Res **12**(5): 495-502.
61. Noonan, K. J., C. E. Farnum, et al. (2004). "Growing pains: are they due to increased growth during recumbency as documented in a lamb model?" J Pediatr Orthop **24**(6): 726-31.
62. Olsen, I. (1975). "Denture stomatitis. Effects of chlorhexidine and amphotericin B on the mycotic flora." Acta Odontol Scand **33**(1): 41-6.
63. Park, J. B. and N. H. Park (1989). "Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **67**(2): 149-53.
64. Porras, A. G., S. D. Holland, et al. (1999). "Pharmacokinetics of alendronate." Clin Pharmacokinet **36**(5): 315-28.
65. Proff, P. and P. Romer (2009). "The molecular mechanism behind bone remodeling: a review." Clin Oral Investig **13**(4): 355-62.
66. ProWital. (2010). from <http://www.prowital.de/produkte/chirurgie/chirurgische-bohrer/>.
67. Pucher, J. J. and J. C. Daniel (1992). "The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro." J Periodontol **63**(6): 526-32.
68. Reichert, T. E., U. Wahlmann, et al. (2008). Augmentation in der Implantologie-Knochenblock versus "Gebrösel". Implantologischer Nachmittag. Universitätsklinikum Regensburg.
69. Sanz, M., M. G. Newman, et al. (1989). "Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse." J Periodontol **60**(10): 570-6.

70. Savant, T. D., K. S. Smith, et al. (2001). "Bone volume collected from dental implant sites during osteotomy." J Oral Maxillofac Surg **59**(8): 905-7.
71. Schiott, C. R., H. Loe, et al. (1970). "The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora." J Periodontal Res **5**(2): 84-9.
72. Schmalz, G., Z. Ergucu, et al. (2004). "Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents." J Endod **30**(5): 352-8.
73. Springer, I. N., H. Terheyden, et al. (2004). "Particulated bone grafts--effectiveness of bone cell supply." Clin Oral Implants Res **15**(2): 205-12.
74. Tezulas, E. and O. Dilek (2008). "decontamination of autogenous bone grafts collected from dental implant sites via osteotomy: a review." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **2008** **106**: 679-684.
75. Tinti, C., S. Parma-Benfenati, et al. (1996). "Vertical ridge augmentation: what is the limit?" Int J Periodontics Restorative Dent **16**(3): 220-9.
76. Tobgi, R. S., L. P. Samaranayake, et al. (1987). "Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate." J Med Vet Mycol **25**(5): 335-8.
77. Truppe. (2012). "Implantat 3D - Navigationschirurgie mit Piezosurgery." from <http://www.3d-implantat.at/page25/page29/page29.html>.
78. Virolainen, P., E. Vuorio, et al. (1993). "Gene expression at graft-host interfaces of cortical bone allografts and autografts." Clin Orthop Relat Res(297): 144-9.
79. Wahlmann, U. (2009). wasserkühlungsfreie Knochengewinnung bei Implantationen. Regensburg.
80. Wahlmann, U. and R. Detsch (2008). Nachweis von Osteoblasten aus Knochenspänen unterschiedlicher Isolationsmethoden. Regensburg, Uniklinik Regensburg.
81. Whyte, M. P. (1994). "Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization." Endocr Rev **15**(4): 439-61.
82. Young, M. P., M. Korachi, et al. (2002). "The effects of an immediately pre-surgical chlorhexidine oral rinse on the bacterial contaminants of bone debris collected during dental implant surgery." Clin Oral Implants Res **13**(1): 20-9.

83. Young, M. P., H. V. Worthington, et al. (2002). "Bone collected during dental implant surgery: a clinical and histological study." Clin Oral Implants Res **13**(3): 298-303.
84. Zins, J. E. and L. A. Whitaker (1983). "Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction." Plast Reconstr Surg **72**(6): 778-85.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Tarek
Geburtstag	13.05.1982
Geburtsort	Kamp-Lintfort
Familienstand	ledig
Eltern	Dr.med. (Syr.) M. Kweider und Hwaida Kabbani
Schul Ausbildung	
1988-1992	Besuch der Grundschule in Merkstein (Aachen)
1992-2001	Besuch des Couven-Gymnasiums in Aachen
2001	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife in NRW
Grundwehrdienst	
2001-2002	Sanitätszentrum Eschweiler (Aachen)
Ausbildung zum MTA	
2003-2005	Privatuni zu Köln (Abbruch aufgrund Zulassung fürs Zahnmedizinstudium in Regensburg)
Studium der Zahnmedizin	
April 2005	Immatrikulation an der Universität Regensburg für den Studiengang Zahnmedizin
Oktober 2007	Absolvierung des Physikums
22.06.2011	Letzte Prüfung im Staatsexamen
07.07.2011	Erteilung der Approbation durch die Regierung von Oberbayern
seit 15.08.2011	Tätigkeit als Vorbereitungsassistent an der UKR in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie unter Direktor Prof. Dr. G. Schmalz

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Dr. Wahlmann für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert danke ich für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit und für die Bereitstellung der labortechnischen Utensilien.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. G. Schmalz , der es mir ermöglichte, während meiner Tätigkeit als Vorbereitungsassistent an seinem Lehrstuhl, diese Arbeit fertigzustellen.

Herrn Dr.-Ing. Rainer Detsch und der BioCer Entwicklungs GmbH in Bayreuth danke ich für die Kultivierung der Proben, Durchführung der Färbungen, Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder und Auswertung der Proben. Ohne seine Hilfe und die seiner damaligen Mitarbeiter, wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Mein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer.nat. Richard Bauer. Er hat durch seine außerordentlich gute und fürsorgliche Betreuung, durch die Bereitstellung der Kulturmedien, sowie der lokalen Unterstützung bei der Kultivierung der letzten Proben vor Ort und bei der Erstellung der Statistik und Auswertung der Ergebnisse, maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Bräuer danke ich für Ihre klinische Unterstützung, vor allem bei der Akquirierung der Patienten.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern, des Forschungslabors der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, besonders Frau Hauer, die mich in ihren Räumen aufnahmen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die stetige und verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der klinischen Tätigkeit als Zahnarzt.

13 Eidesstaatliche Erklärung

Tarek Kweider

Janusstr. 3

D-93051 Regensburg

Tel: 0176/ 86200036

E-Mail: tarek.kweider@googlemail.com

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tarek Kweider, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Die Arbeit wurde von mir bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 30.05.2012